Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e β -
lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes
de esgoto e lodo tratados.**

Danielle Escudeiro de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública.

Orientadora: Prof^ª. Associada Maria Helena Matté.

São Paulo
2011

**Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e β -
lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes
de esgoto e lodo tratados.**

Danielle Escudeiro de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde. Pública.

Orientadora: Prof^ª. Associada Maria Helena Matté.

São Paulo
2011

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
aos meus queridos pais Walter e Vera,
ao meu companheiro Pedro Henrique
por compreenderem meus passos,
sempre com muito amor, carinho e incentivo.*

*“Não sei...
se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido
se não tocamos o coração das pessoas.
Muitas vezes, basta ser:
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que acaricia,
desejo que sacia,
amor que promove.
E isso não é coisa de outro mundo,
é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta,
nem longa demais, mas que seja intensa,
verdadeira, pura... Enquanto durar “.*
(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu a oportunidade da vida, ao meu Anjo da Guarda, que me protege a todo momento e a todo plano espiritual que me auxiliou e me conduziu pelos caminhos da vida até o presente momento.

Aos meus queridos e amados pais, que sempre se dedicaram e investiram na minha educação. Obrigada por terem acreditado em mim! Amo vocês!

À minha irmã Michelle que mesmo de longe sempre torceu pelo meu sucesso e vitória.

À tia Marli, pelo carinho, conselhos, incentivo e sugestões na melhoria da dissertação.

Ao meu amor Pedro Henrique, que ao longo desses anos sempre me incentivou, acreditou no meu potencial, compreendeu os momentos de ausência, de “loucura” e fez com que o “peso” do trabalho se diluísse em muitos momentos de alegria e sorrisos.

À toda minha família, pelo apoio e carinho.

À professora Maria Helena Matté, por ter “aberto as portas” da Saúde Pública para mim, por ter acreditado no meu desempenho, por toda orientação nos momentos em que eu mais precisei e pelo incentivo incessante.

Ao professor Glavúr Rogério Matté, pelas sugestões e pela apresentação em congresso internacional de alguns dados gerados na realização deste trabalho.

À CETESB, pelo fornecimento das amostras e dados pertinentes para a realização deste projeto.

Ao CNPq e FINEP, pelo fornecimento da bolsa e financiamento do projeto

Aos professores Nilton Lincopan, Maria Inês Zanoli Sato, Maria Tereza Pepe Razzolini, pela correção da dissertação, pela atenção e sugestões oferecidas na pré-banca.

À equipe do Laboratório de Prática de Saúde Pública, Patrícia, Elizabeth, Luisa, Cristiane, Fabiana pelo apoio e ajuda durante as análises laboratoriais realizadas ao longo do projeto.

À técnica de Laboratório Milena Dropa, que me recebeu com carinho e me orientou durante todas as etapas realizadas, desde a prática de microbiologia e biologia molecular até a correção final da dissertação.

À técnica de Laboratório Miriam Lopes, pelos livros emprestados e por toda ajuda oferecida nos momentos de formatação de arquivos, planilhas.

À Kélvin, pelos momentos que estudamos juntas para prova da pós-graduação, pelo apoio durante as práticas de laboratório e pela companhia durante as disciplinas.

À Livia Balsalobre, por ter me apresentado a professora Maria Helena Matté, por todos os ensinamentos profissionais, pelas dicas, co-orientação, pela indispensável companhia em congresso internacional e compras em Miami, por todo apoio, pelas palavras de carinho, incentivo e por toda sinceridade que a torna tão especial.

À Milena Dropa, por sempre estar presente e pronta para o que der e vier, por todos os conselhos e por me ouvir sempre, até mesmo nos momentos de silêncio.

À Ronalda Araújo, por toda experiência de vida compartilhada, pelo apoio, por ter me ensinado a nunca desistir diante dos obstáculos, por todos os sorrisos e “ronaldices”.

À Luciane Fontana minha querida “Pepita”, amiga de todas as horas, pelos nossos encontros, conversas, “viagens”, cumplicidade, carinho e amizade.

Ao meu amigo e conselheiro Mauro, por todo carinho, por ter me ensinado que as pedras colocadas no caminho podem ser colecionadas em um jogo, guardadas em um pedaço de cetim e serem substituídas por pedras cada vez mais preciosas de significados e manipuladas pela energia do cosmos.

Às minhas “Vós” do coração, que me receberam desde o início com amor e carinho, pelos almoços compartilhados no “bandeco”, pelos cafezinhos na cantina, pelas comemorações no “mexicano”, pelas sessões de sexta-feira, por todas as lágrimas e sorrisos compartilhados, levarei pra sempre em meu coração. Amo vocês!!!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram tanto para minha formação profissional como pessoal.

Muito Obrigada!

RESUMO

Oliveira DE. **Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e β -lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados**. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Introdução: Bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes em ambientes de água doce, salgada e salobra. O isolamento destes microrganismos já foi relatado em água de abastecimento público e alimentos. Algumas espécies podem ser patogênicas ao homem, causando gastroenterites e outras infecções. Isolados de *Aeromonas* de fontes diversas expressam resistência a antimicrobianos, especialmente a β -lactâmicos, devido à presença de enzimas β -lactamases. A patogenicidade das espécies se deve à virulência multifatorial, que compreende a produção de enterotoxinas (Act, Alt e Ast), de elastase, presença de flagelo, entre outros. **Objetivo:** Isolar, identificar e quantificar *Aeromonas hydrophila* isoladas de esgoto e lodo tratado; pesquisar a ocorrência dos genes de virulência e resistência a β -lactâmicos. **Material e Métodos:** A detecção e quantificação de *Aeromonas hydrophila* foram realizadas por meio da técnica de membrana filtrante e meio de cultura específico; a identificação foi realizada por meio da PCR utilizando um par de primers específicos para a espécie. Após a confirmação da espécie foi realizado o antibiograma para conhecer o perfil de resistência aos antibióticos; a pesquisa dos genes de virulência *act*, *alt*, *ast*, *ela*, *lip* e *fla* e genes de resistência a β -lactâmicos foi realizada por meio da PCR e sequenciamento. **Resultados:** Foram analisadas 15 amostras (seis de esgoto tratado e nove de lodo tratado). Destas, somente nove foram positivas para *A. hydrophila*, obtendo-se 441 colônias típicas, das quais 348 foram positivas, por PCR para identificação do gênero e 209 para identificação da espécie. Os 209 isolados, sendo 92 do esgoto tratado e 117 do lodo tratado, apresentaram os seguintes valores na pesquisa dos genes de virulência: 36% (*act*), 40% (*ast*), 78% (*alt*), 82% (*fla*), 86% (*lip*) e 87% (*ela*) e 100% dos isolados apresentaram pelo menos um dos genes. Para os testes de sensibilidade aos antibióticos todos os isolados foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos. A produção de enzimas MBL, ESBL e AmpC foi detectada em isolados. Também foram encontrados genes de resistência *cphA*, *bla*_{TEM} e *bla*_{MOX}, enquanto que os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{FOX} não foram detectados. **Conclusão:** Os resultados sugerem que *A. hydrophila* pode resistir ao processo de tratamento de esgoto e lodo, além disso, pode apresentar diversos genes de virulência e resistência a antibióticos, motivos pelos quais *A. hydrophila* pode ser uma ameaça à Saúde Pública, uma vez que estas amostras são reutilizadas para fins urbanos ou agrícolas.

Descritores: *Aeromonas hydrophila*, virulência, resistência antimicrobiana, esgoto tratado, lodo tratado, Saúde Pública.

