# MARIA HELENA MATTÉ

RIBOTIPAGEM DE Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria e Aeromonas jandaei, POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS, ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO RESERVATÓRIO DE GUARAPIRANGA, SÃO PAULO.



Tese de Doutorado apresentada junto ao Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de "Doutor em Saúde Pública".

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Associada Sandra M. O. O. Nitrini. Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Irma. N. G. Rivera

# ÍNDICE

| 1. INTRODUÇÃO   | 1  |
|---|----|
| 1.1. A Represa de Guarapiranga  | 1  |
| 1.2. Características do Gênero Aeromonas                              | 1  |
| 1.3. Caracterização Fenotípica e Genotípica do Gênero Aeromonas       | 5  |
| 1.3.1. Métodos Fenotípicos  | 5  |
| 1.3.2. Métodos Genotípicos  | 7  |
| 1.3.2.1. Digestão com Enzimas de Restrição                            | 9  |
| 1.3.2.2. Hibridização   | 10 |
| 1.3.2.3. Ribotipagem  | 12 |
| 1.3.2.4. Reação em Cadeia de Polimerase                               | 13 |
| 1.3.2.5. Análise do Perfil Plasmidial                                 | 17 |
| 1.3.2.6. Eletroforese em Campo Pulsado                                | 23 |
| 1.3.2.7. Sequênciamento.  | 24 |
| 1.4. Aplicação de Métodos Moleculares para Estudo do Gênero Aeromonas | 25 |
| 1.5. Caracterização de Fatores de Virulência                          | 30 |
| 1.6. Aplicação de Métodos Moleculares para Estudos Epidemiológicos    | 35 |
| 2.OBJETIVOS   | 41 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS   | 43 |
| 3.1. Estocagem das culturas   | 43 |
| 3.2. Extração do DNA Genômico   | 45 |
| 3.2.1. Tratamento com Ribonuclease                                    | 46 |
| 3.2.2. Concentração do DNA Genômico                                   | 46 |
| 3.2.3. Qualidade do DNA Genômico.                                     | 46 |
| 3.2.3.1. Preparo da Amostra para Eletroforese                         | 47 |
| 3.2.3.2. Marcador de Peso Molecular                                   | 47 |
| 3.3. Ribotipagem  | 47 |
| 3.3.1. Digestão com Enzimas de Restrição                              | 48 |
| 3.3.2. Transferência dos segmentos de DNA para Membrana de Nylon      | 48 |
| 3.3.3. Preparo da Sonda Genética.                                     | 49 |
| 3.3.3.1 Extração da Sonda Genética                                    | 49 |

| 3.3.3.2. Marcação da Sonda Genética                                   | 51         |
|---|------------|
| 3.3.4. Pré Hibridização e Hibridização                                | 51         |
| 3.3.5. Lavagem das Membranas, Hibridização e Detecção da Hibridização | 53         |
| 3.3.6. Medida das Bandas  | 53         |
| 3.4. Extração do DNA Plasmidial                                       | 53         |
| 3.5. Análise dos Dados  | 54         |
| 3.5.1. Ribotipagem  | 55         |
| 3.5.2. Perfil Plasmidial  | 55         |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 56         |
| 4.1. Ribotipagem  | 56         |
| 4.1.1. Extração do DNA Genômico                                       | 56         |
| 4.1.2. Digestão com Enzimas de Restrição                              | 57         |
| 4.1.3. Hibridização   | 63         |
| 4.1.4. Análise dos Perfis de Ribotipagem                              | 66         |
| 4.2 Perfil Plasmidial   | 82         |
| 5. CONCLUSÃO  | 92         |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 95         |
| 7. RESUMO   | 115        |
| 8. ABSTRACT   | 116        |
| 9. ANEXOS   | , III e IV |

# ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

| FIGURA 1. Pontos de amostragem do Reservatório de Guarapiranga, São Paulo, de         |
|---|
| onde foram isoladas as cepas de <i>Aeromonas</i> spp44                                |
| FIGURA 2. DNA genômico de cepas de Aeromonas submetidas à digestão com                |
| enzimas de restrição Sma I  |
| FIGURA 3. Perfil de digestão com enzima de restrição Pst I, de diferentes espécies de |
| Aeromonas, 199662   |
| FIGURA 4. Perfil de digestão com enzima de restrição Pst I, de diferentes espécies de |
| Aeromonas, e hibridização das bandas de restrição com sonda genética albergando os    |
| fragmentos 5S, 16S e 23S do rRNA de E. coli   |
| FIGURA 5. Representação gráfica da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente     |
| de similaridade de Dice, das cepas de Aeromonas hydrophila, isoladas da Represa de    |
| Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem,                    |
| 1996  |
| FIGURA 6. Representação gráfica da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente     |
| de similaridade de Dice, das cepas de Aeromonas caviae, isoladas da Represa de        |
| Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem,                    |
| 1996  |
| FIGURA 7. Representação gráfica da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente     |
| de similaridade de Dice, das cepas de Aeromonas sobria, isoladas da Represa de        |
| Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem,                    |
| 1996  |
| FIGURA 8. Representação gráfica da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente     |
| de similaridade de Dice, das cepas de Aeromonas jandaei, isoladas da Represa de       |
| Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem,                    |
| 1996  |
| FIGURA 9. Frequência de plasmídios observados em cepas de Aeromonas                   |
| hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria e Aeromonas jandaei, isoladas da       |
| Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1996  |
| FIGURA 10. Frequência do número de plasmídios obtidos, segundo as diferentes          |
| espécies de Aeromonas, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1996           |
| 84  |

| FIGURA 11. Perfil plasmidial de cepas de Aeromonas hydrophila, utilizando a           |
|---|
| metodologia de BIRNBOIM & DOLY (1988), isoladas da Represa de Guarapiranga,           |
| São Paulo, 199686   |
| FIGURA 12. Perfil plasmidial de cepas de Aeromonas sobria, utilizando a               |
| metodologia de BIRNBOIM & DOLY (1988), isoladas da Represa de Guarapiranga,           |
| São Paulo, 1996   |
| FIGURA 13. Perfil plasmidial de cepas de Aeromonas jandaei, utilizando a              |
| metodologia de BIRNBOIM & DOLY (1988), isoladas da Represa de Guarapiranga,           |
| São Paulo, 1996   |
| QUADRO 1. Reações bioquímicas esperadas para espécies do gênero Aeromonas             |
| empregadas para classificação das cepas isoladas do reservatório de Guarapiranga, São |
| Paulo, 19926  |
| QUADRO 2. Distribuição das cepas de Aeromonas hydrophila, segundo o ponto de          |
| isolamento no reservatório de Guarapiranga, São Paulo, a concentração de DNA          |
| obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, |
| 1996  |
| QUADRO 3. Distribuição das cepas de Aeromonas caviae, segundo o ponto de              |
| isolamento no reservatório de Guarapiranga, São Paulo, a concentração de DNA          |
| obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, |
| 199658  |
| QUADRO 4. Distribuição das cepas de Aeromonas sobria, segundo o ponto de              |
| isolamento no reservatório de Guarapiranga, São Paulo, a concentração de DNA          |
| obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, |
| 199659  |
| QUADRO 5. Distribuição das cepas de Aeromonas jandaei, segundo o ponto de             |
| isolamento no reservatório de Guarapiranga, São Paulo, a concentração de DNA          |
| obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, |
| 199659  |
| QUADRO 6. Resultados observados do estudo de ribotipagem de Aeromonas                 |
| hydrophila, isoladas do reservatório de Guarapiranga, São Paulo, de acordo com os     |
| perfis apresentados, o ponto de isolamento e o comportamento frente à diferentes      |
| característica fenotípicas71  |

| QUADRO 7. Resultados observados do estudo de ribotipagem de Aeromonas caviae,         |
|---|
| isoladas do reservatório de Guarapiranga, São Paulo, de acordo com os perfis          |
| apresentados, o ponto de isolamento e o comportamento frente à diferentes             |
| característica fenotípicas  |
| QUADRO 8. Resultados observados do estudo de ribotipagem de Aeromonas sobria,         |
| isoladas do reservatório de Guarapiranga, São Paulo, de acordo com os perfis          |
| apresentados, o ponto de isolamento e o comportamento frente à diferentes             |
| característica fenotípicas  |
| QUADRO 9. Resultados observados do estudo de ribotipagem de Aeromonas                 |
| jandaei, isoladas do reservatório de Guarapiranga, São Paulo, de acordo com os perfis |
| apresentados, o ponto de isolamento e o comportamento frente à diferentes             |
| característica fenotípicas80  |
| TABELA 1. Número e porcentagem de plasmídios presentes em cepas de Aeromonas,         |
| segundo a espécie, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo,                    |
| 199683  |
| TABELA 2. Distribuição das cepas de diferentes espécies de Aeromonas segundo o        |
| número e a porcentagem de plasmídios observados83                                     |

À Profa. Associada SANDRA MARIA OTTATI DE OLIVEIRA NITRINI, pela segura orientação e estímulo na elaboração desse trabalho.

À Dra. IRMA NELLY GUTIERREZ RIVERA, pelo apoio e dedicação durante o desenvolvimento desse trabalho

Aos meus pais,
ROBERTO E LOURDES,
apoio constante nas decisões dificeis;

# Ao GLAVUR

À ELISA,
que acompanhou e sentiu mais que ninguém
o significado de um Doutorado;

#### **AGRADECIMENTOS**

- À FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA, pelo apoio prestado;
- Ao LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela acolhida durante a realização da parte experimental deste trabalho;
- Às BIBLIOTECÁRIAS da Faculdade de Saúde Pública USP, pela colaboração na realização do levantamento e revisão bibliográfica;
- À Juana Gismero Ordonez, Paula Valença Bertacini, Consuelo Lucia Souza de Lima, Maria Natalia de Oliveira, Renata Ribeiro Do Val e Debora Elizabete Alvarado Iparragire, pela colaboração valiosa no desenvolvimento da parte técnica;
- Aos Doutores ARMSTRONG, J.S, GIBBIS, A.J., PEAKALL, R. E WEILLER, G. pelo fornecimento do "software" "RAPDistance" obtido via ftp ou WWW: ftp://life.anu.edu.eu/pub/RAPDistance ou http:// life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html
- À todos aqueles que colaboraram possibilitando a realização deste trabalho.

# 1. INTRODUÇÃO

# 1.1. A Represa de Guarapiranga

A represa de Guarapiranga está localizada a 23°43' Sul e 46° 32' Oeste, a uma altitude de 742 metros; apresenta uma área inundada de aproximadamente 33 Km² fazendo parte da sub bacia do alto Tietê, à qual está ligada através do canal do Rio Pinheiros, no Estado de São Paulo.

Construída em 1906, pela barragem do Rio Guarapiranga e seus afluentes, com a finalidade de regularizar a vazão e para ampliar a produção de energia elétrica, passou, em 1926, a servir ao abastecimento público destinado à cidade de São Paulo. Atualmente esse sistema supre cerca de 3,5 milhões de pessoas de vários municípios de São Paulo, e também é utilizado com finalidades recreacionais, de controle de enchentes e geração de energia 14,24,27.

#### 1.2 Características gerais do gênero Aeromonas

O gênero *Aeromonas* pertence à família *Vibrionaceae*. Segundo o "BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY" (1984)<sup>112</sup>, esse 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 imóveis ou móveis com flagelo polar; são produtoras da enzima citocromo oxidase; são capazes de produzir apenas ácido, ou ácido e gás a partir de carboidratos e possuem metabolismo oxidativo e/ou fermentativo; crescem na ausência de cloreto de sódio. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0°C e 5°C, a máxima entre 38°C e 41°C e a ótima entre 22°C e 28°C; os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0.

São resistentes ao agente vibriostático O129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil timidina); e, algumas cepas são hemolíticas, quando cultivadas em ágar sangue, e em sua maioria são produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinase 69,82,84,96,112,124,125,126,127,128,137

Este gênero pode ser dividido em dois grupos, o primeiro que inclui as formas imóveis, composto pela *A. salmonicida* com 4 sub-espécies: *salmonicida*, *achromogenes*, *mausocida* e *smithia*, responsáveis por doenças em peixes. O segundo grupo, que é composto por formas móveis, que podem apresentar patogenicidade para o homem, atualmente encontrando-se as seguintes espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. veronii*, *A. trota*, e *A. allosaccharophila*<sup>9,22,23,52,53,61,64,91</sup>.

Espécies do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídas em ambientes de águas doce, salgada e salobra, compondo a microbiota de peixes e anfibios<sup>141</sup>. O número de bactérias no ambiente pode ser aumentado pelo ciclo oral-fecal, no entanto esse dependerá mais dos fatores ecológicos, do que da própria contaminação de origem humana. A sobrevivência de espécies de *Aeromonas* no ambiente aquático dependerá de fatores abióticos destacando-se pH, temperatura, potencial de oxidoredução, pressão osmótica, nutrientes e radiação; e de fatores bióticos relacionados à interação entre microrganismos como sinergismo, competição, antagonismo, amensalismo, comensalismo e parasitismo <sup>11,69,70</sup>.

Diversas pesquisas demonstraram que microrganismos do gênero *Aeromonas* podem ser isolados de amostras de água destinadas ao abastecimento público, mesmo naquelas que tenham recebido algum tipo de tratamento, clorada ou não<sup>72,92,107</sup>. Em um trabalho de análise da presença de *Aeromonas* em amostras provenientes das diversas

fases do tratamento de água, realizado no Laboratório de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública, USP em 1996<sup>1</sup>, foi observado que é possivel detectar a presença desses microrganismos nessas amostras mesmo na ausência de bactérias indicadoras de contaminação fecal.

A presença de *Aeromonas* em elevadas concentrações, em águas superficiais utilizadas para abastecimento público, representa um fator agravante na dificuldade de redução desses organismos após o processo de tratamento, uma vez que não sendo totalmente eliminados, podem voltar a crescer no sistema de armazenamento, embora *E. coli* e bactérias indicadoras de contaminação fecal estejam ausentes <sup>94,107,129</sup>

A utilização de águas superficiais para fins recreacionais, é uma prática comum em países de clima tropical, deste modo, esses corpos d'água que apresentam um grande número de microrganismos, potencialmente patogênicos, podem ser considerados como fator de risco para os usuários<sup>73</sup>. Espécies de *Aeromonas* estão distribuidas nesses sistemas em número elevado, como demonstrado na Represa de Guarapiranga, São Paulo<sup>94</sup>, e, também, confirmado por relatos na Europa<sup>92,93</sup>, Chile<sup>95</sup>, Estados Unidos<sup>122</sup> e em outros países<sup>72,97</sup>. Estes microrganismos são capazes de produzir fatores de virulência que podem favorecer a ocorrência de agravos à saúde, em hospedeiros suscetíveis, e podendo ainda ser considerados um agravante em se tratando de pacientes imunodeprimidos ou portadores de fatores predisponentes<sup>72,92,93,94,96,105,107</sup>.

Ambientes aquáticos que apresentem um elevado grau de poluição também são de grande importância para a sobrevivência de *Aeromonas*. Esses podem representar uma fonte de contaminação para corpos d'água que são utilizados para fins recreacionais

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Trabalho desenvolvido dentro do Programa de Iniciação Científica (PIBIC), estando em fase final de redação.

ou para utilização no abastecimento público, devido à elevada concentração de matéria orgânica existente nesses ambientes<sup>7,8,97,122</sup>.

O gênero *Aeromonas* tem sido responsabilizado como agente causal de doenças em diversas espécies animais como peixes, répteis, anfibios e também por uma variedade de doenças na espécie humana<sup>1,7,8,23,25,40,41,45,49,61,64,76,118,140</sup>.

As formas móveis do gênero *Aeromonas* estão relacionadas com diversos tipos de doenças no homem sendo a principal delas a diarréia autolimitante e ainda, formas severas similares à diarréia colérica. A exposição a ambientes contaminados principalmente água e alimentos, aparece relacionado em menor proporção à infecções de pele e ouvidos, casos de necrose e septicemia; e em indivíduos portadores de fatores predisponentes como distúrbios imunológicos, convalescença de cirurgias, e até mesmo cortes, perfurações e abrasões cutâneas ou mucosas 55,116,117,118,121,140.

Essa variedade de formas de infecção têm merecido constante atenção de pesquisadores quanto a fatores que possam estar relacionados à indução de determinada 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 44,59,82,83.

A pesquisa microbiológica no ambiente é necessária em Saúde Pública, pois em muitos casos, os organismos isolados do ambiente, são idênticos àqueles de importância médica, sobretudo para acompanhamento ambiental em estudos ecológicos<sup>10</sup>.

Diversos autores realizaram experimentos com o objetivo de determinar a capacidade de cepas de *Aeromonas*, isoladas de pacientes com e sem sintomas clínicos e

de amostras ambientais, de produzir fatores de virulência. Estes autores utilizaram testes biológicos como o de alça ligada em coelhos, o teste de permeabilidade vascular, teste de hemólise, adesão e ainda de citotoxigenicidade, a fim de estabelecer uma ligação epidemiológica entre esses achados<sup>2,6,40,41,44,45,46,69,121,122,127,128</sup>.

#### 1.3. Caracterização fenotípica e genotípica do gênero Aeromonas

# 1.3.1. Métodos fenotípicos

No **Quadro 1** estão apresentadas as provas fenotípicas empregadas com maior frequência para identificação do gênero *Aeromonas*.

A utilização de métodos fenotípicos para a determinação taxonômica de microrganismos têm sido reavaliada devido a existência de comportamentos atípicos de algumas cepas, que de forma geral diferem de uma espécie já estabelecida, por uma ou duas provas. Outro fator importante é a variabilidade existente dentro de uma mesma espécie para determinada característica, que acaba por dificultar o real posicionamento taxonômico de determinadas espécies bacterianas<sup>6,112,123</sup>.

A taxonomia do gênero *Aeromonas* permanece ainda um pouco confusa quando são empregados métodos fenotípicos para sua identificação. Inicialmente, o grupo das *Aeromonas* móveis foi composto por 3 espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, 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 e, sugeriram a mudança na dinâmica taxonômica para uma real identificação de espécies deste gênero <sup>22,52,63,64,91,112,123</sup>.

Quadro 1. Reações bioquímicas esperadas, para espécies do gênero Aeromonas, empregadas para classificação das cepas isoladas do Reservatório de Guarapiranga, São Paulo, em 1992.

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

<sup>\*</sup> Manual Bergey's of Systematic Bacteriology 1<sup>a</sup> ed., 1984, Hickmman-Brener e col., 1987 e 1988, Carnaham e col., 1991. + reções superiores a 80% V - reações positivas entre 50 e 79%

Muitos autores, atualmente, ainda utilizam a classificação de POPOFF<sup>112</sup> (1984), a qual inclui as três principais espécies do gênero *Aeromonas*, talvez pela dificuldade em decidir qual sistema taxonômico empregar. ALTWEGG<sup>5</sup> e col. 1990, empregaram uma bateria de cem características fenotípicas para identificação deste gênero, ao invés do sistema de classificação de POPOFF<sup>112</sup> 1984, o qual se baseia em provas básicas para diferenciação das espécies, e assim observaram resultados concordantes entre características fenotípicas e o método de hibridização DNA/DNA.

A incerteza da classificação deste grupo gera dificuldades na identificação de espécies, tanto em amostras clínicas quanto ambientais, dificultando que se determine onde estes microrganismos se encontram nos diferentes ecossistemas, levando certas, vezes por falta de concordância taxonômica, à falta de um elo epidemiológico 108,137.

A dificuldade de identificação desses microrganismos através de métodos fenotípicos aponta para a importância da sua caracterização molecular.

#### 1.3.2. Métodos genotípicos

Diferente de vinte anos atrás quando o DNA (ácido desoxiribonucléico) era a macromolécula mais dificil de ser analisada, as moléculas de DNA e RNA podem, atualmente, ser facilmente extraídas da célula, purificadas e analisadas<sup>16</sup>.

Estruturalmente o DNA e o RNA são macromoléculas em cadeias de unidades monoméricas chamadas nucleotídeos, compostas por:

• uma base nitrogenada que é, também, um derivado pirimídico ou purínico - adenina, citosina, guanina e timina para o DNA e adenina, guanina, citosina e uracil para o RNA;

- uma pentose, 2-desoxi-D-ribose para o DNA e D-ribose para o RNA; e,
- uma molécula de ácido fosfórico.

O DNA tem uma estrutura de dupla hélice, onde duas cadeias de polinucleotídeos são dispostas de tal forma que a sustentação é feita por fosfatos e resíduos de açucares alternados, de modo que a base se projete perpendicularmente a um eixo central. As bases das duas cadeias são então unidas, especificamente, por pontes de hidrogênio, de forma que a adenina possa ligar-se apenas com timina e a citosina com guanina. Independente de sua origem todos os DNAs são similares quimicamente<sup>16,32,35</sup>.

O RNA provou ser, não apenas, um marcador filogenético excelente, com os quais se pode elucidar a relação genealógica de microrganismos, mas, também moléculas ideais para a utilização como sondas genéticas pois, sequências do RNA contêm regiões diagnosticas que são idênticas para organismos relacionados filogenéticamente<sup>85</sup>.

Os métodos genotípicos estão baseados na análise destas duas moléculas (DNA e RNA) e oferecem várias vantagens pois, não é necessária uma identificação completa pelos métodos fenotípicos, os fundamentos analíticos são sempre os mesmos e podem ser aplicados a qualquer amostra e, também, porque muitos dos procedimentos são de simples realização<sup>35,114</sup>.

Os métodos convencionais dependem da expressão fenotípica de certas características bacterianas que podem ser variáveis; já os métodos moleculares permitem a observação direta dos genótipos, sendo que a aplicação desta tecnologia na

área clínica ou ambiental proporciona interpretação com base em dados altamente reprodutíveis.

Nos últimos anos os avanços no campo da biologia molecular têm contribuído para o estudo da biodiversidade de microrganismos e da epidemiologia molecular<sup>1,54,75</sup>. O estudo do polimorfismo do DNA, total ou de regiões selecionadas do genoma, constitui uma alternativa muito útil na diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie, e entre gêneros para diferentes espécies<sup>20,28,135</sup>. Porém, ainda existem discordâncias entre grupos de homologia de DNA e aqueles obtidos por métodos fenotípicos<sup>9</sup>.

## 1.3.2.1. Digestão com Enzimas de Restrição (RFLP)

As enzimas de restrição são produzidas por bactérias com função de protegelas, degradando qualquer molécula de DNA estranho. Cada enzima de restrição reconhece uma sequência específica na dupla fita de DNA estranho, que é imediatamente cortado em pedaços, gerando uma série de fragmentos, que podem ser visualizados através de eletroforese, e são denominados fragmentos de restrição. O DNA da bactéria produtora da enzima, é protegido no sítio de corte através de uma reação de metilação. As enzimas de restrição recebem seu nome de acordo com os microrganismos que as produzem como por exemplo a enzima *Eco* RI é produzida por *E. coli*, *Sma* I por *Serratia marcescens* e a *Pst* I por *Providencia stuartii* <sup>16,32</sup>.

A análise do polimorfismo gerado pela clivagem do DNA genômico por enzimas de restrição (RFLP-"Restriction Fragment Length Polymorphism"), descrito por KAN & DOZY<sup>65</sup> em 1978, consiste no estudo e comparação dos perfis obtidos

após o uso de enzimas de restrição que reconhecem uma sequência específica, normalmente composta de quatro a seis pares de bases, e que clivam o DNA em regiões denominadas de sítios de restrição. Esse método apresenta desvantagens quando o DNA é muito grande pois o polimorfismo apresentado é de dificil visualização, e o número e dimensões dos fragmentos gerados podem ser determinados de forma subjetiva, podendo existir fragmentos muito próximos. Esse tipo de estudo pode ser muito útil quando empregado para a análise do DNA de pequenas dimensões, utilizando enzimas de restrição que possam originar um menor número de fragmentos com dimensões maiores; ou então, para amostras que serão submetidas a uma hibridização com sondas específicas, gerando polimorfismo que possa ser utilizado na diferenciação de isolados de uma mesma espécie<sup>115</sup>.

LANGENBERG<sup>78</sup> e col. (1986), utilizaram este método para caracterização de cepas de *Campylobacter pyloridis* isolados de biópsia gástrica. Com a utilização da enzima de restrição *Hind* III, foi observado que os isolados de dezesseis pacientes apresentaram diferentes padrões de digestão dos DNAs. Os autores verificaram que em oito ocasiões foram isoladas 2 cepas de um mesmo paciente, as quais apresentaram o mesmo perfil de digestão: o método foi, assim, considerado útil e sensível para a identificação dos microrganismos estudados.

