MARIA HELENA MATTÉ

Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da Represa de Guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Prática de
Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São
Paulo para obtenção o título de
"Mestre em Saúde Pública"

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Maria O. O. Nitrini

SÃO PAULO - 1995

À Prof^a Dr^a SANDRA MARIA OTATTI DE OLIVEIRA NITRINI,

pela forma valiosa como orientou este trabalho.

Aos meus pais,

ROBERTO e LOURDES,

razão pela qual cheguei até aqui

Ao GLAVUR,

minha fonte de energia, minha luz

À Elisa

razão do meu orgulho, motivo da minha esperança

AGRADECIMENTOS

Desejamos externar nossa gratidão a todos os que colaboraram possibilitando a realização deste trabalho:

- À FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA, pelo apoio prestado;
- Ao DEPARTAMENTO DE SAÚDE AMBIENTAL, pela coleta das amostras e pela colaboração na execução da parte técnica;
- À Dra LUCIA BALDASSI, pela valiosa colaboração na execução da parte técnica;
- Ao Prof. Dr. GLAVUR ROGERIO MATTÉ, da Faculdade de Saúde Pública da USP, pela orientação na execução da técnica de alça ligada em coelhos;
- Às Stas JULIANA VILELA SANT'ANA, MARIA ALVES DE SOUZA e JUCILEIDE MARQUES DA SILVA, pelo apoio na execução da parte prática;
- Às BIBLIOTECÁRIAS da Faculdade de Saúde Pública - USP, pela colaboração na realização do levantamento e revisão bibliográfica.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
2. ANÁLISE DA LITERATURA.....	3
2.1. Características do gênero <i>Aeromonas</i>.....	3
2.2. Patogenia.....	6
2.3. Fatores de Virulência.....	11
2.4. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp no ambiente aquático.....	19
2.5 Aspectos epidemiológicos e relacionados à Saúde Pública.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Coleta e processamento das amostras.....	28
3.2. Preparo das amostras.....	30
3.3. Contagem de <i>Aeromonas</i> spp.....	30

3.3.1. Enriquecimento da amostra para isolamento de <i>Aeromonas</i> spp..	30
3.3.2. Isolamento das colônias.....	32
3.3.3. Identificação das colônias isoladas.....	32
3.4. Pesquisa de fatores de virulência.....	34
3.4.1. Preparo das cepas para o teste de alça ligada.....	34
3.4.2. Pesquisa de hemólise.....	36
3.4.3. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp.....	37
4.1.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>.....	58
4.1.2. <i>Aeromonas caviae</i>.....	59
4.1.3. <i>Aeromonas sobria</i>.....	59
4.1.4. <i>Aeromonas jandaei</i>.....	60

4.1.5.Parâmetros físicos.....	62
4.1.6.Colimetria.....	71
4.2.Pesquisa de fatores de virulência	78
4.2.1.Teste em alça ligada de coelho.....	78
4.2.2.Pesquisa de hemólise	83
5. CONCLUSÕES.....	90
6. RECOMENDAÇÕES.....	91
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8. RESUMO.....	112
9. ABSTRACT.....	113

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características do gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* pertence a família *Vibrionaceae*. Segundo o "BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY" (1984)⁸³, este gênero é composto por bacilos Gram-negativos com comprimento de 1 a 3,5 μm , apresentando formas que variam de cocóides a bacilar, retos ou curvos, com extremidades arredondadas. Podem ser móveis, por possuírem flagelo polar, ou imóveis. Possuem metabolismo oxidativo e fermentativo, e são produtores da enzima citocromo oxidase. São capazes de produzir apenas ácido ou ácido e gás a partir de carboidratos. Crescem na ausência de cloreto de sódio. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0 e 5°C, a máxima entre 38 e 41°C e a ótima entre 22 e 28°C. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0. Algumas cepas são hemolíticas quando cultivadas em ágar sangue. São resistentes ao agente vibriostático O129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil timidina), e em sua maioria são produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinase^{52,61,62,83,93,94,95,96,97,98,102}.

Este gênero pode ser dividido em dois grupos, um que inclui as formas imóveis, composto por *A. salmonicida* e suas sub-espécies, responsáveis por doenças em peixes, e um segundo grupo, que é formado por formas móveis, que podem apresentar

patogenicidade para o homem, onde atualmente se encontram *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. veronii*, *A. trota*, e *A. allosaccharophila*^{18,20,40,41,46,47,48,64}.

Considerando-se a importância crescente de espécies do gênero *Aeromonas* como patógenos em potencial para o homem, e o pouco conhecimento sobre sua ocorrência em nosso meio, principalmente nas coleções hídricas utilizadas com fins recreacionais ou mesmo como fonte de captação de água para abastecimento público, julga-se relevante estudar sua ocorrência nestes tipos de ambientes. É importante fornecer subsídios que possam alertar os técnicos que tratam da qualidade da água para abastecimento público, ou mesmo os profissionais da área de saúde, sobre o possível risco da ocorrência de casos de doença decorrentes da ação deste agente. Com este propósito, realizou-se o presente estudo com os seguintes objetivos:

- Pesquisar a ocorrência de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em pontos da Represa de Guarapiranga utilizados para recreação e captação para abastecimento público;
- Pesquisar a presença de possíveis fatores de virulência, através de testes de alça ligada em coelho e produção de hemólise em ágar sangue em uma amostragem das cepas isoladas;
- Discutir aspectos de Saúde Pública relativos à frequência destes patógenos.

2. ANÁLISE DA LITERATURA

2.1. Taxonomia

O grupo das *Aeromonas* móveis foi inicialmente composto por 3 espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*⁸³, entretanto, considerando-se a existência de amostras com características bioquímicas atípicas, e baseando-se em estudos de biologia molecular, alguns autores propuseram a inclusão de novas espécies para cepas que não apresentavam semelhança, de grupo genético, às cepas com as quais eram semelhantes fenotipicamente.

Em 1987, HICKMAN-BRENNER e col.⁴⁰ propuseram uma nova espécie para o gênero *Aeromonas*, com base no estudo de 9 cepas provenientes de pacientes, que não eram produtoras de arginina dehidrolase, e eram produtoras de lisina e ornitina descarboxilase. Esta cepa, apesar da semelhança com o gênero *Vibrio*, era mais relacionada geneticamente ao gênero *Aeromonas* e diferiam fenotipicamente de *V. cholerae* e *V. mimicus* pela produção de gás, e resistência à ampicilina e à carbenicilina a qual foi denominada *A. veronii*.

JOSEPH e col. (1988)⁴⁷, reavaliaram a classificação de amostras de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* de diferentes origens, e observaram algumas formas atípicas em relação as espécies previamente classificadas. Com base nessas observações os autores sugerem uma mudança na dinâmica taxonômica, e comentam a importância da correta identificação das espécies deste gênero.

HICKMAN-BRENNER e col. (1988)⁴¹, a partir de uma amostra isolada de material clínico, descreveram uma nova espécie de *Aeromonas*, que frente ao teste de acidificação do manitol apresentava-se negativo, a qual foi denominada *A. schubertii*.

CARNAHAN e col. (1991)¹⁸, propuseram uma nova espécie para uma cepa de *Aeromonas* que se assemelhava a *A. sobria* mas que não era fermentadora da sacarose e que havia sido isolada de uma amostra de material clínico. Esta cepa recebeu a denominação de *A. jandaei*.

Num segundo trabalho, CARNAHAN e col. (1991)²⁰ descreveram outra espécie de *Aeromonas* que se apresentava suscetível à ampicilina, até então utilizada para selecionar cepas do gênero *Aeromonas* em vários meios de cultura, a qual denominaram *A. trota*.

Em 1992, MARTINEZ-MURCIA e col.⁶⁴, propuseram a introdução de uma nova espécie para o gênero *Aeromonas*, *A. allosaccharophila*, para uma cepa de *Aeromonas* com características atípicas que havia sido isolada de amostra de fezes diarréicas. A análise através de sequenciamento de RNA apresentou-se diferente das demais espécies anteriormente conhecidas. Fenotipicamente tem como característica a acidificação da arabinose variável, não acidifica a salicina e não produz acetoina (Voges-Proskauer).

Considerando as variações apresentadas no gênero *Aeromonas*, vários autores propuseram diferentes esquemas taxonômicos para sua classificação. Com este intuito, JANDA & DUFFLEY (1988)⁴⁶, propuseram a diferenciação do gênero em 5 espécies

A. hydrophila, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. media*, enquanto JOSEPH e col.(1991)⁴⁸ consideraram 4 espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* agrupando *A. sobria* e *A. veronii* como biogrupos da espécie, e acrescentando a espécie *A. jandaei*.

ALABI & ODUGBEMI (1990)², sugeriram a aplicação de um esquema para triagem de *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* em material clínico, e propuseram que o mesmo fosse utilizado em pequenos laboratórios onde existisse a possibilidade de confirmação da presença de um patógeno em potencial.

Na 5ª Edição do "MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY" (1991)¹⁰³, von GRAEVENITZ & ALTWEGG, atualizando a taxonomia do gênero *Aeromonas*, consideram, entre as espécies que ocorrem em material clínico, como pertencentes a este gênero: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. schubertii*.

Em 1991, CARNAHAN e col.¹⁹, propuseram uma chave para identificação de espécies de *Aeromonas* provenientes de material clínico, baseada em provas bioquímicas, onde foram consideradas as espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* biovariedade *sobria*, *A. veronii* biovariedade *veronii*, *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. jandaei* e *A. trota*.

2.2. Patogenia

O gênero *Aeromonas* tem sido responsabilizado como agente causal de doenças em diversas espécies animais como peixes, répteis, anfíbios e também por uma variedade de doenças no homem^{11,12,21,28,41,55,99}.

As formas móveis do gênero *Aeromonas* estão relacionadas com diversos tipos de doenças no homem sendo a principal delas a diarreia autolimitante e, ainda, formas severas similares à diarreia colérica. Em menor proporção aparece relacionada a infecções de pele, ouvido, casos de necrose e septicemia, envolvendo pacientes portadores de fatores predisponentes como cortes, perfurações, abrasões, cirurgias e distúrbios imunológicos em indivíduos que tiveram prévia exposição a ambientes contaminados, principalmente água, e alimentos^{42,85,86,88,89,104}. O **Quadro 1** apresenta o resumo de alguns casos clínicos em que *Aeromonas* spp foi isolada como agente causal da doença.

Muitos experimentos tiveram como base a comparação entre a presença de *Aeromonas* spp em pacientes com diarreia e pacientes de grupo controle^{3,28,32,36,52,58}. Com o incremento da sensibilidade dos métodos de diagnóstico o número de casos clínicos atribuídos à esta espécie tem aumentado.

Quadro 1. Resumo da ocorrência de casos clínicos em que *Aeromonas* spp foram isolados como agentes causais da infecção, observados segundo autor, ano e parâmetros médicos-laboratoriais, de 1977 a 1994.

Autor	Ano	Caso	Idade	Sexo	Origem da Infecção	Fatores Predisponentes	Material de Isolamento	Agente Isolado	Evolução
HANSON e col. ³⁹	1977	Infecção de pele	22	M	Água contaminada	Lesão na cabeça	Pele	<i>A. hydrophila</i>	Cura
SLEVIN e col. ⁹⁹	1988	Septicemia, abscesso	62	M	NC*	Imunodepressão	Sangue	<i>A. hydrophila</i>	Cura
BADDOUR & BAESELSKI ¹¹	1988	Pneumonia	24	M	Aspiração de água	NC	Sangue	<i>A. hydrophila</i>	Morte
THISYAKORN & THISYAKORN ¹⁰¹	1988	Necrose	12	M	Picada de cobra	Lesão	Pús	<i>A. hydrophila</i>	Cura
JACOB e col. ⁴⁵	1988	Meningite	66	M	NC	Cirurgia	Liquor	<i>A. sobria</i>	Cura
ABRUTYN ¹	1988	Infecção hospitalar	03	NC	Mordida de cachorro	Lesão	NC	<i>A. hydrophila</i>	Cura
REVORD e col. ⁸⁴	1988	Infecção de pele	15	M	Mordida de piranha	Neutropenia cícica	Pús	<i>A. hydrophila</i>	Cura
BERNADESCHI e col. ¹³	1988	Septicemia	76	M	Alimento contaminado	Síndrome mieloplástica	Sangue	<i>A. hydrophila</i>	Cura
BATEMAN e col. ¹²	1988	Celulite	41	M	Imersão em água	Lesão no cotovelo	Secreção serosa	<i>A. hydrophila</i>	Cura
LINEAWEAVER e col. ⁵⁹	1988	Necrose	40	M	Imersão em água	Revascularização	Secreção serosa	<i>A. hydrophila</i>	Cura
Del VAL ²⁵	1990	Diarréia crônica	78	F	NC	NC	Fezes	<i>A. hydrophila</i>	Cura
SACHO e col. ⁸⁷	1990	Infecção de pele	49	M	Imersão em água	Ferimento no pé	Secreção serosa	<i>A. hydrophila</i>	Cura
"			35	F	Mordida de crocodilo	Lesão	Sangue	<i>A. hydrophila</i>	Cura
"			31	M	Imersão em água	Lesão	Tecido	<i>A. hydrophila</i>	Cura
JOSEPH e col. ⁴⁸	1991	Infecção de pele	10	M	Imersão em água	NC	tecido	<i>A. jandaei</i>	Cura
DAVIS & STIRLING ²³	1993	Infecção de pele	39	M	Imersão em água	Lesão no joelho	Pús	<i>A. hydrophila</i>	Cura
NEWTON & KENNEDY ⁷⁴	1993	Infecção de pele	21	M	Imersão em água	Lesão no braço	Pús	<i>A. sobria</i>	Cura
POIRIER e col. ⁸²	1993	Pneumonia	24	M	Lavagem gástrica	Uso de drogas	Lavado bronquico	<i>A. hydrophila</i>	Cura
CAILLEAUX e col. ¹⁷	1993	Infecção pulmonar	57	M	Imersão em água	Inalação de água	Lavado bronquico	<i>A. hydrophila</i>	Cura
"		Septicemia	17 sem.	NC	Alimento contaminado	Neuroblastoma	Sangue	<i>A. hydrophila</i>	Cura
"		Septicemia	17	M	Ferimento em caverna	Lesão de pele	Sangue	<i>A. hydrophila</i>	Cura
GONZALEZ e col. ³⁴	1994	Peritonite	40	M	NC	Cirroze	Líquido ascítico	<i>A. sobria</i>	Cura

NC- Não consta da referência.

sem. - semanas. M - masculino F - feminino

FIGUEROA e col. (1988)²⁸, no Chile, através de um estudo de coorte avaliaram a enteropatogenicidade de cepas de *Aeromonas* isoladas de crianças, estudando, durante o verão, fezes de 187 crianças de 3 a 18 meses de idade, por 16 semanas. *Aeromonas* spp foi isolada em 7,1% dos casos de diarreia e em 5,2% dos casos assintomáticos.

GRACEY (1988)³⁶, na Austrália, estudou durante um ano, 975 casos de crianças com diarreia. Pesquisou várias bactérias enteropatogênicas, vírus e parasitas e encontrou nas amostras de fezes *Aeromonas* spp em 10,8% no grupo sintomático e em 0,7% do grupo controle sugerindo *Aeromonas* spp como um patógeno importante para o homem. No mesmo ano NISHIKAWA⁷⁵, no Japão, realizou estudo semelhante encontrando taxas de 11,1% para casos diarreicos e de 2,2% para os não diarreicos. Outro estudo, desenvolvido na Índia, revelou que a proporção de isolamento de *Aeromonas* spp foi de 1,8% no grupo sintomático contra nenhum do grupo controle²⁶.

LEBLANC (1988)⁵⁸, na França, observou a prevalência de *Aeromonas* spp em gastroenterites infantis. *Aeromonas* foi encontrada em 7 crianças, 6 das quais apresentavam diarreia sanguinolenta. Dentre as 7 pacientes 2 apresentavam outro patógeno concomitante.

No Brasil, GHENGHESH (1989)³², estudando a frequência de *Aeromonas* spp em um grupo de crianças com e sem diarreia, observou a presença de *Aeromonas* spp em 19% do grupo com diarreia e em 13% do grupo controle. Foram isoladas 7 cepas de *A. hydrophila*, 9 de *A. sobria* e 25 de *A. caviae*. O autor observa que no grupo das crianças, *Aeromonas* foi isolada como único patógeno em 11% dos casos com

diarréia e em 9% dos casos sem diarréia.