ABSTRACT

Oliveira DE. **Characterization, investigation of virulence genes and β -lactamases in *Aeromonas hydrophila* from treated wastewater and sludge.** [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Publica da Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: Bacteria of the genus *Aeromonas* are present in fresh, brackish and salty waters. The isolation of these microorganisms has been reported in public water supplies and foods. Some species can be pathogenic to humans, causing gastroenteritis and other infections. *Aeromonas* isolates from different sources express resistance to antimicrobials, especially β -lactams, due to the presence of β -lactamase enzymes. The pathogenicity of the species is due to the multifactorial virulence, which includes the production of enterotoxins (Act, Alt and Ast) of Elastase and presence of flagello, among others. **Objectives:** Identify and quantify *Aeromonas hydrophila* isolated from treated wastewater and sludge, to investigate the occurrence of virulence genes and resistance to β -lactams. **Material and methods:** The detection and quantification of *A. hydrophila* were made through the membrane filter technique and specific culture medium, the identification was performed by PCR using a pair of primers specific for the species. After confirming the species sensitivity was performed to know the profile of antibiotic resistance, the survey of virulence genes *act*, *alt*, *ast*, *ela*, *lip*, *fla* and resistance to β -lactams gene was performed by PCR and sequencing. **Results:** We analyzed 15 samples (six of nine treated wastewater and sludge). Of these only nine were positive for *A. hydrophila*, resulting in 441 typical colonies, of which 348 were positive by PCR to identify the genus and 209 for species identification. The 209 isolates, being 92 and 117 of treated wastewater and treated sludge showed the following values in the study of the virulence genes: 36% (*act*), 78% (*alt*), 82% (*fla*), 86% (*lip*), 87% (*ela*) and 100% of the isolates had at least one of the genes. For antibiotic susceptibility testing all isolates were resistant to at least one antibiotic. The production of MBL, ESBL and AmpC enzyme was detected in isolates. It was also found resistance genes *cphA*, *bla*_{TEM} and *bla*_{MOX}, while genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{FOX} were not detected. **Conclusion:** The results suggest that *A. hydrophila* can resist the process of treating of wastewater and sludge, moreover, may have different virulence genes and antibiotic resistance, which is why *A. hydrophila* can be a threat to public health, since these samples are reused for agricultural or urban purposes.

Descriptor: *Aeromonas hydrophila*, virulence, antibiotic resistance, treated wastewater, treated sludge, Public Health.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	O gênero <i>Aeromonas</i>	17
1.2	Ocorrência de <i>Aeromonas</i>	19
1.2.1	Ocorrência de <i>Aeromonas</i> em diferentes tipos de amostras, Brasil.....	23
1.2.2	Ocorrência de <i>Aeromonas</i> em sistema de tratamento de esgoto.....	26
1.3	REUTILIZAÇÃO DE ESGOTO E LODO TRATADO.....	27
1.4	Métodos utilizados para detecção de <i>Aeromonas hydrophila</i> em esgoto tratado.....	28
1.4.1	Meios de cultura seletivos.....	29
1.4.2	Métodos moleculares.....	31
1.5	ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA.....	32
1.5.1	Antibióticos β -lactâmicos.....	34
1.5.2	β -lactamases.....	35
1.5.3	ESBLs (β -lactamases de Espectro Estendido).....	37
1.5.4	MBLs (Metallo- β -lactamases).....	39
1.5.5	AmpC β -lactamases.....	40
1.6	Resistência a antimicrobianos no gênero <i>Aeromonas</i>	42
1.7	FATORES DE VIRULÊNCIA E O SEU PAPEL NA PATOGENICIDADE.....	45
1.7.1	Virulência.....	46
1.7.2	Toxinas.....	47
1.7.3	Enterotoxinas Citotônicas.....	48
1.7.4	Grupo <i>act/ aer/</i> β -hemolisina.....	48
1.7.5	Protease, Lipase e Elastase.....	50
1.7.6	Pili e Flagelo.....	52
1.7.7	Ocorrência dos fatores de virulência no gênero <i>Aeromonas</i>	53
2.	OBJETIVO GERAL.....	58
2.1	Objetivo específico.....	58
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>A. hydrophila</i>	59
3.1.1	Enumeração por filtração em membrana filtrante.....	60
3.1.2	Leitura das placas e Isolamento.....	60

3.2	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	62
3.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	62
3.3.1	Confirmação do gênero <i>Aeromonas</i> por meio da PCR.....	63
3.3.2	Desenho dos iniciadores para identificação da espécie.....	63
3.3.3	Confirmação da espécie.....	64
3.4	CEPAS TIPO DO GÊNERO <i>AEROMONAS</i>	64
3.5	PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	66
3.5.1	Genes <i>act</i> , <i>alt</i> , <i>ast</i> , <i>fla</i> , <i>lip</i> , <i>ela</i>	66
3.6	PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	66
3.6.1	Genes <i>bla</i> _{CphA} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{MOX} , <i>bla</i> _{FOX}	66
3.7	VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR.....	66
3.8	ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS.....	68
3.8.1	Antibiograma.....	68
3.9	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS β -LACTAMASES.....	69
3.9.1	Produção de MBL (Metallo- β -lactamase).....	69
3.9.2	Produção de AmpC.....	70
3.9.3	Produção de ESBL (β -lactamase de espectro estendido).....	70
4.	RESULTADOS.....	72
4.1	ISOLAMENTO, ENUMERAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA.....	72
4.1.1	Isolamento.....	72
4.1.2	Quantificação e Identificação fenotípica.....	73
4.2	CEPAS TIPOS.....	75
4.2.1	Crescimento das diferentes espécies de <i>Aeromonas</i> em meio seletivo.....	75
4.2.2	Reação de PCR para identificação de <i>A. hydrophila</i>	76
4.2.3	Associação da técnica de membrana filtrante utilizando meio seletivo e a PCR com iniciadores específicos.....	76
4.3	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS PROVENIENTES DE ESGOTO E LODO TRATADO.....	78
4.4	TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.....	78
4.4.1	Sensibilidade e especificidade da técnica de membrana filtrante associada ao meio de cultura específico para <i>A. hydrophila</i>	78

4.4.2	Sensibilidade e especificidade da associação da técnica de membrana filtrante com meio seletivo e os iniciadores desenhados neste estudo para identificação de <i>A. hydrophila</i>	79
4.5	PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	80
4.6	ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS, PRODUÇÃO DE ENZIMA β -LACTAMASE E PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	83
5.	DISCUSSÃO.....	86
5.1	IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	86
5.2	PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	89
5.3	ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS.....	91
5.4	PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES (MBL, ESBL, AMPC) E PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	93
6.	CONCLUSÃO.....	98
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
	CURRÍCULO LATTES	

Lista de Quadros

Quadro 1	– Eventos iniciais na história do gênero <i>Aeromonas</i>	14
Quadro 2	– Meios de cultura mais utilizados na técnica de membrana filtrante para isolamento de organismos do gênero <i>Aeromonas</i>	29
Quadro 3	– Esquema de classificação das β -lactamases, ampliado de Bush et al. (1995).....	36
Quadro 4	– Sequência dos iniciadores (5'-3'), condições dos ciclos, tamanho dos produtos esperados para a identificação dos organismos e referência utilizadas.....	65
Quadro 5	– Sequência dos iniciadores (5'-3'), condições dos ciclos e tamanhos dos produtos esperados na pesquisa dos genes de virulência e resistência.....	67
Quadro 6	– Critério de interpretação para teste de disco difusão, determinação da sensibilidade aos antibióticos em isolados de <i>Aeromonas hydrophila</i>	69
Quadro 7	- Sensibilidade e especificidade da técnica de membrana filtrante associada ao meio de cultura específico para <i>A. hydrophila</i>	79
Quadro 8	- Sensibilidade e especificidade da associação da técnica de membrana filtrante com meio seletivo e os iniciadores desenhados neste estudo para identificação de <i>A. hydrophila</i>	80