#### 1.3.2.2. Hibridização com sondas genéticas

Em 1961 foi observado que uma fita simples de DNA poderia reconstituir a dupla hélice num processo chamado renaturação ou hibridização. Sob condições apropriadas, a hibridização ocorre entre duas fitas simples de cadeias de ácido nucléico, DNA/DNA, RNA/RNA ou RNA/DNA, desde que tenham sequências complementares<sup>32</sup>.

Com base nestas observações desenvolveram-se as sondas genéticas que são segmentos de fita simples de DNA marcadas, por métodos radioatívos ou não, onde seqüências conhecidas específicas de DNA podem ser cortadas, marcadas e utilizadas como sondas das seqüências complementares em DNA total ou fragmentos gerados por enzimas de restrição, dando origem a um mapa do gene de interesse onde se pode observar a relação entre os perfis dos diferentes organismos<sup>16,32</sup>.

Sondas de DNA podem ser empregadas para diferentes estudos microbiológicos, podendo ser aplicadas para a determinação de sequências que codifiquem a produção de toxina por cepas bacterianas isoladas de amostras clínicas e ambientais, ou ainda, em estudos epidemiológicos na determinação da homologia entre cepas de uma mesma espécie bacteriana, através de sondas de sequências conservativas do DNA genômico. Essas sondas, também, podem ser empregadas para a pesquisa de sequências específicas de genes codificadores de diferentes tipos de resistência (antibióticos, metais pesados e outros), e ainda para estudo de microrganismos dificeis de serem cultivados e detectados, e que sejam abundantes em amostras clínicas e no ambiente<sup>3,16,32,35,38,47,60,89,104</sup>.

Esta é uma técnica que permite, ao investigador, determinar quando uma sequência não conhecida do DNA tenha uma homologia significativa com a sonda de DNA de uma estrutura e/ou função previamente conhecida.

As sondas genéticas são uma ferramenta poderosa para o monitoramento de populações microbianas específicas no ambiente<sup>10,11</sup>, e podem ser aplicadas de diferentes maneiras, permitindo observar seqüências conhecidas, diretamente da colônia bacteriana ("colony blot"), em células bacterianas lavadas; ou, ainda em determinada concentração de DNA ("DOT ou SLOT BLOT")<sup>90</sup>.

## 1.3.2.3. Ribotipagem

A Ribotipagem foi descrita por GRIMONT & GRIMONT<sup>47</sup> (1986), a qual é baseada na análise de fragmentos obtidos após a digestão do DNA genômico por enzimas de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e no uso de uma sonda genética para as frações 16S+23S do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA) obtidas de *E. coli*. Essas moléculas são ubiquitárias e extremamente conservadas; e têm sido muito utilizadas em estudos filogenéticos; e, ainda, como uma ferramenta poderosa no monitoramento de populações microbianas específicas no ambiente<sup>10</sup>.

GRIMONT & GRIMONT<sup>47</sup> (1986), extrairam o DNA genômico de 40 espécies bacterianas, incluindo gram-positivas e gram-negativas, clivaram o DNA com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III e, após transferência em filtros de nylon, hibridizaram com a sonda <sup>32</sup>P *Escherichia coli* 16+23S rRNA. Os pesquisadores observaram que um padrão de fragmentos era obtido para cada DNA testado. STULL<sup>134</sup> e col. (1988) demonstraram que este método é um sistema aplicável para estudos epidemiológicos moleculares.

A ribotipagem foi empregada por diversos autores, para estudos taxonômicos e epidemiológicos, como FARUQUE<sup>38</sup> e col. 1994 no estudo envolvendo *V. cholerae* O1, *V. cholerae* não O1 e *V. cholerae* O139, isolados de amostras clínicas e ambientais.

HÄNNINEN & SIITONEN<sup>51</sup> (1995), na Finlândia, utilizaram a ribotipagem como método de estudo da relação entre cepas de *Aeromonas* spp isoladas de casos de diarréia, de amostras de água e de alimento. Para digestão do DNA genômico os autores utilizaram as enzimas de restrição *Pst* I e *Bgl* I, e como sonda, o plasmídio pKK 3535 albergando os fragmentos 5S, 16S e 23S do rRNA de *E.coli*: foi observado

que as cepas dentro de uma mesma espécie, apresentaram diferentes ribotipos independente da enzima de restrição empregada.

HÄNNINEN<sup>49,50</sup> e col. (1995a,b), empregaram a ribotipagem em dois trabalhos, para caracterização de bactérias do gênero *Aeromonas* na Finlândia. No primeiro estudo as cepas caracterizadas foram isoladas de amostras de fezes de pacientes com diarréia dos viajantes, e em um segundo trabalho os autores empregaram cepas de *Aeromonas salmonicida*, responsáveis por doença em peixes.

# 1.3.2.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Outro método, denominado reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR), possibilita a amplificação de seqüências específicas de DNA utilizando iniciadores ("primers"). Essa técnica vem sendo empregada para detecção de microrganismos, detecção de genes codificadores de fatores de virulência, bem como para gerar polimorfismo que tenha importância na caracterização inter-espécies, usando iniciadores, arbitrários ou específicos, em estudos taxonômicos e em epidemiologia molecular 18,19,39,71,114,115,133.

KOCH<sup>73</sup> e col. (1993), detectaram *V. cholerae* em alimentos através do PCR, com base na amplificação seletiva do "operon" da toxina colérica. No estudo foram analisadas amostras de ostras, carne de caranguejo e alface previamente contaminados com os microrganismos. Foi observado que após amplificação do lisado bacteriano (resíduo bruto), *V. cholerae* foi detectado nos alimentos, em valores tão baixos quanto ima UFC/10 g. Concluíram os autores que o método é extremamente rápido e abrevia a necessidade de isolamento de DNA de uma variedade complexa de alimentos.

O método de PCR permite a replicação "in vitro" de uma sequência definida do DNA, onde segmentos genéticos podem ser amplificados. Desta forma, é possível ampliar sequências genéticas escassas, de forma exponencial, aumentando a probabilidade de detecção dessas sequências por sondas genéticas específicas em misturas heterogêneas de DNA<sup>10,85</sup>.

Muitos métodos para classificação de cepas bacterianas estão baseados na amplificação do DNA por técnicas de PCR. De forma geral, duas classes de protocolos para esse estudos são empregados<sup>19</sup>:

O primeiro envolve a amplificação de um ou alguns poucos fragmentos de DNA que em seguida são seqüenciados ou analisados por métodos empregando enzimas de restrição. A análise de regiões intergênicas entre os segmentos 16S e 23S do RNA ou ainda regiões variáveis do RNA transportador (tRNA), podem ser amplificadas e analisadas em eletroforese em gel e, assim, estabelecer a relação entre seqüências de DNA conhecidas, que são diagnósticas para gêneros, espécies ou isolados<sup>62</sup>.

O segundo tipo de protocolo de PCR utiliza seqüências curtas do DNA, que vão ser utilizadas como iniciadores para amplificar numerosos fragmentos distintos do DNA genômico do organismo em estudo. Quando esses fragmentos são submetidos a um sistema eletroforético este resulta num padrão de bandas, gerando um perfil "fingerprinting" semelhante a impressões digitais de espécies ou isolados que podem ser específicos.

1- Emprego de "primers" ou iniciadores de pequena dimensão e de sequências arbitrárias (RAPD).

O PCR com o uso de iniciadores arbitrários ("arbitrary primers-PCR": AP-PCR) apresenta vantagens quando aplicado aos estudos de biodiversidade, porque um conjunto universal de iniciadores pode ser utilizado para a análise do DNA genômico de uma variedade de espécies. É importante, porém, que antes da escolha do iniciador, testes preliminares sejam feitos com sondas de DNA, para verificar a presença de sua següência no DNA a ser estudado.

2. O PCR oferece maiores vantagens quando são utilizados iniciadores específicos, comuns para um determinado grupo de espécies. Essas sequências repetitivas estão presentes nos genomas de todos os organismos, e podem ser utilizadas como iniciadores para determinação filogenética.

Na natureza existem elementos do DNA que são repetitivos e encontrados, se não em todos, mas numa grande maioria de bactérias e que podem ser utilizados como iniciadores para amplificação do mesmo fragmento a partir do DNA genômico das cepas em estudo 19,86. Desta forma, foram desenvolvidos iniciadores de sequências conhecidas a saber:

• Sequências intergênicas repetitivas unânimes em enterobactérias específicas, ("Enterobacteria repetitive intergenic concensus") que receberam a denominação ERIC, compostas de cento e vinte e quatro a cento e vinte e sete pares de bases, e que podem ser usadas como iniciadores no PCR, para obter uma diferenciação genética, evidenciando polimorfismo específico para diversos gêneros e espécies de microrganismos. Essas sequências são altamente conservadas e já foram identificadas em *E. coli*, *S. typhimurium* e em outras espécies como: *Yersinia enterocolítica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Vibrio cholerae*<sup>57</sup>.

• Sequências palindrômicas repetitivas extragênicas, denominadas REP ("Repetitive extragenic palindromic sequence") compostas de trinta e cinco a quarenta pares de bases, e ainda sequências chamadas BOX, com cento e cinquenta e quatro pares de bases e que apresentam 3 sub-unidades (box A, box B e box C), que parecem estar localizadas em regiões intergênicas distintas ao redor do genoma 18,86. Após a amplificação, as bandas geradas, são separadas por tamanho em eletroforese em gel de agarose, que fornece um perfil de padrão complexo o qual lembra um código de barras que funciona como uma impressão digital para uma cepa bacteriana específica.

VERSALOVIC<sup>138</sup> e col. (1991), estudaram a distribuição do DNA das seqüências ERIC e REP em eubactérias, e discutiram sua aplicação empregando o PCR para obter impressões digitais dos genomas bacterianos. Estes pesquisadores empregaram vários grupos de bactérias para o estudo, e concluiram que a distribuição destes fragmentos de DNA repetitivos nos genomas de vários microrganismos, permite uma rápida identificação das diferentes espécies e pode ser útil para análise dos procariotos.

BRUIJN<sup>18</sup> e col. (1992), utilizaram as sequências REP e ERIC como iniciadores em PCR para estudar as impressões digitais dos isolados de *Rhizobium meliloti* e outras bactérias da família *Rhizobiaceae* isoladas de amostras de solo. Os pesquisadores verificaram que os padrões obtidos dos produtos do PCR, analisados em eletroforese, eram altamente específicos para cada cepa.

RIVERA<sup>114</sup> e col. (1995b), empregaram o ERIC-PCR para caracterizar genotipicamente, culturas de *V. cholerae* O:1, não O:1 e O:139 isoladas no Brasil, Perú e Índia, de amostras clínicas e ambientais. Os autores conseguiram diferenciar as

culturas patogênicas (CT+/ZOT+) das não patogênicas mediante esse método com base na caracterização do DNA genômico.

Diversos trabalhos foram realizados com bactérias do gênero *Aeromonas* nos quais foi empregada a técnica de PCR para estudos epidemiológicos, taxonômicos e ainda de pesquisa de fatores de virulência<sup>34,50,81,101,110</sup>.

Em 1995, o periódico "Food Technology" publicou uma reportagem apresentando diferentes métodos e instrumentos para testes microbiológicos rápidos para identificação de microrganismos em alimentos, dentre eles a aplicação de sondas DNA/DNA sendo que o PCR e a Ribotipagem foram considerados métodos úteis no processamento de alimentos para a determinação de pontos e fontes possíveis de contaminação<sup>42</sup>.

# 1.3.2.5. Análise do perfil plasmidial

O termo plasmídio foi originalmente utilizado por LEDERBERG<sup>79</sup> em 1952 para descrever todos os determinantes extracromossômicos hereditários. Atualmente, este termo é usado só para designar DNA extracromossômico que se replica de forma autônoma.

Os plasmídios podem codificar uma ampla variedade de determinantes genéticos, que permitirão que seu hospedeiro sobreviva melhor em um ambiente adverso ou mesmo competir com outros organismos que ocupem o mesmo nicho ecológico, embora estes elementos não sejam essenciais para a sobrevivência da bactéria hospedeira<sup>16,32</sup>.

Moléculas de fita dupla de ácido ribonucléico, os plasmídios, podem se apresentar sob 3 formas:

- circular fechada ou "supercoiled" onde o DNA encontra-se dobrado sobre si, de forma a estar extremamente torcido;
- forma circular aberta, onde uma das fitas do DNA apresenta uma quebra produzida por processo enzimático; e,
  - forma linear onde as duas fitas da dupla hélice do DNA apresentam quebra.

Estes elementos têm tamanho aproximado de 0,2 a 4,0 % do DNA cromossômico com peso variando entre 1 e 200 Kb<sup>16,80</sup>.

Basicamente existem três tipos de plasmídios:

- Plasmídios F ou sexuais, que são responsáveis pela habilidade de transferência de genes das célula que contenha esse plasmídio para outra que não o contém. Esses são responsáveis pelo contato entre as células bacterianas alterando a sua parede celular para permitir a transferência do DNA<sup>16</sup>.
- Plasmídios R conferem às células bacterianas que os contém a resistência a determinados antibióticos e drogas. Este tipo de plasmídio pode favorecer, por exemplo, a sobrevivência da célula hospedeira em um ambiente onde estejam presentes fungos produtores de antibióticos. Os plasmídos R são de considerável interesse médico, uma vez que podem ser transferidos de bactérias capazes de causar epidemias para cepas bacterianas que causam infecção hospitalar 11,16,80.
- Plasmídios COL contidos em células bacterianas este tipo de plasmídios permitem a síntese de proteínas chamadas colicinas que podem inibir o crescimento de outras células bacterianas que não contenham plasmídio do mesmo tipo<sup>16</sup>.

Alguns plasmídios podem ser responsáveis pela produção de toxinas, outros podem conter genes que são responsáveis pela resistência da célula hospedeira a íons e metais pesados, ou ainda existem os que são responsáveis por atividades catabólicas<sup>16</sup>.

Existem diferentes meios de transferência de material genético, contido nos plasmídios de uma célula bacteriana para outra, ou seja processo de conjugação, processo de transdução e processo de transformação. De acordo com a capacidade que os plasmídios tenham ou não de promover sua própria transferência de uma célula bacteriana para outra, podem ser denominados conjugativos ou não conjugativos.

Outros plasmídios têm a capacidade de se integrar ao DNA genômico e quando são transferidos levam consigo parte desse DNA.

Os plasmídios são especialmente importantes na rápida transferência de material genético na comunidade microbiana. Esgotos hospitalares, esgotos residenciais, corpos de água doce ou salgada, animais, plantas e solos, possuem bactérias capazes de transferir seus plasmídios por conjugação. Desse modo, genes que codificam a produção de resistência a determinados antibióticos ou, ainda caminhos para degradação, podem ser transferidos de uma variedade de espécies bacterianas em muitos gêneros, portanto genes que codificam a resistência a antibióticos são, rapidamente, disseminados entre as populações bacterianas. A grande importância dos plasmídios conjugativos no ambiente é que: se um pequeno número de bactérias portadoras de plasmídios conjugativos, principalmente, aqueles que codificam a resistência a antibióticos, é introduzido em um ambiente com grande número de bactérias receptoras apropriadas, esse pode rapidamente converter toda população em doadora, o que pode gerar problemas na quimioterapia de doenças infecciosas 11,16.

Refere-se a cura de plasmídios como sua eliminação da célula bacteriana através de tratamentos específicos, a qual resulta na inibição da replicação do plasmídio sem no entanto, inibir a replicação do cromossomo, gerando como resultado la divisão celular bacteriana uma diluição do plasmídio. Este processo pode ocorrer de

forma espontânea, mas, é drasticamente aumentado com o uso de substâncias, cultivo da bactéria abaixo da temperatura ótima ou ainda uso de temperaturas elevadas: esse processo é irreversível<sup>16</sup>.

Estudos da sua presença foram realizados em diferentes tipos de ambientes aquáticos, onde foi observada a presença dos mesmos nas comunidades bacterianas indígenas dos respectivos ecossistemas.

GYLES<sup>48</sup> e col. (1974), estudaram a natureza genética e molecular dos plasmídios codificadores da produção de enterotoxina em cepas de *E. coli*, isoladas de amostras clínicas e de animais domésticos. Os autores observaram a presença de no mínimo um plasmídio transmissível em 90% das cepas toxigênicas, comparado com 36% das cepas não toxigênicas; salientaram a importância de cepas de *E. coli* como reservatório de plasmídios transmissíveis, que muitas vezes são classificados como fatores sexuais, não carregando, nenhum, determinante conhecido; demonstraram, também, que cepas toxigênicas de *E. coli* são mais propensas a possuir plasmídios do que cepas isoladas de pacientes assintomáticos.

CROSA<sup>30</sup> e col. (1977), analisaram o DNA plasmidial de cepas de *V. anguillarum*, com alta e baixa virulência para peixes, demonstrando a correlação entre a presença de um grupo de plasmídios de 78 Kb e o processo de virulência nessa espécie bacteriana. Em outro trabalho, CROSA<sup>31</sup> e col. (1980), com o auxílio de processos de cura de plasmídios, estudaram a atenuação da virulência em cepas de *V. anguillarum* altamente patogênicas para peixes; os autores observaram que existia uma associação entre a virulência desse grupo de microrganismos com a presença de uma classe específica de plasmídios.

TORANZO<sup>136</sup> e col. (1983), trabalharam com diferentes espécies bacterianas patogênicas para peixes onde fizeram a caracterização plasmidial de cepas de *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Pasteurella piscicida*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* e *Renibacterium salmoninarum*. Esses autores empregaram diferentes métodos de extração de DNA plasmidial, alem de observar a presença de vários plasmídios nas cepas estudadas, verificaram ainda que o perfil plasmidial estava relacionado com a região geográfica de isolamento das cepas; salientaram também a importância em saúde pública da presença de plasmídios nesses patógenos, devido à possibilidade de transferência desses plasmídios para cepas patogênicas para o homem tais como: *A. hydrophila*, *V. cholerae* e *E. coli*.

FIGUEROA<sup>40</sup> e col. (1988), estudaram a patogenicidade de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas, mediante a pesquisa de enterotoxina, invasividade em células Hep-2 e pesquisa de plasmídios. Obtiveram em 50% das cepas estudadas a presença de plasmídios, porém não conseguiram estabelecer uma associação entre a presença desses elementos e invasividade ou enterotoxigenicidade ou ainda com a resistência a antibióticos.

BELLAND & TRUST<sup>13</sup>, (1988), estudaram o perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas salmonicida*, com características fenotípicas típicas e atípicas. As cepas atípicas apresentaram de um a quatro plasmídios os quais foram diferentes dos plasmídios das cepas típicas. Esses perfis eram correspondentes ao biotipo e fonte de isolamento, sugerindo ser uma ferramenta útil como marcador epidemiológico de cepas de *A. salmonicida* atípicas.

KELLY & KAIN<sup>68</sup> (1991), caracterizaram através de provas bioquímicas e por perfil plasmidial cepas de *Plesiomonas shigelloides*. Plasmídios estavam presentes em

39,7% das cepas estudadas, sendo que quinze diferentes plasmídios foram observados entre as vinte e nove cepas. Observaram que a metade das cepas resistentes a antibióticos apresentaram plasmídios, e que não houve correlação entre a presença destes elementos e características bioquímicas.

MORGAM<sup>100</sup> e col. (1991), utilizaram a presença de plasmídios como método para pesquisa de sobrevivência de *A. salmonicida* em água de lago, em um sistema de microcosmos: esses autores detectaram plasmídios nas células bacterianas vinte e um dias após o início do experimento.

MORGAM<sup>101</sup> e col.(1993), realizaram um estudo para avaliar a sobrevivência de *A. salmonicida* em água de lago com o auxílio de um sistema de microcosmo. Para tanto utilizaram a detecção de DNA genômico e plasmidial no sistema, observando que os plasmídios semelhantes aos da cepa inóculo, nas cepas cultiváveis, podem ser detectado até seis meses depois no sistema contendo a água estéril.

SANDAA & ENGER<sup>120</sup>, (1994), pesquisaram a transferência de plasmídios naturais codificadores de múltipla resistência a antibióticos, em cepas de *A. salmonicida*. Em um sistema de microcosmos utilizaram este microrganismo como célula doadora de plasmídios de resistência, e observaram que a transferência desses plasmídios ocorria para a célula receptora (*E. coli*) dentro do sistema, com alta requência mesmo na ausência de um fator seletivo ou seja, em um meio que não continha o antibiótico.

GILES<sup>43</sup> e col. (1995), analisaram o perfil plasmidial de cepas de A. salmonicida, V. anguillarum e V. ordalli, patogênicas para peixes, e que apresentavam resistência aos antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina. Observaram que as cepas de Vibrio estudadas não apresentavam plasmídios e que as cepas de A. salmonicida

apresentavam de quatro a seis plasmídios. Os autores não observaram correlação entre a presença destes plasmídios com a resistência aos antibióticos uma vez que o cultivo em sua presença ou ausência, não revelou diferenças no perfil plasmidial; e, ainda, os experimentos de cura dos plasmídios não revelaram alteração na resistência aos antibióticos, sugerindo que, nos patógenos estudados, a mesma não seria mediada por plasmídios.

HANNINEN<sup>50</sup> e col. (1995b), caracterizaram genotípicamente cepas de *A. salmonicida* isoladas na Finlândia. Os autores utilizaram a análise do perfil plasmidial e PCR e encontraram oito perfis entre as vinte e oito cepas estudadas. Observaram que essa espécie de *Aeromonas* geralmente apresenta um ou mais plasmídios grandes (com tamanho superior a 50 Kb), e também plasmídios pequenos universais.

VADIVELU<sup>137</sup> e col. (1995), observaram a presença de plasmídios em cepas de *A. hydrophila* isoladas de casos de bacteremia, com a finalidade de estudar o envolvimento de fatores de virulência nesses casos: das cepas estudadas, apenas uma, foi negativa para a presença de plasmídio. Os autores sugerem que a pesquisa do perfil plasmidial seja uma ferramenta útil para a avaliação da presença de fatores de virulência em *A. hydrophila*.

#### 1.3.2.6. Eletroforese em campo pulsado

Outro método, que vem sendo utilizado com bastante sucesso, é a eletroforese de campo pulsado em gel ("pulsed-field gel electrophoresis" - PFGE). Essa técnica é similar a uma análise de DNA após clivagem com enzimas de restrição, no entanto apresenta maiores vantagens quanto ao tratamento do DNA na extração e na clivagem com enzimas de restrição, no qual após aplicação de eletroforese de campo pulsado, as bandas e os perfis são melhor visualizados.

MORENA<sup>99</sup> e col. (1993), empregaram a técnica de PFGE para o estudo de associação entre cepas de *Aeromonas* isoladas de fezes de crianças com diarréia e que frequentavam uma mesma creche nos Estados Unidos.

BUCHRIESER<sup>20</sup> e col. (1995), aplicaram o método de eletroforese em campo pulsado e observaram a heterogeneidade entre cepas de *V. vulnificus* isoladas de ostras. Salientaram que os casos de infecção são devidos a uma população mista de *V. vulnificus* e que somente algumas dessas diferentes cepas são patogênicas, enfatizando a necessidade do estudo molecular em investigações epidemiológicas e ecológicas.

#### 1.3.2.7. Sequenciamento

Análises mais detalhadas, ao nível molecular de microrganismos, podem ser efetuadas pelo sequenciamento de regiões específicas do DNA genômico, porém sua utilização é muito cara, demorada e de pouca aplicabilidade diária. Entretanto o conhecimento de sequências de nucleotídeos de regiões específicas do DNA ou RNA, possibilita a criação de um banco de dados genético, que pode ser empregado no delineamento de sondas com fins epidemiológicos, taxonômicos ou mesmo de diagnóstico tanto em amostras clínicas como ambientais.

A determinação da relação filogenética por comparação das seqüências de macromoléculas está, atualmente, muito bem estabelecida. A molécula de RNA encontra-se entre as biomoléculas nas quais é possível ser determinada uma relação filogenética, devido a sua ampla distribuição, homologia, estabilidade e, ainda, por ser um elemento conservativo.

O isolamento direto e sequênciamento de fragmentos 5S do rRNA, de ambientes pouco complexos e que apresentem uma biomassa considerável, pode oferecer uma determinação conveniente dos membros da comunidade

dominante<sup>28,29,132</sup>. Esse método foi aplicado para a família *Aeromonadaceae*<sup>29</sup>, espécies do gênero *Aeromonas*<sup>26</sup> e ainda nas comunidades microbianas das nascentes quentes de Yellowstone<sup>132</sup>.