ALABI & ODUGBEMI (1990)³ na Nigéria, verificaram que a prevalência de *Aeromonas* spp em pacientes com diarréia foi de 2,26%, entretanto em pacientes sem diarréia foi de 0,4%. Esses autores também observaram que: *Aeromonas* spp pode causar casos agudos de diarréia e pode atingir qualquer grupo etário, principalmente crianças com menos de 5 anos de idade; os sintomas da doença causada por este microrganismo se apresentam da mesma forma que os causados por outros enteropatógenos, e que, a presença de *Aeromonas* spp na água pode ser responsável pela sazonalidade da diarréia causada por este agente naquele país.

ROLSTON e col. (1991)⁸⁶, observaram em pacientes com câncer e AIDS, e que faziam uso de medicamentos imunodepressores, a presença de *Aeromonas* spp causando gastroenterites, bacteremia, infecção no trato biliar, infecção peri-retal e doenças disseminadas.

GLUSKIN e col. (1992)³³, realizaram um estudo de 15 anos onde relatam o envolvimento de *Aeromonas* spp em casos de diarréia em crianças hospitalizadas. Estudaram 32.810 amostras de fezes de crianças até 13 anos de idade resultando em 146 amostras positivas para esses microrganismos, o que representou 4% de todas as bactérias patogênicas isoladas. Foi observada uma maior incidência em crianças menores de 1 ano de idade.

Em 1992, KING e col.⁵³, na Califórnia, propuseram a inclusão de casos de infecção por *Aeromonas* spp, na lista de doenças de notificação compulsória.

Observaram que em 1 ano foram registradas 280 notificações com 219 casos confirmados. O estudo revelou que 81% dos casos foram associados ao trato gastrintestinal e 9% associados à lesão de pele, com uma taxa de 10,6 casos por um milhão de pessoas. Confirmaram a patogenicidade de espécies de *Aeromonas* com base na alta proporção de pacientes apresentando sintomas gastrintestinais onde raramente foi isolado outro enteropatógeno.

MORENA e col. (1993)⁷¹, estudaram dois surtos de diarreia causados por *Aeromonas* spp. No primeiro surto que atingiu 25 crianças, *Aeromonas* spp foi o único enteropatógeno isolado nas fezes de 6 crianças (24%), sendo que destas, 5 apresentavam diarreia. Em um segundo surto, diversos enteropatógenos, incluindo *Aeromonas* spp, *Giardia lamblia* e adenovirus entérico, foram identificados nas amostras de fezes das crianças com diarreia. As espécies de *Aeromonas* estavam presentes em amostras de fezes de 5 (21%) das 24 crianças com diarreia. Estes 2 surtos envolveram a mesma creche em diferentes épocas. No primeiro surto foram isoladas *A. caviae* em 4 crianças e *A. hydrophila* em 2. No segundo surto isolaram *A. caviae* em 4 crianças e *A. sobria* em 1 criança .

ASHDOWN & KOEHLER (1993)¹⁰, na Austrália, estudaram 912 amostras de fezes diarreicas colhidas nos hospitais da região de Queensland, entre 1991 e 1992, para estudar a prevalência de doença diarreica causada por *Aeromonas* spp. Este microrganismo foi isolado de 45 pacientes (4,9%), sendo considerado, pelos autores, como um patógeno em potencial naquela região.

KELLY e col. (1993)⁵¹, em Queensland, na Austrália, estudaram o espectro de

doenças extraintestinais provocadas por espécies de *Aeromonas*. Analisaram todas as amostras clínicas, exceto fezes, durante um período de 12 meses, em vários hospitais da região. Diagnosticaram 52 pacientes com infecção por este agente, dos quais 46 adquiriram a infecção do ambiente e 6 do hospital. Entre esses casos, 27 (59%) foram devidos à lacerações superficiais em extremidades, relacionadas ao contato com água ou solo, e 17 ocorreram após perfuração ou corte enquanto o paciente nadava em água doce.

Diversos autores estudaram a suscetibilidade de espécies de *Aeromonas* frente a antibióticos. De forma geral *Aeromonas* spp se apresenta resistente às penicilinas, com exceção de *A. trota* que é sensível à ampicilina, e sensíveis à terceira geração de cefalosporinas, aos aminoglicosídeos e às quinolonas^{1,12,13,17,20,23,25,30,33,34,39,40,41,45,48,59,64,71,72,74,78,84,85,87,99,101,103}.

2.3. Fatores de Virulência

Pela variedade de formas de infecção que espécies do gênero *Aeromonas* podem apresentar, estas têm merecido constante atenção de pesquisadores, quanto a fatores que possam estar relacionados à produção de doença. Dentre estes fatores podem ser citados toxinas citolíticas, endopeptidases, proteinases, hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, quitinase e adesinas entre outros, que de forma combinada ou isolada podem produzir uma gama de efeitos patogênicos para o hospedeiro^{3,52,60,61}.

A hemorragia é um fator evidente nas infecções dos animais ectodérmicos, causadas por *Aeromonas* spp, e, relaciona o nome da doença "red leg" (doença da

perna vermelha), ao aspecto desta. No homem, esse tipo de doença recebe o nome de infecção dos tecidos moles ou celulite, que pode ser indistinguível da infecção causada por *Streptococcus pyogenes*. A produção de hemólise observada quando cepas de *Aeromonas* são inoculadas em ágar sangue é uma prova indicativa de que este microrganismo é produtor de hemolisina e, portanto podendo estar relacionada com a patogênese deste microrganismo^{9,14,42,52,60,63,96,97,98}.

A. hydrophila produz duas hemolisinas distintas, α -hemolisina e β -hemolisina, elaboradas em diferentes fases do seu crescimento em meios de cultivo artificiais.

A primeira, a α -hemolisina, apresenta peso molecular (PM) estimado em 65.000 dáltons e ponto isoelétrico (PI) de 5,2; é produzida durante a fase estacionária de crescimento tardio e é inativada a 56°C por 10 minutos. Sua produção máxima é de 1%, em temperatura de 22°C, sendo reprimida a 37°C, e é extremamente instável após purificada. É dermonecrótica quando inoculada por via intradérmica em coelhos, e letal para coelhos e camundongos por via intragástrica. A α -hemolisina é citotóxica para células HeLa e fibroblastos embrionados de pulmão humano^{52,60}.

A segunda, β -hemolisina, produzida na fase logarítmica de crescimento, que foi anteriormente descrita como toxina citolítica, aerolisina ou proteína citotóxica^{15,52,60}, apresenta um peso molecular estimado de 50.000 a 51.000 dáltons. A atividade hemolítica é abolida em uma hora à temperatura de 50°C em pH 7 ou a 37°C em pH 8,2. Esta toxina não restaura seu efeito tóxico após aquecimento a 80°C ou 100°C. Como acontece com a toxina de *V. parahaemolyticus* ou *S. aureus*, a toxina parcialmente purificada é estável à temperatura ambiente em pH que varia entre 4 e 9.

É letal para camundongos, ratos e coelhos e apresenta reação dermonecrótica quando inoculada via intradérmica em coelho induzindo constrição capilar, edema e necrose. Em teste de alça ligada de coelho, altas doses desta toxina podem causar acúmulo de fluido sanguinolento em pequenas quantidades ($< 0,2$ ml de fluido acumulado por centímetro de alça)^{15,52,61}.

A presença de enterotoxina de *A. hydrophila* foi demonstrada em 1975, na Índia, quando um grupo de pesquisadores injetou células vivas em alça ligada de coelho. Atualmente esta enterotoxina tem sido detectada em cepas isoladas de peixes, suínos, cães e até mesmo de água de rio. Induzem acúmulo de fluido em alça ligada de coelho e também em alça de rato e camundongo. À semelhança da toxina de *V. cholerae*, também apresenta teste de permeabilidade vascular positivo^{60,89,104}.

A enterotoxina de *A. hydrophila* pode ser produzida em vários tipos de meios complexos durante a fase logarítmica de crescimento bacteriano. O ponto isoelétrico varia entre 4,0 e 5,7, o PM estimado em 15.000 a 20.000 daltons e é estável entre pH 4,5 e 10. A toxina parcialmente purificada é estável à temperatura de 56°C por 10 minutos e destruída por papaína. Por sua atividade em células Y1 de adrenal e células HeLa foi considerada citotóxica e citotônica¹⁵.

Com a diferenciação de espécies de *Aeromonas* pesquisadores vêm estudando fatores de virulência produzidos por cepas obtidas de amostras ambientais e clínicas, de forma isolada ou em conjunto, procurando estabelecer a relação entre tipos de toxina e patogenicidade.

SANYAL e col. (1975)⁸⁹, estudaram a enteropatogenicidade de *Aeromonas* e *Plesiomonas* em amostras de casos de diarreia. Através de teste de alça ligada em coelho e teste de multiplicação do microrganismo em alça intestinal, verificaram que de 14 cepas de *A. hydrophila*, 12 (86%) apresentaram teste de alça ligada positivo, e que todas foram capazes de se multiplicar na alça intestinal.

Em 1977, ANNAPURNA & SANYAL⁵, na Índia, estudaram a enterotoxigenicidade de *A. hydrophila* usando cepas isoladas de casos clínicos, animais e de vários tipos de água. Usando teste de alça ligada em coelho e teste de multiplicação de bactérias em alça intestinal, observaram que 47 das 50 cepas de *A. hydrophila*, quando o inóculo continha células vivas, haviam causado acúmulo de fluido em alça intestinal de coelho e que em muitas delas o volume acumulado foi semelhante ao produzido por cepas de *V. cholerae*. Duas cepas que não causaram acúmulo de fluido em alça intestinal produziram alterações morfológicas ao nível das vilosidades intestinais, o que foi considerado como um fator tóxico. Os filtrados de cultura das 50 cepas testadas causaram acúmulo de fluido em alça intestinal de coelho, e o volume acumulado variou com a cepa.

Em 1980, SEIDLER e col.⁹⁰, estudaram a produção de fatores de virulência em 17 cepas de *Aeromonas* spp isoladas de água poluída, quanto ao acúmulo de fluido em alça ligada de coelho. Das 9 cepas de *A. sobria*, 5 induziram acúmulo com volume variando entre 0,9 e 1,1 ml/cm de alça. As cepas que foram positivas para esse teste, foram submetidas à provas de citotoxigenicidade para células Y1 com filtrado de cultura, também apresentando resultado positivo. Das cepas de *A. hydrophila*, 4 apresentaram teste positivo para produção de enterotoxina e para citotoxina, 9

apresentaram resultados negativos para todos os testes anteriores.

GEMMELL (1984)³¹ comparou a atividade natural e biológica de enterotoxinas de diversas espécies de bactérias, e observou que *Aeromonas* spp produz enterotoxinas termo-estáveis e termo-lábeis, mas salienta que cepas que causam diarreia no homem produzem somente a toxina termo-lábil, e que as cepas isoladas de peixes produzem os dois tipos de enterotoxinas. Biologicamente a enterotoxina de *Aeromonas* spp assemelha-se à de *V. cholerae* e à LT de *E. coli*, mas a diferença pode estar relacionada à natureza da toxina, que apresenta PM menor (15.000 dáltons), e que aparentemente não possui sub-unidades sendo muito sensível à digestão proteolítica, que a inativa.

PATHAK e col. (1988)⁷⁹, observaram a produção de fatores de virulência em cepas de *A. hydrophila* isoladas de peixes e de água doce. Usaram filtrado de cultura para realização do teste de alça ligada e de Dean; em 7 das cepas testadas 4 foram positivas para o primeiro e 4 para o segundo teste.

STELMA e col. (1988)¹⁰⁰, estudaram a produção de toxina por cepas de *A. veronii*. Observaram que todas as cepas que foram β -hemolíticas causaram significativo acúmulo de fluido em alça ligada de coelho e que as α -hemolíticas e não hemolíticas não produziram acúmulo de fluido quando testadas, tanto com filtrado de cultura quanto com caldo de cultura.

Em 1990 GRAY e col.³⁷, estudaram a incidência de fatores de virulência em cepas de *Aeromonas* isoladas de animais e de amostras de água de áreas agrícolas, e

observaram a existência de diferenças significativas entre as espécies de *Aeromonas* na produção de fatores de virulência; constataram que *A. caviae* não foi enterotoxigênica, invasiva ou hemolítica. Resultados opostos foram observados para *A. hydrophila*, tendo-se verificado ainda que *A. sobria* apresentou maior índice de invasão que *A. hydrophila*, mas com baixa ocorrência de hemolisina e enterotoxina.

No Brasil NEVES e col. (1990)⁷³, estudaram a produção de enterotoxina e citotoxina por cepas de *A. veronii*. Foram testadas 14 cepas, isoladas de amostras de água, para pesquisa de fatores de virulência. Obtiveram 11 (79%) positivas para teste de Dean, que consiste na inoculação intragástrica do filtrado de cultura em camundongos lactentes, e 13 (93%) produtoras de hemolisina. A pesquisa de citotoxina foi positiva para todas as cepas produtoras de hemolisina.

HUSSLEIN e col. em 1991⁴⁴, verificaram a produção de aerolisina e proteases séricas por *A. trota*, observando a presença de genes para produção de aerolisina através de provas de hibridização molecular e o concomitante isolamento de uma protease sérica (aerolisina), com peso molecular de 54.000 dáltons.

Em 1991 CARNAHAN e col.²⁰, trabalhando com *A. trota* observaram que filtrados de cultura deste microrganismo apresentavam atividade hemolítica para eritrócitos humanos, atividade citolítica em células VERO e atividade proteolítica.

MONFORT & BALEUX em 1991⁶⁹, observaram a ocorrência de hemolisina, utilizando eritrócitos de carneiro, de cavalo e de coelho, entre espécies de *Aeromonas* isoladas de diferentes ecossistemas aquáticos. Encontraram 59% dos isolados

positivos para os três tipos de eritrócitos enquanto 35,2% não apresentaram atividade hemolítica. Das cepas, 1,2% não foram hemolíticas para eritrócitos de cavalo ou eritrócitos de coelho.

Em 1991, NISHIKAWA e col.⁷⁶, estudaram o fenômeno de adesão, em células INT 407, em 102 cepas de *Aeromonas* spp isoladas de fezes e 118 de alimentos e água de rio. Observaram positividade em 17 (16,7%) cepas entre as isoladas de fezes e em 2 (1,7%) das de alimentos e água, sugerindo o fator de adesão como indicador de patogenicidade .

SINGH & SANYAL (1992)^{94,95}, em um estudo envolvendo cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* provenientes de amostras clínicas e ambientais, procuraram estabelecer a correlação entre a produção de hemólise e a enterotoxigenicidade das cepas. Observaram que a maioria das cepas de *Aeromonas* testadas produziam β -hemólise, sendo que *A. caviae* foi hemolítica nas mesmas proporções que *A. hydrophila* e *A. sobria*. A presença de enterotoxina foi detectada na maioria das cepas β -hemolíticas num primeiro teste, mas, nas cepas não hemolíticas e α -hemolíticas foi possível a detecção de acúmulo de fluido em alça intestinal, após algumas passagens da cepa em intestino de coelho. Concluíram que todas as cepas de *Aeromonas* independente da espécie ou fonte de isolamento, possuem um gene para a produção de β -hemolisina.

Na sequência desse estudo SINGH & SANYAL (1992)⁹³, procuraram estabelecer a relação existente entre as características bioquímicas e a enterotoxigenicidade de cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, isoladas de

amostras clínicas e ambientais. Observaram que a enterotoxigenicidade das *Aeromonas* estudadas não apresentavam qualquer relação com as características bioquímicas apresentadas.

KOKKA e col. (1992)⁵⁶, estudaram as propriedades patogênicas de *Aeromonas schubertii* isoladas de amostras de fezes, onde observaram que todas as cepas testadas eram produtoras de amilase e proteinase e ainda, 64% destas elaboraram β -hemolisina quando testadas em ágar contendo 5% de sangue de carneiro. A atividade citotóxica foi observada em 64% das cepas testadas em células HEp-2. Os autores revelam que essa espécie de *Aeromonas* apresenta propriedades patogênicas semelhantes às de outras espécies previamente reconhecidas como prejudiciais para o homem.