Lista de Figuras

Figura 1 –	Fontes ambientais de <i>Aeromonas</i> que podem levar à infecção ou colonização em seres humanos. Setas pretas indicam suspeita dos principais itinerários e aquisição secundária levando a colonização/infecção.....	21
Figura 2 –	Esquema da técnica de membrana filtrante, isolamento e triagem dos isolados.....	61
Figura 3 –	Placa de Ágar Base com membrana filtrante e colônias sugestivas de serem <i>A. hydrophila</i> , após 24 horas de incubação a 37°C.....	73
Figura 4 –	Alinhamento das seqüências do GenBank e seqüências encontradas neste estudo (<i>A. hydrophila</i> 490, 491, 492 e 493). AHF e AHR (par de iniciadores desenhados neste estudo).....	77
Figura 5 –	Ocorrência (%) dos genes de virulência em isolados de <i>A. hydrophila</i> (n=209).....	82
Figura 6 –	Ocorrência (%) de isolados de <i>A. hydrophila</i> correspondentes a quantidade de genes de virulência encontrados em cada um dos isolados (n=209).....	82
Figura 7 –	Gráfico representando a porcentagem (%) de isolados em ordem decrescente resistentes aos antibióticos utilizados (n=209).....	83
Figura 8 –	Porcentagem de isolados produtores de enzimas (MBL, ESBL e AmpC) e presença do genes de resistência calculada de acordo com número de isolados positivos para espécie <i>A. hydrophila</i> , presentes no esgoto e lodo tratados (n=209).....	85

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Número de amostras coletadas de esgoto e lodo tratados, provenientes de ETs do estado de São Paulo, que apresentaram ou não crescimento na triagem dos isolados.....	72
Tabela 2 –	Concentração de <i>A. hydrophila</i> , obtida na contagem de colônias típicas, pH e tipo de tratamento final das amostras de esgoto e lodo tratado.....	74
Tabela 3 –	Número de colônias selecionadas na placa contendo meio seletivo de <i>A. hydrophila</i> , confirmadas fenotipicamente nos testes da triagem de <i>Aeromonas</i>	75
Tabela 4 –	Número de colônias selecionadas na placa contendo meio seletivo de <i>A. hydrophila</i> e número de isolados que foram positivos na PCR de identificação do gênero e espécie, provenientes de amostras de esgoto e lodo tratados do estado de São Paulo.....	78
Tabela 5 –	Número de isolados positivos para a presença de cada gene de virulência.....	81

1. INTRODUÇÃO

De muitas maneiras, a história do gênero *Aeromonas* reflete as crônicas da bacteriologia médica moderna, que se estende por mais de 100 anos, desde o seu nascimento como uma ciência de laboratório reconhecida no final do século XIX e início do século XX, através de sua evolução para a era molecular pós-genômica (JANDA e ABBOTT, 2010).

A percepção do gênero *Aeromonas* pela comunidade científica evolui durante o mesmo intervalo. Inicialmente, espécies de *Aeromonas* eram reconhecidas apenas como causadoras de doenças sistêmicas em animais pecilotérmicos. Hoje, o gênero é considerado não só uma causa de doença importante em peixes e outras espécies de sangue frio, mas também como o agente etiológico responsável por uma variedade de complicações infecciosas em humanos tanto em indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos (JANDA e ABBOTT, 2010).

Do ano de 1890 até hoje, diversos eventos discutiram aspectos do gênero, e algumas dessas realizações, que tiveram lugar ao longo do século passado, são fundamentais para a compreensão de questões atuais e de práticas laboratoriais em relação a este grupo de bactérias. Tais eventos iniciais na cronologia do gênero *Aeromonas* são listados no Quadro 1.

Quadro 1 – Eventos iniciais na história do gênero *Aeromonas*.

Data	Marco ou realização	Comentário	Referência
1891	Gênero ligado à bacteremia (pé vermelho), doença de sapos	Não existe cepa isolada; presunção de <i>Aeromonas</i>	Ewing et al. (1961)
1943	Definida a taxonomia e a classificação de <i>A. hydrophila</i>	Separação de hastes com flagelo polar	Stanier (1943)
1951	Primeira associação do gênero com a infecção humana (miosite metastática fulminante)	<i>Aeromonas</i> isolada de amostra de autópsia	Caseltz (1996)

1968	Primeiro e principal relatório médico que descreve uma associação do gênero <i>Aeromonas</i> , com uma variedade de infecções humanas	28 casos notificados; septicemia associada à doença do fígado (cirrose Laennec)	Von Graevenitz e Mensch (1968)
1981	Gênero contém várias espécies distintas dentro do grupo “mesófilos”	Estudos de parentesco de DNA baseado em 55 cepas	Popoff et al. (1981)
1986	Gênero <i>Aeromonas</i> filogeneticamente distinto do gênero <i>Vibrio</i>	Baseado em 5S e sequenciamento do gene 16S rRNA; nova família proposta (<i>Aeromonadaceae</i>)	Colwell et al. (1986)
2006	Seqüência do genoma completo (4,7 Mb) de <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 ^T	Cepas tipo de espécie tipo do gênero, falta de fluidez nos elementos móveis; pistas sobre repertório metabólico ambiental	Seshadri et al. (2006)

Fonte: JANDA e ABBOTT, 2010.

A busca ao Pubmed usando o termo “*Aeromonas*” gerava cerca de 663 citações para o período de 1944 até 1980. Em contraste, nos últimos 31 anos (de 1981 até 2010) o número de publicações científicas cresceu sete vezes, com o número total de entradas hoje em 4.928, fato que evidencia o crescimento do interesse neste gênero pelo setor científico e médico (JANDA e ABBOTT, 2010).

Da mesma forma, em 1980, apenas quatro espécies de *Aeromonas* eram reconhecidas (*Aeromonas hydrophila*, *A. punctata*, *A. salmonicida*, e *A. sobria*). Atualmente, esse número está em 24 espécies e finalmente o primeiro genoma completo de uma cepa de *Aeromonas* (ATCC 7966^T) foi seqüenciado. Essas conquistas são um testemunho não só da revolução genômica molecular, mas também do quanto os conhecimentos científicos e médicos sobre este gênero evoluíram em 117 anos (JANDA e ABBOTT, 2010).

Estudos recentes incluem o gênero *Aeromonas* no grupo de patógenos emergentes pela sua relação cada vez mais freqüente com infecções locais e sistêmicas em hospedeiros imunologicamente competentes (DEODHAR et al.,

1991; SCOGLIO et al., 2001; PALÚ et al., 2006; SESHADRI et al., 2006). Os organismos pertencentes a este gênero são de origem aquática e podem causar doenças diarréicas mais freqüentemente do que geralmente é observado (JOSEPH e CARNAHAN, 2000).

O gênero *Aeromonas* representa uma importante ameaça para a saúde pública, já que as infecções causadas por estes organismos geralmente são adquiridas pelo consumo de água e alimentos contaminados (CHOPRA, 1999; MERINO et al., 1995; SEN e RODGERS, 2004; EPA, 2006).

O primeiro caso de infecção por *Aeromonas* foi relatado em 1954 em uma mulher na Jamaica (VON GRAEVENITZ, 2007) e durante os últimos anos o número de estudos com o gênero *Aeromonas* vem aumentando, bem como o reconhecimento destes organismos enquanto agentes causadores de doenças humanas (PARKER e SHAW, 2011).

As principais doenças causadas por *Aeromonas* podem ser classificadas em dois grupos: septicemias e gastrointestinais (MERINO et al., 1995; ALBERT et al., 2000; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Analisando a literatura pode-se observar um aumento esporádico de infecções de feridas em pacientes imunocomprometidos, infecções gastrointestinais e uma expansão das inúmeras associações com quadros de septicemia, meningite, osteomielite, gastroenterite e peritonite bacteriana espontânea (CARNAHAN et al., 1991; MERINO et al., 1995; ALBERT et al., 2000; VON GRAEVENITZ, 2007; CHOI et al., 2008).

Dentre as espécies associadas com a causa de doenças em humanos, *Aeromonas hydrophila* foi considerada a espécie mais patogênica, sendo necessária a priorização da pesquisa da distribuição e ocorrência de determinantes genéticos responsáveis pela virulência e resistência desta espécie (JANDA e ABBOTT, 2010;

PARKER e SHAW, 2011).

1.1 O gênero *Aeromonas*

Embora o gênero *Aeromonas* tenha sido descoberto há 100 anos, somente nas últimas três décadas teve seu papel comprovado em uma variedade de doenças em humanos (JANDA e ABBOTT, 1998; TENA et al., 2007).