MARTINEZ MURCIA<sup>91</sup> e col. (1992), empregaram a análise do segmento 16S rRNA em cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas, para determinar a posição taxonômica de diferentes cepas pertencentes a esse gênero, e que apresentavam características atípicas; após a amplificação do segmento, nas amostras do DNA genômico das cepas estudadas, o fragmento foi seqüenciado e analisado no seu conteúdo de bases. Esses autores observaram que as seqüências para cada cepa eram idênticas demonstrando que pertenciam a uma mesma espécie e quando comparadas com o mesmo fragmento proveniente de diferentes espécies de *Aeromonas*, já conhecidas, apresentava-se distinto dessas embora pertencentes também a esse gênero.

#### 1.4. Aplicação de métodos moleculares para estudos do gênero Aeromonas

A identificação de espécies do gênero *Aeromonas* tem sido incrementada, nas últimas décadas, primariamente como resultado de estudos cromossômicos e de pareamento DNA-DNA. Hoje existem oito espécies reconhecidas fenotipicamente, as quais foram distribuidas genotipicamente em doze grupos de hibridização de DNA de acordo com ALTWEGG<sup>5</sup> e col. (1990). A constituição desses grupos foi a seguinte: *A. hydrophila* (grupos 1, 2 e 3); *A. caviae* (grupo 4); *A. media* (grupos 5Ae 5B); *A. eucrenophila* (grupo 6); *A. sobria* (grupo 7, 8 e 9); *A. veronii* (grupo 10 e 11); *A.* 

schubertii (grupo 12); e A. salmonicida (grupo 3). Embora residam na família Vibrionaceae, COLWELL<sup>29</sup> e col. propuseram em 1986, que esse gênero constituísse uma nova família, Aeromonadaceae, baseado na catalogação do fragmento 5S do rRNA e em dados de hibridização de RNA/DNA<sup>63</sup>.

HICKMAN-BRENNER<sup>52</sup> e col. (1987), empregaram a hibridização de DNA/DNA para estabelecer a filogenia de 9 cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas. Essas cepas assemelhavam-se à de *V. cholerae*, com exceção da produção de gás; as cepas eram lisina e ornitina positivas e arginina dehidrolase negativas. A análise de hibridização do DNA/DNA revelou que as cepas estavam mais relacionadas com espécies de *Aeromonas* do que com espécies de *Vibrio*, sendo então designadas como uma nova espécie, *A. veronii*.

SCHUBERT & HEGAZI<sup>130</sup> (1988), empregando o estudo de hibridização DNA/DNA, descreveram uma nova espécie de *Aeromonas*: *A. eucrenophila*. Esses pesquisadores encontraram uma cepa de *Aeromonas* que se assemelhava à de *A. hydrophila*, porém apresentava test.e de Voges Proskauer negativo. Essa foi então comparada com a cepa padrão NCM B74 (*Aeromonas* não identificada), a qual apresentava características semelhantes, obtendo homologia de 80% a 100%, em contraste com uma homologia inferior a 70% com cepas de *A. hydrophila* e *A. caviae*, o que a classificou como uma nova espécie.

ALTWEGG<sup>4</sup> e col. (1988), compararam as técnicas: perfil eletroforetico de multilocus enzimático; análise de endonuclease de restrição usando as enzimas *Pst* I e *Sma* I; tipagem do DNA ribossômico e tipagem de fagos para caracterização de espécies de *Aeromonas*, sendo que as cepas não estavam relacionadas epidemiologicamente. Os autores observaram que houve uma elevada sensibilidade na

diferenciação de *Aeromonas* pelos métodos de tipagem de fagos e análise com enzima de restrição, seguida pela tipagem do DNA e eletroforese de multilocus enzimático.

HICKMAN-BRENNER<sup>52</sup> e col. (1988), utilizaram a técnica de hibridização de DNA/DNA para determinar a posição taxonômica de cepas bacterianas anteriormente isoladas e que estavam sem classificação definida. Essas cepas, isoladas de amostras clínicas, assemelhavam-se à de *V. damsela* exceto pela habilidade de se multiplicar na ausência de cloreto de sódio. O DNA das oito cepas em estudo foi comparado com DNA de espécies pertencentes à Família *Vibrionaceae* incluindo todas as espécies de *Aeromonas* e *P. shiguelloides*, e ainda com *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Todas as cepas estavam altamente relacionadas tanto por hibridização de DNA quanto fenotipicamente com a cepa padrão (*Aeromonas* ATCC 2446) representante deste grupo.

KUIJPER<sup>74</sup> e col (1989a), estudaram cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras de fezes, utilizando a análise do DNA da célula total através da digestão com enzimas de restrição. Também utilizaram a análise de hibridização dos fragmentos de digestão do DNA, com o segmento 16+23S rRNA de *E. coli* (ribotipagem), e observaram uma redução do número de bandas de restrição, de oito a treze fragmentos de hibridização, no entanto, o valor discriminatório foi menor que quando comparado com a análise de endonuclease de restrição (RFLP).

KUIJPER<sup>75</sup> e col. (1989b), caracterizaram cepas de *Aeromonas*, isoladas de fezes humanas, através de provas fenotípicas convencionais e a técnica de hibridização molecular DNA/DNA, frente à cepa padrão representante do grupo genotípico de *Aeromonas*. Observaram a dificuldade em se estabelecer uma adequada diferenciação através dessas provas fenotípicas, pois essas não foram suficientemente específicas.

Com base nesses resultados, os autores alertaram para a importância dos métodos moleculares para sua melhor caracterização.

ALTWEGG<sup>5</sup> e col. (1990), utilizaram a hibridização de DNA/DNA para a identificação genotípica de cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras de fezes. As sondas preparadas a partir de cepas padrão de cada grupo genotípico, foram utilizadas para determinação da homologia entre as cepas. Os autores empregaram para caracterização fenotípica dos isolados dois esquemas de identificação, sendo um deles a metodologia empregada por POPOFF<sup>112</sup> (1984), contendo as provas básicas para diferenciação das espécies, e o segundo uma bateria de 100 provas fenotípicas utilizadas com menor frequência. Desse estudo foi observado que quando comparado com sistemas mais simples de identificação fenotípica, o método genotípico não apresentava uma correlação com as características bioquímicas; com o emprego de um sistema mais amplo, contendo maior número de provas, os dois esquemas, fenotípico e genotípico, apresentavam uma boa correlação.

JOSEPH<sup>64</sup> e col. (1991), estudaram uma cepa de *Aeromonas* isolada de amostra clínica, mediante a hibridização de DNA/DNA, para conferir sua identificação. Esse microrganismo, inicialmente classificado como *A. hydrophila*, apresentou 78% a 80% de homologia com a cepa padrão de *A. jandaei*, confirmando assim essa espécie.

CARNAHAN<sup>21</sup> e col. (1991a), estudaram cepas de *Aeromonas*, que apresentavam prova de sacarose negativa, isoladas de várias regiões geográficas. Essas cepas foram submetidas à hibridização de DNA/DNA frente à cepa padrão ATCC 49568 que pertence ao grupo DNA 9 de *A. sobria*, resultando em elevada similaridade entre elas. Os autores sugeriram a inclusão de uma nova espécie, *A. jandaei*, uma vez que a cepa padrão do grupo DNA 9 (*Aeromonas* ATCC 49568) era suficientemente

distinta das cepas referência de A. sobria e A. veronii para reforçar a validade do DNA grupo 9 como uma nova espécie.

CARNAHAN<sup>22</sup> e col. (1991b), delinearam uma nova genospécie de *Aeromonas*, *A. trota*, a partir de treze cepas isoladas de amostras de fezes e que eram suscetíveis à ampicilina. Os pesquisadores usaram a análise de homologia por hibridização do DNA/DNA com uma cepa padrão de *Aeromonas* (ATCC 49657), previamente caracterizada por provas fenotípicas, e determinaram, frente a outros grupos fenotípicos de *Aeromonas*, que esta era uma nova espécie.

MARTINEZ MURCIA<sup>91</sup> e col. (1992), utilizaram a técnica de PCR, para analisar o segmento 16S do rRNA e determinar a posição taxonômica de cepas de *Aeromonas* com características atípicas. Foram estudadas três cepas, sendo duas isoladas de amostras ambientais e uma isolada de fezes de paciente que apresentou intoxicação alimentar. A análise da seqüência do segmento 16S do rRNA demonstrou que as três cepas eram idênticas e pertenciam a uma só espécie, a qual foi denominada *A. allosaccharophila*.

ASH<sup>9</sup> e col. (1993). empregaram PCR, com a utilização de iniciadores baseados no segmento 16S do rRNA, para identificação de cepas de *A. jandaei* e *A. schubertii*. Os autores consideraram que o método foi altamente específico e rápido para identificação dessas cepas.

DORSCH<sup>34</sup> e col. (1994), seqüênciaram e estudaram o segmento 16S do rRNA de sessenta e sete isolados de *Aeromonas* de procedência ambiental e clínica, para determinar as seqüências comuns do gênero. Com base nesse estudo, construiram uma sonda espécie específica para *A. hydrophila* e *A. veronii*, aplicaram em ensaios de PCR

e observaram que essas espécies foram claramente discriminadas de outros isolados de Aeromonas bem como organismos.

ESTEVE<sup>36</sup> e col. (1995), estudaram a relação genômica entre três cepas de *A. allosaccharophila* e sua cepa padrão (ATCC 35942) e outras espécies de *Aeromonas*. Utilizaram o método de hibridização molecular com base no segmento 16S do rRNA e observaram que a homologia obtida entre as cepas testadas e a cepa padrão de *A. allosaccharophila* foi de 70% ou superior, e de 0% a 35% com as demais espécies: confirmaram que as cepas em estudo constituíam um grupo genotípico homogêneo, concordando com o conceito de genospécie corrente (homologia superior a 70%).

HÄNNINEN<sup>50</sup> e col. (1995b), empregaram diferentes métodos moleculares, perfil plasmidial, RAPD e ribotipagem, para caracterização de cepas de *Aeromonas* salmonicida sub-espécie salmonicida para comparação com o perfil fenotípico.

## 1.5. Caracterização de fatores de virulência em microrganismos

Os métodos de avaliação da patogenicidade, utilizando modelos animais, permitem que seja determinada a toxicidade das culturas microbianas pela presença de vários fatores de virulência, entretanto a maioria dessas metodologias são custosas e inespecíficas<sup>114</sup>.

Sondas genéticas de DNA vêm sendo empregadas de forma crescente em estudos epidemiológicos e clínicos<sup>35</sup>. Essas têm sido usadas para determinação de cepas enterotoxigênicas como *E. coli* em isolados de fezes, diretamente de amostras de fezes<sup>98,102,104,111</sup> e isolados de amostras ambientais<sup>89</sup>

Diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos, empregando métodos moleculares, para a pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência, em

diferentes microrganismos tais como: hibridização com sondas específicas e PCR<sup>26,38,39,55,56,77,81,98,114</sup>

MOSELEY<sup>102</sup> e col. (1982), verificaram a aplicabilidade do exame de cepas de *E. coli*, isoladas de amostras clínicas, por técnica de hibridização molecular para pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas. Utilizaram como cepa padrão *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produtora de toxina termo-lábil (LT) e toxina termo-estável (ST), e compararam com testes de camundongo lactente (Dean) e teste em células Y1. Observaram que todos LT+ ST+ e LT+ ST- foram homólogos à sonda LT. Todos LT+ ST+ e LT- ST+ foram detectados com a sonda ST+ ou STH. Quando testada para detecção de ETEC em água contaminada com outras bactérias, verificaram que essas estavam presentes nas amostras diluídas até dez vezes. Concluiram que a hibridização pode servir como ferramenta útil para definição da epidemiologia de infecção por ETEC, com a grande vantagem de diferenciar entre cepas com genes codificadores de ST, oferecendo um marcador epidemiológico e, ainda, para caracterizar e identificar fontes ambientais de ETEC.

NATARO<sup>104</sup> e col. (1985), usaram sonda de DNA para detectar genes que conferem adesão localizada, de cepas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) a culturas de células Hep-2. Trabalharam com cepas isoladas de amostras de fezes de crianças com e sem diarréia. Observaram que a sonda foi altamente sensível e específica para identificar, epidemiologicamente, cepas de *E. coli* enteropatogênica clássica.

HUSSLEIN<sup>58</sup> e col. (1988), empregaram sondas DNA radioativas para detectar a presença do gene codificador de aerolisina em cepas de *Aeromonas* spp, isoladas de amostras clínicas, de pacientes com e sem sintomas, e do ambiente. Esses testes foram comparados com testes de hemolisina e ensaios em cultura celular, onde foi observado

que a seqüência homóloga para o gene codificador da aerolisina estava presente em todas as cepas testadas, independente da fonte de isolamento. Uma segunda sonda de DNA para o gene codificador de uma hemolisina não relacionada, hibridizou com A. hydrophila e A. sobria, porém com apenas 50% das A. caviae. Os pesquisadores concluiram que não houve correlação entre a hibridização com sondas para hemolisina e a elaboração de fatores de virulência, como atividade hemolítica (ágar sangue) ou citolítica (cultura em células VERO).

MONTENEGRO<sup>98</sup> e col. (1990), detectaram e caracterizaram cepas de *E. coli* produtoras de verotoxina em amostras de fezes de gado saudável. Utilizaram técnicas de hibridização de DNA com sondas específicas para genes codificadores da produção de verotoxina I e II. A sorotipagem das cepas revelou que 40,0% pertencia a grupos conhecidamente patogênicos para o homem, e que 10,8% dos animais estudados possuíam cepas produtoras de verotoxina.

HUSSLEIN<sup>60</sup> e col. 1992, estudaram o gene codificador da produção de aerolisina em espécies de *Aeromonas*, através de hibridização molecular, utilizando a região estrutural *aerA* e a região regulatória *aerC* como sondas para detecção do gene. Um grupo de *Aeromonas* e outros organismos entéricos foram submetidos à hibridização. A seqüência correspondente ao fragmento estrutural foi encontrada entre todos os isolados de *Aeromonas*, sendo que a região regulatória foi detectada somente em algumas cepas. Os autores salientaram que estudos taxonômicos anteriores, com o segmento *aerC*, determinaram um grupo de cepas identificadas previamente como *A. sobria*, que foram agrupados em uma nova espécie *A. trota* e com isso, descobriu-se uma sonda espécie específica para esse microrganismo. Observaram também que os genes aerolisina existem no gênero *Aeromonas* e são similares àqueles observados para

as várias classes de "shiga-like" toxina, bem como para a toxina colérica. O resultado sugere que a escolha das sondas juntamente com a amplificação do DNA "in vitro" pode ser um caminho rápido para revelar a diversidade deste importante fator de virulência nesse gênero.

MARTINS<sup>89</sup> e col. (1992), detectaram a presença de fatores de virulência em cepas de *E. coli* isoladas de amostras de água. Através de hibridização com sondas de DNA, detectaram a homologia e sequências codificadoras de toxina "shiga-like" I e II, toxinas termo estável (ST) e termolábil (LT), fatores de aderência *eaf* e *eae*, e ainda antígenos fimbriais de *E. coli* enterohemorrágica. Os autores observaram uma significativa frequência de cepas com potencial genético para produção de fatores de virulência. Salientaram que técnicas de hibridização possibilitam um método sensível para detectar organismos que carregam genes codificadores de fatores de virulência.

NISHIKAWA<sup>106</sup> e col. (1994), utilizaram hibridização com sonda de DNA para pesquisa de genes associados com adesão e produção de infecção em cepas de *A. hydrophila* e *A. sobria* isoladas de amostras clínicas, e que haviam apresentado adesão quando testadas em culturas de células INT407 e Caco-2. Utilizando sondas de *E. coli eae* de *ipaB*, que são genes associados com adesão e efeitos de invasão nesta espécie. Observaram que os DNAs das cepas de *Aeromonas* testadas não hibridizaram com as referidas sondas. Os autores sugeriram que a invasividade em células Caco-2 pode representar um potencial na produção de diarréia por essas cepas de *Aeromonas* e, ainda, que o mecanismo de invasão dessas cepas possa diferir daqueles presentes em *E. coli* e *Shigella*.

POLLARD<sup>110</sup> e col. (1990a), sequênciaram o gene codificador da aerolisina em

A. hydrophila e desenharam iniciadores para triar a presença desses genes em A.

caviae, A. sobria e A. veronii, isoladas de amostras clínicas, mediante técnica de PCR. Observaram que essa técnica identificou claramente as cepas de A. hydrophila produtoras de aerolisina e que pode ser utilizada como um teste rápido, espécie específico de virulência, visto que cepas de outras espécies foram negativas para a presença deste gene.

POLLARD<sup>111</sup> e col. (1990b), estudaram a presença de genes codificadores da produção de verotoxina em cepas de *E.coli* por técnicas de PCR. Os autores utilizaram sondas sintéticas derivadas de seqüência de genes Verotoxina I (VTI), Verotoxina II (VTII) e toxina "shiga like" II (SLTII), observando que o produto de amplificação por PCR, identificou seqüências VTI e VTII, apenas, na cepa VT positiva pelo teste tradicional de cultura celular. Constataram também, que a sonda distingue, claramente, cepas de *E. coli* VTI e VTII e não identificou esses genes em cepas produtoras de outros fatores de virulência como enterotoxina ou citotoxina, apresentando uma sensibilidade de um nanograma do total de ácido nucléico. Finalmente concluiram que o teste permite uma análise rápida de baixo custo para a detecção desse importante gene em amostra clínica e, possivelmente, em alimentos contaminados.

LIOR & JOHNSON<sup>81</sup> (1991), aplicaram a técnica de PCR para detecção do gene codificador de aerolisina em células íntegras de culturas de *A. hydrophila* β hemolíticas, comparando com provas biológicas de hemólise, citotoxigenicidade e enterotoxigenicidade. Os autores utilizaram iniciadores específicos na produção da sonda para aerolisina, de modo que a metodologia aplicada identificou, claramente, as cepas produtoras de aerolisina com 100% de concordância, sugerindo que este possa ser um teste de aplicação rápida, espécie específico. Os resultados dos testes de PCR foram idênticos, tanto com célula integral, quanto com ácido desoxiribonucléico

previamente purificado, observando que o método com célula integral oferece vantagens, reduzindo o tempo necessário para o ensaio.

FIELDS<sup>39</sup> e col. (1992), empregaram a técnica de PCR para detecção de cepas toxigênicas de *V. cholerae* O1 isolados da epidemia de cólera da América Latina. Amplificando um fragmento do gene da toxina colérica subunidade A (ctxA), que foi empregado para identificar cepas de *V. cholerae* O1 toxigênico. Em um total de cento e cinquenta cepas, de origem clínica e ambiental, sem determinação toxigênica, cento e quarenta foram toxigênicas, tanto pelo teste de PCR, quanto por teste de Elisa. As trinta e oito cepas com toxigenicidade conhecida, foram positivas também por teste de PCR. Cepas de *V. cholerae* não toxigênicos, *E. coli* e *Aeromonas* foram negativas para o teste. Os autores relatam que o teste foi mais rápido que outros métodos diagnósticos para detecção de toxinas nessas cepas sendo, também, mais sensível e específico que aqueles atualmente empregados.

CHOWDHURY<sup>26</sup> e col. (1994), aplicaram PCR para detectar o gene codificador da produção de enterotoxina ZOT e toxina colérica (ctx) em cepas de *V. mimicus* e *V. cholerae* O139. Observam que três das cinco cepas de *V. mimicus* estudadas possuíam o gene ZOT de *V. cholerae* O1, e que apenas uma apresentou o gene ctx. Estudos de hibridização confirmaram que os fragmentos detectados nestas cepas, foram altamente homólogos ao gene ZOT de *V. cholerae* O1 confirmando que *V. mimicus* e *V. cholerae* O139 são potencialmente portadores desse gene.

# 1.6. Aplicação de métodos moleculares em estudos epidemiológicos

O estudo epidemiológico é uma ferramenta importante para a prevenção e atuação em situações de emergência, onde organismos estão sendo implicados como agentes causais de doenças no homem. Estudos que identifiquem a origem da doença,

os possíveis veículos de transmissão e o número de indivíduos envolvidos em um surto, são de extrema importância para auxiliar os profissionais de saúde pública a predizer e a investigar os casos envolvidos. Os métodos convencionais para estudos epidemiológicos procuram analisar os microrganismos envolvidos, em determinado surto, identificando os isolados dos pacientes e relacionando as características fenotípicas desses organismos a fim de que se estabeleça as semelhanças entre eles e, ainda, a sua presença no ambiente e no possível veículo de transmissão.

Todos estes dados demandam muito tempo de investigação e ainda existe a dificuldade de se recuperar os microrganismos, que estejam envolvidos com os casos, bem como, todos os indivíduos envolvidos, que muitas vezes apresentam sintomatologia menos grave e não buscam o atendimento médico para resolução do problema. Muito importante é a pesquisa das fontes e dos envolvidos, quando se trata de um surto hospitalar em que os indivíduos, geralmente, se encontram em um estado de saúde debilitado, e quando os organismos estão relacionados com alta resistência a antibióticos, fazendo-se necessária, portanto, a pesquisa da fonte de infecção e a relação dos pacientes envolvidos.

O uso de esquemas padronizados de tipagem poderia permitir aos Laboratórios de Saúde Pública o acompanhamento do movimento e origem de microrganismos, dados que seriam úteis para as autoridades de saúde pública ao estabelecer estratégias de prevenção e intervenção com base nessas informações<sup>87</sup>. A sonda de nucleotídeos salienta sítios (fragmentos) específicos do DNA quebrados por enzima de restrição diminuindo o número de bandas a serem analisadas facilitando o acesso ao resultado. As sondas podem ser construídas a partir de seqüências cromossômicas clonadas, randômicas, que codificam a resistência a antibióticos. Esse método tem o potencial de

distinguir a individualidade da cepa bacteriana<sup>113,115</sup>. A ribotipagem tem sido usada com sucesso para caracterização de sorogrupos de microrganismos pertencentes a diferentes gêneros e espécies<sup>139</sup>.

KUIJPER & PEETERS<sup>76</sup> (1991), empregaram métodos moleculares baseados em homologia de DNA/DNA para o estudo de cepas de *Aeromonas* isoladas de casos de diarréia em Amsterdan (Holanda). Caracterizaram, bioquímica e geneticamente, isolados de *Aeromonas* provenientes de amostra de fezes, os quais pertenciam aos grupos de DNA de 1 a 4 e de 5 a 8. Os autores observaram uma boa correlação entre as duas metodologias empregadas.

WACHSMUTH<sup>139</sup> e col. (1993), empregaram diferentes técnicas moleculares para determinar a epidemiologia da cólera na América Latina, com a finalidade de explicar seu súbito aparecimento e rápida disseminação. Os autores empregaram os métodos RFLP, sequênciamento e eletroforese de multilocus enzimático, para caracterização dos isolados em estudo.

BACK<sup>12</sup> e col. (1993), estudaram epidemias causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à eritromicina. Compararam métodos clínico-epidemiológicos com métodos moleculares para identificar a fonte de duas epidemias ocorridas em um berçário. Confrontaram os métodos usuais com a análise plasmídial e caracterização genotípica. Os testes moleculares mostraram que os organismos eram os mesmos dessas duas epidemias, e que o indivíduo que havia sido implicado na primeira delas não era portador da cepa envolvida mas, sim o médico que atendeu às duas epidemias. Concluíram que os métodos epidemiológicos tradicionais podem levar a conclusões e resultados falsos que só podem ser esclarecidos por provas moleculares.

FANG<sup>37</sup> e col. (1993), determinaram a validade de estudos epidemiológicos moleculares, para utilização em surtos de *S. aureus* resistente à meticilina: Utilizaram as técnicas de análise de plasmídios digeridos por enzima de restrição (REAP) e também por PCR, empregando iniciadores arbitrários; Os autores compararam esses métodos moleculares com os epidemiológicos convencionais e com dados de sensibilidade aos antimicrobianos, encontrando uma clara relação clonal entre as cepas isoladas desse surto e as isoladas dos empregados dessa área, porém distintas dos isoladas de um outro hospital. Observaram que embora os métodos epidemiológicos tradicionais tenham um papel central no controle dessas infecções, ajudando assim a isolar pacientes infectados, com a cepa envolvida dificultando a colonização do microrganismo em outros pacientes e/ou empregados envolvidos, sustando desta forma o surto.