GREY & KIROV (1993)³⁸, estudaram a aderência em células HEp-2 de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, provenientes de material clínico, amostras ambientais e de alimentos. Observaram que a adesão foi marcadamente dependente da espécie, sendo a maior proporção de cepas adesivas as de *A. sobria* (58%) seguidas de *A. caviae* (33%) e *A. hydrophila* (11%).

SINGH e col. (1993)⁹⁸, estudaram a capacidade de adesão de 4 cepas de *A. hydrophila*, 4 de *A. caviae* e 4 de *A. sobria* em epitélio intestinal de coelho, sendo 6 cepas de procedência clínica e 6 ambiental. Concluíram que cepas ambientais e clínicas apresentavam padrões semelhantes em relação à capacidade de adesão, apesar desta não ser relacionada à capacidade de hemaglutinação.

SINGH & SANYAL (1993)⁹⁷, avaliaram a atividade hemaglutinante,

enterotoxigênica e a sensibilidade ao soro normal humano em 97 cepas de *Aeromonas* spp, sendo 35 de origem clínica e 62 de origem ambiental. Observaram atividade hemaglutinante em 45% das cepas sem, entretanto correlacionar a origem das mesmas. Entre as espécies estudadas, *A. hydrophila* foi a que apresentou maior proporção de atividade hemaglutinante. Das cepas hemaglutinantes, 82% foram enterotoxigênicas. Observaram que o acúmulo de fluido aumentou após passagens seriadas por alça intestinal de coelho, em todas as cepas anteriormente testadas, embora a capacidade de hemaglutinação não tenha se alterado. Verificaram que 64% dos isolados clínicos e ambientais foram resistentes à ação bactericida do soro normal humano, dos quais 74% produziram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho.

GOSLING e col. (1993)³⁵, isolaram e purificaram uma enterotoxina e uma β -hemolisina de *Aeromonas sobria*. A enterotoxina apresentou PM de 15.000 dáltons, era citotóxica, provocou acúmulo de fluido em intestino de camundongo lactente e não hemolisou eritrócitos de coelho. A β -hemolisina apresentou PM de 55.000 dáltons, não produziu acúmulo de fluido em camundongo lactente e hemolisou eritrócitos de coelho.

2.4. Ocorrência de *Aeromonas* no ambiente aquático.

Espécies do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídas em ambientes de água doce, salgada e salobra, compondo a microbiota de peixes e anfíbios¹⁰⁵.

Diferente de outros enteropatógenos *Aeromonas* spp não necessita de um hospedeiro humano ou mamífero para sobreviver e/ou se multiplicar. Sobrevive no

ambiente aquático e constitui a microbiota das águas superficiais. O ciclo oral-fecal pode contribuir para o aumento do número de bactérias no ambiente, entretanto este número é determinado muito mais por fatores ecológicos do que por contaminação humana^{52,55}.

BURKE e col. (1984)¹⁶ na Austrália, pesquisaram *Aeromonas* spp em um sistema de distribuição de água não clorada para abastecimento. A pesquisa foi realizada nas fases de captação, armazenamento e distribuição, onde *Aeromonas* spp foi encontrada em 34% das amostras analisadas, coliformes totais em 23% e *E. coli* em 11%. Isolaram *Aeromonas* spp em 9,9% das amostras do serviço de captação, 57,1% do serviço de armazenamento e em 33,3% do sistema de distribuição. Salientam ainda que, 61% das cepas isoladas eram enterotoxigênicas e 64% eram produtoras de hemolisina.

KOOIJ (1988)⁵⁷ estudou a ocorrência e significado de *Aeromonas* spp em água destinada ao abastecimento, relatando a presença deste microrganismo em água clorada ou não e associando casos de diarreia com o consumo de água, considerando-a como um potencial patógeno em hospedeiros suscetíveis, incluindo crianças e pessoas imunodeprimidas. Sugeriu que a contagem após o tratamento não exceda 200 UFC/100ml.

PAYMENT e col. (1988)⁸⁰, no Canadá, analisaram água do sistema de filtração e distribuição. Observaram *A. hydrophila* e coliformes em água bruta, na concentração de 74.000 e 21.000 UFC/l respectivamente. Na análise da água tratada não foi observada a presença de *Aeromonas* spp, mas esta reapareceu no sistema de

distribuição. Os autores chamam a atenção para a possibilidade de seu isolamento, quando em cultivos anteriores eram negativos, e salientam os efeitos de sua presença, pois são considerados patógenos oportunistas.

MASCHER e col. (1988)⁶⁵, isolaram *Aeromonas* spp em água do sistema de abastecimento na Europa e estudaram a produção de toxinas por estas cepas, onde observaram que 50% delas eram capazes de produzir enterotoxina. Verificaram também, que estes microrganismos podem ocorrer em água tratada independente da presença de *E. coli* ou outro indicador de contaminação fecal.

Com relação aos diferentes tipos de água que são utilizadas para fins recreacionais, deve-se levar em conta a associação entre a presença de espécies de *Aeromonas* spp nesses ecossistemas, a capacidade de produção de fatores de virulência pelo microrganismo e a presença de fatores predisponentes do hospedeiro.

Indivíduos imunodeprimidos ou que apresentem lesões resultantes de ferimentos na superfície do corpo, podem estar sujeitos a infecções ocasionadas tanto por ingestão desta água, quanto pelo contato das partes lesadas com a água contaminada por *Aeromonas* spp. As formas de infecção diversas das gastrintestinais como celulite, necrose e até septicemia secundária, também representam grande importância clínica, pois podem levar o paciente a óbito⁵⁵.

FRANCO e col. (1990)²⁹, na Argentina, estudando a sobrevivência de microrganismos patogênicos em águas recreacionais, utilizando cepas padrão, observaram *in vitro*, a sobrevivência destas cepas quando submetidas à diferentes

temperaturas, destacando este fator como o mais importante para a sobrevivência bacteriana. Comentam que cepas amplamente distribuídas no ambiente, relacionadas como patógenos humanos, podem ser transmitidas para o homem pelo uso da água salgada ou doce e aponta dentre as várias espécies a *A. hydrophila*.

NEVES e col. (1990)⁷³, no Brasil, observaram a produção de enterotoxina e citotoxina por cepas de *A. veronii* isoladas de ambiente aquático do Rio de Janeiro. Os autores sugerem que a água pode ser um reservatório da cepa toxigênica, podendo ser responsável por sua transmissão, e que mananciais contaminados representam um risco à Saúde Pública.

MONFORT & BALEUX (1991)⁶⁹, estudaram a presença de hemolisina em cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* isoladas do ecossistema aquático. Relatam a presença de *Aeromonas* spp móveis e citam a importância atual desta bactéria como agente de infecções em pacientes imunocompetentes e em casos clínicos gastrintestinais ou dermatológicas após ingestão de água.

Águas poluídas também são de grande importância quando se estuda a sobrevivência de *Aeromonas* spp no ambiente pois, esta pode representar uma fonte de contaminação para águas superficiais que são utilizadas para fins recreacionais. A presença de *Aeromonas* spp é favorecida pelo conteúdo de matéria orgânica presente na água, portanto sua sobrevivência é aumentada em águas poluídas e com descarga de esgotos⁶⁸.

SEIDLER e col. (1980)⁹⁰, isolaram *Aeromonas* spp de águas poluídas. De um

total de 17 cepas estudadas 9 eram *A. sobria* e 4 *A. hydrophila*, as quais apresentaram potencial patogênico quando pesquisadas para a presença de fatores de virulência.

ARAUJO e col. (1990)⁶, em Barcelona, trabalhando com *Aeromonas* spp em águas costeiras, observaram que a concentração de *Aeromonas* spp supera a de coliformes fecais e de *Streptococcus fecalis*, em todas as amostras, relacionando os picos de crescimento de *Aeromonas* spp com o aumento da concentração de entrada de água poluída. No mesmo estudo compararam a sobrevivência de *Aeromonas* spp e bactérias do grupo coliforme em águas salobras, e observaram que quando inoculados em água do mar, o número de *Aeromonas* spp declina inicialmente para voltar a subir em seguida, o que não acontece com o número de coliformes que diminui e assim permanece. Desta maneira, demonstram por que *Aeromonas* spp não pode ser estimada pela concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal, mostrando a necessidade de monitoramento deste microrganismo.

MONFORT & BALEUX (1991)⁷⁰, observaram a dinâmica de espécies de *Aeromonas* em um sistema de tratamento de esgoto, sugerindo que a presença de *Aeromonas* spp é mais importante que a de coliformes fecais. Comentam que efluentes de sistemas de tratamento de esgotos podem contribuir para a contaminação de águas, onde são realizadas atividades recreacionais e de pesca.

ARAUJO e col. (1991)⁷, isolaram *Aeromonas* spp em água com diferentes graus de poluição. As amostras foram coletadas de esgoto urbano, lagos eutróficos, rios e praias, e em todas elas esta bactéria foi encontrada. A espécie mais frequente foi *A. caviae* que estava presente em águas com alto grau de poluição e em esgotos. *A.*

hydrophila foi isolada em água com baixo teor de poluição fecal e *A. sobria* em águas sem poluição fecal. Os autores sugerem, uma possível relação inversa entre a diversidade de espécies de *Aeromonas* e o grau de poluição da água. Em todas as contagens a concentração de *Aeromonas* spp foi maior que a concentração de coliformes fecais.

POFFÉ & BEECK (1991)⁸⁴, pesquisaram a presença de *Aeromonas* spp nas diversas fases do tratamento de esgotos. *Aeromonas* spp foi isolada em concentrações de 10^4 a 10^6 organismos/ml no esgoto doméstico. No sistema de tratamento do esgoto, 99% das *Aeromonas* spp era eliminada pelos filtros prensa, e, apenas 20% estava no lodo primário, mesmo assim no lodo seco foi observada a contagem de 10^7 organismos/g. Os autores referem que águas que recebem esgoto bruto apresentam centenas de *Aeromonas* spp por mililitro, enquanto águas que não recebem esgoto ou que são destinadas ao abastecimento apresentam, apenas, pequenos números destes microrganismos. Demonstraram, através da alta concentração deste microrganismo em lodo após 3 meses de fermentação que, quando há presença de nutrientes, *Aeromonas* spp pode sobreviver por muito tempo.

2.5. Aspectos epidemiológicos e relacionados à Saúde Pública.

Do ponto de vista epidemiológico, relativo ao processo de transmissão de doenças por *Aeromonas* spp, devem ser considerados os aspectos referentes ao agente, hospedeiro e meio ambiente.

A enteropatogenicidade de *Aeromonas* spp vem sendo demonstrada tanto em

estudos com cepas de origem ambiental como clínica^{5,89}.

Em relação ao hospedeiro, para doença gastrointestinal, apresentam-se como suscetíveis tanto adultos como crianças, embora sua casuística seja mais elevada na população infantil com menos de 5 anos de idade³³.

As demais manifestações clínicas, estão associadas principalmente à utilização em larga escala de ambientes aquáticos seja para atividades de lazer e/ou profissionais, como ocorre na prática de diversas modalidades de esportes aquáticos ou mesmo no mergulho e pesca profissionais. Estas atividades expõem, com frequência, as pessoas ao risco de sofrer traumatismos ou ferimentos de intensidade variada, que podem servir como porta de entrada de *Aeromonas* spp, podendo resultar em quadros infecciosos diversos, algumas vezes graves, levando por exemplo à amputação da região afetada, ou mesmo à morte^{17,51}.

A doença por *Aeromonas* spp pode apresentar-se mais grave em indivíduos que tenham as suas defesas naturais debilitadas devido a distúrbios imunológicos^{13,17}.

A ocorrência de casos de infecção hospitalar por esses agentes é preocupante, uma vez que afeta grupos de pessoas menos híginas em relação aos demais integrantes da população⁵¹.

Em relação ao meio ambiente, podemos considerar que a ubiquidade do agente, associada à situação deficitária, ou mesmo caótica do saneamento básico em muitas regiões brasileiras, deva ser o principal fator que contribui para o acesso do

microrganismo ao intestino do homem, de forma que sua enteropatogenicidade pode ser favorecida⁹⁴.

A falta de consenso entre os autores, na taxonomia do gênero *Aeromonas*, dificulta a classificação ao nível de espécie de cepas provenientes do ambiente e que não se enquadram no esquema proposto por POPOFF em 1984⁸³ (cepas atípicas). As características fenotípicas são, muitas vezes, pouco concludentes em relação às 3 espécies definidas classicamente, sendo entretanto ainda empregadas por vários pesquisadores.

De forma geral, mas principalmente no Brasil, os estudos ambientais sobre esses microrganismos são ainda escassos, para que possam elucidar os aspectos ecológicos relacionados a patogenia humana e animal.

A quase inexistência no país de diagnóstico clínico/laboratorial para esse grupo de microrganismos, pode ser um dos fatores da baixa casuística de doença no Brasil, o que difere de países, como Austrália, Canadá e EUA, em que sua pesquisa é implementada. Esta situação reflete a precariedade do sistema de saúde existente, que mal dá cobertura ao diagnóstico de infecções corriqueiras; trata-se a maioria dos casos de infecção de forma empírica, com antibióticos de largo espectro, sem conhecer a real sensibilidade destes microrganismos, com o agravante de que *Aeromonas* spp, são em sua maioria resistentes às penicilinas⁷².

GLUSKIN e col. (1992)³³, alertam para o fato que apenas os casos mais graves de diarreia são hospitalizados e, conseqüentemente, diagnosticados, sendo possível

que haja um número significativo de casos menos intensos devidos a *Aeromonas* spp, que são tratados de outra forma sem serem identificados. Recomendamos a cultura de rotina para estes microrganismos em exames bacteriológicos de fezes.

A capacidade de espécies de *Aeromonas* serem resistentes a vários antibióticos é um aspecto de interesse em Saúde Pública, uma vez que estes microrganismos são altamente resistentes aos antibióticos β -lactâmico⁷² e eventualmente a outros antibióticos de largo espectro^{48,71,72,85,87,103}.

A dificuldade de se prever quando *Aeromonas* está envolvida em determinado caso de infecção, pois outros grupos de bactérias causam quadros semelhantes, dificulta a antibioticoterapia empírica, isto é, de emergência, onde muitas vezes se lança mão de antibióticos aos quais o microrganismo é resistente, comprometendo o restabelecimento do paciente^{17,39,59,74,101}.

O conhecimento sobre este grupo de microrganismos é ainda pouco difundido entre os profissionais de saúde, que atuam na área clínica, sendo necessária a conscientização dos mesmos, para que em casos de gastroenterites, ou outros tipos de infecção, relacionadas ao contato com o ambiente aquático, seja também realizada a pesquisa de *Aeromonas* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e processamento das amostras

Foram coletadas 64 amostras de água de superfície e 24 amostras de sedimento, provenientes de 4 pontos denominados de I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo. A represa é utilizada durante todo o ano para a captação de água para tratamento e destinação ao abastecimento público, bem como para fins recreacionais .

Os pontos foram denominados de **PI**, para o 1º ponto localizado logo acima da barragem, onde é feita a captação de água para tratamento, e **PII**, **PIII** e **PIV**, a partir do primeiro, distanciando-se da barragem, e situados próximos a clubes desportivos. A **Figura 1** apresenta o mapa da região da represa a que pertencem os pontos de coleta das amostras.

As amostras de superfície foram coletadas semanalmente, no período entre fevereiro e junho de 1992, enquanto as de sedimento entre maio e junho de 1992. Todas as amostras foram transportadas sob refrigeração para o laboratório.

No momento da coleta era determinada a temperatura da água.

Figura 1. Pontos de amostragem da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

No decorrer da pesquisa além das amostras para pesquisa de *Aeromonas* spp, mensalmente eram coletadas amostras dos 4 pontos (I, II, III e IV) para determinação de bactérias indicadoras de contaminação fecal (Coliformes totais e fecais), pela técnica dos tubos múltiplos⁴, realizada pelo laboratório de Microbiologia Ambiental, do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

3.2. Preparo das amostras

No laboratório mediu-se o pH das amostras, e aplicou-se a técnica dos tubos múltiplos para a contagem de espécies de *Aeromonas* móveis, conforme esquema constante na **Figura 2**.