Os organismos deste gênero compreendem bacilos Gram-negativos, com comprimento de 1 a 3,5µm, apresentando formas que variam de cocóides a bacilares, retos ou curvos, com extremidades arredondadas, podendo ser móveis por meio de um flagelo polar ou imóveis. São anaeróbios facultativos, produtores das enzimas catalase e oxidase, e fermentadores de glicose. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0 e 5°C, a máxima entre 38 e 41°C e a ótima entre 22 e 28°C. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0 (MARTINEZ-MURCIA et al., 1992; MATTÉ et al., 1996; DELAMARE et al., 2002; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

O gênero *Aeromonas* era localizado taxonomicamente na Família *Vibrionaceae* desde 1965, juntamente com outros dois gêneros patogênicos para o homem (*Vibrio* e *Plesiomonas*). Este regime de classificação sistemática era conveniente, pois estes gêneros compartilhavam as mesmas características fenotípicas e os mesmo ecossistemas (água, peixe, répteis e anfíbios) e causavam as mesmas doenças (gastrenterites e septicemia) (JANDA e ABBOTT, 1998).

Classificações equivocadas de organismos do gênero *Aeromonas* estimularam estudos buscando a melhor forma de identificar e diferenciar as

espécies deste gênero, e com a evolução dos estudos taxonômicos favorecidos pelos avanços tecnológicos e principalmente com o emprego de métodos moleculares, em 1986 COLWELL et al. propuseram a criação da Família *Aeromonadaceae*.

O conhecimento da distribuição e diversidade de organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* nos diferentes ambientes aquáticos tem despertado o interesse de vários pesquisadores (MARTINEZ-MURCIA et al., 2011). Esse interesse especial está relacionado à sua grande capacidade de adaptação em ambientes diversos, inclusive em baixas temperaturas, ou mesmo com diferentes graus de poluição, sendo capaz de se multiplicar na ausência de um hospedeiro humano, o que lhe confere a característica de organismo autóctone no ambiente (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Até 2005 estavam descritas no Manual Bergey's of Systematic Bacteriology 14 espécies de *Aeromonas* e dois grupos de hibridização (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Porém, um grande número de espécies foi recentemente descrito para esse gênero, resultando em 11 novas espécies adicionais, perfazendo um total de 25 espécies novas descritas de *Aeromonas* (MARTINEZ-MURCIA et al., 2011).

Atualmente o gênero é composto pelas seguintes espécies: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biogrupo *sóbria e veronii*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, dois grupos de DNA homólogos (HG): *Aeromonas* sp. HG11 (agora incluída em *A. encheleia*) e *Aeromonas* sp. HG13 (anteriormente o grupo entérico 501) que foi nomeado como *A. diversa*. Além disso, outras espécies previamente definidas, tais como *A. enteropelogenes* e *A.*

ichthiosmia, são considerados sinônimos de *A. trota* e *A. veronii*, respectivamente (MARTINEZ-MURCIA et al., 2011).

Entre as onze novas espécies recentemente descritas estão: *A. culicicola*, *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium*, *A. aquariorum*, *A. tecta*, *A. piscicola*, *A. fluvialis*, *A. taiwanensis*, *A. sanarellii* e *A. rivuli*. Outras duas possíveis novas espécies, *A. cavernicola* e *A. lusitana*, foram recentemente reconhecidas e estão em processo de caracterização (dados não publicados) (MARTINEZ-MURCIA et al., 2011).

MATTÉ et al. (1999) descreveram outra espécie denominada *Aeromonas arequipensis* (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). SAHA e CHAKRABARTI (2006) descreveram uma nova espécie denominada *Aeromonas sharmana*, isolada de uma fonte termal na Índia.

Estes estudos mostram que a identificação das espécies do gênero é complexa, já que novas espécies são cada vez mais freqüentemente propostas e incluídas nas chaves de identificação destes microrganismos. Devido ao crescimento da importância do gênero *Aeromonas* em infecções clínicas e as limitações dos métodos existentes, há a necessidade da elaboração de um sistema que possa identificar corretamente esses organismos (CHACÓN et al., 2002).

1.2 Ocorrência de *Aeromonas*

As bactérias do gênero *Aeromonas* são microrganismos naturais de ambientes aquáticos e apresentam alta capacidade de adaptação a uma grande diversidade destes ambientes, sendo observada sua presença em água doce e salgada, tanto de regiões tropicais como temperadas. Sua presença é mais freqüente na superfície e

no sedimento de águas de represas de abastecimentos, em rios com diferentes graus de poluição, bebedouros, caixas d'água, água mineral, água de caverna, lagoas de estabilização, biofilmes e ambientes para fins recreacionais como pesqueiros (MATTE, 1995; MARTONE-ROCHA, 2004; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; BOMO et al., 2004; JANDA e ABBOTT, 2010).

Além de ambientes aquáticos, esses microrganismos podem ser encontrados em solo, alimentos e animais, tais como anfíbios, répteis, aves, mamíferos e peixes (MATTE et al., 1996; SINGH et al., 2001; MATTE, 2004; VON GRAEVENITZ, 2007; SILVA et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 2010). Diversos estudos demonstram a presença de *Aeromonas* em sistemas de distribuição de água potável e sua capacidade de colonizar a tubulação do sistema formando biofilme (HOLMES et al., 1996; BOMO et al., 2004; JANDA e ABBOTT, 2010).

Considerando a distribuição ubiquitária do gênero *Aeromonas*, são diversas as fontes que podem levar à infecção e colonização em animais ou seres humanos (Figura 1).

Figura 1 - Fontes ambientais de *Aeromonas* que podem levar à infecção ou colonização em seres humanos. Setas pretas indicam suspeita dos principais itinerários e aquisição secundária levando à colonização/infecção.

Fonte: JANDA e ABBOTT (2010).

Bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes na biosfera microbiana, e podem ser isoladas de praticamente todos os nichos ambientais onde existem ecossistemas bacterianos. O vasto panorama de fontes ambientais a partir das quais podem ser encontradas *Aeromonas* empresta-se prontamente à exposição constante e interações entre bactérias deste gênero e seres humanos (JANDA e ABBOTT, 2010).

BOMO et al. (2004) relataram a presença de *Aeromonas* em biofilmes formados em água potável e reciclada que resistem à desinfecção. TOKAJIAN e HASHWA (2004) relataram a presença do gênero em um sistema de água clorada e HIRANSUTHIKUL et al. (2005) relataram que o gênero *Aeromonas* foi a maior causa de infecções de pele e mucosa entre os sobreviventes do tsunami no sul da Tailândia.

Diversos trabalhos relatam que o alimento é outra fonte de contaminação por bactérias do gênero *Aeromonas*, por meio de água contaminada, irrigação ou contato direto com o ambiente de origem (CANSIAN et al., 2005; MCMAHON et al., 2001; PIANETTI et al., 2004; VALLY et al., 2004; SEN, 2005; SAAVEDRA et al., 2006).

No estudo de SINHA et al. (2004), o qual analisou amostras clínicas, 65% das amostras de fezes diarréicas analisadas foram positivas para *Aeromonas*. Este grupo de bactérias também foi implicado em 12% das infecções hepatobiliares, sendo a colangite (infecção das vias biliares) a mais comum (FIGUEIRAS, 2005).

CABRERA et al. (2007) estudaram 95 cepas de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e oxidase positiva isolados de diversas amostras clínicas de diferentes laboratórios provenientes de diversos hospitais de Cuba. Das cepas estudadas 89,4% pertenciam ao gênero *Aeromonas* e as espécies eram: *A. jandaei*, *A. veronii* bv *sobria*, *A. hydrophila* e *A. caviae*.

TULSIDAS et al. (2008) relataram um caso de piemia portal secundária e bacteremia, causada por *A. hydrophila* em um chinês de 71 anos sem histórico de doença hepatobiliar, e observaram que casos de infecção extra-intestinal causada por *A. hydrophila* em humanos não é comum, mas deve ser suspeita em pacientes imunodeprimidos expostos à água salobra ou salgada.