MORENA<sup>99</sup> e col. (1993), utilizaram a análise de DNA para relacionar e caracterizar cepas de *Aeromonas* isoladas de crianças com diarréia em uma creche em Houston. Aplicaram técnicas de perfil plasmidial e eletroforese de campo pulsado (PFGE), para análise da relação entre os DNAs das cepas em estudo. Encontraram um padrão de DNA idêntico para duas crianças envolvidas no surto; as cepas restantes apresentavam diferentes padrões, fato, também, verificado com cepas isoladas de um outro surto. O padrão de DNA genômico diferenciou cepas de *Aeromonas* melhor que o padrão plasmidial. Os autores observaram também que muitas genospécies de *Aeromonas* estão envolvidas em cada surto.

POPOVIC<sup>113</sup> e col. (1993), estudaram a aplicação epidemiológica de um esquema padronizado de ribotipagem para *V. cholerae* O1. Trabalharam com duzentos e quatorze cepas isoladas de amostras clínicas e ambientais em sessenta anos,

observando diferentes ribotipos para cepas clínicas de *V. cholerae* O1 El Tor. Encontraram seis diferentes padrões para cepas da sétima pandemia de cólera sendo o ribotipo 8 encontrado apenas nas cepas provenientes de países da África Central, enquanto que o ribotipo 3 ocorreu, principalmente, em cepas da Ásia e Ilhas do Pacífico. Cepas com ribotipo 6 foram as mais amplamente distribuidas apresentando três subtipos muito semelhantes. Concluíram os autores, que a ribotipagem em combinação com outros métodos bem definidos, pode contribuir em investigações epidemiológicas auxiliando a traçar o movimento das cepas e identificando sua origem geográfica.

KARAOLIS<sup>66</sup> e col. (1994), compararam a evolução molecular do clone de *V. cholerae* O1 da sétima pandemia de cólera com os isolados de outras pandemias e epidemias. Para o estudo, foram utilizadas cepas de *V. cholerae* da sexta e sétima pandemias, bem como cepas de casos esporádicos de diarréia causados por *V. cholerae* O1 El Tor, cepas de *V. cholerae* O139 Bengal de surtos e casos isolados. Para cepas da sétima pandemia foram observados onze ribotipos, os quais eram mais diferenciados entre si que os da sexta e pré sétima pandemias. *V. cholerae* O139 foi observado muita semelhança com os isolados do início da sétima pandemia com diferença de apenas duas bandas. Concluíram os autores que há necessidade de mais estudos envolvendo o seqüenciamento de DNA, e que embora a ribotipagem possa fornecer uma grande indicação do ribotipo, os resultados não foram suficientes para estabelecer um clone da sétima pandemia.

KARAOLIS<sup>67</sup> e col. (1995), realizaram estudo epidemiológico, envolvendo cepas de *V. cholerae* da sexta e sétima pandemias e estudaram a relação dessas cepas com outras cepas de *V. cholerae* não O1. Os genes codificadores da utilização de

aspartato semialdeído dehidrogenase (asa), o qual tem a função de determinar uma via comum para a biossíntese de treonina, lisina e metionina, foram utilizados para relacionar as cepas estudadas. Pesquisas realizados anteriormente demonstraram, através do emprego de técnicas de polimorfismo de rRNA, PFGE e multilocus enzimático, que as duas pandemias eram derivadas de clones distintos de V. cholerae. O uso dessa nova fração, para o estudo, revelou que as cepas com antígeno O1 não pertenciam ao mesmo grupo e que, embora o antígeno O1 seja relacionado com a pandemia, o mesmo está presente em várias linhagens bacterianas e parecem insuficientes para identificar um "cluster" separado, podendo haver transferência desse gene entre cepas de V. cholerae no ambiente.

#### 2. OBJETIVOS

Dando prosseguimento ao trabalho de mestrado desenvolvido em 1995, em que foram pesquisadas sessenta e quatro amostras de água da Represa de Guarapiranga, SP, para a presença de *Aeromonas* spp, onde 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%. Foi também pesquisada a presença de fatores de virulência, os quais revelaram que 80,0% 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. Complementarmente, 86,6% de *A. hydrophila*, 33,3% de *A. caviae*, 60,0% de *A. sobria* e 100,0% de *A. jandaei* foram produtoras de β-hemólise em ágar sangue, confirmando o elevado potencial patogênico desses microrganismos, e considerando como referencial os seguintes aspectos:

- a grande diversidade e o potencial patogênico das cepas de *Aeromonas* isoladas do ambiente aquático da Represa de Guarapiranga;
  - a necessidade de uma melhor caracterização molecular desses isolados;
- os escassos estudos de natureza molecular com microrganismos do gênero Aeromonas no Brasil;
- que o método de ribotipagem tem sido empregado com sucesso na caracterização de microrganismos de diferentes gêneros e espécies;
- qua a pesquisa de plasmídios tem sido empregada em estudos epidemiológicos e ecológicos; e,

- a necessidade de serem estabelecidos marcadores para utilização em estudos de epidemiologia molecular. Com base nesses aspectos estabeleceu-se os seguintes objetivos:
- caracterizar genotipicamente, através da ribotipagem, as culturas de A. hydrophila, A. caviae, A. sobria e A. jandaei isoladas da Represa de Guarapiranga;
- relacionar os polimorfismos obtidos na ribotipagem, com os testes fenotípicos e de virulência realizados previamente;
- pesquisar a a ocorrência de plasmídios nas culturas de A. hydrophila, A. caviae, A. sobria, e A. jandaei isoladas da Represa de Guarapiranga; e,
- relacionar os perfis plasmidiais encontrados, com os dados de isolamento e virulência previamente obtidos.

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas 60 cepas de *Aeromonas*, 15 *A. hydrophila*, 15 *A. caviae*, 15 *A. sobria* e 15 *A. jandaei*, isoladas do reservatório de Guarapiranga São Paulo. Estas cepas já foram caracterizadas fenotipicamente, e avaliadas quanto a produção de fatores de virulência, utilizando modelo animal (teste de alça ligada) e hemólise em ágar sangue.

Os pontos da Represa de Guarapiranga de onde foram coletadas as amostras de água para isolamento das cepas de *Aeromonas* utilizadas neste estudo estão apresentadas na Figura 1. Estes pontos foram designados como I, II, III, IV e V, onde o ponto I está localizado logo acima da barragem, onde é feita a captação de água para tratamento, e os demais pontos a partir do primeiro distanciando-se da barragem, e situados próximos de clubes desportivos. Foram realizadas algumas amostragens de material de sedimento nos mesmos pontos de coleta acima descritos, os quais foram denominados com o número do ponto de isolamento acrescido da letra "F" para identificar as amostras de fundo.

As cepas de *Aeromonas* foram submetidas à caracterização molecular pela técnica de ribotipagem tendo seus perfis comparados e agrupados de acordo com a similaridade apresentada. O desenvolvimento da parte técnica foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

#### 3.1. Estocagem das culturas

Todas as cepas foram reisoladas em ágar Lúria (anexo A.1.1); uma unidade formadora de colônia foi semeada em 3 mL de caldo Lúria, incubada a 35°C por 24

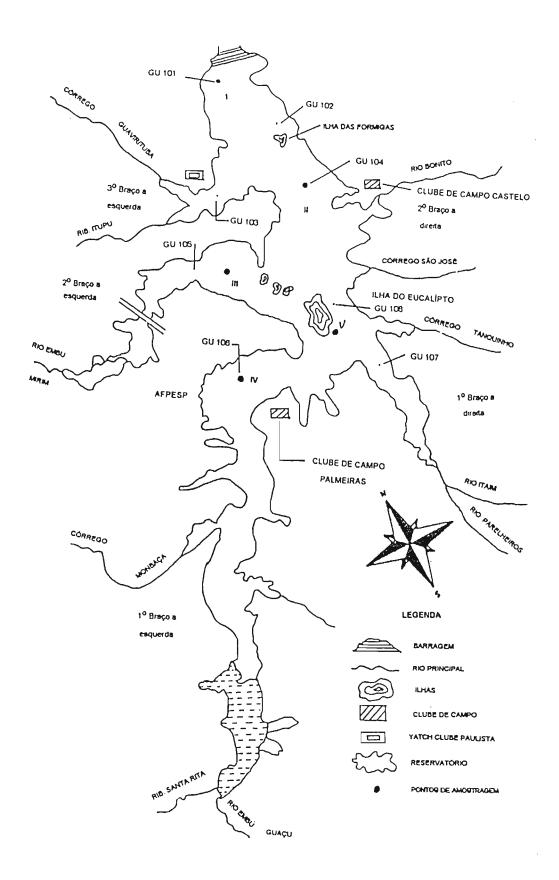


FIGURA 1 Pontos de amostragem, do reservatório de Guarapiranga São Paulo, de onde foram isoladas as cepas de *Aeromonas* spp, 1992

horas. Após esse período de tempo, 0,5 mL da cultura foi adicionado a um microtubo de polipropileno "eppendorf" contendo 0,5 mL de caldo Lúria com 30% de glicerina estéril para conservação a -70°C para estudos posteriores, e uma alça da cultura foi semeada em ágar Lúria inclinado, e incubado a 35°C por 24 horas (cultura de trabalho).

## 3.2. Extração do DNA genômico

Foi utilizada uma modificação da metodologia **MURRAY** de THOMPSON<sup>103</sup> (1980), para extração de DNA em plantas descrita por RIVERA<sup>114</sup> e col. (1995), sem a utilização de fenol. Todas as cepas foram semeadas em ágar Lúria (anexo A.1.2), por toda superficie de uma placa de Petri, cultivadas por 18 horas a 35°C, sendo que todo crescimento da placa foi ressuspenso em 4,75 mL de solução tampão TE I (anexo A.2.1), onde foi adicionado 125 µL de uma solução a 10% de SDS e 12,5 µL de uma solução de proteinase K (20 mg/mL em água milli Q), o qual foi agitado com cuidado e incubado por uma hora a 37°C. Após a incubação foi : adicionado 0,6 mL de uma solução 5M de NaCl e 375 µL de CTAB (anexo A.2.3) preaquecido a 65°C, homogeneizado cuidadosamente, e incubado na mesma temperatura por 20 minutos. Em seguida foi adicionada igual quantidade de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), aproximadamente 6 mL, e após homogeneização a mistura foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida com cuidado para outro tubo e então tratada, novamente, com igual quantidade de clorofórmio e novamente centrifugada. A solução de ácido nucléico da fase aquosa foi removida para um tubo de vidro e precipitada com 0,6 vezes o volume de 2-propanol (álcool isopropílico), retirado com uma vareta de vidro,

lavado com etanol 70% e seco sob vácuo. Finalmente, o DNA foi dissolvido em 500 μL da solução tampão TE II (anexo 2.4).

# 3.2.1. Tratamento com ribonuclease

Ao DNA, devidamente ressuspenso em 500 μl de tampão TE II (anexo A.2.4), foi adicionado 5 μl de solução de RNAse 10 mg/mL (Boehringer Mannheim); os tubos foram homogeneizados, tampados e em seguida incubados por uma hora, em Banho Maria, a 37°C. Após esse período de tempo, os tubos foram levados para banho de gêlo e foi adicionado 30 μL de solução de acetato de sódio 3 M, pH 4,5. Após a homogeneização, os DNAs foram precipitados com a adição de 3 mL de álcool etílico gelado (-20°C); os tubos foram agitados por inversão e o DNA recuperados com capilar de vidro, lavados com etanol 70%, e levados para secagem em dessecador por uma hora.

Depois de secos os DNAs foram ressuspensos em tampão TE II (anexo A.2.4), pH = 8,0 e armazenados sob refrigeração (4°C)até o momento do uso.

#### 3.2.2. Concentração do DNA genômico

A concentração do DNA genômico foi medida por comparação com um marcador de peso molecular e concentração de DNA. O fago λ DNA 0,5 μg foi digerido com enzima *Hind* III e as concentrações dos fragmentos foram calculadas.

## 3.2.3. Qualidade do DNA genômico

A eletroforese foi realizada de acordo com metodologia descrita por SAMBROOK<sup>119</sup> e col. (1989) em gel de agarose (Sigma) na concentração 1% em tampão TAE (anexo A.3.1).

## 3.2.3.1. Preparo da amostra para eletroforese

Foram adicionados, em um tubo "eppendorf", 2  $\mu$ L do DNA genômico, 2  $\mu$ L de tampão TE II (anexo A.2.4) e 1  $\mu$ L de uma solução tampão corante de gel 6X (anexo A.3.2).

## 3.2.3.2. Marcador de peso molecular

Em um tubo "eppendorf" foram adicionados 1  $\mu$ L de marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA *Hind* III (Promega Co., Madison, WI), 3  $\mu$ L de tampão TE II e 1  $\mu$ L de solução tampão corante de gel 6X.

Após homogeneização as amostras foram centrifugadas, rapidamente, e colocadas, em Banho Maria, a 50°C por 10 minutos e a seguir em banho de gelo.

As amostras foram adicionadas nas posições correspondentes aos poços do gel de agarose e colocado na cuba de eletroforese contendo tampão TAE 1X.

A corrida eletroforetica foi realizada sob uma intensidade de corrente elétrica de 50 volts durante, aproximadamente, três horas (Eletrophoresis systems, Fischer Biotech, Pittsburgh, PA). Em seguida o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio e visualizado em uma fonte de luz ultravioleta a 312 nm. Os resultados foram fotografados usando câmara e filme Polaroid tipo 667.

#### 3.3. Ribotipagem

O procedimento foi realizado segundo as recomendações de POPOVIC<sup>113</sup> e col., 1993, onde foi efetuada a clivagem do DNA bacteriano com a enzima de restrição Pst I (Boehringer Mannheim), segundo metodologia descrita em SAMBROOK<sup>119</sup> e col., 1989, seguida por eletroforese em gel de agarose 1%, com posterior transferência

para membrana de nylon (Southern Blot)<sup>131</sup> para hibridização da membrana com sonda para fragmento 5+16+23s do rRNA de *Escherichia coli*, utilizando-se o "Kit" de detecção DIG DNA Labeling and Detection GENIUS (Boehringer Mannheim), conforme metodologia descrita a seguir:

### 3.3.1 Digestão do DNA genômico

A digestão foi realizada com 1μg DNA de cada cepa de *Aeromonas* com a enzima de restrição *Pst* I (10 U/μl) por um período de uma hora a 37°C em Banho Maria. Após a digestão, as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos.

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese horizontal sob uma intensidade de corrente elétrica de 55 volts, durante aproximadamente 5 horas. Foi utilizado também, em paralelo, um marcador de peso molecular λ DNA digerido com *Hind* III ao lado do gel, na primeira posição. Em seguida o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio e visualizado em uma fonte de luz ultravioleta a 312 nm. Os resultados foram fotografados usando câmara e filme Polaroid tipo 667.

# 3.3.2. Transferência dos segmentos de DNA para membrana de nylon (Southern Blot)

O gel de agarose contendo os fragmentos do DNA digerido foi tratado por 10 minutos em solução I (anexo A.4.1) e em seguida lavado com água destilada por duas ou três vezes

Finalmente, a desnaturação do gel foi realizada em solução II (anexo A.4.2) por 30 minutos, e em seguida lavado com água destilada. A seguir procedeu-se à neutralização do gel com solução III (anexo A.4.3) e a lavagem com água destilada.

Após este tratamento a transferência foi iniciada segundo as recomendações de SAMBROOK e col. 119. O tempo de contato do gel com a membrana de nylon foi de 12 a 16 horas, numa solução de 20X SSC (anexo A.4.4). Depois deste período a membrana foi seca e o DNA fixado sob luz ultravioleta usando o aparelho STRATALINKER UV CROSSLINKER 1800, (Stratagene).

#### 3.3.3. Preparação da sonda

Para a hibridização foi utilizada como sonda o plasmídio pKK3535 de 11,864 Kb albergando os segmentos 5s,16s e 23s do rRNA de *E. coli*<sup>16</sup> marcado com digoxigenina utilizando-se o "Kit GENIUS LABELING AND DETECTION" (Boehringer Mannheim).

#### 3.3.3.1. Extração e purificação do plasmídio

O plasmídio pKK 3535 foi extraído pela metodologia descrita para extração de plasmídios por BIRNBOIN E DOLY<sup>15</sup> (1979), e purificada segundo a metodologia descrita por MARTINS<sup>89</sup> e col. (1992), utilizando o Kit GENE CLEAN II Kit BIO 101 Inc.:

• Após uma eletroforese com um volume total de 200 μl do plasmídio, a banda representante do segmento com peso de 11,864 Kb, foi observada, por exposição rápida do gel de agarose, corado com brometo de etidio, a luz ultravioleta do transiluminador, e o fragmento foi cortado e colocado em um tubo plástico previamente tarado. Este procedimento foi realizado no menor espaço de tempo

possível, para evitar danos ao DNA plasmidial, por excessiva exposição à luz ultravioleta.

- Após a determinação do peso do gel, contendo o plasmídio, foi adicionada uma solução estoque de NaI na proporção de 4,5 vezes o peso do gel que foi homogeneizado e aquecido a 55°C por 5 minutos, ou tempo suficiente para dissolver o gel, agitando-se de tempos em tempos.
- Uma suspensão de "Glassmilk" foi adicionada de acordo com a concentração de DNA plasmidial observado na comparação deste com o marcador λ DNA *Hind* III, na foto do gel, sendo que até 5 μg de DNA utilizou-se 5 μl de "Glassmilk". Essa mistura foi então homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, movimentado o tubo levemente a cada minuto.
- O complexo "Glassmilk"/DNA foi centrifugado por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 3 vezes com 200 a 700 μl de solução "New Ice" gelada, que foi então centrifugado por 1 minuto.
- O plasmídio foi dissolvido com a adição de 10 μl de tampão TE II (anexo A.2.4) e incubado em Banho Maria com temperatura de 55°C por 3 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, o precipitado foi, novamente, ressuspenso com 5μL de tampão TE II e mais uma vez incubado em Banho Maria entre 45°C e 55°C por 3 minutos; depois da nova centrifugação, o sobrenadante foi retirado e juntado à porção anterior.
- Para verificar a pureza e o tamanho do plasmídio, uma aliquota deste DNA foi submetida à uma eletroforese.

#### 3.3.3.2. Marcação não radioativa da sonda

O plasmídio inteiro purificado, foi marcado com digoxigenina pelo método não radioativo a seguir descrito. Em um tubo de polipropileno "eppendorf", foram adicionados reagentes na seguinte ordem: uma aliquota correspondente a 10ng do plasmídio purificado (desnaturado por aquecimento em banho fervente por 10 minutos e resfriado no gelo); 2 μL de mistura de hexanucleotídeos; 2 μL de mistura de dNTP; 1 μl de enzima Klenow; e finalmete completou-se o volume para 20 μL.

A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C e em seguida a reação foi paralizada com a adição de 2 μL de EDTA 0,2 M, pH 8,0. O DNA foi precipitado com 2 μL de LiCl 4 M e 60 μL de etanol gelado (-20°C), a mistura foi homogeneizada e incubada a -70°C por 30 minutos. Após essa incubação centrifugou-se a 8.000 rpm por 30 minutos em uma microcentrifuga. O etanol foi decantado e o precipitado lavado com 100 μl de etanol 70% gelado, novamente, centrifugado por 5 minutos e o álcool removido. O precipitado foi então seco e ressuspenso em 50 μl de tampão TE II (anexo A.2.4) e armazenado até o momento do uso em temperatura de refrigeração (4°C).

#### 3.3.4 Pré-hibridização e Hibridização

As membranas de nylon, contendo os fragmentos de restrição do DNA imobilizado, foram pré-tratadas com uma solução de pré-hibridização (anexo A.5.1) no aparelho "Hybridise HB20 Techne", por duas horas a 68°C. Após uma hora, a solução foi substituída por 10 mL de solução de hibridização contendo a sonda marcada com a digoxigenina, previamente desnaturada (fervida por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos). A membrana foi hibridizada a 68°C "overnight".

#### 3.3.5. Lavagem das membranas e detecção da hibridização

Após a retirada da solução de hibridização, as membranas foram removidas do aparelho hibridizador e transferidas para uma cuba de vidro, com a face voltada para cima, onde foram lavadas com 300mL de solução A (anexo A.5.2), por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação. Esse passo foi repetido duas vezes.

As membranas foram então lavadas duas vezes com 300 mL de solução B (anexo A.5.3) por 15 minutos a 68°C com agitação.

A seguir foram transferidas para uma cuba de vidro onde foram lavadas com 100mL de tampão 1 (anexo A.5.4), durante 1 minuto e logo após com 200 mL de tampão 2 (anexo A.5.5) por 30 minutos, à temperatura ambiente.

O conjugado antidigoxigenina foi preparado adicionando-se 8 µL de conjugado 40 ml de tampão 1. As membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos nessa solução e, lavadas com 100 mL de tampão 1 por 15 minutos.

As membranas foram equilibradas utilizado-se 80 mL de tampão 3 (anexo A.5.6) por 2 minutos.

Em seguida, as membranas foram transferidas para um saco plástico, onde foi adicionada a solução de cor (anexo A.5.7). Os sacos plásticos foram então fechados, as bolhas de ar removidas e esse ficou incubado, na ausência de luz sem agitação, e a temperatura ambiente.

A reação de cor pode variar de minutos a horas, então para a interrupção da reação foi utilizado o tampão TE II (anexo A.2.4) por 10 minutos. As membranas foram então secas ao ar, copiadas reprograficamente e mensuradas as bandas de hibridização

#### 3.3.6. Medidas das bandas

As medidas foram tomadas considerando como início o poço de inserção da amostra e como final a base de cada banda visível. As medidas em milímetros foram anotadas e então transferidas para o programa DNASTAR, para a conversão das medidas de percurso em peso (Kilobases) em comparação com o percurso das bandas com peso conhecido do fago λ DNA digerido com enzima *Hind* III que evidencia os fragmentos de 23,1; 9,4: 6,6; 4,4; 2,3; 2,0; 0,5 Kb.

## 3.4. Extração de DNA plasmidial

Depois de crescidas em caldo Lúria (anexo A.1.1) "overnigth", 0,8 mL de caldo de cultura das cepas bacterianas foram transportadas para um tubo tipo "eppendorf", centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μl de solução I (anexo A.6.1). O precipitado ressuspenso, foi incubado em banho de gelo por 30 minutos.

A cada tubo foi adicionado 200 μL de solução II (anexo A.6.2); os tubos foram agitados 6 a 8 vezes e incubados em banho de gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150 μL de solução III (anexo A.6.3), voltou-se a homogeneizar por inversão 12 a 15 vezes, até ser observada a formação de um precipitado branco floculento, o qual foi incubado em banho de gelo por uma hora e trinta minutos. Após este período os foram centrifugados a 4°C por 25 minutos à velocidade de 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno tipo "eppendorf" (aproximadamente 400 μL); em seguida foi adicionado um mL de etanol P.A. gelado (-20°C) e por inversão homogeneizou-se os tubos, incubando-os por no mínimo uma hora a -20°C.

Na sequência do procedimento, os tubos foram centrifugados à velocidade de 10.000, rpm por 25 minutos a 4°C; os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 100 μL de solução IV (anexo A.6.4), agitado, e em seguida adicionados de 250 μl de etanol P.A. gelado (-20°C) o qual foi, novamente, homogeneizado por inversão dos tubos, e incubados por 18 horas a -20°C.

No dia seguinte, após centrifugação por 20 minutos a 4°C e 10.000 rpm, os sobrenadantes foram descartados e ao precipitado foi adicionado etanol 70% gelado (-20°C); centrifugados, pelo mesmo tempo e temperatura e descartados os sobrenadantes. Após a secagem do sedimento, em dessecador por uma hora, os conteúdos dos tubos foram dissolvidos em 15 µL de tampão TE II (anexo A.2.4) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (intensidade de corrente de 45 v), para detecção da presença de bandas de plasmídios, as quais foram visualizadas por coloração do gel de agarose com brometo de etídio e observados em fonte de luz ultravioleta. Os géis foram então fotografados, em câmara Polaroid 667, as bandas de plasmídios observadas e as medidas foram convertidas em pares de bases através do programa DNASTAR. Os perfis obtidos para cada cepa foram comparados, para determinação de um padrão comum, e analisados quanto à correlação com produção de fatores de virulência.

#### 3.5. Análise dos dados

# 3.5.1. Ribotipagem

As características do polimorfismo na Ribotipagem foram analisados com o auxílio de computador, utilizando o programa "RAPD103", para análise por agrupamento ("clusters"), pelo coeficiente de similaridade de DICE<sup>33</sup>, 1945, com o qual foram construídos os dendrogramas.