Foram realizadas diluições decimais de 10^0 a 10^{-4} para as amostras de superfície, e de 10^0 a 10^{-7} para amostras de sedimento, em solução salina fisiológica as quais eram submetidas a enriquecimento em série de 3 tubos para cada diluição⁴.

3.3. Contagem de *Aeromonas* spp móveis.

3.3.1. Enriquecimento da amostra para isolamento de *Aeromonas* spp

As amostras eram semeadas, a partir das diluições, para um caldo de enriquecimento, água peptonada alcalina (APA) contendo 1% de cloreto de sódio, e então, incubadas por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, a partir de cada tubo de enriquecimento, era semeada uma alça do material da superfície do crescimento bacteriano em placa de Petri contendo "Blood Agar Base"

Figura 2. Representação esquemática da determinação do número estimado de *Aeromonas* pela técnica dos tubos múltiplos

(Difco) adicionado de 5% de sangue de coelho desfibrinado e 10 mg/l de ampicilina, e incubada por 24 horas a 35°C

3.3.2. Isolamento das colônias.

A partir das placas de ágar sangue, colônias com diâmetro entre 2 a 3 mm, brilhantes e convexas, sugestivas de pertencerem ao gênero *Aeromonas*, e que se apresentavam com ou sem hemólise, eram transferidas para tubos contendo ágar nutriente destinado à conservação (10g de peptona, 4g de extrato de lêvedo microbiológico e 15g de ágar para 1000 ml de água destilada). O crescimento assim obtido era utilizado para realização do teste de oxidase e para manutenção das cepas^{91,92}.

3.3.3. Identificação das colônias isoladas

Com base no estudo de revisão da literatura obteve-se o **Quadro 2** onde estão apresentadas as características bioquímicas esperadas para as diversas espécies de *Aeromonas*, o qual inclui as novas espécies propostas desde a última edição do Manual Bergey (1984)⁸³. A classificação das cepas isoladas neste estudo, baseou-se nas características relacionadas no **Quadro 2**.

As colônias produtoras da enzima citocromo oxidase eram repicadas para meio de ágar ferro de Kligler (Difco), para a determinação de produção de indol, acidificação da lactose, fermentação da glicose e produção de gás, e submetidas a teste de motilidade pela técnica de gota pendente.

QUADRO 2. Reações bioquímicas esperadas para as espécies do gênero *Aeromonas**.

Provas bioquímicas	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. allosacharophila</i>
Arginina	+	+	+	+	+	+	-	+
Lisina	V	V	V	+	+	+	+	+
Ornitina	-	-	-	-	-	-	+	-
Indol	+	+	+	+	+	-	+	+
Esculina	+	V	-	-	-	-	+	+
Voges Proskauer	+	-	V	-	+	-	+	-
Manitol	+	+	+	V	+	-	+	+
Manose	+	V	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	-	-	-	-	-	V
Sacarose	+	+	+	-	-	-	+	+
Gás de glicose	+	-	+	V	+	-	+	+

* Manual Bergey's of Systematic Bacteriology 1ª ed., 1984, Hickman-Brener e col., 1987 e 1988, Camaham e col., 1991. + reações superiores a 80% V - reações positivas entre 50 e 79%

As colônias que apresentavam testes presuntivos positivos para *Aeromonas* spp móveis, eram submetidas a provas bioquímicas complementares para confirmação da espécie, a saber: arginina dehidrolase, lisina e ornitina descarboxilase, crescimento em concentrações de 6 e 8% de cloreto de sódio e na ausência deste sal, produção de ácido a partir de: arabinose, manose, manitol, sacarose e hidrólise da esculina como demonstra a **figura 2**.

3.4. Pesquisa de fatores de virulência.

Foram pesquisados, através de ensaio em modelo animal, pelo teste de alça intestinal ligada de coelhos, e hemólise em ágar sangue humano e de coelho, a presença de fatores de virulência em 60 cepas de *Aeromonas* spp, sendo 15 de *A. hydrophila*, 15 de *A. caviae*, 15 de *A. sobria* e 15 de *A. jandaei*^{24,60,89}.

3.4.1. Preparo das cepas para o teste de alça ligada.

As cepas selecionadas, após crescimento por 24 horas em ágar nutriente, eram semeadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI-Difco) na concentração relativa à escala de McFarland, correspondendo a 10^8 organismos por ml, no momento que antecedia a realização do teste.

Foram utilizados para o ensaio coelhos brancos da raça Nova Zelândia, com peso variando entre 1500 a 2000 g. Os animais de experimentação eram mantidos em jejum prévio de 24 horas, recebendo apenas água²⁴.

Utilizou-se como pré-anestésico INOVAL (Janssen), na dosagem de 0,2 ml por quilo de peso, por via intramuscular. Decorridos 10 minutos desta aplicação era inoculado o anestésico, ZOLETIL 50 (Virbac), pela mesma via, na dose de 0,2 ml por quilo de peso. A dose de manutenção era feita quando necessário, aplicando-se doses adicionais de 0,1 ml/kg.

Como controle positivo do teste foi utilizada cepa de *A. hydrophila* ATCC 7966, e como controle negativo o próprio meio de cultura sem o inóculo.

Ao término da cirurgia o animal era mantido sob observação por um período de 16 a 18 horas, quando era sacrificado para a retirada da alça intestinal e leitura dos resultados. O líquido acumulado em cada segmento de alça era aspirado por intermédio de uma seringa para a medida do volume, e o comprimento da alça era anotado.

O resultado do teste de cada uma das cepas era dado pelo quociente entre o valor do volume acumulado em mililitros, e o valor do comprimento do segmento de alça em centímetros.

Para interpretação do teste foi adotada como positiva, a resposta secretória a partir de 0,25 ml de fluido acumulado por centímetro de alça (ml/cm), classificando-se os mesmos em 3 faixas, sendo a primeira entre 0,25 e 0,49 ml/cm, a segunda entre 0,50 e 0,99 ml/cm e a terceira acima de 1,00 ml/cm⁹⁴. Esta forma de classificação dos resultados foi empregada também por MATTE e col. (1994)⁶⁷, para avaliação do potencial enterotoxigênico de cepas de espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, a qual

favorece a interpretação e comparação dos resultados obtidos entre as diferentes espécies, bem como com os de outros autores.

3.4.2. Pesquisa de hemólise

Foi realizada em "Blood Agar Base"(Difco), adicionado de 5% de sangue, humano ou de coelho, desfibrinado. As cepas eram semeadas na forma de "spots" na superfície do ágar e incubadas à 37°C por 24 horas.

Para interpretação do teste foi observada a presença de halos de β -hemólise (hemólise total), α -hemólise (hemólise parcial) e ausência de hemólise ao redor das colônias.

3.4.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa "SPSS-PC", para as seguintes determinações: i) máximo, mínimo, média e mediana de cada parâmetro; ii) análise de correlação entre os parâmetros para cada ponto estudado; iii) teste t de Student, para análise das diferenças entre as médias dos NMP de *Aeromonas* spp nos diferentes pontos estudados.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram examinadas 64 amostras de água de superfície e 24 amostras de sedimento provenientes de 4 pontos (I, II, III e IV) da Represa de Guarapiranga (**Figura 1**). Dessas amostras foram isoladas e submetidas a triagem 1802 cepas, sendo que destas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* 536 cepas.

Das 536 cepas de *Aeromonas* spp isoladas, 34 (6,3%) foram confirmadas como *A. hydrophila*, 55 (10,3%) *A. caviae*, 59 (11%) *A. sobria*, 373 (69,6%) *A. jandaei* e 14 (2,6%) atípicas .

O número estimado (NMP/100ml) de *Aeromonas* isolados nos 4 pontos, bem como os valores da temperatura da água e pH da amostra estão relacionados nas **Tabelas de 1 a 4**.

4.1. Ocorrência de *Aeromonas* spp

Os percentuais de isolamento por amostra, segundo as espécies de *Aeromonas*, nos pontos de coleta são apresentados na **Figura 3**, onde se pode observar que as espécies isoladas nos 4 pontos estudados foram *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *A. jandaei*, com porcentagens de 18,7%, 31,2%, 43,7% e 76,6% respectivamente.

Figura 3. Porcentagem de amostras positivas para as diversas espécies de *Aeromonas* obtidas nos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Tabela 1. Distribuição da temperatura, pH e do número estimado de espécies de *Aeromonas* (em NMP/100 ml), segundo o tipo de coleta realizada no ponto I, da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Coleta	Data	Temperatura °C	pH	<i>*Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Aeromonas atípica</i>
1S	12/02/92	25	7.48	< 3	< 3	< 3	90	< 3
2S	21/02/92	26	7.38	< 3	< 3	< 3	40	< 3
3S	25/02/92	26	7.28	< 3	< 3	40	< 3	40
4S	12/03/92	24	7.03	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
5S	26/03/92	25	7.34	40	< 3	< 3	40	< 3
6S	10/04/92	23	7.19	< 3	30	40	110	< 3
7S	23/04/92	22	7.41	< 3	< 3	40	< 3	< 3
8S	29/04/92	22	8.06	< 3	< 3	30	< 3	< 3
9S	06/05/92	22	7.47	< 3	< 3	40	40	< 3
10S	13/05/92	22	7.23	< 3	30	30	70	< 3
11S	27/05/92	21	7.20	< 3	110	< 3	110	< 3
11F	27/05/92			< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
12S	03/06/92	21	7.40	< 3	< 3	40	430	< 3
12F	03/06/92			< 3	< 3	< 3	< 30	< 3
13S	10/06/92	21	7.40	90	40	< 3	70	< 3
13F	10/06/92			< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
14S	16/06/92	19	7.50	< 3	< 3	< 3	< 3	40
14F	16/06/92			< 3	< 3	< 3	70000	< 3
15S	24/06/92	19	7.20	< 3	< 3	< 3	3900	40
15F	24/06/92			< 3	< 3	< 3	110000	300
16S	30/06/92	17	7.2	30	30	40	70	< 3
16F	30/06/92			< 3	< 3	< 3	460	< 3

S - amostra de superfície; F- amostra de sedimento; *NMP / 100 ml

Tabela 2 Distribuição da temperatura, pH e número estimado de espécies de *Aeromonas* (em NMP/100 ml), segundo o tipo de coleta realizada no ponto II da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Coleta	Data	Temperatura °C	pH	* <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Aeromonas atípica</i>
1S	02/02/92	25	7.50	<3	<3	<3	<3	<3
2S	21/02/92	27	7.36	<3	<3	<3	<3	<3
3S	25/02/92	26	7.22	<3	<3	40	70	<3
4S	12/03/92	25	7.09	40	700	<3	230	<3
5S	26/03/92	25	7.20	30	<3	<3	40	<3
6S	10/04/92	23	7.30	<3	<3	<3	40	<3
7S	23/04/92	24	7.53	<3	<3	<3	40	<3
8S	29/04/92	22	7.90	<3	<3	<3	30	<3
9S	06/05/92	23	7.74	<3	<3	<3	<3	<3
10S	13/05/92	22	7.16	<3	<3	<3	930	<3
11S	27/05/92	21	7.20	<3	40	<3	40	<3
11F	27/05/92			<3	<3	300	240000	<3
12S	03/06/92	21	7.50	70	30	30	30	<3
12F	03/06/92			<3	<3	<3	<3	<3
13S	10/06/92	20	7.50	90	40	30	<3	<3
13F	10/06/92			30000	<3	110000	15000	<3
14S	16/06/92	20.5	7.30	<3	40	<3	70	<3
14F	16/06/92			<3	<3	<3	<3	<3
15S	24/06/92	20	7.40	70	110	40	110	<3
15F	24/06/92			<3	3000	<3	110000	<3
16S	30/06/92	17	7.10	<3	<3	40	70	<3
16F	30/06/92			30	<3	<3	30	<3

S amostra de superfície; F amostra de sedimento; * NMP/ 100 ml

Tabela 3. Distribuição da Temperatura, pH e o número estimado de espécies de *Aeromonas* (em NMP/100 ml), segundo o tipo de coleta realizada no ponto III da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Coleta	Data	Temperatura °C	pH	* <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Aeromonas atípica</i>
1S	12/02/92	25	7.53	<3	<3	<3	70	<3
2S	21/02/92	27	7.39	<3	<3	<3	30	<3
3S	25/02/92	26	7.25	<3	30	40	110	<3
4S	12/03/92	25	7.08	<3	40	<3	200	<3
5S	26/03/92	25	7.12	<3	<3	<3	70	<3
6S	10/04/92	24	7.25	<3	<3	<3	70	<3
7S	23/04/92	23	7.58	<3	<3	<3	110	<3
8S	29/04/92	22	7.78	<3	<3	40	<3	<3
9S	06/05/92	23	7.61	<3	<3	30	90	<3
10S	13/05/92	22	7.20	30	30	<3	2000	30
11S	27/05/92	21	7.20	<3	<3	30	200	<3
11F	27/05/92			<3	<3	<3	<3	<3
12S	03/06/92	20	7.50	<3	<3	30	70	40
12F	03/06/92			<3	<3	<3	240000	<3
13S	10/06/92	21.5	7.50	40	<3	110	280	70
13F	10/06/92			30	<3	110	7000	<3
14S	16/06/92	20.5	7.40	<3	<3	30	460	40
14F	16/06/92			<3	<3	<3	30	<3
15S	24/06/92	20	7.80	30	430	300	70	30
15F	24/06/92			<3	<3	<3	64000	30
16S	30/06/92	12	7.20	<3	30	<3	210	<3
16F	30/06/92			30	30	<3	90	<3

S amostra de superfície; F amostra de sedimento; * NMP / 100 ml

Tabela 4. Distribuição da temperatura, pH e do número estimado de espécies de *Aeromonas* (em NMP/100 ml), segundo o tipo de coleta realizada no ponto IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Coleta	Data	Temperatura °C	pH	* <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Aeromonas</i> atípica
1S	12/02/92	25	7.52	<3	<3	<3	30	<3
2S	21/02/92	27	7.37	<3	<3	<3	<3	<3
3S	25/02/92	26	7.22	<3	<3	<3	<3	<3
4S	12/03/92	26	7.16	<3	110	70	150	<3
5S	26/03/92	26	7.12	<3	<3	140	<3	<3
6S	10/04/92	24	7.14	30	30	1100	20000	<3
7S	23/04/92	23	7.64	<3	<3	<3	1500	40
8S	29/04/92	23	7.63	<3	<3	40	<3	<3
9S	06/05/92	23	7.45	<3	<3	30	210	<3
10S	13/05/92	22	7.24	<3	<3	<3	110	<3
11S	27/05/92	22	7.20	<3	<3	<3	40	<3
11F	27/05/92			<3	<3	<3	300	<3
12S	03/06/92	21	7.30	<3	<3	30	930	<3
12F	03/06/92			11000	<3	30	30	<3
13S	10/06/92	20	7.50	<3	930	<3	210	<3
13F	10/06/92			7000	30	<3	11000	<3
14S	16/06/92	21	7.50	<3	<3	<3	11000	<3
14F	16/06/92			<3	<3	<3	110000	<3
15S	24/06/92	25	6.90	<3	70	1100	110	<3
15F	24/06/92			300	300	<3	46000	<3
16S	30/06/92	13	7.50	<3	<3	<3	<3	<3
16F	30/06/92			<3	<3	<3	<3	<3

S amostra de superfície; F amostra de sedimento; * NMP / 100 ml

Levando-se em conta as 3 espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, que têm sido isoladas de amostras ambientais, podemos comparar os resultados obtidos neste estudo com os de PATHAK e col. (1988)⁷⁹, que encontraram 56,1% de *A. hydrophila* quando examinaram água de rio, usando para isolamento o meio ágar desoxicolato citrato xilose.

CHOWDHURY e col. (1990)²², no Japão, isolaram de ambiente aquático *A. hydrophila* em 21,1% das amostras, *A. caviae* em 38,4% e *A. sobria* em 16,8%, mediante a utilização do ágar MacConkey adicionado de ampicilina. Estes percentuais são próximos aos encontrados nesta pesquisa para *A. hydrophila* e *A. caviae* e inferiores para *A. sobria*.