Na Índia, o estudo de MUKHOPADHYAY et al. (2009) mostrou oito casos clínicos identificados como infecção extra-intestinal causada por *Aeromonas hydrophila*.

1.2.1 Ocorrência de *Aeromonas* em diferentes tipos de amostras, no Brasil

No Brasil, a relação da presença de espécies do gênero *Aeromonas* com a causa de doenças é pouco documentada, assim como relatos sobre a ocorrência das espécies do gênero e estudos moleculares para vigilância da presença de genes de virulência e resistência são fatores que precisam ser mais estudados e investigados para o esclarecimento do risco que esses microrganismos representam para a Saúde Pública (NOJIMOTO et al., 1997).

MATTÉ (1995) isolou 536 cepas de *Aeromonas* de 64 amostras de água de superfície e 24 amostras de sedimento da Represa de Guarapiranga em São Paulo, das quais 10,3% eram *A. hydrophila*, 11% *A. caviae*, 11% *A. sobria*, 69,6% *A. jandaei* e 2,6% atípicas.

NOJIMOTO et al. (1997) analisaram 163 amostras de fezes de crianças com idade abaixo de 5 anos, na cidade de Goiânia. Das amostras, 91 eram diarréicas e 72 não diarréicas. Das fezes diarréicas foram isoladas 21,9% de *Aeromonas*, enquanto que das fezes não diarréicas nenhuma cepa do gênero foi isolada.

FALCÃO et al. (1998) pesquisaram a presença de *Aeromonas* e outros organismos em água fresca de diversas fontes em Araraquara, interior de São Paulo. Também foram analisados fatores de virulência e presença de plasmídeo. De 100 amostras de água coletadas, foram isoladas 6 cepas: 3 *A. hydrophila*, 1 *A. sóbria*, 1 *A. veronii* bv *sobria* e 1 *A. media*. Todas as cepas de *Aeromonas* foram positivas para o teste de β -hemólise e negativas para presença de plasmídeos e enterotoxinas Ast e Alt.

GIBOTTI et al. (2000) pesquisaram a ocorrência de *Aeromonas* e outros microrganismos em amostras de água do córrego de Cambé, Paraná. Foram isoladas 12 cepas de *A. hydrophila*, 12 *A. caviae* e 8 *A. veronii* bv sobria. Todos isolados apresentaram capacidade hemolítica em Ágar sangue. O teste em camundongos neonatos para detecção de acúmulo de fluido foi positivo para 2 *A. hydrophila*, 1 *A. caviae* e 2 *A. veronii* bv sobria.

SOUZA e SILVA-SOUZA (2001) conduziram um estudo para pesquisa de bactérias em peixes no rio Congonhas em Sertaneja, Paraná. Em 44% das amostras analisadas, foram isoladas bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, família *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Lactobacillus*, sendo que o grupo isolado com maior frequência foi o gênero *Aeromonas*.

BAUAB et al. (2003) estudaram isolados de *Aeromonas* de origem ambiental e clínica, nas cidades de Araraquara e Ribeirão Preto. Um total 88 cepas de *Aeromonas* foram isoladas, sendo 31 de fezes diarreicas, 10 de fezes não diarreicas, 39 de material humano extra-intestinal e 8 de água doce. Os resultados mostraram associação dos ribotipos com a origem das cepas, e a análise de agrupamento permitiu a identificação de um complexo de ribotipos pertencentes a fontes distintas, mas relacionadas, incluindo isolados clínicos e ambientais.

PEREIRA et al. (2004) pesquisaram a presença de *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides* em 86 amostras de mexilhão (43 *in natura* e 43 pré-cozida), em Niterói. Das 380 cepas isoladas de ambas as espécies, 15,5% foram caracterizadas como *A. hydrophila*. A identificação feita pelos pesquisadores alocou 372 cepas em nove espécies de *Aeromonas*, alertando que bactérias deste gênero podem continuar presentes em mexilhões mesmo após o cozimento.

CABRAL (2005) analisou 273 isolados pertencentes ao gênero *Aeromonas*, em amostras de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, dentre as espécies encontradas 22 isolados foram classificadas como *A. hydrophila*.

Em 2004, ocorreu um surto de diarreia em São Bento do Una, Pernambuco, que envolveu 2170 casos. Foram realizadas 582 coproculturas, e em 114 amostras foi detectada a presença de *Aeromonas* (HOFER et al., 2006).

RAZZOLINI et al. (2008) analisaram 200 amostras de água provenientes de reservatórios domésticos e públicos, e fontes potáveis localizadas em São Paulo. A presença do gênero *Aeromonas* foi detectada em 12 (6%) das amostras coletadas, sendo que um número expressivo destes isolados tinha o potencial de produzir toxinas.

BALSALOBRE (2009) selecionou 100 isolados provenientes de ambiente aquático, destes 41 isolados de *A. hydrophila*. A pesquisa demonstrou a ocorrência dos genes *act*, *alt* e *ast* em 70% (29), 97% (40) e 26% (11) respectivamente nos isolados de *A. hydrophila*. Os resultados mostraram o potencial patogênico do gênero, indicando que a presença destes patógenos em sistema de água é uma preocupação para a Saúde Pública.

MOURA (2010) analisou o perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em 24 isolados *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais coletadas no período de 1995 a 2000. Todos os isolados produziram enzimas MBL (Metallo-β-lactamases) e AmpC. Nenhum isolado apresentou produção de ESBL. Os resultados da PCR demonstraram a presença de pelo menos um gene de virulência em cada isolado e a presença dos genes *bla*_{MOX}, *bla*_{CHPA}, *bla*_{TEM} e *cepH*.

1.2.2 Ocorrência de *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgoto

Estudos realizados na América Latina e Europa investigaram a presença de *Aeromonas* em sistema de tratamento de esgoto, bem como sua distribuição, dinâmica, incidência e permanência após o tratamento (MARTONE-ROCHA, 2004).

A partir de 2005, o estudo de VILLARRUEL-LÓPEZ et al. (2005) verificou a ocorrência de *Aeromonas* na entrada e saída de três estações de tratamento de águas residuárias (ETAR) e duas estações de tratamento de água potável (ETAP), no México. Um total de 144 amostras foi obtido da ETAR e 96 da ETAP. *Aeromonas* foram isoladas em 31% (44) das amostras de ambas as fontes. A presença do patógeno foi detectada tanto no sistema de ETAR como no de ETAP.

SHANNON et al. (2007), detectaram a presença de patógenos em águas residuárias pelo método da PCR em tempo real. Foram coletadas amostras de cinco estágios de tratamento de esgoto bruto, efluente primário, misto, resíduos de lodo ativado e efluentes finais. Os resultados demonstraram a presença de diferentes patógenos distribuídos nos cinco estágios de tratamento, porém *A. hydrophila* foi detectada somente na primeira fase, ou seja, no esgoto bruto.

Outro estudo pesquisou a persistência de *Aeromonas* em diferentes tipos de amostras, em Bangladesh. De 670 amostras coletadas de estação de tratamento de água, de fezes de crianças hospitalizadas com diarreia, de lagoas de estabilização e de fezes de pessoas saudáveis, foram isoladas 1.315 cepas de *Aeromonas*. O gênero *Aeromonas* foi observado em todos os tipos de amostras estudadas sendo

que estava presente em: 40% nas amostras de lagoas de estabilização, 8,5% em crianças hospitalizadas com diarreia e em 3,5% amostras de pessoas saudáveis. Os resultados indicam que *Aeromonas* pode persistir no sistema de tratamento e pode propagar de crianças hospitalizadas com diarreia para peixes produzidos para consumo humano por meio do sistema de esgoto tratado (RAHMAN et al., 2007).