#### 3.5.2. Perfil plasmidial

A análise da correlação entre a presença de plasmídios e a produção de fatores de virulência foi realizada mediante a utilização do programa SPSS-PC, aplicando-se o teste "t" de Student para comparação de médias.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Programa para análise do perfil gerado pelo processo de ribotipagem fornecido via Internet da seguinte fonte: http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html

#### 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Ribotipagem

#### 4.1.1- Extração do DNA genômico:

Das 60 cepas de *Aeromonas* utilizadas para o presente estudo, 54 (90%) apresentaram respostas à extração do DNA genômico pelo método aplicado (MURRAY & THOMPSON<sup>103</sup>, 1980 modificado por RIVERA<sup>114</sup> e col. 1995).

A utilização da metodologia empregando clorofórmio-álcool isoamílico para a extração de DNA genômico de bactérias do gênero *Aeromonas* no presente trabalho, foi escolhida por ser um método que havia sido aplicado anteriormente para bactérias do gênero *Vibrio*<sup>115</sup>. Esse apresentou um bom rendimento em concentração de DNA, para esse grupo de bactérias, além de ser menos agressiva que o método utilizando fenol-clorofórmio para a extração, o qual apresenta superior toxicidade, além de ser de dificil descarte.

Os resultados satisfatórios obtidos neste estudo, para a extração do DNA genômico de cepas de *Aeromonas*, em relação à utilização de clorofórmio-álcool isoamílico, pode ser resultante da utilização de meio sólido (Ágar Lúria) para a produção de massa bacteriana inicial. Outros protocolos utilizam meios líquidos para crescimento da cepa bacteriana a ser submetida ao processo de extração, porém, a utilização do meio alternativo provavelmente tenha diminuído a possibilidade de atuação da enzima DNAse, que geralmente é produzida por espécies de *Aeromonas* empregadas neste estudo<sup>23,112</sup>, favorecendo assim a obtenção de uma maior concentração de DNA genômico.

Das 54 cepas que tiveram seus DNAs genômicos extraídos por esse método, foi observado que o rendimento e qualidade do DNA foram satisfatórios para o desenvolvimento do trabalho proposto. A concentração de DNA variou de 0,2 a 3,0 μg/μL como pode ser observado nos **Quadros 2-5**.

## 4.1.2. Digestão com enzima de restrição

Com base na análise da literatura levantada, foi observado que as enzimas de restrição que são utilizadas com maior frequência, para digestão do DNA genômico de cepas de *Aeromonas*, são *Sma* I e *Pst* I. Desta forma, foi realizado um pré-teste com essas enzimas e as cepas de *Aeromonas*, empregadas neste estudo, onde foi observado que, somente, a enzima *Pst* I promoveu a digestão dos DNAs das cepas.

No processo de digestão com enzimas de restrição, o qual é um passo básico para o estudo de ribotipagem, foi observado que a digestão com a enzima *Pst*I foi satisfatória para a digestão em 98,4% das cepas de *Aeromonas* empregadas neste estudo.

Diversos autores que trabalharam com enzimas de restrição, para digestão de DNA genômico de cepas de *Aeromonas*, observaram perfis com resultados semelhantes com o uso de diferentes enzimas de restrição<sup>4,50,75</sup>, embora KUIJPER<sup>74</sup> e col., 1989a tenham revelado que 15% do DNA das cepas de *Aeromonas* estudadas por eles não responderam à digestão com a enzima de restrição *Pst* I.

A enzima de restrição *Sma* I indicada por outros autores para a digestão de DNA genômico de cepas de *Aeromonas*, não apresentou resultados satisfatórios na digestão do DNA das cepas testadas no presente trabalho e, portanto, foi substituída

Quadro 2. Distribuição das cepas de Aeromonas hydrophila, segundo o ponto de isolamento no reservatório de Guarapiranga, a concentração de DNA obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, São Paulo, 1996.

| Espécie                                 | Número<br>da cepa | Ponto de la Isolamento | Concentração<br>[µg/µL DNA] | Hemólise (ágar sangue) | Alça Ligada<br>(mL/cm) |
|---|-------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
|   | 1085              | III                    | 1,2                         | β                      | •                      |
| A. 12                                   | 747               | III                    | 0,7                         | β                      | 0,35                   |
| NATIONAL PROPERTY.                      | 1466              | III                    | 2,4                         | β                      | 0,46                   |
| h                                       | 338               | II                     | 0,2                         | β                      | 0,25                   |
|   | 920               | 11                     | 1,2                         | β                      | -                      |
| d                                       | 1028              | IV F                   | 1,2                         | β                      | 0,29                   |
|   | 324               | I                      | 0,2                         | β                      | 0,10                   |
| and of the                              | 1171              | IIF                    | 0,7                         | β                      | 0,40                   |
| nin p                                   | 1728              | III F                  | 3,0                         | β                      | ~                      |
| h                                       | 1206              | IV F                   | 0,2                         | β                      | 0,46                   |
| 111111111111111111111111111111111111111 | 1450              | II                     | 0,5                         | β                      | -                      |
| DOM: Latin                              | 260               | II                     | 0,6                         | α                      | 0,20                   |
| li a                                    | 1622              | IV F                   | _                           | β                      | 0,61                   |
| isideji lida                            | 749               | III                    | 0,5                         | β                      | -                      |
| THE TARREST OF                          | 1060              | II                     | 1,2                         | β                      | -                      |
|   | ATCC              | -                      | 1,2                         | β                      | -                      |

Quadro 3. Distribuição das cepas de Aeromonas caviae, segundo o ponto de isolamento no reservatório de Guarapiranga, a concentração de DNA obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, São Paulo, 1996.

| Espécie              | Número<br>da cepa | Ponto de<br>Isolamento | Concentração [µg/µL DNA] | Hemólise (ágar sangue) | Alça Ligada<br>(ml./cm) |
|----------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| THERE                | 1061              | II                     | 1.2                      | β                      | -                       |
| #3m/#07m             | 1592              | I                      | 1.2                      | •                      | 0.23                    |
|                      | 932               | II                     | 1.2                      | -                      | 0.47                    |
| A.                   | 1659              | I                      | 0.2                      | α                      | 0.25                    |
| PORMINE              | 1272              | II                     | 0.2                      | β                      | 0.25                    |
| C C                  | 271               | II                     | 0.5                      | β                      | 0.12                    |
| a line               | 1107              | IV                     | 0.5                      | α                      | 0.25                    |
| V V                  | 452               | IV                     | 0.2                      | -                      | -                       |
| 理問題開                 | 1731              | III F                  | 0.2                      | β                      | 0.43                    |
| 1121 <b>a</b> 11414  | 878               | V                      | 0.2                      | -                      | 0.40                    |
| · e                  | 1438              | II                     | 0.2                      | α                      | 0.30                    |
| understand state     | 1197              | IV F                   | 0.2                      | β                      | 0.27                    |
| Partie of the second | 1106              | IV                     | 1.2                      | β                      | -                       |
|                      | 313               | IV                     | 0.2                      | α                      | 0.12                    |
| 加坡四個門里               | 732               | III                    | 1.8                      | α                      | 0.50                    |

Quadro 4. Distribuição das cepas de Aeromonas sobria, segundo o ponto de isolamento no reservatório de Guarapiranga, a concentração de DNA obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, São Paulo, 1996.

| Espécie                 | Número<br>da cepa | Ponto de Isolamento | Concentração<br>[μg/μL DNA] | Hemólise (ágar sangue) | Alça Ligada<br>(mL/cm) |
|-------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
|                         | 669               | IV                  | 0.7                         | β                      | 0.92                   |
| thus the managed and    | 382               | IV                  | 0.4                         | α                      | 0.1                    |
| ALLEGE PROGRESS FOR THE | 303               | IV                  | 0.6                         | β                      | 0.20                   |
| A                       | 232               | III                 | 0.6                         | α                      | -                      |
|                         | 439               | IV                  | 1.8                         | β                      | 0.13                   |
| S. S. S.                | 1027              | IV F                | 0.7                         | β                      | 0.16                   |
| illio illi              | 564               | III                 | 0.5                         | α                      | 0.12                   |
| b                       | 692               | I                   | 2.2                         | -                      | 0.24                   |
| r in the                | 990               | V                   | 1.2                         | β                      | -                      |
| line and I have been    | 108               | III                 | 0.2                         | β                      | -                      |
| a                       | 846               | III                 | . 0.2                       | β                      | 1.14                   |
| Constant arteru         | 1129              | VF                  | 0.6                         | β                      | 0.29                   |
| Shiring artification    | 1490              | IV                  | 1.2                         | α                      | 0.15                   |
| standary (hide)         | 1395              | VF                  | -                           | β                      | 0.40                   |
| Henry Andrews           | 1669              | _ II                | -                           | β                      | 0.42                   |

Quadro 5. Distribuição das cepas de Aeromonas jandaei, segundo o ponto de isolamento no reservatório de Guarapiranga, a concentração de DNA obtida e os resultados de hemólise em ágar sangue e acúmulo de fluído em alça ligada, São Paulo, 1996.

| Espécie          | Número<br>da cepa | Ponto de Isolamento | Concentração [µg/µL DNA] | Hemólise<br>(ágar sangue) | Alça Ligada<br>(mL/cm) |
|------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
|                  | 294               | III                 | -                        | β                         | 0.33                   |
|                  | 491               | III                 | 0.2                      | β                         | 1.07                   |
| 地區的海流            | 1034              | VF                  | 0.5                      | β                         | 0.16                   |
| A. 3             | 882               | II F                | 0.2                      | β                         | 0.53                   |
| Man of John Cale | 981               | IV                  | 1.2                      | β                         | 0.23                   |
|                  | 554               | II                  | 1.2                      | β                         | 0.70                   |
| atina a pilipi   | 638               | Ш                   | 0.2                      | β                         | 1.05                   |
| malarin n marin  | 396               | I                   | 1.2                      | β                         | 1.05                   |
| d                | 186               | III                 | 0.2                      | β                         | 0.37                   |
| Mar ar min       | 1136              | V                   | 0.2                      | β                         | 0.26                   |
| nde e            | 508               | IV                  | 1.2                      | β                         | _                      |
| distribution     | 225               | II                  | 0.5                      | β                         | 0.3                    |
| MARINE STATE     | 1341              | IV                  | 0.6                      | β                         | 0.27                   |
|                  | 117               | III                 | 0.6                      | β                         | 0.53                   |
|                  | 746               | III                 | -                        | β                         | 0.96                   |

pela enzima Pst I. Segundo a literatura essa última enzima de restrição, Pst I, gera perfis e números de grupamentos, em estudos de ribotipagem, semelhantes aos produzidos pela enzima Sma I,quando aplicada para esses microrganismos<sup>4,49</sup>, tendo sido eficaz na digestão dos mesmos DNAs testados com a enzima de restrição Sma I, sob as condições estabelecidas pelo fabricante para cada enzima. A Figura 2 apresenta DNAs de cepas de Aeromonas testadas quanto à digestão com enzima de restrição Sma I, onde pode ser observada a ausência de bandas de restrição, após eletroforese em gel de agarose.

Os perfis resultantes da digestão dos DNAs, com esta enzima de restrição, *Pst* I, apresentaram-se com um número muito elevado de bandas de restrição, distribuídas por toda a área do gel de agarose e muito próximas umas das outras, dificultando a análise desta metodologia para as cepas estudadas. A dificuldade de análise do perfil gerado por enzimas de restrição é um fato já observado, anteriormente, por outros autores, que utilizaram esse método como base para outros estudos<sup>4</sup>.

Embora o padrão resultante desse processo não tenha sido de valia na análise de diferenças entre as cepas, o resultado da digestão apresentou os requisitos necessários para sua aplicação, como base para estudos de ribotipagem, ou seja, um número grande de bandas distribuídas por toda a extensão do gel de agarose<sup>135</sup>.

As FIGURAS 3 (a e b), apresentam DNAs de *Aeromonas* submetidos à digestão com a enzima Pst I, onde pode ser observada a presença e a distribuição das bandas de restrição por toda a superfície do gel de agarose.

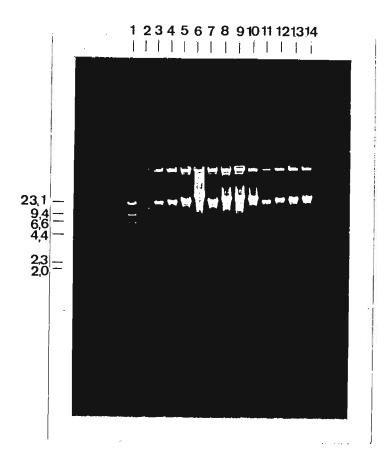


FIGURA 2. DNA genômico de cepas de *Aeromonas* submetidas à digestão com a enzima de restrição *Sma* I. Linha 1- Marker II, linha 2- Plasmídio pKK3535 *E. coli*, linha 3-5 - *A. hydrophila*, linha 6-7 *A. sobria*, linha 8- *A. jandaei*, linha 9- *A. caviae* e linhas 10-14 *A. jandaei* 

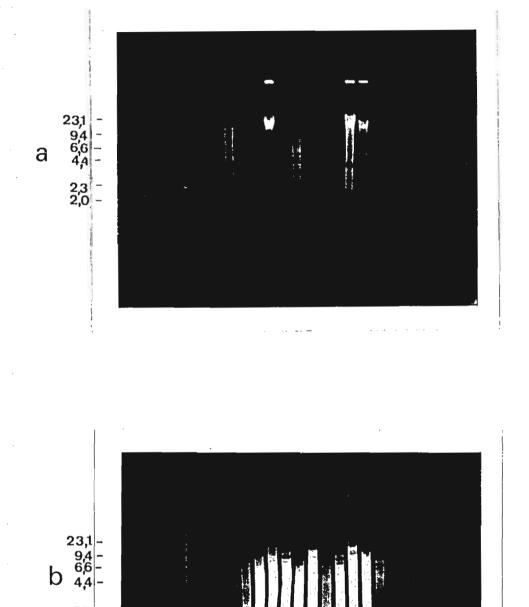


FIGURA 3. Perfil de digestão do DNA genômico com enzima de restrição Pst I, de diferentes espécies de Aeromonas, 1996.

#### 4.1.3. Hibridização

Após a transferência dos fragmentos do DNA para a membrana de nylon, pelo método de SOUTHERN<sup>131</sup>, e a hibridização dos fragmentos com o plasmídio albergando os fragmentos 5, 16 e 23S do rRNA de *E. coli*, marcado, foi observada uma diminuição do número de bandas a serem analisadas, resultando em um número de bandas que variou entre 4 e 16 para cada amostra de DNA.

As **Figuras 4 (a e b)** apresentam os perfis obtidos após a hibridização dos DNAs digeridos das diferentes cepas de *Aeromonas*. Este novo perfil, permitiu que fossem determinadas com clareza, as distâncias de percurso de cada banda e, ainda, o número exato das mesmas na membrana de nylon, contendo no final, as bandas geradas pelo processo de hibridização com a sonda genética.

De forma semelhante, KUIJPER<sup>75</sup> e col. em 1989b, trabalhando com cepas de *Aeromonas* de origem clínica, observaram uma redução no número de bandas a ser analisadas, após o processo de hibridização da membrana, contendo as bandas de restrição, com sonda genética albergando os fragmentos 16S e 23S do rRNA de *E.coli*, o qual passou a apresentar de 8 a 13 bandas para cada perfil.

No total, o processo de hibridização gerou 130 bandas com pesos moleculares distintos que variaram entre 1,3 e 28,6 Kb. Resultado semelhante a esse foi observado por HÄNNINEM<sup>49</sup> e col., (1995a), em trabalho realizado com cepas de *Aeromonas*, provenientes de amostras clínicas, onde obtiveram bandas com peso variando entre 0,8 e 23 Kb, após a hibridização com sonda genética albergando os mesmos fragmentos utilizados no trabalho em tela.



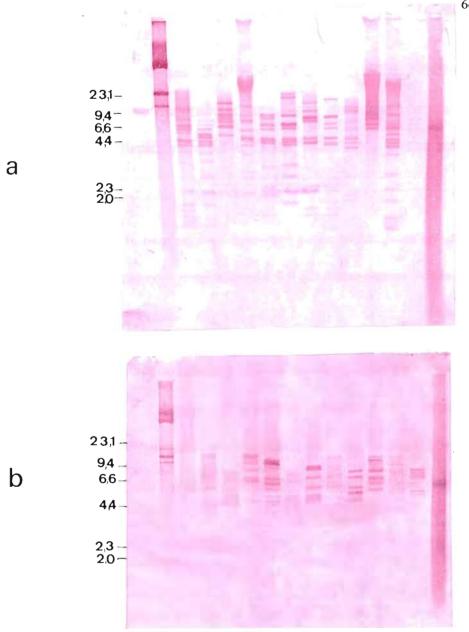


FIGURA 4. Perfil de digestão com enzima de restrição Pst I, de diferentes espécies de Aeromonas, e hibridização das bandas de restrição com sonda genética albergando os fragmentos 5S, 16S e 23S do rRNA de E. coli.

Em um segundo trabalho, no mesmo ano, HÄNNINEM<sup>50</sup> e col. (1995b), estudando cepas de Aeromonas salmonicida, responsáveis por doença em peixes observaram perfis contendo bandas que variaram entre 0,8 e 23 Kb, utilizando a mesma sonda genética.

Da análise da presença de bandas, com diferentes pesos moleculares em cada perfil, foi observado que as bandas com peso inferior a 4,0 Kb foram menos frequentes que as bandas com peso superior a esse.

De forma geral, os trabalhos aplicando a técnica de ribotipagem para espécies de *Aeromonas*, utilizam de 2 a 5 μg de DNA para a digestão com enzimas de restrição<sup>50,52</sup>. Este artefato proporciona um perfil contendo maiores concentrações de cada banda de restrição, permitindo assim, a visualização de fragmentos que estariam em menores concentrações, entretanto, pode haver uma sobreposição das bandas quando as concentrações forem maiores.

No presente estudo verificou-se que o fragmento de 0,8 Kb, comumente encontrado nos perfis obtidos através de técnicas de ribotipagem de cepas de *Aeromonas*, não estava presente. Esse fato pode ser resultado da menor concentração de DNA utilizado para digestão com enzima de restrição, que seria utilizado posteriormente empregado para a hibridização com a sonda genética nesse estudo (1μg).

Outros fragmentos, normalmente presentes na região de peso variando entre 0,8 e 4,0 Kb, poderiam estar em concentração abaixo da detectável pela sonda genética e portanto, não visualizados após a reação de detecção. Segundo observações feitas

por HÄNNINEM & SIITONEN<sup>51</sup> em 1995, fragmentos de pequeno tamanho nem sempre são visíveis após a hibridização com sonda genética, a menos que seja utilizado no mínimo 5 μg de DNA para digestão.

De forma semelhante à empregada no presente trabalho, ALTWEGG<sup>4</sup> e col. (1988), utilizaram 0,5 a 2µg de DNA genômico, para digestão com enzima de restrição quando trabalharam com espécies de *Aeromonas*, porém, os autores não relatam a faixa de peso molecular das bandas observadas nos perfis obtidos.

Diferente resultado foi obtido por HÄNNINEM<sup>50</sup> e col., 1995b, com cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas, em concentrações de DNA variando entre 2 e 5µg para digestão, onde os autores obtiveram fragmentos de baixo peso molecular.

## 4.1.4. Análise dos perfis de ribotipagem

Os perfis gerados pela análise da ribotipagem das diferentes espécies de *Aeromonas*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, após hibridização com a sonda genética, albergando os fragmentos 5S, 16S e 23S do rRNA de *E. coli*, determinou as matrizes de similaridade, as quais foram baseadas na comparação das bandas compartilhadas por pares de cepas empregadas neste estudo, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE<sup>35</sup>, 1945. As distâncias estimadas entre as cepas, foram utilizadas para a construção de dendrogramas que estão apresentados nas **Figuras 5-8.** 

Em resumo foram utilizadas para o estudo de ribotipagem, 13 cepas de Aeromonas hydrophila, 14 cepas de Aeromonas caviae, 13 cepas de Aeromonas

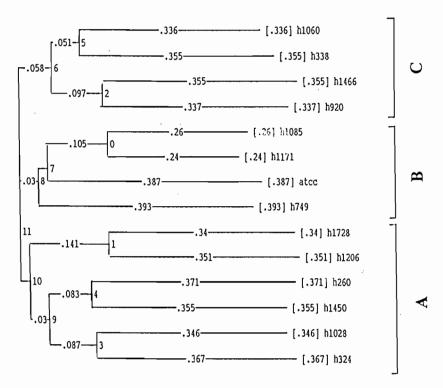


FIGURA 5. Representação gráfica, da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de similaridade de DICE, das cepas de *Aeromonas hydrophila*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem, 1996.

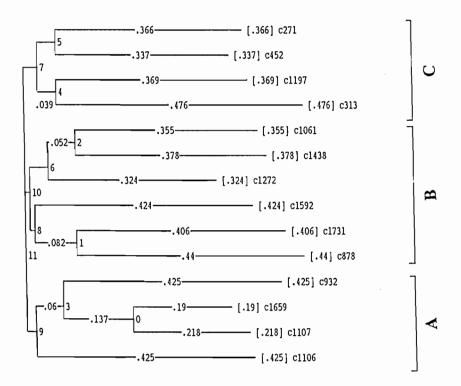


FIGURA 6. Representação gráfica, da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de similaridade de DICE, das cepas de *Aeromonas caviae*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem, 1996.

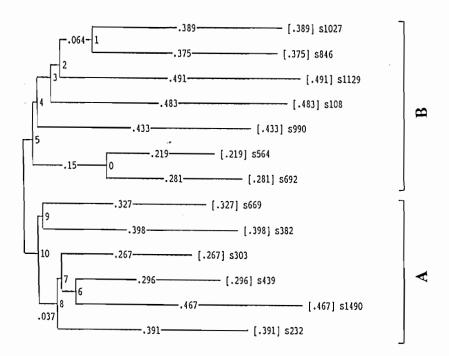


FIGURA 7. Representação gráfica, da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de similaridade de DICE, das cepas de *Aeromonas sobria*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem, 1996.

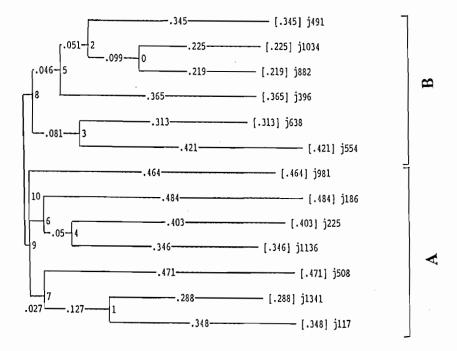


FIGURA 8. Representação gráfica, da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de similaridade de DICE, das cepas de *Aeromonas jandaei*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo e empregadas para o estudo de ribotipagem, 1996.

sobria, 13 cepas de Aeromonas jandaei, e ainda uma cepa de Aeromonas hydrophila padrão ATCC 7966.

As espécies *A. hydrophila* e *A. caviae* foram divididas em 3 agrupamentos diferentes e as espécies *A. sobria* e *A. jandaei* em 2 agrupamentos. Cada cepa estudada apresentou um perfil distinto de ribotipagem, independente da espécie analisada. Esses resultados concordam com aqueles obtidos por ALTWEGG<sup>4</sup> e col., 1988; HÄNNINEN<sup>49,50</sup> e col., 1995a,b em trabalhos empregando cepas de *Aeromonas*.

Para o desenvolvimento do trabalho em pauta, as diferentes espécies de Aeromonas foram separadas e os perfis analisados, individualmente, de forma que os resultados serão apresentados em separado para facilitar a interpretação dos mesmos.

A metodologia empregada foi altamente discriminatória, sendo capaz de diferenciar cepas isoladas de um mesmo ponto de amostragem da Represa de Guarapiranga, em alguns casos, discriminando aquelas que apresentaram um comportamento diferente frente a características fenotípicas variáveis próprias da espécie.

### 4.1.4.1. A. hydrophila

Para o estudo, 14 cepas de *Aeromonas hydrophila* foram submetidas ao processo de ribotipagem, incluindo a cepa padrão ATCC 7966, onde foi observado que cada uma apresentou um perfil distinto.

Essa espécie de *Aeromonas* foi agrupada em 3 agrupamentos diferentes denominados A, B e C, nos quais foi possível observar uma tendência para o agrupamento de cepas com a mesma origem, isto é, provenientes de um mesmo ponto de amostragem da

Represa de Guarapiranga. O Quadro 6 apresenta os respectivos pontos de isolamento, o comportamento frente a diferentes características fenotípicas e o conjunto de bandas constituintes de cada perfil.