MATEOS e col. (1990)⁶⁶, na Espanha, isolaram *A. hydrophila* em 30,2% das amostras, *A. caviae* em 1,8% e *A. sobria* em 6,6% quando trabalhavam com água de rio. Estes resultados são superiores para *A. hydrophila* e inferiores para *A. caviae* e *A. sobria* em relação aos encontrados neste estudo. Entretanto, os autores utilizaram ágar amido ampicilina, que é um meio mais específico para *A. hydrophila*.

No presente estudo foi empregado ágar sangue ampicilina, o qual favorece o isolamento de uma gama maior espécies de *Aeromonas* (KELLY e col., 1988)⁵⁰. Esse fato é comprovado pela diversidade de espécies encontradas e pelas elevadas porcentagens de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, incluindo também *A. jandaei* que ainda não havia sido relatada no ambiente aquático.

Como se pode observar nas **Tabelas de 1 a 4** e **Figuras de 4 a 7** *A. jandaei* foi a espécie que apresentou maiores contagens.

Com relação ao número de espécies diferentes isoladas em cada ponto, foi possível verificar a ocorrência simultânea de mais de uma espécie de *Aeromonas* na mesma amostra, sendo que a presença de 2, 3 ou 4 espécies ocorreu com elevada frequência (**Figura 8**).

As **Figuras de 9 a 12** apresentam a comparação do número estimado de microrganismos encontrados nos 4 pontos estudados, para cada espécie identificada. A **Tabela 5** apresenta os resultados de estatística básica obtidos para os parâmetros analisados e a **Tabela 6** apresenta os cálculos de correlação entre esses parâmetros, observados segundo os pontos de amostragem. A **Tabela 7** apresenta os resultados dos cálculos de correlação dos mesmos parâmetros observados para os 4 pontos em conjunto.

Nas amostras em que foi realizada a análise de material de sedimento, verificou-se a ocorrência de maiores contagens de *Aeromonas* spp e também uma diminuição no número de espécies concomitantes numa mesma amostra. Este resultado pode ser devido ao fato de que as contagens se deram em diluições mais elevadas da amostra, onde provavelmente, o elevado número de determinadas espécies de *Aeromonas* tenha prejudicado o isolamento de espécies que ocorrem em menor número, devido à confluência de crescimento nas placas de meio de cultura correspondentes às diluições menores da amostra, diminuindo a probabilidade de isolamento (**Tabela 8**).

Figura 4. Distribuição do número estimado de *Aeromonas* spp (NMP/100 ml), provenientes de amostras de água do ponto I da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 5. Distribuição do número estimado de *Aeromonas* spp (NMP/100 ml), provenientes de amostras de água do ponto II da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 6. Distribuição do número estimado de *Aeromonas* spp (NMP/100 ml), provenientes de amostras de água do ponto III da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 7. Distribuição do número estimado de *Aeromonas* spp (NMP/100 ml), provenientes de amostras de água do ponto IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 8. Número de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água provenientes dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 9. Distribuição do número estimado de *Aeromonas hydrophila* (NMP/100 ml), nas amostras de água dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 10. Distribuição do número estimado de *Aeromonas caviae* (NMP/100 ml), nas amostras de água dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga. São Paulo, 1992.

Figura 11. Distribuição do número estimado de *Aeromonas sobria* (NMP/100 ml), nas amostras de água dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 12. Distribuição do número estimado de *Aeromonas jandaei* (NMP/100 ml), nas amostras de água dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Tabela 5. Resultados da análise estatística dos parâmetros analisados de amostras de água, provenientes dos pontos I, II, III e IV, da Represa de Guarapiranga Guarapiranga, São Paulo, 1992.

	Variável	Unidade	Média	Mínimo	Máximo	Mediana
P I	Temperatura	°C	22,2	17	26	22
	pH	-	7,31	7,03	8,06	7,36
	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	12,4	<3	90	3
	<i>A. caviae</i>	"	17,1	<3	110	3
	<i>A. sobria</i>	"	20,2	<3	40	16,5
	<i>A. jandaei</i>	"	311,6	<3	3900	55
P II	Temperatura	°C	22,6	17	27	22,5
	pH	-	7,33	7,09	7,90	7,33
	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	20,8	<3	90	3
	<i>A. caviae</i>	"	61,9	<3	700	3
	<i>A. sobria</i>	"	13,3	<3	40	3
	<i>A. jandaei</i>	"	107	<3	930	40
P III	Temperatura	°C	22,1	12	27	22,5
	pH	-	7,34	7,08	7,80	7,39
	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	8,7	<3	40	3
	<i>A. caviae</i>	"	38,7	<3	430	3
	<i>A. sobria</i>	"	39,6	<3	300	16,5
	<i>A. jandaei</i>	"	241,4	<3	2000	80
P IV	Temperatura	°C	22,9	13	27	23
	pH	-	7,28	6,90	7,64	7,33
	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	4,7	<3	30	3
	<i>A. caviae</i>	"	73,5	<3	930	3
	<i>A. sobria</i>	"	158,6	<3	1100	3
	<i>A. jandaei</i>	"	2144,1	<3	20000	110

NMP - Número Mais Provável de organismos

Tabela 6. Resultados do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os diversos parâmetros obtidos na Represa de Guarapiranga, segundo os pontos de amostragem. São Paulo, 1992.

	VARIÁVEIS	Temp	pH	Ah	Ac	As	Aj
P O N T O I	Temperatua	-					
	pH	-.180	-				
	<i>A. hydrophila</i>	-.1599	-.0209	-			
	<i>A. caviae</i>	-.2764	-.2933	.1847	-		
	<i>A. sobria</i>	-.1476	.1203	-.2524	-.1514	-	
	<i>A. jandaei</i>	-.3465	-.1965	-.1111	-.1208	-.2287	-
P O N T O II	Temperatura	-					
	pH	.0191	-				
	<i>A. hydrophila</i>	-.2837	.0550	-			
	<i>A. caviae</i>	.1635	-.3341	.2724	-		
	<i>A. sobria</i>	-.4410	-.1500	.5107	-.0970	-	
	<i>A. jandaei</i>	-.0562	-.3711	-.1102	.1301	-.1378	-
P O N T O III	Temperatura	-					
	pH	-.0383	-				
	<i>A. hydrophila</i>	-.1523	.2180	-			
	<i>A. caviae</i>	-.1760	.4131	.5107	-		
	<i>A. sobria</i>	-.1946	.5586	.6213*	.9299**	-	
	<i>A. jandaei</i>	-.1243	-.2575	.4925	-.0489	-.1189	-
P O N T O IV	Temperatura	-					
	pH	-.4007	-				
	<i>A. hydrophila</i>	.0839	-.2510	-			
	<i>A. caviae</i>	-.1910	.1352	-.0503	-		
	<i>A. sobria</i>	.2141	-.6248*	.6798*	-.0511	-	
	<i>A. jandaei</i>	-.0064	-.1017	.8687**	-.0876	.5521	-

*p < 0,01 ** p < 0,001 n = 16 para cada ponto Temp- Temperatura, Ah- *Aeromonas hydrophila*, Ac- *Aeromonas caviae*, As- *Aeromonas sobria*, Aj- *Aeromonas jandaei*.

Tabela 7. Resultados do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os diversos parâmetros obtidos nos 4 pontos da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

VARIÁVEIS	Temp	pH	Ah	Ac	As	Aj
Temperatua	-					
pH	-.1206	-				
<i>A. hydrophila</i>	-.1483	.0376	-			
<i>A. caviae</i>	-.0697	.0035	.1569	-		
<i>A. sobria</i>	.1007	-.2412	.0744	.0497	-	
<i>A. jandaei</i>	-.0090	-.1036	.0661	-.0349	.5672**	-

*p < 0,01 ** p < 0,001 n = 16 para cada ponto Temp- Temperatura, Ah- *Aeromonas hydrophila*, Ac- *Aeromonas caviae*, As- *Aeromonas sobria*, Aj- *Aeromonas jandaei*.

Tabela 8. Resultados da análise estatística dos parâmetros analisados de amostras de água (superfície) e de sedimento, provenientes dos pontos I, II, III, IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

	Variável	Unidade	Média		Mínima		Máxima		Mediana	
			A	S	A	S	A	S	A	S
P	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	22	<3	<3	<3	90	<3	3	3
	<i>A. caviae</i>	"	31,5	<3	<3	<3	110	<3	16,5	3
I	<i>A. sobria</i>	"	15,3	<3	<3	<3	40	<3	3	3
	<i>A. jandaei</i>	"	763,8	30078	<3	<3	3900	110000	90	231,5
P	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	39,8	5007	<3	<3	90	30000	36,5	3
	<i>A. caviae</i>	"	43,83	502,5	<3	<3	110	3000	40	3
II	<i>A. sobria</i>	"	24,3	18385,3	<3	<3	40	110000	30	3
	<i>A. jandaei</i>	"	53,8	60839,3	<3	<3	110	240000	55	7515
P	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	13,7	12	<3	<3	40	30	3	3
	<i>A. caviae</i>	"	83,17	7,5	<3	<3	430	30	16,50	3
III	<i>A. sobria</i>	"	83,8	20,8	<3	<3	300	110	30	3
	<i>A. jandaei</i>	"	215	51853,8	70	<3	460	240000	205	3545
P	<i>A. hydrophila</i>	NMP/100ml	<3	3051,5	<3	<3	<3	11000	3	151,5
	<i>A. caviae</i>	"	168,7	57	<3	<3	930	300	3	3
IV	<i>A. sobria</i>	"	190,3	12	<3	<3	1100	30	3	3
	<i>A. jandaei</i>	"	2048,8	27888,8	<3	<3	11000	110000	160	5650

NMP - Número Mais Provável, A- Amostra de Água , S - Amostra de Sedimento P - Ponto de Coleta

Observou-se que *A. jandaei* estava presente em maior número nas amostras de sedimento ($p > 0,05$).

A comparação do número estimado (NMP/100ml) de espécies de *Aeromonas* entre amostras provenientes de superfície e sedimento podem ser observadas nas Tabelas de 1 a 4

4.1.1 *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila foi isolada em 18,7% das amostras provenientes do ponto I, 31,2% do ponto II, 18,7% do ponto III e em 6,2% do ponto IV, sendo observadas diferenças significativas apenas entre as médias das contagens do ponto III e ponto IV ($p > 0,05$). *A. hydrophila* de forma geral foi isolada em contagens baixas nos 4 pontos estudados, apresentado número estimado variando entre <3 e 90 organismos por 100 ml de amostra, com menores contagens observadas para o ponto IV, que variou entre <3 e 30 organismos por 100 ml de amostra.

Ao se comparar a variação das contagens das amostras de sedimento, com NMP variando entre <3 e 30.000 organismos/100ml, e de amostras de água de superfície com NMP variando entre <3 e 90 organismos/100ml, pode-se observar que as maiores contagens ocorreram no sedimento, embora a comparação das duas médias não tenha apresentado diferença significativa ($p > 0,05$).

PATHAK e col. 1988⁷⁹, observaram, em amostras de origem ambiental, que as contagens de *A. hydrophila* variavam entre 10^3 e 10^4 .

4.1.2. *Aeromonas caviae*

Aeromonas caviae foi isolada de 31,2% das amostras do ponto I, 37,5% do ponto II, 31,2% do ponto III e 25% do ponto IV. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das contagens destes microrganismos entre os 4 pontos estudados ($p > 0,05$) onde o NMP variou entre <3 e 930 organismos por 100 ml de amostras (**Tabela 8**).

Comparando-se as contagens de *A. caviae* em amostras de sedimento (entre <3 e 3000 organismos/100 ml) com as de superfície (entre <3 e 930 organismos/100 ml) verificou-se que os maiores valores ocorreram nas amostras de sedimento, entretanto comparando-se as médias das contagens constatou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois tipos de amostras (**Tabela 8**).

4.1.3. *Aeromonas sobria*

Aeromonas sobria estava presente em 50% das amostras do ponto I, 31,2% do ponto II, 50% do ponto III e 43,7% do ponto IV, não tendo sido observada diferença significativa entre as contagens deste microrganismo entre os 4 pontos estudados ($p > 0,05$).

Quando comparado o NMP das amostras de sedimento (entre <3 e 110.000 organismos / ml) com as de superfície (entre <3 e 1.100 organismos/ml), constatou-se que as contagens mais altas ocorreram no sedimento, entretanto observou-se que não se registraram diferenças significativas ($p > 0,05$) quando foram comparadas as

médias da superfície e sedimento.

4.1.4. *Aeromonas jandaei*

Este microrganismo foi isolada de 66,6% das amostras do ponto I, 83,3% do ponto II, 100% do ponto III e 83,3% do ponto IV, sendo a espécie de *Aeromonas* isolada com maior frequência em todos os pontos estudados.

As contagens variaram entre <3 e 110.000 organismos/100 ml, para amostras de superfície e entre <3 e 240.000 organismos/100 ml, para as de sedimento. Observou-se que as contagens médias foram significativamente maiores ($p > 0,05$) nas amostras de sedimento do que nas de superfície (**Tabela 8**).

Deve-se destacar que esta espécie foi reconhecida recentemente¹⁸ apresentando como principal característica fenotípica, para diferenciação de *A. sobria*, a prova de acidificação da sacarose, a qual é negativa para *A. jandaei*.

JOSEPH e col.⁴⁸, em 1991, relacionaram um caso de infecção, causada por *A. jandaei*, após o contato com água de rio, sugerindo a presença deste microrganismo no ambiente aquático. Observaram que a cepa estudada havia sido inicialmente classificada como *A. hydrophila*, a qual foi por eles reavaliada e reclassificada. Apresentaram como hipóteses que possam justificar a baixa frequência de isolamento deste microrganismo os seguintes fatores: baixa incidência de *A. jandaei* no ambiente; baixa virulência do microrganismo ou ainda falta de familiaridade com as características que permitem aos laboratoristas indentificar *A. jandaei*. Salientaram

também que, as características bioquímicas de *A. jandaei* são suficientemente distintas das de outras espécies de *Aeromonas* e permitem que sejam identificadas a nível de espécie nos laboratórios, não necessitando a aplicação de técnicas de biologia molecular.

A experiência resultante dessa pesquisa, concorda com JOSEPH e col. (1991)⁴⁸, que relata não haver dificuldade para a identificação de *A. jandaei* através de suas características bioquímicas, e ao mesmo tempo confirma sua hipótese de que esta nova espécie possa ocorrer no ambiente aquático, uma vez que não se obteve, até o presente momento, relatos de outros autores de sua ocorrência no ambiente.

As elevadas contagens de *A. jandaei* obtidas neste estudo, com números que chegaram a $10^5/100\text{ml}$, corroboram com as evidências epidemiológicas, relatadas por JOSEPH (1991)⁴⁸, que atribuiu ao contato com o ambiente aquático, a provável fonte de contaminação, em um caso de infecção relacionado a esta espécie. Fato semelhante ocorreu com *A. veronii*⁷³, inicialmente isolada de amostras clínicas, e mais tarde isolada de amostras ambientais.

As maiores concentrações observadas de *Aeromonas* spp nas amostras de sedimento, podem indicar que o mesmo seja um importante reservatório para esse grupo de microrganismos, o que o tornaria uma fonte de contaminação das águas de superfície, onde *Aeromonas* spp poderia manter-se por longo período de tempo sem alteração de suas características, o que também foi observado por MATEOS e col. (1992)⁶⁶.

4.1.5. Parâmetros físicos (pH, Temperatura)

Os valores médios, mínimos e máximos dos parâmetros físicos, temperatura da água e pH da amostra, estão descritos na **Tabela 5**. Observou-se, considerando-se os 4 pontos estudados, que a temperatura média foi de 23°C, máxima de 27°C e a mínima de 20°C, as quais são características de regiões subtropicais. Estes valores de temperatura foram propícias à presença de *Aeromonas* spp cujo desenvolvimento é favorecido em temperaturas entre 18 e 20°C⁸³.

O pH médio para os pontos I, II, III e IV foram 7,31, 7,33, 7,34 e 7,28 respectivamente, sendo o mínimo de 6,40 e o máximo de 8,06. Sabendo-se que a faixa de pH para crescimento de *Aeromonas* spp varia entre 5,5 e 9,0⁸³, o pH das amostras apresentou-se em sua totalidade não só favorável à sua sobrevivência como também à sua multiplicação.