MARTONE-ROCHA et al. (2010) avaliaram a dinâmica de espécies de *Aeromonas* isoladas do sistema de tratamento de águas residuárias, em São Paulo. O isolamento das cepas foi realizado em Ágar sangue – ampicilina e confirmado pela caracterização bioquímica. Espécies de *Aeromonas* foram isoladas em 72,4% de esgoto bruto, 55,2% de lagoa anaeróbia e 48,3% de lagoa facultativa. Os autores concluíram que a compreensão da dinâmica de organismo patogênico em sistemas de tratamento de águas residuais com potencial de reutilização é importante, devido ao risco que representam.

1.3 REUTILIZAÇÃO DE ESGOTO E LODO TRATADO

O tratamento de esgoto varia de uma estação para outra, mas em geral é um processo com vários estágios que trata os efluentes antes de serem reintroduzidos a um corpo d'água, aplicados ao solo ou reutilizado. O tratamento de água residuária é dividido em três etapas: a) tratamento primário, b) tratamento secundário e c) tratamento terciário (GERBA, 2000).

Assim como o esgoto, o lodo ou biossólido resultante das diversas etapas do tratamento de esgoto (lodo primário e lodo ativado gerado pelos processos secundários) também necessitam de tratamento antes de serem despejados em aterros sanitários ou reutilizados na agricultura. Para redução do volume e do teor de

matéria orgânica, o tratamento do lodo usualmente inclui as seguintes etapas: a) adensamento, b) estabilização e c) desidratação (GERBA, 2000).

O reúso de resíduo de sistema de tratamento de esgoto, efluente e lodo é uma prática que demanda cuidados especiais, pois microrganismos patogênicos podem estar presentes nesses produtos. A OMS (1998) determina que a eliminação de patógenos é fundamental para o reúso de esgoto tratado. Assim como nos métodos convencionais de tratamento de esgoto acentua-se a redução ou remoção de matéria orgânica e de sólido em suspensão, no reúso de esgoto tratado ou de águas residuárias, é necessária a eliminação de patógenos como bactérias, vírus e parasitas (CUTOLO, 2009).

Para que a reutilização de esgoto doméstico ou de águas residuárias aconteça é necessária a adoção de quatro medidas principais para a proteção à saúde: a) tratamento dos esgotos; b) restrição de irrigação de cultivos; c) controle de classes de cultivos quanto às normas e d) incentivo à higiene (CUTOLO, 2009).

Enfim, a melhoria da saúde global, de saneamento e a conseqüente redução na propagação de doença dependem em grande parte de boas práticas de higiene, disponibilidade de serviços de saúde e coleta de confiança para tratamento de águas residuais (MUGA e MIHELCIC, 2008).

1.4 Métodos utilizados para detecção de *Aeromonas hydrophila* em esgoto tratado

Estações de tratamento de águas residuais normalmente monitoram a qualidade do efluente final utilizando técnicas padronizadas como membrana filtrante, aplicáveis às diversas matrizes de águas residuárias. Apesar de haver

novas ferramentas moleculares como PCR e DNA microarray, sua aplicação de rotina no monitoramento de águas residuárias ainda não é comum (LEE et al., 2008).

Estudos de pesquisa de *Aeromonas hydrophila* utilizam diversas técnicas para isolamento, quantificação e identificação desse microrganismo em amostras de água superficial, esgoto bruto e esgoto tratado, destacando a técnica da membrana filtrante, a qual é colocada sobre a placa de petri contendo meio de cultura seletivo.

1.4.1. Meios de cultura seletivos

Diferentes estudos foram realizados com objetivo de selecionar o melhor meio de cultivo para isolamento de *Aeromonas* nas diferentes matrizes, desta forma uma variedade de meios seletivos foi proposta para detecção desses microrganismos (Quadro 2). Embora a utilização de meios seletivos aplicados a técnica de membrana filtrante seja muito utilizado para organismos do grupo coliformes, para o gênero *Aeromonas* são poucos os estudos descritos na literatura aplicando esta técnica (VILLARI et al., 1999; CHAO et al., 2003; DJUIKOM et al., 2008).

Quadro 2 – Meios de cultura mais utilizados na técnica de membrana filtrante para isolamento de organismos do gênero *Aeromonas*.

Sigla (meio)	Nome / composição	Referências
mA	Ágar Rippey Cabelli (ampicilina, sodio deoxicolato, etanol, trealose)	RIPPEY e CABELLI (1979)
SAA	Ágar Ampicilina Starch	PALUMBO et al. (1985)
ADA	Ágar Dextrina Ampicilina	HAVELAAR et al. (1986)
Ágar MIX	Ágar Xilose Inositol Sais Biliares Ampicilina	CUNLIFFE e ADCOCK (1989)
Ágar PADE	Ágar Pril Ampicilina Dextrina Etanol	IMZLIN et al. (1996)
LES	Endo Agar	KUHN et al., 1997

SGAP-IOC	Amido Glutamato Ampicilina Glicose	HUGUET e RIBAS (1997)
MEIO BASE	XLD modificado adicionando Ampicilina	Ryan (1985)

VILLARI et al. (1999) realizaram um estudo para desenvolver uma metodologia adequada para detecção de *Aeromonas* em água. Os autores compararam diferentes meios de cultura utilizados na técnica de membrana filtrante e incluíram outras variáveis como temperatura (37°C e 30°C), tempo (24h e 48h) e condição de incubação (aeróbia e anaeróbia). O estudo foi realizado com 18 amostras de água estéril contaminadas com 5 cepas de *A. hydrophila* e 3 cepas de *A. caviae* isoladas de esgoto bruto e material fecal. De acordo com os resultados, a escolha do meio de cultura depende do nível esperado de contaminação bacteriana da amostra, para amostras com nível de contaminação baixa a utilização dos meios SAA, mA, ADA, Ágar PADE é recomendado, contrapondo com amostras com elevado nível de contaminação, que devem ser analisadas através de um meio mais seletivo como Ágar MIX.

CHAO et al. (2003) analisaram a clássica técnica da membrana filtrante e o método Colilert para enumeração de indicadores de poluição fecal em águas subterrâneas, de rios e de nascentes. Pesquisaram diversos microrganismos e entre eles *A. hydrophila*. Em média os resultados mostraram que amostras de água avaliadas com o método Colilert tinham igual ou maior contagem de coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, em comparação com o método da membrana filtrante. E o número de *A. hydrophila* encontrado foi menor em relação aos outros patógenos.

DJUIKOM et al. (2008) pesquisaram a importância de *A. hydrophila* quando

comparada às bactérias do grupo coliformes na avaliação da qualidade microbiológica da água. A técnica da membrana filtrante e meios seletivos (ADA) foram utilizados para o isolamento e enumeração dos microrganismos. As amostras eram de diversos pontos da bacia do rio Mfoundi, África. Os resultados indicaram prevalência de *A. hydrophila* em relação aos coliformes, sugerindo que a água do rio e seus efluentes poderiam ser classificados como hipereutrófico, com base na densidade de *Aeromonas*. Os autores sugeriram que *A. hydrophila* poderia ser usada como indicador da qualidade de água em ambientes altamente poluídos.

Com base na pesquisa bibliográfica realizada em diferentes fontes científicas (pubmed e scielo) para o presente estudo, observamos a falta de estudos científicos com objetivo de pesquisar *A. hydrophila* em amostras de esgoto e lodo tratado para reúso, por meio da técnica de membrana filtrante e meio de cultura seletivo associados ao uso de técnicas moleculares.

1.4.2 Métodos moleculares

A taxonomia complexa do gênero *Aeromonas* torna difícil sua identificação quando são utilizados métodos convencionais como teste bioquímicos, tornando-se necessária a padronização de técnicas que consigam isolar e identificar microrganismos deste grupo.

O recente estudo de LEE et al., (2008) mostrou a eficácia do método de microarray em um estudo paralelo, onde os genes de patógenos e células de *E. coli* foram enumeradas utilizando a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e a técnica de membrana filtrante, respectivamente. A técnica do microarray e qPCR detectaram várias espécies de patógenos entre elas *A. hydrophila*, em águas residuárias de

diferentes fases do processo de desinfecção e diferentes métodos de desinfecção. Os resultados do microarray corresponderam aos da qPCR em todas as amostras, apresentando uma análise detalhada da qualidade das águas residuárias. No entanto a qPCR apresentou dificuldades em diferenciar alvos viáveis de não viáveis quando comparada com a técnica de membrana filtrante.