No agrupamento A dessa espécie, ficaram agrupadas 6 cepas, sendo 3 cepas originárias de amostra de sedimento das quais duas foram coletadas no ponto IV, e uma no ponto III, e ainda duas cepas originárias de amostras de superficie do ponto de coleta II e uma cepa do ponto de coleta I .No agrupamento B ficaram agrupadas 4 cepas, 2 originárias do ponto III de isolamento, e que apresentavam prova de salicina positiva; uma cepa originária do ponto II, proveniente de amostra de sedimento; e ainda, a cepa padrão para essa espécie ATCC 7966.

No agrupamento C foram agrupadas 4 cepas, 3 provenientes do ponto III e uma cepa do ponto III.

Com a análise dos perfis obtidos dentro de cada agrupamento encontrado, foi possível observar a presença de bandas com pesos moleculares iguais, ou ainda muito próximos (com diferença até 0,2 Kb), entre as cepas agrupadas em um mesmo grupamento e que eram originárias de um mesmo ponto de amostragem. Este fato pode ser observado no **Quadro 6** onde, se verifica que as cepas 1028, 1206 e 1728, alocadas no agrupamento **A** e provenientes de amostras de sedimento, apresentaram uma banda em comum com peso molecular muito próximo, sendo 6,1 Kb para a primeira, 6,3 Kb para a segunda e 6,2 Kb para a terceira.

Quadro 6 . Resultado do comportamento frente a diferentes características fenotípicas, e bandas constituintes do perfil de ribotipagem apresentados por cepas de Aeromonas hydrophila de cada agrupamento observado, isoladas do Reservatório de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

| Agrupamento | Cepa | Ponto | SAL | MSE | VM | TTC | Bandas (Kb)   |  |  |
|-------------|------|-------|-----|-----|----|-----|---|--|--|
|             | 1028 | IVF   | -   | +   | -  | +   | 13.1 12.1 7.5 6.7 6.1 5.0 4.7 4.4                           |  |  |
|             | 1206 | IVF   | -   | +   | -  | +   | 12.3 11.2 8.2 7.5 6.3 5.7                                   |  |  |
| A           | 1728 | Ш     | -   | +   | -  | +   | 10.6 9.5 8.2 8.0 6.2 5.7                                    |  |  |
|             | 1450 | Ш     | -   | +   | -  | -   | 13.9 9.1 8.0 7.6 6.1 5.0 4.5 3.9 3.0 2.8 2.3                |  |  |
|             | 260  | П     | ~   | -   | +  | +   | 12.5 8.5 7.6 6.1 5.5 4.0 3.8 3.5                            |  |  |
|             | 324  | I     | +   | +   | -  | +   | 3.3 7.0 5.6 5.0 4.6 4.4                                     |  |  |
|             | 1085 | Ш     | +   | +   | +  | +   | 12.9 9.5 8.2 7.0 6.0 5.1 4.7 4.3 4.1 3.5 2.4 1.9 1.6 1.3    |  |  |
| [           | 749  | Ш     | +   | +   | -  | -   | 7.0 5.8 4.8 4.3 4.0 3.8 3.5 2.7 2,4 2.0                     |  |  |
| В           | 1171 | IIF   | -   | +   | -  | +   | 8.8 8.2 7.0 6.6 4.9 4.8 4.3 4.1 2.1 1.9 1.8 1.6 1.5 1.4 1.3 |  |  |
|             | atcc | 7966  |     | +   | +  | +   | 7.8 6.7 6.0 5.4 4.9 4.5 4.3 3.9 2.7 2.1 1.9 1.7 1.4         |  |  |
|             | 920  | П     | -   | -   | +  | +   | 17.4 12.1 9.8 8.1 7.2 4.8                                   |  |  |
|             | 1060 | П     | -   | +   | -  | +   | 9.1 7.9 6.3 5.2 4.8 4.5 4.0 3.4 1.8                         |  |  |
| C           | 338  | п     | -   | +   | -  | +   | 9.4 6.8 4.8 4.5   |  |  |
|             | 1466 | Ш     | -   | + _ | -  | +   | 17.6 11.9 10.1 9.0 8.1 6.4 4.8                              |  |  |

SAL- prova de acidificação da Salicina; MSE- prova de acidificação da Manose; VM -Reação de Vermelho de Metila; TTC-Prova de utilização do Cloreto de trifenil tetrazolium, F amostras de sedimento.

Foi observado que, embora determinados pela presença de bandas comuns em seus perfis de ribotipagem, os grupamentos dessas cepas de *Aeromonas hydrophila* puderam distinguir diferenças para as cepas do ponto de amostragem III. Uma dessas, a cepa 1466 alocada no agrupamento C, apresentou comportamento diferente frente à prova de salicina, e foi separada das outras duas (1085 e 749) que apresentaram resultado positivo para esta prova fenotípica.

Do mesmo modo, as cepas provenientes do ponto de amostragem II e alocadas nesse mesmo agrupamento, apresentaram em comum duas bandas de peso molecular igual a 6,1 e 7,6 Kb. Nesse grupo apenas a cepa 1450 apresentou uma característica, fortemente, discriminatória das outras provenientes desse ponto de amostragem e alocadas em outro agrupamento; a prova de TTC (Cloreto de trifeniltetrazolium) que foi negativa o qual permitiu separar essa cepa das outras com prova positiva e alocadas no agrupamento C. A cepa 260, que embora tenha apresentado um comportamento frente às características fenotípicas, semelhante às apresentadas pela cepa 920 e alocada no agrupamento C, tinha em seu perfil de ribotipagem a banda de 7,6 Kb, a qual não estava presente na cepas alocadas no agrupamento C e, também, não possuía a banda de peso molecular 4,8 Kb, presente em todas as cepas alocadas no agrupamento C.

A cepa 1171, proveniente de amostra de sedimento do ponto II da Represa de Guarapiranga, e alocada no agrupamento B, embora tenha apresentado comportamento frente às características fenotípicas semelhantes àquelas apresentadas pelas outras cepas provenientes de amostras de sedimento, foi separada do agrupamento A, onde estavam alocadas estas últimas.

#### 4.1.4.2 Aeromonas caviae

A análise de 14 cepas pertencentes a essa espécie, pelo sistema de similaridade, originou 3 agrupamentos que foram denominados A, B e C. O Quadro 7 apresenta as cepas de A. caviae empregadas para este estudo com os respectivos pontos de isolamento, o comportamento frente a diferentes características fenotípicas e o conjunto de bandas que constituíram cada perfil.

No agrupamento A foram dispostas 4 cepas, duas cepas provenientes do ponto de amostragem IV, uma cepa do ponto de amostragem I, e uma cepa do ponto II.

No agrupamento **B**, 6 cepas estavam presentes, 4 originárias do ponto de amostragem **II**, sendo uma delas de amostra de sedimento, 1 do ponto **V** e outra de sedimento do ponto **III**.

No agrupamento C, 3 cepas eram provenientes do ponto IV, duas das quais eram provenientes de amostras de superfície e a outra proveniente de amostra de sedimento. A última cepa pertencente a este grupo foi obtida no ponto II.

Da análise dos perfis obtidos, dentro de cada agrupamento para esta espécie de Aeromonas, foi observado que: as cepas que, originalmente, haviam sido isoladas de um mesmo ponto de coleta da Represa de Guarapiranga, apresentavam bandas com pesos moleculares iguais.

Tomando-se como forma de separação o comportamento frente a características fenotípicas, pode-se observar que duas cepas provenientes do ponto de isolamento II, cepas 932 e 271, as quais ficaram alocadas em agrupamentos diferentes

Quadro 7. Resultado do comportamento frente a difrentes características fenotípicas, e bandas constituintes do perfil de ribotipagem apresentados por cepas de *Aeromonas caviae* de cada agrupamento observado, isoladas do Reservatório de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

| Agrupamento | Cepa | Ponto | SAL | MSE | VM | TTC | Bandas (Kb)  |  |  |  |  |
|-------------|------|-------|-----|-----|----|-----|--|--|--|--|--|
|             | 1106 | IV    | +   | +   | +  | +   | 10.4 8.6 7.8 6.4 5.8 5.4 4.9 4.6                       |  |  |  |  |
|             | 1107 | IV    | +   | +   | +  | +   | 18.3 8.5 7.0 6.1 5.0 4.6 4.4 2.5 2.4 2.1 2.0 1.9 1.7   |  |  |  |  |
| A           | 1659 | I     | +   | +   | +  | +   | 13.1 11.1 8.3 7.0 6.4 6.0 5.0 4.6 2.4 1.8 1.7          |  |  |  |  |
|             | 932  | II    | -   | -   | -  | +   | 6.2 5.8 4.0 3.8 2.4 2.1 2.2                            |  |  |  |  |
|             | 1592 | II    | -   | +   | +  | +   | 9.9 8.2 7.6 6.4 5.7 5.3 4.8 3.8                        |  |  |  |  |
|             | 1272 | II    | +   | +   | -  | +   | 9.8 8.3 6.8 6.4 5.6 5.3 4.0 3.5 2.8 2.3 2.1            |  |  |  |  |
| В           | 1438 | II    | -   | +   | -  | +   | 13.9 10.7 8.7 7.7 6.8 6.0 5.3 5.0                      |  |  |  |  |
|             | 1061 | II    | - ' | +   | -  | +   | 6.8 5.3 4.6 3.9 3.7 3.2 2.0                            |  |  |  |  |
|             | 1731 | ШҒ    | -   | +   | -  | +   | 16.1 12.0 9.7 8.8 7.8 6.8 6.1                          |  |  |  |  |
|             | 878  | V     | 1   | +   | -  | +   | 17.6 11.7 8.8 8.0 7.5 4.8                              |  |  |  |  |
|             | 313  | IV    | -   |     | +  | +   | 7.2 6.7 6.1 5.6 4.4 4.1                                |  |  |  |  |
| C           | 452  | IV    | +   | -   | +  | +   | 13.0 11.8 10.1 7.8 7.1 6.1 5.7 5.0 4.6 4.1 2.8 2.3 2.1 |  |  |  |  |
|             | 1197 | IVF   | -   | +   | -  | +   | 7.1 6.4 5.9 5.6 5.2 5.0 4.1                            |  |  |  |  |
|             | 271  | II    | -   | -   | +  | +   | 22.1 13.0 10.7 9.2 6.9 6.4 5.0 4.8 4.5 3.3 2.8 2.4 2.0 |  |  |  |  |

SAL- prova de acidificação da Salicina; MSE- prova de acidificação da Manose; VM -Reação de Vermelho de Metila; TTC-Prova de utilização do Cloreto de trifenil tetrazolium, F- amostras desedimento.

da maioria das cepas isoladas do ponto II, apresentaram-se diferente daquelas, à prova de manose negativa sendo que a cepa alocada no agrupamento A (932), apresentou prova de vermelho de metila negativa, e a outra cepa (271), alocada no agrupamento C apresentouse positiva à esta prova, além do mais estas duas não apresentaram a banda de 5,3 Kb comum no perfil das cepas alocadas no agrupamento B.

Das cepas que foram isoladas do ponto de amostragem IV, 5 no total, e alocadas no agrupamento A apresentaram como características bioquímicas: positividade para as provas de salicina, manose, vermelho de metila e TTC. As cepas alocadas no agrupamento C revelaram no mínimo, uma destas provas com resultado negativo. Uma cepa proveniente do ponto de amostragem I da Represa de Guarapiranga, e que foi alocada no agrupamento A, apresentou, também, positividade para as mesmas provas fenotípicas apresentadas por aquelas cepas provenientes do ponto de amostragem IV, alocadas neste mesmo agrupamento como se pode observar no Quadro 7.

### 4.1.4.3. Aeromonas sobria

As 13 cepas pertencentes a essa espécie de *Aeromonas*, empregadas para o estudo de ribotipagem, foram divididas em dois agrupamentos A e B.O Quadro 8 apresenta as cepas de *Aeromonas sobria* estudadas, com os respectivos pontos de isolamento, o comportamento frente a diferentes características fenotípicas e o conjunto de bandas que constituiu o perfil de cada cepa.

No agrupamento A foram agrupadas 6 cepas, sendo que 5 delas eram originárias do ponto IV de isolamento da Represa de Guarapiranga e uma proveniente do ponto III.

No agrupamento **B** ficaram 3 cepas provenientes do ponto **III**, duas cepas do ponto **V**, uma delas de amostra de sedimento, e uma cepa do ponto **IV** também proveniente de amostra de sedimento.

Do estudo das bandas que compõem os perfis de ribotipagem para esta espécie de *Aeromonas*, foi observado, de maneira geral, que as cepas provenientes de cada ponto de amostragem, dentro de um mesmo agrupamento, apresentaram bandas com igual peso molecular. Desta forma, as cepas alocadas no agrupamento **A**, e que eram provenientes do ponto de amostragem **IV** da Represa de Guarapiranga (5 cepas no total), apresentaram uma banda com peso molecular de 2,1 Kb.

Das cepas de *Aeromonas sobria* alocadas no agrupamento **B** e que eram originárias do ponto de amostragem **III** (3 cepas no total) apresentaram uma das banda com peso molecular próximos, sendo que duas delas, as cepas 564 e 846, possuíam a banda com peso molecular de 7,2 Kb e a cepa 108 com a banda de peso molecular igual a 7,3 Kb. Para as cepas provenientes do ponto de isolamento **V**, alocadas nesse grupo, observou-se a presença da banda de peso molecular 7,5 Kb para a cepa 990, e a de peso molecular 7,4 Kb para a cepa 1129.

Uma cepa proveniente de uma amostra de sedimento do ponto **IV** de isolamento, foi alocada no agrupamento em que estava a outra cepa proveniente de amostra de sedimento. Enquanto uma cepa proveniente do ponto de amostragem **I**, a qual apresentou uma banda de peso molecular de 7,4 Kb foi alocada, juntamente, com aquelas que possuíam esta banda em seu perfil de ribotipagem.

Quadro 8. Resultado do comportamento frente a difrentes características fenotípicas, e bandas constituintes do perfil de ribotipagem apresentados por cepas de *Aeromonas sobria* de cada agrupamento observado, isoladas do Reservatório de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

| Agrupamento | Cepa | Ponto        | SAL | MSE        | VM  | TTC | ARA | Bandas (Kb)  |  |  |  |
|-------------|------|--------------|-----|------------|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|             | 1490 | IV           | -   | +          | +   | +   | +   | 13.0 8.2 6.0 2.1   |  |  |  |
|             | 439  | IV           | -   | +          | -   | +   | -   | 8.3 6.4 5.5 5.1 9.9 4.2 3.7 2.6 2.4 2.1 2.0 1.9                      |  |  |  |
| A           | 303  | IV           | -   | -          | _   | +   | +   | 8.2 6.6 5.7 5.1 4.1 3.8 2.9 2.4 2.3 2.1 2.0                          |  |  |  |
|             | 382  | IV           | _   | -          | +   | +   | _   | 9.8 8.7 7.0 6.7 6.3 5.9 3.7 2.9 2.6 2.3 2.1                          |  |  |  |
|             | 669  | IV           | -   | <b>-</b> , | +   | -   | -   | 11.1 8.1 7.0 6.6 6.4 5.9 5.3 4.7 4.2 3.4 3.2 2.9 2.8 2.4 2.3 2.1 2.0 |  |  |  |
|             | 232  | Ш            | -   | +          | -   | -   | +   | 9.9 9.2 7.9 6.2 5.1 4.8 4.5 4.1 3.3 2.6 2.4 2.3 2.0                  |  |  |  |
|             | 564  | Ш            | -   | -          | -   | +   | _   | 9.3 8.8 8.3 7.2 6.8 6.3 5.1 4.7 3.2 2.5 2.4 2.3 2.0 1.9              |  |  |  |
|             | 108  | Ш            | -   | . +        | -   | +   | ~   | 11.1 7.7 7.3 5.6   |  |  |  |
|             | 846  | Ш            | -   | +          | - ; | +   | -   | 9.0 8.3 7.6 7.2 5.5 5.1  |  |  |  |
| В           | 990  | $\mathbf{V}$ | -   | +          | -   | + [ | -   | 10.4 7.5 6.1 5.6 5.2 4.7 4.4 3.9 2.6 2.1 2.0 1.8 1.7                 |  |  |  |
|             | 1129 | VF           | -   | +          | _   | +   | -   | 14.7 11.6 9.1 7.4 6.8  |  |  |  |
|             | 1027 | IVF          | -   | +          | -   | +   | -   | 22.3 19.5 15.6 11.9 9.6 9.1 8.3 7.8 6.7 5.5 2.5 2.4 2.0 1.9          |  |  |  |
|             | 692  | I            | -   | -          |     | +   | -   | 14.6 10.6 8.3 7.4 5.0 4.6  |  |  |  |

SAL- prova de acidificação da Salicina; MSE- prova de acidificação da Manose; VM - reação de Vermelho de Metila; TTC-Prova de utilização do Cloreto de trifenil tetrazolium, F- amostras de sedimento.

Com relação ao comportamento frente às características fenotípicas, apresentadas pelas cepas dessa espécie, alocadas em diferentes agrupamentos, pode-se verificar que a cepa número 232, proveniente do ponto de isolamento III da Represa de Guarapiranga, e que foi alocada no agrupamento A, diferente das outras representantes desse ponto de isolamento, apresentou comportamento frente à prova de arabinose distinta das demais cepas do mesmo ponto, como pode-se observar no Quadro 8.

## 4.1.4.4. Aeromonas jandaei

I.

Essa espécie de *Aeromonas*, 13 cepas no total, foi agrupada em dois agrupamentos A e B. O Quadro 9, apresenta as cepas estudadas com os respectivos pontos de amostragem, o comportamento frente a diferentes características fenotípicas e o conjunto de bandas constituintes de cada perfil de ribotipagem.

Para essa espécie de *Aeromonas* foi possível observar uma tendência de agrupamento de cepas, provenientes de um mesmo ponto de amostragem, assim como observado para as outras espécies de *Aeromonas* empregadas para este estudo.

No agrupamento A ficaram alocadas 7 cepas, duas provenientes do ponto de amostragem IV da Represa de Guarapiranga, outras duas provenientes do ponto III, duas do ponto V e uma do ponto II.

No agrupamento  $\bf B$ , três cepas do ponto de isolamento  $\bf III$  estavam presentes sendo que uma delas era originária de amostra de sedimento, uma cepa de amostra de sedimento do ponto  $\bf V$ , uma cepa proveniente do ponto  $\bf II$  e ainda uma cepa do ponto

A presença de bandas comuns em cepas provenientes de um mesmo ponto de amostragem, dentro de um mesmo agrupamento, também, pode ser observado para este grupo de microrganismos como se pode ver no **Quadro 9**. Desta forma, as cepas do agrupamento **A**, provenientes do ponto **IV**, apresentaram uma banda com peso molecular muito próximo umas das outras, 6,5 para a cepa 1341 e 6,3 para a cepa 508. As cepas 117 e 186 originárias do ponto **III**, apresentaram as bandas 9,4 Kb e 7,1 Kb e ainda 9,3 Kb e 7,0 Kb respectivamente.

Dentro do agrupamento A, ainda, foi possível observar que as duas cepas provenientes do ponto V apresentaram a banda de peso molecular igual a 4,2 Kb, e que, uma cepa do ponto II, separada da outra cepa isolada do mesmo ponto e alocada no outro agrupamento, também, apresentou essa mesma banda em seu perfil de ribotipagem.

Dentro do agrupamento **B**, das cepas de *A. jandaei*, foi observado que as 3 cepas provenientes do ponto de amostragem **III**, alocadas nesse grupo, incluindo uma de amostra de sedimento, apresentaram uma banda comum com peso molecular de 8,7 Kb. A cepa do ponto **V** proveniente de amostra de sedimento, alocada neste grupo, além de apresentar a banda de 8,7 Kb, também, apresentou outras duas bandas em comum com as cepas provenientes de amostra de sedimento do ponto **III**, as bandas de 5,0 e 3,0 Kb.

No que se refere ao comportamento frente a diferentes características fenotípicas para estes microrganismos, não foi possível observar uma relação ou justificativa destas características com os diferentes agrupamentos obtidos, uma vez que as cepas de *A. jandaei*, comportamento semelhante para as provas empregadas.

Quadro 9. Resultado do comportamento frente a diferentes características fenotípicas, e bandas constituintes do perfil de ribotipagem apresentados por cepas de *Aeromonas jandaei* de cada agrupamento observado, isoladas do Reservatório de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

| Agrupamento | Cepa | Ponto                          | SAL | MSE | VM | TTC | Bandas (Kb)  |
|-------------|------|--------------------------------|-----|-----|----|-----|--|
|             | 1341 | IV                             | -   | +   | -  | +   | 17.6 14.1 8.7 7.1 6.5 4.5  |
|             | 508  | IV                             | -   | +   | -  | +   | 10.1 7.6 6.8 6.3 6.0 5.1 3.5                                     |
|             | 117  | ш                              | -   | +   | -  | +   | 13.9 9.4 7.1 6.8 5.7   |
| A           | 186  | Ш                              | -   | -   | -  | +   | 11.9 10.7 9.3 8.6 7.0 5.3  |
|             | 1136 | $\mathbf{V}$                   | -   | +   | -  | +   | 11.8 8.6 6.8 6.2 5.9 5.3 4.7 4.5 4.2 3.7 2.8 2.6 2.2 1.8 1.7 1.6 |
|             | 981  | $\mathbf{V}$                   | -   | +   | -  | +   | 10.9 8.8 6.5 4.2   |
|             | 225  | П                              |     | +   | -  | +   | 17 15 12 10.4 8.9 6.6 6.2 5.9 4.9 4.3 4.2 3.9 3.5 2.9 2.7 2.4    |
|             | 638  | $\parallel { m III} \parallel$ | -   | +   | +  | +   | 11 8.7 6.7 6.3 5.6 4.6 4.2 4.0 3.7                               |
|             | 491  | ш                              | -   | +   | -  | +   | 17.7 15.1 11.2 9.8 8.7 7.0 5.4 4.5 2.4                           |
| В           | 882  | ШҒ                             | -   | +   | -  | +   | 11.2 8.7 6.7 6.4 5.8 5.0 4.5 4.0 3.0                             |
|             | 1034 | VF                             | -   | +   | -  | +   | 16.1 12.2 8.7 7.0 6.4 5.3 5.0 4.5 3.0                            |
|             | 554  | n                              | -   | +   | -  | +   | 16.1 12.5 9.0 7.1 6.4 5.6  |
|             | 396  | I                              | -   | +   | +  | +   | 13.9 10.9 8.7 5.4 4.7 4.1  |

SAL- prova de acidificação da Salicina; MSE- prova de acidificação da Manose; VM -Reção de Vermelho de Metila; TTC-Prova de utilização do Cloreto de trifenil tetrazolium, F- amostras de sedimento.

Este resultado pode ser devido à utilização de um número mínimo de provas bioquímicas para a identificação de bactérias do gênero *Aeromonas*, e que poderiam apresentar diferentes características se fossem empregadas provas menos usuais para comparação.

Estudos realizados por ALTWEGG<sup>5</sup> e col., (1990), revelaram que a classificação utilizada para denominar microrganismos do gênero *Aeromonas*, não foi compatível com a diferenciação dos grupos genotípicos gerados por estudos de hibridização DNA/DNA, porém, observaram que com a utilização de uma bateria maior de provas bioquímicas, contendo reações menos usuais, foi possível observar uma relação entre as características fenotípicas e genotípicas apresentadas por cepas de *Aeromonas*.

HANNINEM<sup>51</sup> e col. 1995, observaram que 20% das cepas de *Aeromonas* isoladas de água e que apresentavam características fenotípicas atípicas, permanecem sem nome devido a essas características ou por serem grupos novos. Esses autores salientam que embora a ribotipagem seja útil na caracterização de espécies pouco comuns como *A. jandaei*, este método não funciona para cepas pouco caracterizadas.

#### 4.2. Perfil Plasmidial.

Das 60 cepas de *Aeromonas* estudadas, foi observado que 15 (25,0%), apresentaram pelo menos um plasmídio os quais apresentaram tamanho variando entre 0,9 e 88,6 Kb (**Tabelas 1 e 2**).

Na análise da presença de plasmídios nas diferentes espécies de *Aeromonas*, 15 A. *hydrophila*, 15 A. *caviae*, 15 A. *sobria* e 15 A. *jandaei*, foi observado que 2 (13,4%) das A. *hydrophila*, 5 (33,3%) das A. *sobria* e 8 (53,3%) das A. *jandaei* apresentaram pelo menos 1 plasmídio, enquanto que entre cepas de A. *caviae* estes elementos extracromossômicos estavam ausentes (**Tabelas 1 e 2, Figura 9**).