Não foi observada correlação entre pH e temperatura com as contagens de *Aeromonas* spp ($p < 0,01$) (**Tabela 6, Figuras de 13 a 20**). Estes resultados são concordantes com os encontrados por CHOWDHURY e col.(1990)²² e PATHAK e col.(1988)⁷⁹. A ausência de correlação de *Aeromonas* spp com temperatura, se justifica uma vez que em regiões sub-tropicais, como a que está situada a Represa de Guarapiranga, não são observadas temperatura extremas, como as observadas em países de clima frio, como por exemplo as que ocorrem no Canadá.

Figura 13. Resultados da comparação entre temperatura da água e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto I da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 14. Resultados da comparação entre temperatura da água e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto II da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 15. Resultados da comparação entre temperatura da água e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto III da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 16. Resultados da comparação entre temperatura da água e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 17. Resultados da comparação entre pH da amostra e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto I da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 18. Resultados da comparação entre pH da amostra e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto II da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 19. Resultados da comparação entre pH da amostra e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto III da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 20. Resultados da comparação entre pH da amostra e presença de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml), isoladas do ponto IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Resultados semelhantes, de ausência de correlação para temperatura, foram observados por MATTÉ e col. (1994)⁶⁷, quando pesquisavam espécies do gênero *Vibrio*, os quais pertencem à mesma família do gênero *Aeromonas* (*Vibrionaceae*), provenientes de região sub-tropical (Ubatuba-SP).

4.1.6. Colimetria

A avaliação do número estimado de bactérias do grupo coliforme foi realizada em 24 amostras de água de superfície coletadas 1 vez por mês, provenientes dos 4 pontos estudados. As contagens de coliformes fecais e totais destas amostras constam da **Tabela 9**. Não foi observada a correlação ($p < 0,01$) entre presença de *Aeromonas* spp e os indicadores de contaminação fecal (**Tabela 10, Figuras de 21 a 24**) confirmando que *Aeromonas* spp ocorrem de forma autóctone nesse ambiente não podendo ser estimado através das contagens de bactérias indicadoras de contaminação fecal, observação também feita por ARAUJO e col.(1990)⁶ e CHOWDHURY e col. (1990)²².

A ausência de correlação com os indicadores de contaminação fecal foi também observada por MATTÉ e col. (1994)⁶⁷, para espécies do gênero *Vibrio*, o que demonstra que as espécies que compõem estes 2 gêneros, pertencentes a mesma Família, são autóctones nos ambientes estudados.

TABELA 9. Número estimado de coliformes totais e fecais (NMP/100 ml), obtidos de amostra de água provenientes dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Coleta	Ponto I		Ponto II		Ponto III		Ponto IV	
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
4	2	2	26	2	1300	1300	1300	90
6	26	9	17	17	6	4	2	<2
10	7	<2	9	4	7	7	33	9
12	<2	<2	<2	<2	500	170	<2	17
13	240	11	2300	26	170	7	1300	800
14	27	11	4	4	800	23	4	2
15	1100	12	170	22	500	34	5000	130

TABELA 10. Resultados do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre coliformes totais, fecais e as diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas nos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

	VARIÁVEIS	CT	CF	Ah	Ac	As	Aj
P	Coliformes totais	-					
O	Coliformes fecais	.0917	-				
N	<i>A. hydrophila</i>	.0429	.0313	-			
T	<i>A. caviae</i>	-.2105	-.3061	.6393	-		
O	<i>A. sobria</i>	-.4272	-.6693	-.3476	.2283	-	
I	<i>A. jandaei</i>	.9679**	.0462	-.1840	-.3747	-.2897	-
P	Coliformes totais	-					
O	Coliformes fecais	.6792	-				
N	<i>A. hydrophila</i>	.6204	.4761	-			
T	<i>A. caviae</i>	-.1578	-.3213	.0815	-		
O	<i>A. sobria</i>	.4180	.5539	.8831*	-.2420	-	
II	<i>A. jandaei</i>	-.2769	-.3834	-.4582	-.0142	-.4095	-
P	Coliformes totais	-					
O	Coliformes fecais	.8057	-				
N	<i>A. hydrophila</i>	-.4874	-.3930	-			
T	<i>A. caviae</i>	.0708	-.1002	.3741	-		
O	<i>A. sobria</i>	-.0425	-.2714	.5570	.9167*	-	
III	<i>A. jandaei</i>	-.3650	-.1961	.3647	-.1957	-.3091	-
P	Coliformes totais	-					
O	Coliformes fecais	.2073	-				
N	<i>A. hydrophila</i>	-.2629	-.2243	-			
T	<i>A. caviae</i>	.1201	.9950**	-.1739	-		
O	<i>A. sobria</i>	.5328	-.2087	.6448	-.2404	-	
IV	<i>A. jandaei</i>	-.3987	-.3353	.8611*	-.2792	.4616	-

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$, $n = 7$ para cada ponto, CT- Coliformes Totais, CF- Coliformes Fecais, Ah- *Aeromonas hydrophila*, Ac- *Aeromonas caviae*, As- *Aeromonas sobria*, Aj- *Aeromonas jandaei*.

Figura 21. Resultado da comparação entre o número estimado de coliformes totais e fecais e de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml) das amostras de água provenientes do ponto I da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 22. Resultado da comparação entre o número estimado de coliformes totais e fecais e de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml) das amostras de água provenientes do ponto II da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 23. Resultado da comparação entre o número estimado de coliformes totais e fecais e de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml) das amostras de água provenientes do ponto III da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Figura 24. Resultado da comparação entre o número estimado de coliformes totais e fecais e de espécies de *Aeromonas* (NMP/100 ml) das amostras de água provenientes do ponto IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

4.2-Pesquisa de fatores de virulência

Os resultados dos testes de alça ligada em coelhos, e teste de hemólise em ágar contendo eritrócitos humanos e de coelho, segundo as diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas, estão apresentados na **Tabela 11**.

4.2.1. Teste em alça ileal de coelho

A **Figura 25**, apresenta os percentuais de positividade dos testes efetuados, segundo a espécie de *Aeromonas* e o volume de fluido acumulado no segmento de alça intestinal de coelho. Observou-se que das 60 cepas de *Aeromonas* spp pesquisadas, 43 (71,7%) produziram acúmulo de fluido, que variou entre 0,25 e 1,14 ml/cm de alça.

Entre as 15 cepas de *A. hydrophila* submetidas ao teste de alça ligada em coelho, 12 (80%) produziram acúmulo de fluido que variou entre 0,25 e 0,99 ml/cm; das 15 cepas de *A. caviae*, 11 (73,3%), variaram entre 0,29 e 0,96 ml/cm; das 15 cepas de *A. sobria* 7 (46,7%) variaram entre 0,25 e 1,14; e das 15 cepas de *A. jandaei* 13 (86,7%) variaram entre 0,26 e 1,07 ml/cm.

SINGH & SANYAL, (1992)^{94,95}, estudando 93 cepas de *Aeromonas* spp de origem ambiental, obtiveram 52 (55,9%) positivas para o teste de alça ligada em coelhos. Entre as 9 cepas de *A. hydrophila*, 5 (55,5%) produziram acúmulo variando entre 0,6 e 1,7ml/cm, das 33 *A. sobria*, 14 (42,4%) variando entre 0,5 e 1,3ml/cm, e das 51 *A. caviae*, 33 (64,7%), variando de 0,5-1,00.

TABELA 11. Resultado dos testes de alça ligada, em íleo de coelho, e de hemólise em ágar sangue, humano e de coelho, de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água dos diferentes pontos da represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

Espécie	Nº de amostras testadas	Variação de acúmulo de fluido			Hemólise α		Hemólise β		Não hemolítica	
		Nº	%	ml/centímetro de alça	H	C	H	C	H	C
<i>A. hydrophila</i>	15	3	20	0	1	1	2	2	0	0
		10	66,6	0,25 - 0,49	1	1	9	9	0	0
		2	13,3	0,50 - 0,99	0	0	2	2	0	0
		-	-	> 1,00	0	0	0	0	0	0
<i>A. caviae</i>	15	4	26,6	0	1	0	1	0	2	4
		9	60	0,25 - 0,49	3	3	3	3	3	3
		2	13,3	0,50 - 0,99	1	1	1	1	0	0
		-	-	> 1,00	0	0	0	0	0	0
<i>A. sobria</i>	15	8	53,3	0	3	3	3	2	2	2
		4	26,6	0,25 - 0,49	0	0	3	3	1	1
		2	13,3	0,50 - 0,99	0	0	2	2	0	0
		1	6,6	> 1,00	0	0	1	1	0	0
<i>A. jandaei</i>	15	2	13,3	0	0	0	2	2	0	0
		5	33,3	0,25 - 0,49	0	0	5	5	0	0
		6	40	0,50 - 0,99	0	0	6	6	0	0
		2	13,3	> 1,00	0	0	2	2	0	0

H- ágar contendo 5% de sangue humano, C- ágar contendo 5% sangue de coelho, Nº- número, %- porcentagem.

Figura 25. Percentual de cepas de *Aeromonas* spp, que produziram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, isoladas dos pontos I, II, III e IV da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1992.

PATHAK e col. (1988)⁷⁹, estudando 12 cepas de *A. hydrophila* provenientes de amostras ambientais, para o teste de alça ligada em coelhos, observaram que 1 (8,3%) apresentou acúmulo entre 0,25 e 0,49 ml/cm, 5 (41,7%) entre 0,50 e 0,99 ml/cm, 1 (8,3%) acima de 1 ml/cm e 5 (41,7%) não apresentaram acúmulo de fluido.

MASCHER e col. (1988)⁶⁵, testando cepas de *Aeromonas* spp para acúmulo de fluido em alça ligada, obtiveram em média 50% de positividade.

Apesar de *A. caviae* ter apresentado 73,3% de positividade, a qual foi próxima a de *A. hydrophila*. e *A. jandaei* e superior à de *A. sobria*, o volume de fluido acumulado foi em geral inferior aos encontrados para as demais espécies (**Tabela 11, Figura 25**), observação esta também constatada por SINGH & SANYAL (1992)⁹⁵ e DEOHDAR e col., (1991)²⁶.

SEIDLER e col. (1980)⁹⁰, observaram entre 9 cepas de *A. sobria*, que 5 (55,5%) induziram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, com volume variando entre 0,9 e 1,1 ml/cm de alça. Estes resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo, no qual 15 cepas de *A. sobria*, 7 (46,6%) induziram acúmulo de fluido em alça ligada, com volume variando entre 0,25 e 1,14 ml/cm de alça.

DEODHAR e col. (1991)²⁶, trabalhando com cepas de *Aeromonas* spp de origem clínica, observaram acúmulo de fluido variando de 0,8 a 1,8 ml/cm. No entanto, as 3 cepas de *A. caviae* testadas causaram acúmulo de fluido, somente, após 3 passagens seriadas por alça intestinal de coelho.

GEMMEL (1984)³¹, considera que, biologicamente, a enterotoxina de *Aeromonas* spp assemelha-se a de *V. cholerae* e à LT de *E. coli*, mas a diferença pode estar relacionada a natureza da toxina. Esta apresenta peso molecular menor (15.000 dáltons) e aparentemente não possui sub-unidades e é muito sensível à digestão proteolítica, que a inativa. A ocorrência neste estudo de cepas com volume de fluido acima de 0,5 ml/cm e mesmo acima de 1 ml/cm [*A. jandaei* (2) e *A. sobria* (1)], com padrões semelhantes aos encontrados por MATTÉ e col. (1994)⁶⁷, para vibrios isolados de mariscos e ostras, isto é, elevado volume de fluido acumulado sem a presença de hemorragia, sugere que as *Aeromonas* spp isoladas podem ser produtoras de enterotoxina, uma vez que o acúmulo de fluido provocado por hemolisinas é, em geral, inferior a 0,2 m./cm de alça.

BOULANGER e col. (1989)¹⁴, obtiveram teste positivo, para alça ligada de coelho, em 30,7% das *A. hydrophila* e em 100% das *A. sobria*. Este resultado é inverso ao verificado no presente trabalho, onde se obteve 80% de positividade para *A. hydrophila* e 46,6% para *A. sobria*.

Aeromonas jandaei apresentou, comparativamente as demais espécies testadas, maior percentual de cepas que produziram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, das quais 33,3% apresentaram acúmulo variando entre 0,25 e 0,49 ml/cm de alça, 40% entre 0,50 e 0,99 ml/cm e 13,3% acima de 1 ml/cm. Considerando-se o valor de acúmulo de fluido acima de 0,5 ml/cm, *A. jandaei* apresentou percentual ainda maior de cepas (53,3%), quando comparada com *A. hydrophila* (13,3%), *A. caviae* (13,3%) e *A. sobria* (20%).

Estudos tem demonstrado que repiques sucessivos de *Aeromonas* spp, bem como sua prolongada permanência em meios de manutenção, provocam uma sensível redução no potencial de produção de acúmulo de fluido. Passagens sucessivas dessas cepas por alça intestinal de coelho geralmente revertem este potencial^{26,95}.

4.2.2. Pesquisa de hemólise

Os percentuais de positividade para os testes de hemólise em ágar contendo eritrócitos humanos e de coelho estão demonstrados, respectivamente, nas **Figuras 26 e 27**.

Das 60 cepas testadas para a produção de hemólise 42 (70%) produziram β -hemólise, 10 (16,6%) produziram α -hemólise e 8 (13,3%) não produziram hemólise.

Quanto ao tipo de eritrócitos utilizados para o teste, observou-se que os resultados foram idênticos entre *A. hydrophila* e *A. jandaei*. Entre *A. caviae*, 2 cepas apresentaram, respectivamente, α e β -hemólise em sangue humano e não foram hemolíticas em sangue de coelho, enquanto 1 cepa de *A. sobria* apresentou β -hemólise em sangue humano e α -hemólise no sangue de coelho, e 1 cepa apresentou α -hemólise em sangue humano e não foi hemolítica em sangue de coelho.

Analisando-se por espécie, observou-se que das 15 cepas de *A. hydrophila* 13 (86,7%) produziram β -hemólise e 2 (13,3%) apresentaram α -hemólise. Entre as 15 cepas de *A. caviae*, 5 (33,3%) apresentaram β -hemólise, 5 (33,3%) apresentaram α -hemólise e 5 (33,3%) não foram hemolíticas. Entre as 15 cepas de *A. sobria* 9 (60%) produziram β -hemólise, 3 (20%) produziram α -hemólise e 3 (20%) não foram

Figura 26. Percentual de hemólise, em ágar contendo eritrócitos humanos, produzido por espécies de *Aeromonas*, isoladas de amostras de água provenientes da Represa de Guarapiranga, segundo os tipos e espécies. São Paulo, 1992.

Figura 27. Percentual de hemólise, em ágar contendo eritrócitos de coelho, produzido por espécies de *Aeromonas*, isoladas de amostras de água proveniente da Represa de Guarapiranga, segundo os tipos e espécies. São Paulo, 1992.

hemolíticas. Entre as 15 cepas de *A. jandaei* todas (100%) produziram β -hemólise. Estes resultados sugerem que as cepas de *Aeromonas* spp isoladas neste estudo são produtoras de hemolisina, confirmando o potencial patogênico das mesmas.

BOULANGER e col. (1977)¹⁴, estudando *Aeromonas* spp isoladas de amostras ambientais, observaram que de 13 *A. hydrophila*, testadas para produção de hemólise em ágar sangue, 12 (92,3%) apresentaram β -hemólise e 1 (7,7%) α -hemólise; e, de 8 *A. sobria* 6 (75%) apresentaram β -hemólise e 2 (25%) apresentaram α -hemólise. Estes resultados são semelhantes aos observados no presente estudo (**Tabela 11**).

GRAY e col. (1990)³⁷, trabalhando com cepas ambientais de *Aeromonas* spp, observaram β -hemólise em 67,9% das *A. hydrophila*, 36,4% das *A. caviae* e 54,5% das *A. sobria*. Estes percentuais são inferiores aos encontrados neste trabalho para *A. hydrophila* e *A. sobria* e semelhantes aos encontrados para *A. caviae* (**Tabela 11**).