1.5 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA

Antimicrobianos são produtos elaborados capazes de inibir parcial ou totalmente a multiplicação e crescimento de microrganismos. Estas substâncias são classificadas como antibióticos (substâncias químicas produzidas por microrganismos) e como quimioterápicos (substâncias sintetizadas ou produtos microbianos modificados estruturalmente em laboratório). O uso dessas substâncias químicas revolucionou a abordagem das infecções e o seu sucesso gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, a prescrição nem sempre criteriosa ou racional desses antimicrobianos, rapidamente gerou dificuldades para seu uso, devido à progressiva resistência bacteriana a essas drogas (MONTELLI e SADATSUNE, 2001).

O uso indiscriminado de antibióticos no campo da médico e ambiental é uma prática que contribui para a seleção e disseminação da resistência em microrganismos, com isso, nas últimas décadas, a emergência da resistência entre bactérias patogênicas em ambientes clínicos se tornou um grande problema no mundo todo (FRENCH, 2005; HENRIQUES et al., 2006).

Dentre os diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos estão: mutação cromossômica, expressão de resistência cromossômica latente, ou

aquisição de novo material genético através da incorporação de DNA (transformação), por meio de bacteriófagos (transdução) e por conjugação plasmidial. A informação codificada neste material genético permite que a bactéria desenvolva resistência por meio de três mecanismos principais: a) produção de uma enzima que inativa ou destrói o antibiótico; b) alteração do sítio alvo do antibiótico impedindo a ação da droga; ou c) a prevenção do acesso do antibiótico ao sítio alvo (SHLAES et al., 1997).

Os genes associados à resistência bacteriana podem estar localizados no cromossomo, ou em elementos móveis como plasmídeos, facilitando assim a disseminação dos genes. A rápida emergência da resistência bacteriana é devido à disseminação de genes por transferência horizontal mediada por plasmídeos; transposons, porções de DNA que se movem pelo genoma, e integrons, que capturam e integram genes contidos em cassetes (HENRIQUES et al., 2006; DROPA, 2006).

A presença de antibióticos e outros poluentes no ambiente contribuem para a permanência e disseminação de genes relacionados à resistência bacteriana (KRUSE e SORUM, 1994; GOÑI-URRIZA et al., 2005; HUDDLESTON et al., 2006), e o fato de determinantes genéticos terem sido encontrados em organismos de comunidades de ambientes naturais aumenta a preocupação sobre o risco que estes reservatórios de resistência podem constituir para a saúde humana e ecológica (CHEE-SANFORD et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003; HENRIQUES et al., 2006b).

1.5.1 Antibióticos β -lactâmicos

Por ser o maior grupo de antimicrobianos com ação geralmente bactericida e com baixa toxicidade, a classe de antibióticos β -lactâmicos é a mais utilizada nos casos de doenças infecciosas em humanos. Esses antibióticos agem como inibidores da síntese da parede celular bacteriana, estrutura vital para as bactérias e inexistente nas células humanas, o que os torna o foco de atenção para o desenvolvimento de novas drogas. Estes compostos são formados por um anel β -lactâmico central, o qual é responsável pela sua ação na parede celular bacteriana, por meio de sua ligação às enzimas envolvidas na síntese da parede celular (DROPA, 2006).

Primeiramente os β -lactâmicos são incorporados na célula bacteriana e inibem a ação da enzima transpeptidase, responsável por complementar a parede celular. Em seguida, eles se ligam às proteínas receptoras de penicilina (PBP – *Penicilin Binding Proteins*), as quais normalmente suprimem as hidrolases da parede celular, liberando estas hidrolases que por sua vez destroem a parede celular bacteriana (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003).

Existem diversos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos desenvolvidos pelas bactérias, e apesar da produção de β -lactamase ser o mecanismo mais importante, existem outros como:

a) alteração na permeabilidade da membrana em bacilos Gram-negativos, dificultando a penetração de substâncias hidrofílicas como os antibióticos β -lactâmicos;

b) modificação no sítio ativo que implica na perda de afinidade dos β -

lactâmicos pelas PBPs, diminuindo sua atividade;

c) expressão de bombas de eliminação ativa que consiste num mecanismo de expulsão, a qual depende de bombas de efluxo, que bombeiam o antibiótico para o exterior da célula bacteriana (MARÍN e GUDIOL, 2003; HENRIQUES et al., 2006).

1.5.2 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas cuja função é clivar o anel β -lactâmico, hidrolisar o antibiótico e impedir que o mesmo se ligue efetivamente às PBPs (STURENBURG e MACK, 2003).

A síntese destas enzimas pode ser cromossômica (constitutiva) ou mediada por plasmídeos (indutiva). A produção de β -lactamases pode ser induzida tanto pela presença de β -lactâmicos como por precursores da parede celular no meio extracelular (KONEMAN et al., 2001; SAMAHA-KFOURY e ARAJ, 2003).

As enzimas de origem cromossômica são universais em algumas espécies bacterianas, enquanto que, aquelas de origem plasmidial são variáveis, permitindo que esses elementos sejam transferidos entre espécies. A mobilidade genética pode ser ampliada por meio de transposons, os quais transportam os genes das β -lactamases dos plasmídeos até os cromossomos. Esta mobilidade é importante, pois permite que os genes resistentes se disseminem através das diversas comunidades bacterianas (WILLIAMS, 1999; BABIC et al., 2006).

A classificação das β -lactamases é feita de acordo com dois esquemas gerais (Quadro 3). O primeiro é o esquema de classificação molecular de Ambler (1995),

baseado nas sequências de aminoácidos e na homologia das proteínas, divide as enzimas em quatro classes A, B, C e D. Já o segundo esquema, proposto por Bush e Jacoby (1995) foi baseado nas propriedades bioquímicas, na estrutura molecular e na sequência nucleotídica das enzimas, separando-as em grupos funcionais (perfil de substrato e inibidor) (BUSH e JACOBY, 2010).

Quadro 3 - Esquema de classificação de β -lactamases, ampliado de Bush et al. (1995).

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe Molecular	Antibióticos	Inibição por AC	Inibição por EDTA	Características	Enzimas Representativas
1	1	C	Cefalosporinas	não	não	Melhor hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilina. Hidrolisa Cefamicina.	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^C	C	Cefalosporinas	não	não	Hidrólise de Cefotaxima aumenta e outros oximino-beta-lactâmicos	GC1, CMY-37
2 ^a	2 ^a	A	Penicilinas	sim	não	Melhor hidrólise de benzilpenicilinas do que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas 3 ^a geração	sim	não	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporina de espectro estendido e monobactâmicos	sim	não	Hidrólise de oximino-beta-lactâmicos aumentada (Cefotaxima, Cefotaxidima, Ceftriaxoma, Cefepime, Aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	não	não	Resistência a ácido clavulânico, Sulbactam e Tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporina de espectro estendido e monobactâmicos	não	não	Hidrólise de oximino-beta-lactâmicos aumentada combinada com resistência a ácido clavulânico, sulbactam e Tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbanicilina	sim	não	Hidrólise de Carbanicilina aumentada	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbanicilina, Cefepime	sim	não	Hidrólise de Carbanicilina, Cefepime e Cefpirona aumentada	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	v ^d	não	Hidrólise de Cloxacilina ou Oxacilina aumentada	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro estendido	v	não	Hidrólise de Cloxacilina ou Oxacilina e oximino-beta-lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenêmicoss	v	não	Hidrólise de Cloxacilina ou Oxacilina e carbapenêmicoss	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas	sim	não	Hidrólise de	CepA

			de espectro estendido			cefalosporinas. Inibidas por ácido clavulânico, mas não por Aztreonam	
2f	2f	A	Carbapenêmic s	v	sim	Hidrólise de carbapenênicos, oximino-beta-lactâmicos, cefamicinas aumentada	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	3	B (subclasse B1) (subclasse B3)	Carbapenêmic s	não	sim	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenênicos mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3B	3	B (subclasse B2)	Carbapenêmic s	não	sim	Hidrólise preferencial de carbapenênicos	CphA, Sfh-1
NI	4	desconhecid o					

^aAC, Ácido clavulânico; ^bEDTA, ácido etilenodiaminotetracético; ^cNI, não incluso;
^dv, variável. **Fonte:** BUSH e JACOBY (2010).