De forma geral, cada cepa estudada apresentou um perfil próprio, constituído de plasmídios de pequeno tamanho, porém, alguns plasmídios de tamanho grande, superiores a 50 Kb, foram observados em cepas de *A. sobria* e *A. jandaei* em um total de 5 (8,33%) das cepas dessas espécies (**Tabela 1**).

A diferença entre o número de bandas nas diferentes especies estudadas, sugerem que esses elementos podem ser relacionados com as espécies, porém de forma superficial, onde *A. caviae* revelou ser uma espécie que não apresenta plasmídios, *A. hydrophila* apresentando no máximo dois plasmídios, *A. sobria* e *A. jandaei* com até 6 plasmídios, embora estudos confirmem que esses elementos não apresentem correlação com características bioquímicas( Figura 10).

**TABELA 1**. Distribuição das cepas de diferentes espécies de *Aeromonas* segundo o número e a porcentagem de plasmídios observados, São Paulo, 1996.

|                  | 70500 W. 9031<br>3433 W. 1 |     | N° de | Plasm | ídios | State Comment |     |
|------------------|----------------------------|-----|-------|-------|-------|---------------|-----|
| <b>Espécie</b>   | 0                          | 1   | 2/1   | 3     | 4     | 5.4           | 6   |
| A. hydrophila Nº | 13                         | -   | 2     | -     | _     | -             | -   |
| %                | 86,6                       |     | 13,4  |       |       |               |     |
| A. caviae Nº     | 15                         | -   | -     | -     | -     | -             | -   |
| %                | 100                        |     |       |       |       |               |     |
| A. sobria Nº     | 10                         | -   | 3     | -     | -     | 2             | -   |
| %                | 66,6                       | -   | 20    |       |       | 13,4          | -   |
| A. jandaei N°    | 7                          | 1   | 3     | -     | 1     | 2             | 1   |
| %                | 46,8                       | 6,6 | 20    |       | 6,6   | 13,4          | 6,6 |

**TABELA 2.** Número de plasmídios, e perfil plasmidial das cepas de *Aeromonas* isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

| Espécie       | N° da cepa | Porcentagem | N° de<br>Plasmídios | Perfil = (peso molecular Kb)         |
|---------------|------------|-------------|---------------------|--------------------------------------|
|               | 1085       | 13,4%       | 2                   | 15,5 - 4,3                           |
| A. hydrophila | 1450       |             | 2                   | 11,5 -3,8                            |
|               | 232        |             | 5                   | 15,5 - 9,8 - 5,0 - 3,7 - 2,8         |
|               | 564        |             | 2                   | 4,3 - 2,4                            |
| A. sobria     | 1129       | 33,3%       | 2                   | 6,2 - 6,1                            |
|               | 1490       |             | 5                   | 88,1 - 6,1 -5,4 - 5,0 - 0,9          |
|               | 382        |             | 2                   | 4,3 - 2,4                            |
|               | 1341       |             | 2                   | 6,6 - 5,5                            |
|               | 981        |             | 6                   | 88,6 - 17,9 - 12,3 - 8,2 - 5,5 - 3,3 |
|               | 882        |             | 2                   | 16,3 - 4,6                           |
| A. jandaei    | 554        | 53,3%       | 2                   | 12,3 - 4,4                           |
|               | 1034       |             | 4                   | 12,3 - 3,8 - 3,0 - 1,9               |
|               | 225        | ·           | 5                   | 88,1 - 22,3 - 3,8 - 3,0 - 1,9        |
|               | 508        |             | 1                   | 88,1                                 |
|               | 294        |             | 5                   | 88,1 - 23,0 - 10,6 - 5,5 - 3,5       |

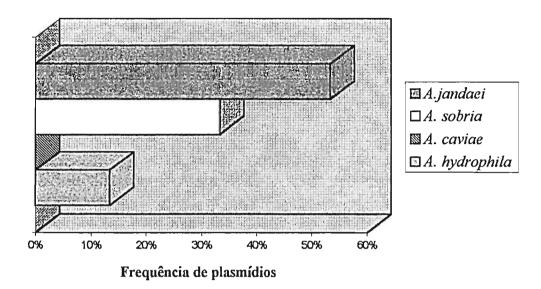


FIGURA 9. Frequência de plasmídios observados em cepas de Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria e Aeromonas jandaei, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

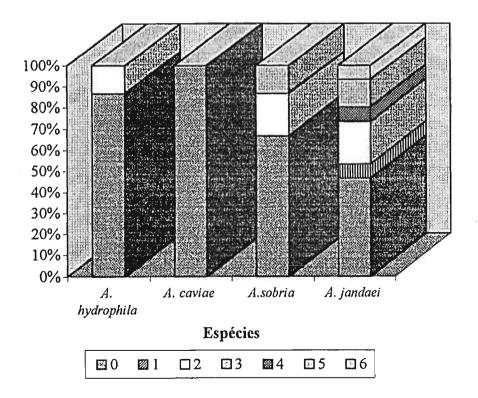


FIGURA 10 Frequência do número de plasmídios obtidos, segundo as diferentes espécies de *Aeromonas*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, 1996.

Levando em consideração que os plasmídios podem ser responsáveis pela manutenção de microrganismos no ambiente, favorecendo sua adaptação, podemos considerar que esses elementos poderiam estar favorecendo a presença de *A. sobria* e *A. jandaei* no ambiente da Represa de Guarapiranga, uma vez que estas duas espécies foram as isoladas com maior frequência do ambiente estudado (MATTÉ<sup>94</sup>, 1995). Por outro lado, esse ambiente está sujeito a uma série de fatores que podem contribuir para o desequilíbrio microbiano, como por exemplo, excesso de poluentes, esgotos, e ainda produtos químicos para preparo da água para captação<sup>14</sup>.

Foi observado, também, que o ponto de amostragem mais próximo da barragem, Ponto I (Figura 1), além de ter apresentado menor frequência de espécies de *Aeromonas* (máximo de 90/100ml para *A. hydrophila*, 110/100ml para *A. caviae*, 40/100ml para *A. sobria* e 3900/100ml para *A. jandaei*)<sup>93</sup>, também não demonstrou possuir cepas portadoras de plasmídios. Essa constatação demonstra que esse ponto apresenta características ambientais bastante distintas dos demais estudados. Sabe-se que este ponto recebe a aplicação de produtos químicos como o sulfato de cobre visando favorecer o processo de tratamento da água para abastecimento público<sup>14</sup>. Esses aspectos considerados apontam para a necessidade de outros estudos visando melhor caracterizar o impacto do lançamento desses produtos sobre o equilíbrio do ecossistema desta área da Represa de Guarapiranga.

A. hydrophila apresentou 13,4% de cepas que possuíam plasmídios, as quais apresentaram até 2 plasmídios com tamanho variando entre 2,4 e 15,5 Kb (Tabela 1 e 2, Figura 10 e 11)



FIGURA 11. Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas hydrophila*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, utilizando a metodologia de BIRNBOIM & DOLY, 1996. Linha 1- Marker II; linha 2- cepa 1085; linha 3- cepa 1450;

Estudos realizados por FIGUEROA<sup>40</sup> e col. em 1988, com cepas de *A. hydrophila* isoladas de amostras clínicas, revelaram plasmídios nesses microrganismos em 50% das cepas, os quais apresentavam baixo peso molecular. Entretanto, VADIVELU<sup>137</sup> e col. em 1995, observaram 94% de presença de plasmídios em cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas de diferentes tipos de infecção.

A. jandaei apresentou algumas cepas com 5 ou 6 plasmídios o que foi observado, também, para cepas de A. sobria à qual A. jandaei se apresenta muito relacionada quanto às características bioquímicas, pois diferem somente, na prova de acidificação da sacarose (Figuras 10, 12 e 13).

Não foi possível observar correlação entre a presença de plasmídios e a produção de fatores de virulência pelas cepas de *Aeromonas* estudadas ( $\alpha$ =1%), como está apresentado nos **Quadros 2-5.** Esses dados são concordantes com os observados por FIGUEROA<sup>40</sup> e col., 1988 e VADIVELU<sup>137</sup> e col., 1995.

A presença de plasmídios que possam ser conjugativos, em cepas ambientais de diferentes espécies de *Aeromonas*, bem como em outras espécies bacterianas, podem representar um risco à saúde, uma vez que espécies do gênero *Aeromonas* são habitantes naturais do ambiente aquático. Essas podem fazer parte da flora de variadas espécies animais, e além disso ser patogênicas para o homem. Essas cepas podem transferir ou receber plasmídios codificadores de diferentes tipos de resistência e, assim, passarem a exibir este potencial<sup>20,48,120,136</sup>.

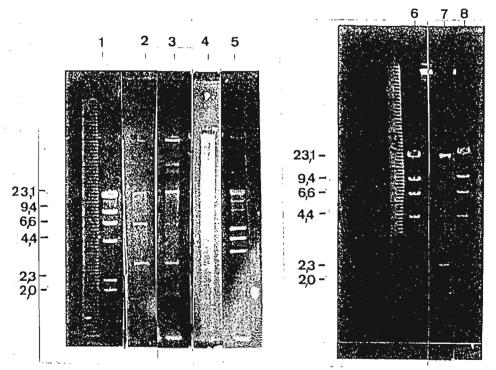


FIGURA 12. Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas sobria*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, utilizando a metodologia de BIRNBOIM & DOLY, 1996. Linha 1- Marker II; linhas 2 a 5 cepas 1229,1490, 564, 232 Linha 6- Marker II; linhas 7-cepa 382 linha 8-Marker II

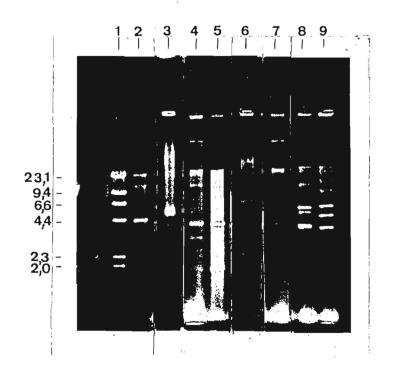


FIGURA 13. Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas jandaei*, isoladas da Represa de Guarapiranga, São Paulo, utilizando a metodologia de BIRNBOIM & DOLY, 1996. Linha 1- Marker II; linhas 2 a 9- cepas 554, 882, 225, 1034,1341, 508, 294, 981.

A taxonomia de *Aeromonas* tem sido dificil de ser estabelecida<sup>23,29,75</sup>, gerando dificuldades na escolha de um esquema fenotípico de identificação para espécies deste gênero. Enquanto novas espécies designadas por grupos genotípicos surgem<sup>1,21,22</sup>, os métodos de identificação fenotípicos vêm tentando acompanhar e se equiparar às novas metodologias, a fim de se aproximar ao máximo das diferenciações oferecidas pelos métodos empregando a biologia molecular<sup>1,5</sup>, com o intuito de estabelecer provas que sejam capazes de identificar os diferentes grupos de hibridização, que acabam por dar origem a novas espécies que até então não podiam ser diferenciadas por provas fenotípicas<sup>21,22,52,53</sup>.

A aplicação da ribotipagem em estudos epidemiológicos tem sido de grande valia para distinguir cepas isoladas de amostras clínicas, provenientes de diferentes casos, para determinação da relação existente entre elas, e outras provenientes de diferentes regiões geográficas ou ainda para determinação de possíveis fontes de contaminação 12,37,99,113,139.

No presente estudo foi observado que a técnica de ribotipagem tem um alto poder de discriminar cepas pertencentes a uma mesma espécie de *Aeromonas*, considerando diferenças de área de isolamento e ainda de comportamento frente a características fenotípicas individuais. Isso permite sua utilização para estudos epidemiológicos envolvendo esse gênero de bactérias ou, também, para ser aplicado a outros grupos de microrganismos e, portanto, vindo se somar às ferramentas empregadas em Vigilância Epidemiológica bem como em Vigilância Sanitária.

Embora não se tenha observado cepas com perfis idênticos, esse dado pode representar uma grande diversidade, dentro de cada espécie estudada no ambiente da Represa de Guarapiranga. A presença de um grande número de afluentes, que banham

regiões populosas e que desembocam na Represa de Guarapiranga, podem estar contribuindo para a introdução de cepas originárias de diferentes regiões geográficas mais distantes, uma vez que a diferença entre as características das populações que margeiam este manancial e seu afluentes são muito diversas.

Considerando que o fluxo de água desloca-se do Ponto IV em direção ao ponto I, existe a possibilidade de cepas provenientes dos pontos de amostragem a montante terem alcançado os pontos a jusante. Esse dado pode, provavelmente, explicar o fato da presença de cepas originarias de diferentes pontos de amostragem, terem sido alocadas em um mesmo grupamento, o qual poderia ter sido diferente, se os pontos de amostragem não pertencessem ao mesmo ambiente aquático. Outros autores que empregaram a ribotipagem para estudos epidemiológicos, utilizando cepas de diferentes regiões geográficas, observaram diferenças mais evidentes entre os grupos de ribotipagem encontrados<sup>50,135</sup>.

O pequeno número de trabalhos envolvendo esses microrganismos atenta para a necessidade de ampliação de estudos nesta área, principalmente em se tratando de um gênero de bactérias potencialmente patogênico para o homem, e que revelou possuir as características necessárias para a produção de agravos à saúde da comunidade<sup>94</sup>.

A espécie *Aeromonas jandaei* apresentou características diferenciadas tanto a nível de grupamento pela técnica de ribotipagem, como em relação ao perfil plasmidial, confirmando tratar-se de um grupo de microrganismos com características distintas. Estes resultados confirmam o trabalho anterior, realizado durante o programa de Mestrado<sup>94</sup> do autor, onde foi observado um perfil tanto fenotípico como de virulência

(86,6% de acúmulo de fluido em alça ligada de coelhos e 100,0% de hemólise em ágar sangue) diferenciando-as das demais espécies isoladas.

Estudos adicionais devem ser realizados para determinar a presença e a natureza de plasmídios em *Aeromonas* isoladas de ambiente, uma vez que esses elementos são perdidos com facilidade durante o processo de armazenamento e manuseio das cepas em estoque. Do mesmo modo, para que seja ampliado o conhecimento e a relação destes elementos com determinadas atividades metabólicas, com processos patogênicos ou ainda com a resistência a antibióticos, uma vez que estudos deste tipo são pouco freqüentes para esta espécie no Brasil e que estes microrganismos estão relacionados com diversas doenças no homem.

## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. Ribotipagem

- **5.1.1.** A análise dos perfis gerados pela ribotipagem das 13 cepas de *A. hydrophila*, 14 de *A. caviae*, 13 de *A. sobria* e 13 de *A. jandaei*, utilizando-se o coeficiente de similaridade de DICE, resultou na divisão de *A. hydrophila* e *A. caviae* em 3 agrupamentos diferentes para cada espécie e de *A. sobria* e *A. jandaei* em 2 agrupamentos cada.
- **5.1.2.** Pela metodologia empregada, ribotipagem, foi possível evidenciar polimorfismo genômico dentro de uma mesma espécie, possibilitando em alguns casos, detectar diferenças associadas aos pontos de amostragem ou mesmo de comportamento frente a características fenotípicas individuais.
- 5.1.3. O conjunto de características apresentadas pela técnica de ribotipagem, em relação as espécies de Aeromonas estudadas, a qualificam como uma metodologia altamente eficaz, a qual poderá ser empregada em estudos epidemiológicos de doenças causadas por esses microrganismos, bem como em estudos ecológicos, constituindo-se portanto em uma poderosa ferramenta, que pode ser utilizada pelos Laboratórios de Saúde Pública em atividades de apoio a Vigilância Sanitária e Epidemiológica.

### 5.2. Perfil plasmidial

5.2.1. A frequência de cepas com pelo menos um plasmídio entre as 60 cepas de *Aeromonas* spp. estudadas foi de 25,0 %, os quais apresentaram peso variando entre 0,9 e 88,6 Kb. De forma geral, entre as cepas que apresentaram plasmídios, cada uma delas evidenciou um perfil próprio, que era constituído em sua maioria de plasmídios de pequeno tamanho, porém, uma pequena parte (8,3%) tinha peso superior a 50 Kb.

- 5.2.2. A freqüência de cepas que apresentaram pelo menos 1 plasmídio segundo as espécies estudadas foi, de 13,4% em *A. hydrophila*, 33,0% em *A. sobria*, 53,3% em *A. jandaei* e ausente em *A. caviae*. Apesar do perfil plasmidial não ser considerado uma característica estável para ser aplicado com fins taxonômicos, observou-se uma diferença significativa entre as espécies, variando de ausente (*A. caviae*) a presente em 53,3% (*A. jandaei*) das cepas, o que pode estar indicando diferentes formas de adaptação desses microrganismos ao ambiente estudado.
- **5.2.3.** Dentre as 15 cepas (25%) que apresentaram plasmídios, *A. hydrophila* apresentou no máximo 2 plasmídios, enquanto que em *A. sobria* e *A. jandaei* foram observados até 6 plasmídios.
- **5.2.4.** As espécies que apresentaram maior percentual e número de plasmídios (*A. jandaei e A. sobria*) foram as que estavam presentes em maior número e em maior percentual de amostras em estudo anterior<sup>94</sup>, indicando um provável papel desses plasmídios na manutenção destes organismos no ambiente estudado.
- 5.2.5. A ausência de plasmídios nas cepas de *Aeromonas* isoladas no ponto mais próximo da captação (Ponto I), associado às baixas contagens de *Aeromonas* observadas em estudo anterior, e considerando-se que este ponto recebe adição de produtos químicos para preparo da água para captação, estão indicando uma importante alteração neste ecossistema, o que sugere a necessidade de estudos mais aprofundados.
- 5.2.6. Não foi observada correlação entre a presença de plasmídios e a produção de fatores de virulência pelas cepas de *Aeromonas* estudadas (α=1%)(Quadros 2-5, Tabela 2). Este fato sugere que a expressão destes fatores de virulência, em específico

produção de β-hemolisina e acúmulo de fluído em alça ligada, tenham sua codificação determinada ao nível genômico, porém não descarta a possibilidade, por exemplo, do papel destes plasmídios em resistência a antibióticos, merecendo, portanto, estudos mais aprofundados.

#### 5.3. Gerais

- **5.3.1.** A espécie *A. jandaei* apresentou características diferenciadas tanto pelo agrupamento pela técnica de ribotipagem quanto em relação ao perfil plasmidial, confirmando o estudo anterior<sup>93</sup>, que apresentou características fenotípicas e de virulência diferenciadas em relação às demais espécies estudadas. Esse fato merece especial atenção, principalmente, considerando-se que essa espécie foi isolada de forma pioneira a partir de amostra ambiental, o que justifica a realização de estudos complementares como por exemplo o seqüenciamento de nucleotídeos.
- 5.3.2. As meta logias empregadas, ribotipagem e pesquisa do perfil plasmidial, demonstraram ser aplicáveis tanto em estudos epidemiológicos quanto ecológicos, constituindo-se, portanto, em instrumentos de grande valia a serem utilizados em Serviços de Vigilância a Saúde.

# 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; KROSKE-BYSTROM, S.; MALEKZADEH, T.; JANDA, J.M. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecy level in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol., 30(5):1262-6, 1992.
- 2.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, 1990.
- 3.ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R.; SATLER, B.; GLÖCKNER, F.O.; WILLE, A.; PSENNER, R. Community analysis of bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high montain lake by in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 62(6):2138-44, 1996.
- 4.ALTWEGG, M.; ALTWEGG-BISSIG, R.; DEMARTA, A.; PEDUZZI, R.; REEVES, M.W.; SWAMINATHAN, B. Comparison of four typing methods for *Aeromonas* species. J. Diarrhoeal Dis. Res., 6(2):88-94, 1988.
- 5.ALTWEGG, M.; STEIGERWALT, A.G.; ALTWEGG-BISSIG, R.; LÜTHY-HOTTENSTEIN, J.; BRENNER, D.J. biochemical identification of Aeromonas genospecies isolated from humans. J. Clin. Microbiol., 28(2):258-64, 1990.
- 6.ANNAPURNA, E. & SANYAL, S.C. Enterotoxicity of Aeromonas hydrophila. J. Med. Microbiol., 69:317-23, 1977.
- 7.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.

- 8.ARAUJO, R.M.; ARRIBAS, R.M.; PARES, R. Distrubution of Aeromonas sp in waters with different levels pf pollution. J. Appl. Bacteriol., 71:182-6, 1991.
- 9.ASH, C; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; COLLINS, M.D. Identification of Aeromonas schubertii and Aeromonas jandaei by using a polymerase chain reaction probe test. FEMS Microbiol. Lett., 108:151-6, 1993.
- 10.ATLAS, R.M.; SAYLER, G.; BURLAGE, R.S.; BEJ, A.K. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. **Biotechniques**, **12**:706-17, 1992.
- 11.ATLAS, R.M. & BARTHA, R. Microbial ecology, fundamentals and applications. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. 3<sup>a</sup> ed., 1993.
- 12.BACK, N.A.; LINNEMANN, C.C.; PFALLER, M.A.; STANECK, J.L.; MORTHLAND, V. Recurrent epidemics caused by a single strain of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA, 270(11):1329-33, 1993.
- 13.BELLAND, R. J. & TRUST, T.J. DNA/DNA reassociation analysis of *Aeromonas* salmonicida. J. Gen. Microbiol., 134(2):307-15, 1988
- 14. BEYRUTH, Z. Comunidade fitoplanctônica da Represa de Guarapiranga 1991-1992. Aspectos ecológicos, sanitários e subsídios para reabilitação da qualidade ambiental. 1996. [Tese de Doutorado- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
- 15.BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res., 7(6):1513-, 1979.

- 16.BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, S. Biology of microorganisms. Prentice Hall, Inc. A Paramount Cominication Company, Englewood Cliffs, New Jersey. 7a ed. pp. 1-286, 1994.
- 17.BROSIUS, J.; ULLRICH, A.; RAKER, M.A.; GRAY, A.; DULL, T.J.; GUTELL, R.R.; NOLLER, H.F. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrn* B ribosomal RNA operon of *E. coli.* Plasmid, 6:112-8, 1981.
- 18.BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and de polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melilot* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 53:2180-7, 1992.
- 19.BRUIJN, F.J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U.; LOUWS, F.J. Automated fluorescent and conventional Rep-PCR genomic fingerprinting and Multiplex PCR to classify bacteria and track genes. In: proceedings of the 7th International Symposium on Microbial Ecology (1995) Brazil.
- 20.BUCHRIESER, C.; GANGAR, V.V.; MURPHEE, R.L.; TAMPLIN, M.L.; KASPAR, C.W. Multiple Vibrio vulnificus strains in oyster as demonstrated by clamped homogenous electric field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol., 61:1163-8, 1995.
- 21.CARNAHAN, A.M.; FANNING, G.R.; JOSEPH, S.W. Aeromonas jandaei (formerly genospecies DNA group 9 A .sobria) a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 29(3):560-4, 1991a.

- 22.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, 1991b.
- 23.CARNAHAN, A.M.; JOSEPH, S.W. *Aeromonas* update: new species and global distribution. **Experientia**, 47:402-3, 1991.
- 24.CETESB. Avaliação da qualidade da água para consumo humano no Estado de São Paulo- 1990. São Paulo, CETESB. Relatório Técnico, 1991.
- 25.CHALLAPALI, M.; TESS, B.R.; CUNNIGHAM, D.G.; CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. *Aeromonas* associated diarrhea in children. **Pediatric**Infect. Dis. J. 7(10):693-8, 1988.
- 26.CHOWDHURY, M.A.R.; HILL, R.T.; COLWELL, R.R. A gene for the enterotoxin zonula occludens toxin is present in *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae* O139. FEMS Microbiol. Lett., 119:377-80, 1994.
- 27.COBRAPE. Programa de saneamento ambiental em áreas metropolitanas- bacia do Guarapiranga. Relatório. (Publicação do Governo do Estado de São Paulo), 1991.
- 28.COLLINS, M.D.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; CAI, J. Aeromonas enteropelogenes and Aeromonas ichthiosmia are identical to Aeromonas trota and Aeromonas veronii, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol., 43(4):855-6, 1993.
- 29.COLWELL, R.R.; MacDONELL, M.T.; LEY, J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam.nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 36:473-7, 1986.

- 30.CROSA, J.H.; SCHIEWE, M.H.; FALKOW, S. Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. **Infect. Immun.**, **18**(2):509-13, 1977.
- 31.CROSA, J.H.; HODGES, L.L.; SCHIEWE, M.H. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio* anguillarum. Infect. Immun., 27(3):897-902, 1980.
- 32.DARBRE, P.D. Introduction to practical molecular biology. A Willey-Interscience Publication, 1<sup>a</sup> ed., 1989.
- 33.DICE, L.R. Meansures of the amount of ecologic association between species.