MONFORT & BALEAUX, 1991⁶⁹, estudando amostras ambientais observaram que 96% das *A. hydrophila* e 97% das *A. sobria* produziram β -hemólise e 5% das *A. caviae* eram β -hemolíticas.

SINGH & SANYAL (1992)⁹⁵, pesquisando cepas de origem ambiental, constataram que das *A. hydrophila*, testadas para produção de hemólise, 78,5% eram β -hemolíticas e 21,5% não produziram hemólise. Das *A. caviae* 69,9% eram β -hemolíticas e 27% α -hemolíticas. Das *A. sobria* 76,7% eram β -hemolíticas e 10% eram α -hemolíticas, o que se apresenta muito próximo dos resultados encontrados no presente estudo.

Constatou-se, considerando-se as 3 espécies frequentemente isoladas do ambiente (*A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*), que *A. hydrophila* apresentou, com maior frequência, cepas β -hemolíticas em relação as demais espécies, o que também foi observado por outros autores^{14,37,69,95}.

A frequência de β -hemólise em *A. jandaei* (100%), comparativamente as demais espécies estudadas, apresentou-se marcadamente superior. Este resultado sugere que *A. jandaei*, tenha, em sua totalidade, um elevado potencial patogênico para o homem, o que propicia um maior risco à saúde da população devido aos elevados números deste organismo no ambiente estudado.

Observou-se que das 42 cepas β -hemolíticas estudadas, 20 (47,6%) produziram acúmulo de fluido, com valores variando entre 0,25 e 0,49 ml/cm de alça, 11(26,2%) com volumes variando entre 0,50 e 0,99 ml/cm e 3 (7,14%) com valores acima de 1 ml/cm, sendo que 8 (19%) não apresentaram acúmulo de fluido. Das 10 cepas α -hemolíticas 4 (40%) apresentaram acúmulo variando entre 0,25 e 0,49 ml/cm, 1 (10%) apresentou acúmulo variando entre 0,50 e 0,99 e 5 (50%) não produziram acúmulo. Das 8 cepas não hemolíticas 4 (50%) acumularam fluido variando entre 0,25 e 0,49 ml/cm e 4 (50%) não produziram acúmulo.

Comparando-se o tipo de hemólise com a variação de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho observou-se, de forma geral, que as cepas β -hemolíticas produziram maior volume de acúmulo de fluido em alça ligada.

Das cepas β -hemolíticas isoladas no presente estudo, e que foram submetidas a

testes de virulência, foi observado acúmulo de fluido em alça ligada de coelho em 84,6% das *A. hydrophila*, em 80% das *A. caviae*, em 66,7% das *A. sobria* e em 86,7% das *A. jandaei*; entre as α -hemolíticas, em 50% das *A. hydrophila*, 80% das *A. caviae* e ausência em *A. sobria*; e, nas não hemolíticas, em 42,3% das *A. caviae* e em 33,3% das *A. sobria*.

SIINGH & SANYAL (1992)⁹⁵ observaram, para cepas β -hemolíticas, 72.7% das *A. hydrophila* produtoras de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, 68,6% das *A. caviae* e 58,6% das *A. sobria*; para as α -hemolíticas, 1 *A. sobria* e 1 *A. caviae* produziram acúmulo de fluido, enquanto que das não hemolíticas 1 *A. sobria* e 9 *A. caviae* produziram acúmulo.

As cepas β -hemolíticas produziram, com maior frequência, acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, que cepas α e não hemolíticas. Nestas cepas o acúmulo de fluido produzido se apresentou com valores acima de 0,50 ml/cm de alça em 33,3% das β -hemolíticas, comparado a apenas 10% das α -hemolíticas. Estes resultados também foram observados por MASCHER e col. (1988)⁶⁵ e SINGH & SANYIAL, (1992)⁹⁵.

BOULANGER e col. (1977)¹⁴, afirmam que a produção de hemólise em ágar sangue e a resposta secretória em alça ligada de coelho pode ser um indicativo do potencial do microrganismo, testado para produzir hemolisinas, enterotoxinas e citotoxinas.

Observou-se que *A. jandaei* além de ter produzido 100% de β -hemólise em ágar

sangue foi a espécie que revelou maior frequência de acúmulo de fluido em alça ligada, apresentando 8 cepas com valores acima de 0,50 ml/cm enquanto que apenas 2 cepas de *A. hydrophila*, 1 de *A. caviae* e 3 de *A. sobria* apresentaram esses valores. Os resultados observados são comparáveis aos produzidos por espécies, como *V. cholerae* e *E. coli*, comprovadamente produtores de enterotoxina^{60,67}.

KARUNAKARAN & DEVI (1994)⁴⁹ constataram que, após vários repiques em meio de cultura, *Aeromonas* spp pode diminuir sua capacidade de produção de hemolisina, e que, após algumas passagens em alça intestinal, essa característica volta a aparecer.

5 - CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos e dos fatos apresentados pode-se afirmar que:

- A frequência de amostras de água positivas para *A. hydrophila* (18,7%), *A. caviae* (31,2%), *A. sobria* (43,7%) e *A. jandaei* (76,6%), indica que pode haver risco à saúde da comunidade no contato com o ambiente estudado (Represa de Guarapiranga), principalmente quando se trata de indivíduos imunodeprimidos ou que apresentem outros fatores predisponentes.

- Os percentuais de amostras de *Aeromonas* spp que apresentaram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, 46,7% de 0,25 a 0,49 ml/cm de alça, 20% de 0,50 a 0,99 ml/cm e 5% superiores a 1,00 ml/cm, e o alto percentual (70%) de cepas que apresentaram β -hemólise em ágar sangue indicam o elevado potencial patogênico, e reforçam as evidências, em nosso meio, de que esse grupo de microrganismos é capaz de produzir agravos a saúde do homem.

- A ausência de correlação observada entre a presença de *Aeromonas* spp e as bactérias indicadoras de contaminação fecal (Coliformes totais e fecais), confirma que estes microrganismos são autóctones no ambiente estudado.

- A temperatura e pH, foram favoráveis durante todo período de estudo, à presença de espécie do gênero *Aeromonas*.

6. RECOMENDAÇÕES

Com base nas conclusões deste trabalho, e considerando-se que o risco de infecção com espécies de *Aeromonas* potencialmente patogênicas, está associado com a presença de fatores de resistência do hospedeiro; o uso recreacional ou ocupacional do ambiente aquático e com a utilização deste manancial como reservatório de água para tratamento e abastecimento público recomenda-se que:

- A pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas, deve ser estendida para mananciais de outras regiões do Brasil, de forma que se possa estabelecer sua distribuição, ecologia e taxonomia, o que viria a contribuir para a determinação da sua biodiversidade, bem como para área médica.

- Nos casos em que o paciente apresente doença infecciosa, relacionada ao contato com o ambiente aquático, considerar a possibilidade da presença de espécies de *Aeromonas* como agentes causais.

- Pacientes portadores de fatores predisponentes, como imunodepressão e problemas hepáticos, sejam orientados a evitar o contato com ambientes e alimentos que possam ser vias de transmissão destes microrganismos.

A ocorrência de *Aeromonas* spp de forma autóctone, indica, que a prevenção de casos de doença gastrointestinal, só será alcançada através da garantia de fornecimento

de água tratada à população, e também pela manipulação adequada de alimentos, sobretudo os que habitualmente são ingeridos crus, mesmo porque esses microrganismos são capazes de sobreviver, e até mesmo se multiplicar em temperaturas de refrigeração ^{27,54,77}.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- 1.ABRUTYN, E. Hospital associated infection from leeches. **Ann. Inter. Medicine**, **109**(5):356-8, 1988.
- 2.ALABI, S.A. & ODUGBEMI, T. Biochemical characteristics and simple scheme for the identification of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. **J. Tropic. Med. Hyg.**, **93**:166-9, 1990a.
- 3.ALABI, S.A. & ODUGBEMI, T. Occurrence of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* in patients with and without diarrhoea in Lagos, Nigeria. **J. Med. Microbiol.**, **32**:45-8, 1990b.
- 4.AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Standard methods for examination of water and wastewater**. 16th ed. Washington, 1985. p. 880-6. Estimation of bacterial density.
- 5.ANNAPURNA, E. & SANYAL, S.C. Enterotoxicity of *A. hydrophila*. **J. Med. Microbiol.**, **10**:317-23, 1977.
- 6.ARAUJO, R.M.; PARES, R.; LUCENA, F. The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* sp in coastal waters. **J. Appl. Bacteriol.**, **69**:439-44, 1990.

¹NB 66 norma adotada pela Faculdade de Saúde Pública, USP.

7. ARAUJO, R.M.; ARRIBAS, R.M.; PARES, R. Distribution of *Aeromonas* sp in waters with different levels of pollution. **J. Appl. Bacteriol.**, 71:182-6, 1991.
8. ASAO, T.; KINOSHITA, Y.; KOZAKI, S.; UEMURA, T.; SAKAGUCHI, G. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. **Infect. Immun.**, 46(1):122-7, 1984.
9. ASAO, T.; KOZAKI, S.; YONEDA, N.; KURDKAWA, A.; KAMATA, Y.; SAKAGUCHI, G. Characterisation of *A. sobria* haemolysin. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 6(2):147, 1988.
10. ASHDOWN, L.R. & KOEHLER, J. The spectrum of *Aeromonas*-associated diarrhea in tropical Queensland, Australia. **Southeast Asean J. Trop. Med. Public Health**, 24(2):347-53, 1993.
11. BADDOUR, L.M. & BASELSKI, V.S. Pneumonia due to *A. hydrophila*-complex: epidemiologic, clinical, microbiological features. **South. Med. J.**, 81(4):461-3, 1988.
12. BATEMAN, J.L.; TU, R.P.; STRAMPFER, M.J.; CUNHA, B.A. *A. hydrophila* cellulitis and wound infections caused by waterborne organisms. **Heart & Lung**, 17(1):99-102, 1988.

13. BERNADESCHI, P.; BONECHI, I.; CAVALLINI, G. *A. hydrophila* infection after cokes ingestion. **Haematologica**, **73**(6):548-9, 1988.
14. BOULANGER, Y.; LALLIER, R.; COUSINEAU, G. Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. **Can. J. Microbiol.**, **23**(9):1161-4, 1977.
15. BUCKLEY, J.T.; HALASA, L.N.; LUND, K.D.; MacINTYRE, S. Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. **Can. J. Biochem.**, **59**:430-5, 1981.
16. BURKE, V.; ROBINSON, J.; GRACEY, M.; PETERSON, D.; MEYER, N.; HALEY, V. Isolation of *Aeromonas* spp. from an unchlorinated domestic water supply. **Appl. Environ. Microbiol.**, **48**(2):367-70, 1984a.
17. CAILLEAUX, U.; DUPONT, M.J.; HORY, B.; AMSALLEM, D.; MICHEL-BRIAND, Y. Why did infection with *A. hydrophila* occur when water contains so many other microorganisms? **Clin. Infect. Dis.**, **16**(1):174, 1993.
18. CARNAHAN, A.M. & JOSEPH, S.W. *Aeromonas* update: new species and global distribution. **Experientia**, **47**:402-3, 1991a.

- 19.CARNAHAN, A.M.; BEHRAMS, S.; JOSEPH, S.W. Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. **J. Clin. Microbiol.**, **29**(12):2843-9, 1991b.
- 20.CARNAHAN, A.M.; CHAKRABORTY, T.; FANNING, G.R.; VERMA, D.; ALI, A.; JANDA, J.M.; JOSEPH, S.W. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin susceptible species isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **29**(6):1206-10, 1991c.
- 21.CHALLAPALLI, M.; TESS, B.R.; CUNNINGHAM, D.G.; CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. *Aeromonas* associated diarrhea in children. **Pediatric Infect. Dis. J.**, **7**(10):693-8, 1988.
- 22.CHOWDHURY, M.A.R.; YAMANAKA, H.; MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Ecology of mesophilic *Aeromonas* spp in aquatic environments of a temperate region and relationship with some biotic and abiotic environmental parameters. **Zbl. Hyg.**, **190**:344-56, 1990.
- 23.DAVIS, P.J. & STIRLING, A.J. *Aeromonas hydrophila* wound infection associated with water immersion: an unusual football injury. **Injury**, **24**(9):633-4, 1993.

- 24.DE, S.N. & CHATTERJEE, D.N. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. **J. Pathol. Bacteriol.**, 66:559-62, 1953.
- 25.Del VAL, A.; MOLÉS, J.R.; GARRIGUES, V. Very prolonged diarrhea associated with *A. hydrophila*. **Am. J. Gastreterology**, 85(11):1535, 1990.
- 26.DEODHAR, L.P.; SARASWATHI, K.; VARUDKAR, A. *Aeromonas* sp and their association with human diarrheal disease. **J. Clin. Microbiol.**, 29(5):853-6, 1991.
- 27.ELEY, A.; GEARY, I.; WILCOX, M.H. Growth of *Aeromonas spp* at 40°C and related toxin production. **Appl. Microbiol. Let.** 16:36-9, 1993.
- 28.FIGUEROA, G.; GALENO, H.; SOTO, V.; TRONCOSO, M.; HINRICHSEN, V.; YUDELEVICH, A. Enteropathogenicity of *Aeromonas* species isolated from infants: A cohort study. **J. Infect.**, 17:205-13, 1988.
- 29.FRANCO, M.A.; SANTINI, P.I.; KOROL, S.; MORETTON, J.; DOMINGUEZ, N.; D'AQUINO, M. In vitro survival of pathogenic microorganisms in recreational water. **Rev. Lat-amer. Microbiol.**, 32:149-52, 1990.

- 30.GARCIA, M.; SANROMAN, A.L.; GISBERT, J.P.; ARGILA, C.M.; MOREIRA, V.F. *A. sobria* spontaneous bacterial peritonitis. **Am. J. gastroenterol.**, **87**(12):1890, 1992
- 31.GEMMEL, C.G. Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. **J. Med. Microbiol.**, **17**:217-35, 1984.
- 32.GHENGHESH, K.F. *Aeromonas*: Epidemiological aspects and virulence factors. São Paulo. (1989)./ Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina/.
- 33.GLUSKIN, I.; BATASH, D.; SHOSEYOV, D.; MOR, A.; KAZAR, R.; AZIZI, E.; BOLDUR, I. A 15 year study of the role of *Aeromonas* spp in gastroenteritis in hospitalised children. **J. Med. Microbiol.**, **37**:315-8, 1992.
- 34.GONZALEZ, P.R.; ESCOLANO, C.; RODRIGUEZ, J.C.; SILLERO, C.; ROYO, G. *A. sobria* spontaneous bacterial peritonite and bacteremia. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**(2):290-1, 1994.
- 35.GOSLING, P.J.; TURNBULL, P.C.B.; LIGHTFOOT, N.F.; PETHER, J.V.S.; LEWIS, R.J. Isolation and purification of *Aeromonas sobria* cytotoxic enterotoxin and β -hemolysin. **J. Med. Microbiol.**, **38**:227-34, 1993.

36. GRACEY, M. Gastro enteritis in Australian children: studies on the aetiology of acute diarrhoea. **Ann. Trop. Pediatrics**, **8**:68-75, 1988.
37. GRAY, S.J.; STICKLER, D.J.; BRYANT, T.N. The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from farm animals and their environment. **Epidemiol. Infect.**, **105**:277-94, 1990.
38. GREY, P.A.; KIROV, S.M. Adherence to HEp-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas* spp. **Epidemiol. Infect.**, **110**:279-87, 1993.
39. HANSON, P.G.; STRANDRIDGE, J.; JARRETT, F.; MAKI, D.G. Freshwater wound infection due to *A. hydrophila*. **J. Amer. Med. Assoc.**, **238**(10):1053-4, 1977.
40. HICKMAN-BRENNER, F.W.; MAC DONALD, K.L.; STEIGERWALT, A.G.; FANNING, G.R.; BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. *A. veronii* a new ornithine decarboxylase positive species that may cause diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, **25**(5):900-6, 1987.

- 41.HICKMAN-BRENNER, F.W.; FANNING, G.R.; ARDUINO, M.J.; BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 26(8):1561-4, 1988.
- 42.HOUSTON, C.W.; CHOPRA, A.K.; ROSE, J.M.; KUROSKY, A. Review of *Aeromonas* enterotoxins. **Experientia**, 47:424-9, 1991.
- 43.HSUNG, G.D. Wound infection due to *A. sobria*. **Clin. Infect. Dis.**, 17:1082-3, 1993.
- 44.HUSSLEIN, V.; BERGBAUER, H.; CHAKRABORTY, T. Studies on aerolysin and a serine protease from *Aeromonas trota* sp. nov. **Experientia**, 47:420-1, 1991.
- 45.JACOB, L.; CARRON, B.; HAJI, C.; ROBERTS, W. An unusual case of pyogenic meningitis due to *A. sobria*. **Br. J. Hosp. Med.**, 39(5):449, 1988.
- 46.JANDA, J.M. & DUFFEY, P.S. Mesophilic Aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum. **Rew. Infect. Disease**, 10(5):980-97, 1988.

47. JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.; ROLLINS, D.; WALKER, R.I. *Aeromonas* and *Plesiomonas* in the environment: value of differential biotyping of *Aeromonads*. **J. Diarr. Dis. Res.**, 6(2):80-7, 1988.
48. JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.W.; BRAYTON, P.R.; FANNING, G.R.; ALMAZAN, R.; DRABICK, C.; TRUDO JR., E.W.; COLWEEL, R.R. *A. jandaei* and *A. veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. **J. Clin. Microbiol.**, 29(3):565-9, 1991.
49. KARUNAKARAN, T. & DEVI, B.G. Characterisation of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. **Epidemiol. Infect.**, 112:291-8, 1994.
50. KELLY, M.T.; DAN STROH, E.M.; JESSOP, J. Comparison of blood agar, ampicillin blood agar, macconkey-ampicilin-tween agar and modified cefsulodin-igarsan-novobiocin agar for isolation of *Aeromonas* spp from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 26(9):1738-40, 1988.
51. KELLY, K.A.; KOEHLER, J.M.; ASHDOWN, L.R. Spectrum of extraintestinal disease due to *Aeromonas* species in tropical Queensland, Australia. **Clin. Infect. Dis.**, 16:574-9, 1993.

- 52.KHARDORI, N. & FAINSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Ann. Rev. Microbiol.**, 42:395-419, 1988.
- 53.KING, E.G.; WERNER, S.B.; KIZER, K.W. Epidemiology of *Aeromonas* infections in California. **Clin. Infect. Dis.**, 15:449-52, 1992.
- 54.KIROV, S.M.; ARDESTANI, E.K.; HAYWARD, L.J. The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. **Int. J. Food Microbiol.**, 20:159-69, 1993.
- 55.KIROV, S.M. The public health significance of *Aeromonas* spp in foods. **Int. J. Food Microbiol.**, 20:179-98, 1993.
- 56.KOKKA, R.P.; LINDQUIST, D.; ABBOTT, S.L.; JANDA, J.M. Structural and pathogenic properties of *Aeromonas schubertii*. **Infect. Imm.**, 60(5):2075-82, 1992.
- 57.KOOLJ, D.V.D. Properties of *Aeromonas* and their occurrence and hygienic significance in drink water. **Zbl. Bakt. Hyg.**, 187:1-17, 1988.

58. LeBLANC, M.; DELAGE, G.; ROUSSEAW, E.; DOBRESCU, O.; BONNIN, A.C.B. Prévalence d'*Aeromonas* spp. dans les gastro-entérites de l'enfant. **CMAJ**, **138**:714-7, 1988.

59. LINEAWEAVER, W.C.; FOLLANSBEE, S.; HING, D.N. Cefotaxime sensitive *A. hydrophila* infection in a revascularized foot. **Ann. Plastic. Surg.**, **20**(1):322-5, 1988.

60. LJUNG, A. & WADSTROM, T. *Aeromonas* toxins In: DORNER, F. & DREWS, J., **Pharmacology of bacterial toxins**, Pergamon Press, New Haven, 1986, p.289-305.

61. LJUNG, A. *Aeromonas* toxins and other virulence factors. **Experientia**, **43**:367-8, 1987.

62. LOEWY, A.G.; SANTER, U.V.; WIECZOREK, M.; BLODGETT, J.K.; JONES, S.W.; CHERONIS, J.C. Purification and characterization of a novel zinc proteinase from cultures of *A. hydrophila*. **J. Biol. Chemistry**, **268**(12):9071-8, 1993.

63. MARTIN, A.L. & McPHEARSON; R.M. Haemolytic activity and antimicrobial resistance in clinical and environmental *Aeromonas* spp. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, **6**(2)146, 1988.

- 64.MARTINEZ-MURCIA, A.J.; ESTEVE, C.; GUARAY, E.; COLLINS, M.D. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiol. Let.**, **91**:199-206, 1992.
- 65.MASCHER, F.; REINTHALER, F.F.; STUNZNER, D.; LAMBERGER, B. *Aeromonas* species in a municipal water supply of a central European city: Biotyping of strains and detection of toxins. **Zbl. Bakt. Hyg.**, **186**:333-7, 1988.
- 66.MATEOS, D.; ANGUITA, J.; RIVERO, O.; NAHARRO, G.; PANIAGUA, C. Comparative study of virulence and virulence factors of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from water and sediments of a river. **Zbl. Hyg.**, **193**:114-22, 1992.
- 67.MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; SATO, M.I.Z.; SANCHEZ, P.S.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **J. Appl. Bacteriol.**, **77**:281-7, 1994.
- 68.MONFORT, P. & BALEUX, B. Dynamics of *A. hydrophila*, *A. sobria*, and *A. caviae* in a sewage treatment pond. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56**(7):1999-2006, 1990.

69. MONFORT, P. & BALEUX, B. Haemolysin occurrence among *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* strains isolated from different aquatic ecosystems. **Res. Microbiol.**, **142**:95-102, 1991.
70. MONFORT, P. & BALEUX, B. Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp in brackish water receiving sewage treatment effluent. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**(9):2459-67, 1991.
71. MORENA, M.L.; VAEN, R.; SINGH, K.; BRIAN, M.; MURRAY, B.E.; PICKERING, L.K. Diarrhea associated with *Aeromonas* species in children in day care centers. **J. Infect. Dis.**, **168**:215-8, 1993.
72. MORITA, K.; WATANABE, N.; KURATA, S.; KANAMORI, M. β -lactam resistance of motile *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38**(2):353-5, 1994.
73. NEVES, M.S.; NUNES, M.P.; MILHOMEM, A.M.; RICCIARDI, I.D. Production of enterotoxin and cytotoxin by *A. veronii*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **23**:437-40, 1990.
74. NEWTON, J.A. & KENNEDY, C.A. Wound infection due to *Aeromonas sobria*. **Clin. Infect. Dis.**, **17**:1082-3, 1993.

75. NISHIKAWA, Y. & KISHI, T. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. **Epidem. Infect.**, **101**:213-23, 1988.
76. NISHIKAWA, Y.; KIMURA, T.; KISHI, T. Manose-resistant adhesion of motile *Aeromonas* to INT 407 cells and the differences among isolates from humans, food and water. **Epidemiol. Infect.**, **107**:171-9, 1991.
77. NISHIKAWA, Y.; OGASAWARA, J.; KIMURA, T. Heat and acid sensitivity of motile *Aeromonas*: a comparison with other food-poisoning bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** **18**:271-8, 1993.
78. PARRAZ, F.; DIAZ, M.D.; REINA, J.; MORENO, S.; GERRERO, C.; BOUZA, E. Meningitis due to *Aeromonas* species: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, **17**:1058-60, 1993.
79. PATHAK, S.P.; BHATTACHERJEE, J.W.; KARLA, N.; CHANDRA, S. Seasonal distribution of *A. hydrophila* in river water and isolation from river fish. **J. Appl. Bacteriol.**, **65**:347-52, 1988.
80. PAYMENT, P.; GAMACHC, F.; PAQUETTE, G. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. **Can. J. Microbiol.**, **34**(12):1304-9, 1988.

81. POFFÉ, R. & BEECK, E.O. Enumeration of *A. hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. **J. Appl. Microbiol.**, 71:366-70, 1991.

82. POIRIER, T.; LAURENS, E.; VIAUD, J.Y.; POUJOL, B.; LORRE, G. Pneumopathie nosocomiale à *Aeromonas hydrophila* compliquant un coma toxique. **Ann. Fr. Anesth. Réanim.**, 12:72-4, 1993.

83. POPOFF, M. *Aeromonas* In: MURRAY, R.G.E.; BRENNER, D.J.; BRYANT, M.T.; HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; MOULDER, J.W.; PFENNIG, N.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY** Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984, 1^o ed, V 1 p. 545-8.

84. REVORD, M.E.; GOLDFARB, J.; SHURIN, S.B. *A. hydrophila* wound infection in a patient with cyclic neutropenia following a piranha bite. **Pediatrics Infect. Dis. J.**, 7(1):70-1, 1988.

85. ROLSTON, K.V.I. Human extraintestinal infections caused by *Aeromonas* species. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 6(2):99-102, 1988.

86. ROLSTON, K.V.I.; ZANDULIET, S.E.; RODRIGUEZ, S.; NEUYEN, H.T.; BODEY, G.P. Spectrum of *Aeromonas* and *Plesiomonas* infections in patients with cancer and AIDS. **Experientia**, 47:437-9, 1991.

- 87.SACHO, H.; MOORE, P.J.; HIDE, G.R. Aquatically acquired *A. hydrophila* wound infection. **South. Afr. Med. J.**, 78:339-40, 1990.
- 88.SACK, D.A.; CHOWDHURY, K.A.; HUQ, A.; KAY, B.A.; SAYEED, S. Epidemiology of *Aeromonas* and *Plesiomonas* diarrhoea. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 6(2):107-12, 1988.
- 89.SANYAL, S.C.; SINGH, S.J.; SEN, P.C. Enteropathogenicity of *A. hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. **J. Med. Microbiol.**, 3:195-9, 1975.
- 90.SEIDLER, R.J.; ALLEN, D.A.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R.R.; JOSEPH, S.W.; DAILY, O.P. Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. **Appl. Environ. Microbiol.**, 39(5):1010-8, 1980.
- 91.SEYMOUR, C.; LONGO, K.T.; RUBIN, S.J. Enhanced isolation of enteric *A. hydrophila* by enrichment in alkaline peptone water (APW). **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 6(2):138-9, 1988.
- 92.SEYMOUR, C. & RANK, E.L. Effect of enrichment and selection for enteric *Aeromonas* on frequency and clinical significance of isolates. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 6(2):139, 1988.

- 93.SINGH, D.V.; SANYAL, S.C. Production of chitinase by enterotoxigenic *Aeromonas* species isolated from clinical and environmental sources. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 10(4):213-6, 1992.
- 94.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Biochemical characteristics and enterotoxicity of *Aeromonas* species from man and environment. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 10(4):231-4, 1992.
- 95.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **J. Med. Microbiol.**, 36:269-72, 1992.
- 96.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp. **J. Med. Microbiol.**, 37:267, 1992.
- 97.SINGH, D.V.; DUBEY, R.S.; SANYAL, S.C. Adherence of haemagglutinating and non haemagglutinating clinical and environmental isolates of *Aeromonas*. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 11(3):157-60, 1993.
- 98.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Haemagglutinating activity, serum sensitivity and enterotoxigenicity of *Aeromonas* spp. **J. Med. Microbiol.**, 38:49-53, 1993.

- 99.SLEVIN, N.J.; OPPENHEIM, B.A.; DEAKIN, D.P. *A. hydrophila* septicemia and muscle abscesses associated with immunosuppression. **Postgraduate Med. J.**, **64**:701-2, 1988.
- 100.STELMA Jr., G.N.; JOHNSON, C.H.; SPAULDING, P.L. Experimental evidence for enteropathogenicity in *A. veronii*. **Can. J. Microbiol.**, **34**:877-80, 1988.
- 101.THISYAKORN, U. & THISYAKORN, C. *Aeromonas* infection following a snake bite: A case report. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.**, **19**(2):307-8, 1988.
- 102.VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S.D.; NAVARATNAM, P. Enterotoxin profiles of clinical isolates of *A. hydrophila*. **J. Med. Microbiol.**, **35**:363-7, 1991.
- 103.Von GRAEVENITZ, A. & ALTWEGG, M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* In: BALOWS, A. **Manual of Clinical Microbiology**, 5^a ed., p.396-401, 1991. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 104.WADSTROM, T.; LJUNGH, A.; WRETLIND, B. Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *A. hydrophila* from human infections. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect.**, **84**:112-4, 1976.

105. WES.T, P.A. & COLWELL, R.R. Identification and classification of *Vibrionaceae* an overview In: COLWELL, R.R. & HATEN, M.B. **Vibrios in the environment**. New York, John Wiley Sons, 1983, p. 285-363.

8. RESUMO

No presente estudo 64 amostras de água de superfície e 24 amostras de sedimento provenientes da Represa de Guarapiranga, SP, foram submetidas à técnica dos tubos múltiplos para a pesquisa de *Aeromonas* spp. As amostras eram submetidas a enriquecimento com água peptonada alcalina (APA), adicionado de 1% de cloreto de sódio, pH 8,6 e isoladas em agar sangue contendo 10 mg/l de ampicilina. As colônias que se apresentavam hemolíticas ou não, eram submetidas a triagem pelos testes de oxidase e agar ferro de Kligler (Difco) e confirmadas através de provas bioquímicas complementares. Foram isoladas *A. hydrophila* em 18,7% das amostras, *A. caviae* em 31,2%, *A. sobria* em 43,7% e *A. jandaei* em 76,6%. Não foi observada a correlação das espécies isoladas com temperatura da água, pH da amostra ou contagens de indicadores de contaminação fecal. As maiores contagens de *Aeromonas* spp foram encontradas em amostras de sedimento. Do total de cepas isoladas, 15 de *A. hydrophila*, 15 de *Aeromonas caviae*, 15 de *A. sobria* e 15 de *A. jandaei* foram submetidas ao teste de alça ligada em coelhos e teste de hemólise em ágar sangue de coelho e humano. A pesquisa de fatores de virulência revelou que 80% das cepas de *A. hydrophila*, 73,3% de *A. caviae*, 46,7% de *A. sobria* e 86,6% de *A. jandaei* causaram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho e que 86,6% de *A. hydrophila*, 33,3% de *A. caviae*, 60% de *A. sobria* e 100% de *A. jandaei* foram produtoras de β -hemólise em ágar sangue, confirmando o elevado potencial patogênico desses microrganismos. Considerando os resultados obtidos pode-se concluir que cepas de *Aeromonas* isoladas de ambiente aquático são capazes de produzir fatores de virulência que constituem um risco à saúde da população.

9. ABSTRACT

In this work, 64 superficial water samples and 24 of sediment, were collected from Guarapiranga dam in the State of São Paulo, Brazil, and were analysed to the presence of *Aeromonas* spp. Enrichment of samples were made in Alkaline Peptone Water (APW) with sodium chloride 1%, pH 8,6. Blood Agar Ampicilin (10g/l) were used as isolation medium. Colonies that were hemolytic or not, were submitted to oxidase test and Kligler Iron Agar (difco), and were confirmed through complementar biochemical tests. *A. hydrophila* were isolated in 18,7% of the samples, *A. caviae* in 31,2%, *A. sobria* in 43,7%, and *A. jandaei* in 76,6%. No correlation was observed between *Aeromonas* sapecies neither with temperature or pH, nor with fecal contaminantion indicators. The highests values of *Aeromonas* spp, were observed in sediment samples. From the total of strains that were isolated, 15 of *A. hydrophila*, 15 *A. caviae*, 15 *A. sobria* and 15 of *A. jandaei*. were submitted to the rabbit ileal loop assay and to the hemolysis producion on Blood agar with human and rabbit erytrocyts. The virulence facters reseach revealed that 80% of *A. hydrophila*, 73,3% of *A. caviae*, 46,7 of *A. sobria* and 86,8% of the *A. jandaei* were able to cause fluid accumulation in rabbit ileal loop, and, 86,6% of *A. hydrophila* strains, 33,3% of *A. caviae*, 60% of *A. sobria* and 100% of *A. jandaei* produced β -hemolysis in blood agar. these results confirms the pathogenic potential of these microorganisms. Considering the given results, it was concluded that *Aeromonas* strains, isolated from this environment are able to produce virulence factors that are considered a risk to public health.