  Ecology, 26:297-302, 1945.
- 34.DORSCH, M.; ASHBOLT, N.J.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. J. Appl. Bacteriol., 77:722-6, 1994.
- 35.EISENSTEIN, B.I. & ENGLEBERG, N.C. Applied molecular genetics: new tools for microbiologists and clinicians. J. Infect. Dis., 153(30):416-30, 1986.
- 36.ESTEVE, C. GUTIERREZ, M.C.; VENTOSA, A. DNA relatdness among Aeromonas allosaccharophila strains and DNA hybridization groups of the genus Aeromonas. Int. J. Syst. Bacteriol., 45(2):390-91, 1995.
- 37.FANG, F.C.; McCLELLAND, M.; GUINEY, D.G.; JACKSON, M.M.; HARTSTEIN, A.I.; MORTHLAND, V.H.; DAVIS, C.E.; McPHERSON, D.C.; WELSH, J. Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. **JAMA**, **270**(11):1323-8, 1993.
- 38.FARUQUE, S.M.; ABDUL ALIM, A.R.M.; ROY, S.K.; KHAN, F.; NAIR, G.B.; SACK, R.B.; ALBERT, M.J. Molecular analysis of rRNA and cholerae toxin genes carried by the new epidemic strain of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. J. Clin. Microbiol., 32(4):1050-3, 1994.
- 39.FIELDS, P.I.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K.; OLSVIK, O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from Latin America cholera epidemic. **J. Clin. Microbiol.**, **30**(8):2118-21, 1992.
- 40.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.
- 41.GHEMGHESH, K.F.; *Aeromonas*: epidemiological aspects and virulence factors. São Paulo. (1989). / Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina/.
- 42.GIESE, J. Rapid microbiological testing kits and instruments. Food Technology, 64-71, 1995.
- 43.GILES, J.S.; HARIHARAN, H.; HEANEY, S.B. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalli* from the Atlantic and Pacifig coasts of Canada. Can. J. Microbiol., 41:209-16, 1995.
- 44.GOSLING, P.J.; TURNBULL, P.C.B.; LIGHTFOOT, N.F.; PETHER, J.V.S.; LEWIS, R.J. Isolation and purification of *Aeromonas sobria* cytotonic enterotoxin and β- hemolysin. **J. Med. Microbiol.**, **38**:227-34, 1993.

- 45.GRACEY, M. Gastro enteritis in Australian children: studies on the aetiology of acute diarrhoea. Ann. Trop. Pediatrics, 8:68-75, 1988.
- 46.GREY, P.A. & KIROV, S.M. Adherence to Hep-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas* spp. **Epidemiol. Infect.**, 110:279-87, 1993.
- 47.GRIMONT, F. & GRIMONT, P.A.D. Ribossomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 137B:165-75, 1986.
- 48.GYLES, C.; SO, M.; FALKOW, S. The enterotoxin plasmids plasmids of *E. coli.*J. Infect. Dis., 130(1):40-9, 1974.
- 49.HÄNNINEN, M.L.; SALMI, S.; MATTILA, L.; TAIPALINEN, R.; SIITONEN,

  A. Association of *Aeromonas* spp. with travellers' diarrhoea in Finland. J.

  Med. Microbiol., 42:26-31, 1995a.
- 50.HÄNNINEN, M.L.; RIDELL, J.; HIVERLÄ-KOSKI, V. Phenotypic and molecular characteristics of *Aeromonas salmonicida* subsp, *salmonicida* isolated in Southern and Northern Finland. J. Appl. Bacteriol., 79:12-21, 1995b.
- 51.HÄNNINEN, M.L. & SIITONEN Distribution of Aeromonas phenospecies and genospecies amog strains isolated from water, foods or from human clinical samples. **Epidemiol. Infect.**, **115**:39-50, 1995.
- 52.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 descarboxilase positive species that may cause diarrhea. J. Clin. Microbiol., 25(5):900-6, 1987.

- 53.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.
- 54.HÖFLE, M.G. Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of non indigenous bacteria as reveald by low molecular weight RNA analysis. Appl. Env. Microbiol., 52(10):3387-94, 1992.
- 55.HOUSTON, C.W.; CHOPRA, A.K.; ROSE, J.M.; KUROSKY, A. Review of *Aeromonas* enterotoxins. Experientia, 47:424-9, 1991.
- 56.HUGHES, K.J.; EVERISS, K.D.; HARKEY, C.W.; PETERSON, K.M. Identification of a *Vibrio cholerae* tox R-activaded gene (tag D) that is physically linked to the toxin-coregulated pilus (tcp) gene cluster. **Gene**, 148:97-100, 1994.
- 57.HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* an other enterobacteria. **Mol. Microbiol.**, **5**:825-34, 1991.
- 58.HUSSLEIN, V.; NOTERMANS, S.H.E.; CHAKRABORTY, T. Gene probe for the detection of aerolysin in *Aeromonas* spp. J. Diarrhoeal Dis. Res., 6(2):124-30, 1988.
- 59.HUSSLEIN,V.; BERGBAUER, H.; CHAKRABORTY, T. Studies on aerolysin and serine protease from *Aeromonas trota* sp. nov. **Experientia**, 47:420-1, 1991.

- 60.HUSSLEIN, V.; CHAKRABORTY, T.; CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. Molecular studies on the aerolysin gene of *Aeromonas* species and discovery of a specie specific probe for *Aeromonas trota*, species nova. Clin. Inf. Dis., 14:1061-8, 1992.
- 61. 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.
- 62.JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction Amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl Environ. Microbiol, 59(4):945-52, 1993.
- 63.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.
- 64.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.
- 65. KAN, Y.M. & DOZY, A. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5631-5, 1978.
- 66.KARAOLIS, D.K.R.; LAN, R.; REEVES, P.R. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other

- pandemic and epidemic *Vibrio cholerae* isolates. **J. Bacteriol.**, **176**(20):6199-206, 1994.
- 67.KARAOLIS, D.K.R.; LAN, R.; REEVES, P.R. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones seprately derived from environmental, nontoxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, 177(11):3191-8, 1995.
- 68.KELLY, M.T. & KAIN, K.C. Biochemical charavteristics and plasmids of clinical and environmental *Plesiomonas shigelloides*. Experientia, 47:439-41, 1991.
- 69.KHARDORI, N. & FAINSTEIN, V. Aeromonas and Plesiomonas as etiological agents. Ann. Rev. Microbiol., 42:395-419, 1988.
- 70.KIROV, S.M. The public health significance of *Aeromonas* spp in foods. Int. J. Food Microbiol., 20:179-98, 1993.
- 71.KOCH, W.H.; PAYNE, W.L.; WENTZ, B.A.; CEBULA, T.A. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. Appl. Environ. Microbiol., 59(2):556-60, 1993.
- 72.KOOIJ. D.V.D. Properties of *Aeromonas* and their occurrence and hygienic significance in drink water. **Zbl. Bakt. Hyg.**, **187**:1-17.
- 73.KUEH, C.S.W.; KUTARSKI, P.; BRUNTON, M. Contaminated marine wounds the risk of acquiring acute bacterial infection from marine recreational beaches.
  J. Appl. Bacteriol., 73:412-20, 1992.
- 74.KUIJPER, E.D.J.; Van ALPHEN, L.; LEENDERS, E.; ZANEN, H.C. Typing of Aeromonas strains by DNA restriction endonuclease analysis and

- polyacrylamide gel electrophoresis of cell envelopes. J. Clin. Microbiol., 27(6):1280-5, 1989a.
- 75.KUIJPER, E.D.J.; STEIGERWALT, A.G.; SCHOENMAKERS, B.S.C.I.M.; PEETERS, M.F.; ZANEN, H.C.; BRENNER, D.J. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. J. Clin. Microbiol., 27(1):132-8, 1989b.
- 76.KUIJPER, E.D.J.; PEETERS, M.F. Bacteriological and clinical aspects of *Aeromonas* associated diarrhea in Netherlands. **Experientia**, 47:432-4, 1991.
- 77.KWON, Y.T.; KIM, J.O.; MOON, S.Y.; YOO, Y.D.; RHO, H.M. Cloning and characterization of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio metschinikovii* strain RH530. **Gene**, **152**:59-63, 1995.
- 78.LANGENBERG,W.; RAUWS, E.A.J.; WIDJOJOKUSUMO, A.; TYTGAT, G.N.J.; ZANEN, H.C. Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. J. Clin. Microbiol., 24(3):414-7, 1986.
- LEDERBERG, J.& LEDERBERG, W.E. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol., 63(3): 399-406, 1952
- 80.LEVY, S.B. & MILLER, R.V. Gene transfer in the environment. Mc Grow Hill Publishing Company, 1<sup>a</sup> ed., 1989.
- 81.LIOR H. & JOHNSON, W.M. Application of the polymerase chain reaction (PCR) to detection of the aerolysin gene in whole cell cultures of B-hemolytic A. hydrophila. Experientia 47:421-3, 1991.

- 82.LJUNG, A. & WADSTROM, T. Aeromonas toxins In: DORNER, F. & DREWS, J., Pharmacology of bacterial toxins, Pergamon Press, New Haven, 1986, p.289-305.
- 83.LJUNG, A. Aeromonas toxins and other virulence factors. Experientia, 43:367-8,
- 84.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.
- 85.LUDWIG, W.; DORN, S.; SPRINGER, N.; KIRCHHOF, G.; SCHLEIFER, K.H.
  PCR based preparations of 23S rRNA targed group specific polynucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol., 60(9):3236-44, 1994.
- 86.LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. Specific genonic fingerpints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol., 60(7):2286-95,1994.
- 87.LUPSKI, J.R. Molecular epidemiology and its clinical application. JAMA, 210(11):1363-4, 1993.
- 88. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.T.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.
- 89.MARTINS, M.T.; RIVERA, I.G.; CLARK, D.L.; OLSON, B.A. Detection of virulence factors in culturable *E. coli* isolates from water samples by DNA

- probes and recovery of toxin bearing strains in minimal o-nitrophenol B-D. Glucoronide media. Appl. Environ. Microbiol., 58(9):3095-100, 1992.
- 90. MARTINS, M.T.; RIVERA,I.G.; CLARK, D.L.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L.; OLSON, B.H. Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expressio of β-D-glucoronidase activity in 4-methylumbrelliferyl-β-D-glucoronide media. Appl. Environ. Microbiol., 59(7):2271-6, 1993.
- 91.MARTINEZ-MURCIA, A.J.; ESTEVE, C.; GARAY, E.; COLLINS, M.D.

  \*Aeromonas allosaccharophila\* sp. nov. a new mesophilic member of the genus

  \*Aeromonas.\* FEMS Microbiol. Lett., 91:199-206, 1992.
- 92.MASCHER, F.; REIMTHALER, 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.
- 93.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 sedments of a river. **Zbl. Hyg.**, **193**:114-22, 1992.
- 94.MATTÉ, M.H. Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da Represa de Guarapiranga destinados a recreação e captação para abastecimento público. São Paulo, 1995 [Dissertação de Mestrado Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

- 95.MIRANDA, C.D. & CASTILLO, G. Isolation and characterization of motile Aeromonands from Chilean freshwaters and their potential use as water quality indicators. Environmental Toxicology and water quality, 11:91-8, 1996.
- 96.MONFORT, P. & BALEUX, B. Hemolysin occurrence among A. hydrophila, A. caviae, A. sobria strains isolated from different aquatic ecossistems. Res. Microbiol., 142:95-102., 1991a.
- 97.MONFORT, P. & BALEUX, B. Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp in bracksh water receiving sewage treatment effluent. **Appl. Environ.**Microbiol., 57(9):2459-67, 1991b.
- 98.MONTENEGRO, M.A.; BÜLTE, M.; TRUMPF, T.; ALEKSIC, S.; REUTER, G.; BULLING, E.; HELMUTH, R. Detection and characterization of fecal verotoxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle. **J. Clin. Microbiol.**, **28**(6):1417-1421, 1990.
- 99.MORENA, M.L.; VAN, 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.
- 100.MORGAN, J.A.W.; CRANWELL, P.A.; PICKUP, R.W. Survival of *Aeromonas* salmonicida in lake water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**(6): 1777-82, 1991.
- 101.MORGAN, J.A.W.; RHODES, G.; PICKUP, R.W. Survival of nonculturable Aeromonas salmonicida in lake water. Appl. Environ. Microbiol., 59(3): 874-880, 1993.
- 102.MOSELEY, S.L.; ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TIRAPAT, C.; CHAICUMPA, W.; SAKUL DAIPEARA, T.; FALKOW, S. Identification of

- enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hibridization using the enterotoxin gene probes. **J. Infect. Dis.**, **145**(6):863-9, 1982.
- 103.MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucleic Acid Res., 8:4321-5, 1980.
- 104.NATARO, J.P.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; BRAVO, N.; LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, **152**(3):560-5, 1985.
- 105.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.
- 106.NISHIKAWA, Y.; HASE, A.; OGAWASARA, J.; SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; KIMURA, T. Ahesion to and invasion of human colon carcinoma Caco-2 cells by *Aeromonas* strains. J. Mol. Microbiol., 40:55-61, 1994.
- 107.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.
- 108.PAZZAGLIA, G.; SACK, R.B.; SALAZAR, E.; CHEA, E.; YI, A.; LEON-BARUA, R.; GUERRERO, C.E.; PALOMINO, J. High frequency of coinfecting enteropathogens in *Aeromonas* associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants. J. Clin. Microbiol., 29(6):1151-6, 1991
- 109.PELLIZARI, V.H.; BEZBORODNIKOV, S.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M. Evaluation of strains isolated by growth on naphthalene and biphenyl for

- hybridization of genes to dioxygenase probes and polychlorinated biphenyl-degrading ability. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**(6): 2053-8, 1996.
- 110.POLLARD, D.R.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K.R. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 28(11):2477-81, 1990a.
- 111.POLLARD, D.R.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K.R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaaction. J. Clin. Microbiol., 28(3):540-5, 1990b.
- 112.POPOFF, M. Aeromonas In: MURRAY, R.G.E.; BRENNER, D.J.; BRYANT, M.T.; HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; MOULDER, J.W.; PFNNIG, N.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY Baltimore/ London, Williams & Wilkins, 1984, 1° ed, V 1 p. 545-8.
- 113.POPOVIC, T.; BOPP, C.; OLSVIK, O.; WACHSMUTH, K. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for Vibrio cholerae 01. J. Clin. Microbiol., 31(9):2474-82, 1993.
- 114.RIVERA, I.G.; CHOWDHURY, M.A.R.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.; HUQ, A.; COLWELL, R.R.; MARTINS, M.T. Detection of cholerae (ctx) and zonula occludens (zot) toxin genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. World J. Microbiol. Biotechn., 11:572-7, 1995a.
- 115.RIVERA, I.G.; CHOWDHURY, M.A.R.; HUQ, A.; JACOBS, D.; MARTINS, M.T.; COLWELL, R.R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus

- sequence and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio* cholerae O1, O139 and Nom-O1 strains., **61**(8):2898-904, 1995b.
- 116.ROLSTON, K.V.I. Human extraintestinal infections caused by *Aeromonas* species. J. Diarrhoeal Dis. Res., 6(2):99-102, 1988.
- 117.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.
- 118.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.
- 119.SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIÁTIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 120.SANDAA, R.A. & ENGER, O. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistence. Appl. Environ. Microbiol., 60(12):4234-8, 1994.
- 121.SANYAL, S.C.; SINGH, S.J.; SEN, P.C. Enteropathogenicity of *A. hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. **J. Med. Microbiol.**, **3**:195-9, 1975.
- 122.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.

- 123.SEYMOUR, C.; LONGO, K.T.; RUBIN, S.J. Enhanced isolation of enteric Aeromonas hydrophila by enrichment in alcalin peptone water. J. Diarrhoeal Dis. Res., 6(2):138-9, 1988.
- 124.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, 1992a.
- 125.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. J. Med. Microbiol., 36:269-72, 1992b.
- 126.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp. **J. Med. Microbiol.**, **37**:267, 1992c.
- 127.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.
- 128.SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. Haemagglutinating activity, serum sensitivity and enterotoxigenicity of *Aeromonas* spp. J. Med. Microbiol., 38:49-53, 1993.
- 129.SCHUBERT, R Ecology of *Aeromonads* and isolation from environmetal samples.

  Experientia, 43:351-4, 1987.
- 130.SCHUBERT, R.W.; HEGAZI, M. Aeromonas eucrenophila species nova

  Aeromonas caviae a latter and illegitimate synonym of Aeromonas punctata.

  Zbl. Bakt. Hyg., 268:34-9, 1988.
- 131.SOUTHERN, E.M. Detection of especific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98:503-17, 1975.

- 132.STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J.; PACE, N.R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. Appl. Environ. Microbiol., 49:1379-84, 1985.
- 133.STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F.

  Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell, 37:1015-26, 1984.
- 134.STULL, T.L.; LiPUMA, J.J.; EDLIND, T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: Ribosomal RNA. J. Infect. Dis., 157(2):280-6, 1988.
- 135.TAMPLIM, M.L.; JACKSON, J.K.; BUCHRIESER, C.; MURPHEE, R.L.; PORTIER, K.M.; GANGAR, V.; MILLER, L.G.; KASPAR, C.W. Pulsed-field electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates In: precidings of the 7th International Symposium on Microbial Ecology (1995) Brasil.
- 136.TORANZO, A.E.; BARJA, J.L.; COLWELL, R.R.; HETRICK, F.M. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. Infect. Immun., 39(1): 184-92, 1983.
- 137.VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S.D.; PHIPPS, M.; CHEE, Y.W. Possible virulence factors involved in bacteremia caused by A. hydrophila. J. Med. Microbiol., 42:171-4, 1995.
- 138.VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubactera and application to fingerprinting of bacterial genomes.

  Nucleic Acids Res., 19:6823-31, 1991

- 139.WACHSMUTH, I.K.; EVINS, G.M.; FIELDS, P.I.; OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; BOPP, C.A.; WELLS, J.G.; CARRILLO, C.; BLAKE, P.A. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. J. Infect. Dis., 67:621-6, 1993.
- 140.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.
- 141.WEST, 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.

#### 7. Resumo

Neste estudo 60 cepas de Aeromonas, 15 A. hydrophila, 15 A. caviae, 15 A. sobria e 15 A. jandaei, isoladas de 5 diferentes pontos do reservatório de Guarapiranga, São Paulo, e previamente testada quanto à produção de fatores de virulência, acúmulo de fluído em alça ligada e hemólise em ágar sangue, foram submetidas a ribotipagem e a análise do perfil plasmidial. Cada cepa apresentou um perfil de ribotipagem diferente tendo-se observado para as espécies A. hydrophila e A. caviae a diferenciação em 3 agrupamentos, e A. sobria e A. jandaei dois agrupamentos cada. A análise do perfil plasmidial demonstrou que 13,4% das A. hydrophila apresentaram um ou no máximo 2 plasmídios, enquanto 33,3% das A. sobria e 53,3% das A. jandaei apresentaram de 1 a 6 plasmídios para cada espécie; A. caviae não apresentou cepas contendo plasmídios. Não foi observada correlação entre a presença de plasmídios e a produção de fatores de virulência pelas cepas estudadas. A ribotipagem demonstrou haver um polimorfismo genômico dentro de uma mesma espécie de Aeromonas e, ainda, diferenciou cepas isoladas de um mesmo ponto de amostragem. Estas metodologias, ribotipagem e análise do perfil plasmidial, apresentam em geral características que são complementares, demonstrando ser ferramentas importantes a serem empregadas, tanto em estudos epidemiológicos como ecológicos.

#### 8. Abstract

In this work 60 Aeromonas strains, 15 A. hydrophila, 15 A. caviae, 15 A. sobria and 15 A. jandaei isolated from 5 different points of Guarapiranga Dam, São Paulo, and previously tested for virulence factors production (ileal loop assay and hemolysis on blood agar) were submitted to ribotyping and plasmidial profiles analysis. Each strain showed a different ribopattern and there were observed that for A. hydrophila and A. caviae each specie were grouped in 3 ribotypes, A. sobria and A. jandaei in 2 ribotype each. Plasmidial profiles analysis demonstrated that 13,4% of A. hydrophila had at least one but no more than 2 plasmids, 33,3% of A. sobria and 53,3% of A. jandaei had from one to 6 plasmids each, and A. caviae didn't show to have any plasmids. There were not observed correlation between presence of plasmids and virulence factor production. Ribotyping showed that there are genomic polymorphism within the same Aeromonas specie and differentiate strains that were isolated from the same sample point, indicating that those methodologies have in general characteristics that are complementary and are important tools to be used either in epidemiological or ecological studies.

# 9. Anexos

#### A.1 Meios de Cultura

# A.1.1. Ágar Lúria:

| Bacto triptona                   | 1,0 % |
|----------------------------------|-------|
| Extrato de levedo microbiológico | 0,4 % |
| Cloreto de sódio                 | 1,0 % |
| Bacto ágar                       | 1,5 % |
| pH=6.8                           |       |

#### A.1.2. Caldo Lúria

| Bacto triptona                   | 1,0 % |
|----------------------------------|-------|
| Extrato de levedo microbiológico | 0,4 % |
| Cloreto de sódio                 | 1,0 % |
| pH = 6.8                         |       |

# A.2. Reagentes para extração de DNA genômico

# A.2.1. TE I (Tampão Tris-EDTA- ressuspensão do pellet)

Tris - HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 1 mM

#### **A.2.2.** SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio, solução a 10% em água destilada pH = 7,2

## A.2.3. Solução CTAB/ NaCl

| CTAB (brometo de cetilmetilamônio) | 5 %   |
|------------------------------------|-------|
| NaCl                               | 0,7 M |

Aquecer com agitação constante até dissolução completa dos grumos, utilizar pré- aquecido a 65° C.

# A.2.4. TE II (Tampão Tris EDTA - ressuspensão do DNA)

| Tris- HCl   | pH = 8,0 | 10,0 mM |
|-------------|----------|---------|
| <b>EDTA</b> | pH = 8.0 | 0,1 mM  |

## A.3. Reagentes para Eletroforese

## A.3.1. TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA)

Solução 50X (estoque):

| Tris - base           | 242,0 | g  |
|-----------------------|-------|----|
| Ácido acético glacial | 57,1  | mL |
| EDTA- Na2 pH= 8,0     | 100,0 | mL |
| Água destilada q.s.p. | 1000  | mL |

Solução de uso 1X:

TAE 50X 20 mL água destilada q.s.p. 1.000 mL

## A.3.2 Tampão corante 6X

Azul de Bromofenol 0,25 % glicerina 30 %

# A.4. Reagentes para Southern blott

## A.4.1. Solução I

HCl 0,25 Molar

## A.4.2. Solução II

NaCl 1,5 Molar NaOH 0,5 Molar

## A.4.3. Solução III

Tris - Hel pH = 8,0 1,0 Molar NaCl 1,5 Molar

#### A.4.4. SSC 20X

1X

NaCl 0,15 Molar Citrato de sódio 0,15 Molar

## A.5. Soluções para hibridização

# A.5.1. Solução de hibridização:

5X SSC

Reagente bloqueador 1,0 % Lauril sarcosina 0,1 % SDS 0,02 %

\* Reagente bloqueador = frasco 11 do kit genius labelling and detection, Boheringer Menheim.

### A.5.2. Solução A:

SSC 2X

SDS 0,1%

#### A.5.3. Solução B:

SSC 0,1 X

SDS

0,1%

## A.5.4. Tampão 1:

Tris-HCl (pH=7,5)

100 mM

NaCl

150 mM

#### A.5.5. Tampão 2:

Tampão 1

200 mL

Reagente bloqueador

1,0 g

### **A.5.6.** Tampão 3:

Tris-HCl (pH=9,5)

100 mM

NaCl

100 mM

MgCl<sub>2</sub>

50mM

Preparar no momento do uso.

#### A.5.7. Solução de côr

NBT (frasco 9 Kit Genius labelling and detection)

BICP (frasco 10 Kit Genius Labelling and detection) 70 μL

Tampão 3

20 mL

90 μL

# A.6. Reagentes para extração de plasmídios

# A.6.1. Solução I (solução de lise)

 Lisozima
 4 mg/ mL

 Glicose
 2 %

 EDTA
 10 mM

 Tris-HCl (pH=8,0)
 25 mM

# A.6.2. Solução II

NaOH 0,2 N SDS 1,0 %

# A.6.3. Solução III

Solução de Acetato de sódio 3 Molar pH=4,8 Acertar o pH com ácido acético glacial.

# A.6.4. Solução IV

Acetato de sódio 100 mM Tris-HCl (pH=8,0) 50 mM