1.5.3 ESBLs (β-lactamases de Espectro Estendido)

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são definidas como enzimas da classe molecular A ou D, segundo a classificação de Ambler, ou das classes 2be ou 2d, segundo a classificação de Bush e Jacoby (1995). São capazes de hidrolisar penicilinas, primeira-, segunda- e terceira-geração de cefalosporinas e aztreonam, mas não hidrolisam cefamicinas nem carbapenens (SHANMUGANATHAN et al., 2004; TURNER, 2005; BABIC et al., 2006; POIREL et al., 2008).

A complexa genética das bactérias e a produção de outras β-lactamases (até oito β-lactamases diferentes) fortalecem a eficácia da ação inibidora das β-lactamases (BABIC et al., 2006).

As enzimas ESBL são agrupadas e denominadas de acordo com sua similaridade com enzimas precursoras e ou/ com grupos já conhecidos, elas contêm uma série de substituições de aminoácidos que resultam na expansão do sítio ativo (DROPA, 2006; BABIC et al., 2006).

A maioria dessas enzimas deriva das enzimas TEM, SHV e CTX-M (BUSH e JACOBY, 2010). Nos últimos anos muitos antibióticos β -lactâmicos foram desenvolvidos para serem resistentes as enzimas β -lactamases, no entanto isso resultou na associação desses agentes com a emergência de cepas produtoras de enzimas SHV-2 e TEM-2, que surgiram a partir de mutações e conferiram às bactérias resistência aos β -lactâmicos, posteriormente dando origem às ESBLs (SHAH et al., 2004; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2004; DROPA, 2006).

No início de 1960, foi descrita a primeira β -lactamase mediada por plasmídeo, denominada TEM-1. Uma enzima comumente encontrada em bactérias Gram-negativas, que confere 90% de resistência à ampicilina em *E. coli* (LIVERMORE, 1995; BRADFORD, 2001). Esta enzima também confere resistência à penicilina em outras espécies bacterianas (SHAH et al., 2004).

A β -lactamase TEM-1 está localizada no transposon Tn3, que é pouco seletivo, o que permite uma série de transposições e rearranjos envolvendo seu gene codificador *bla*_{TEM-1} (DROPA, 2006). Sendo a TEM-2 a primeira derivação da TEM-1, essa enzima teve a substituição de um aminoácido da β -lactamase original (BRADFORD, 2001).

Até agora mais de 150 variantes da β -lactamases TEM foram identificadas, muitas delas exibindo um fenótipo típico de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (POIREL et al., 2008).

No Brasil, a presença do gene *bla*_{TEM-116} foi detectada em *A. hydrophila* provenientes de água superficial (BALSALOBRE et al., 2010) e em *Klebsiella pneumoniae* provenientes de amostras clínicas (DROPA et al., 2010).

Existem outros tipos de ESBL importantes como a SHV, TEM e CTX-M são: OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO, GES E BES (STÜRENBURG e MACK, 2003; SHAH et al., 2004; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2004; DROPA, 2006; PHILIPPON e ARLET, 2006; POIREL et al., 2008).

1.5.4 MBL (Metallo- β -lactamases)

As MBLs são betalactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros e hidrolisam todos os betalactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactâmicos, aztreonam (BUSH,1995). Essas enzimas caracterizam-se por utilizarem o zinco ao invés da serina em seu sítio ativo, possibilitando assim a capacidade de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenens, como imipenem e meropenem (HORSFALL et al., 2007; QUEENAN e BUSH, 2007).

Elas ocorrem naturalmente em diversas bactérias Gram-negativas como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella gormanii* e outras (NORDMANN e POIREL, 2002).

Este grupo diverso de β -lactamases é ativado contra as oximino-cefalosporinas, as cefamicinas e as carbapenens (NORDMANN e POIREL, 2002; CORNAGLIA et al., 2007). Além disso, essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e resistentes ao ácido clavulânico (NORDMANN e POIREL, 2002; MENDES et al., 2006).

Atualmente são conhecidos cinco grupos de enzimas MBLs capazes de hidrolisar carbapenens, sendo eles IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase),

SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase) e a mais recente SIM (Seul imipenemase) (MENDES et al., 2006).

A enzima CphA pertencente também a família de metalo- β -lactamases faz parte da subclasse B2, possui um perfil limitado de substrato, hidrolisa quase que exclusivamente carbapenens, apresenta pouca atividade contra penicilinas e cefalosporinas, e é uma das carbapenamases mais ativas conhecidas. Ela é produzida por diversas espécies do gênero *Aeromonas* e é ativada somente pela forma monozinco (ROSSOLINI et al., 1995; GARAU et al., 2005).

No estudo realizado por ROSSOLINI et al. (1995) foi observado a prevalência do genes *cphA* e a produção de carbapenamases em várias cepas de *Aeromonas* pertencentes a seis espécies reconhecidas de interesse clínico. O resultado mostrou que a produção da enzima é restrita a algumas espécies do gênero e em todos os testes a atividade da enzima foi inibida por EDTA.

Semelhante a outros tipos de β -lactamases a produção de metalo- β -lactamase é normalmente regulada nas cepas do gênero *Aeromonas*. Assim, a enzima é produzida em níveis baixos na ausência de indutores convenientes, enquanto que a produção aumenta consideravelmente na presença destes inibidores β -lactâmicos como penicilina ou imipenem (TALAVERA et al., 2006).

1.5.5 AmpC β -lactamases

O tipo de β -lactamase AmpC, de acordo com a classificação de Ambler faz parte da classe C e de acordo com Bush et al. (1995) pertence ao Grupo 1, ocorre principalmente no cromossomo de certas bactérias como *Citrobacter freundii*,

Enterobacter, *Morganella morganii* e *Aeromonas* (RUPPÉ et al., 2006; BABIC et al., 2006).

Bactérias que possuem AmpC β -lactamases ou cefalosporinases, são pouco inibidas pelo ácido clavulânico e são clinicamente importantes porque conferem resistência a uma grande variedade de β -lactâmicos como ceftiofina, cefotetan, cefalotina, cefazolina, cefalexina, terceira geração de cefalosporinas, penicilinas, inibidores de β -lactamases e aztreonam (COUDRON et al., 2000). Não conferem resistência a cefepime, cefpiroma e carbapenems (PÉREZ-PÉREZ e HANSON, 2002).

Bacilos Gram-negativos produtores de AmpC e clinicamente importantes, têm a produção de enzima normalmente reprimida. A repressão e ativação estão ligadas ao processo de síntese de parede e situação de stress para a bactéria (BABIC et al., 2006).

Em *Aeromonas*, uma penicilinase, uma cefalosporinase e uma MBL, são coordenadamente reguladas possuindo um fator comum na indução do mecanismo. Estudos recentes indicam que este mecanismo de indução envolve um sistema de dois componentes regulatórios dependentes da fosforilação, o qual determina um novo mecanismo para expressão de β -lactamases (AVISON et al., 2004; BABIC et al., 2006).

Os genes responsáveis pela produção de enzimas AmpC que conferem resistência em *Aeromonas hydrophila* são cromossomicamente codificados e denominados *ampH* (classe D), *cepH* (classe C) e *imiH* (classe B) (AVISON et al., 2004).

Embora as cefalosporinases sejam denominadas cromossômicas, é crescente o número de relatos de enzimas AmpC associadas a plasmídeos (REISBIG et al., 2004). Essas enzimas já foram relatadas na África, Ásia, Europa e América (HOPKINS et al., 2006).

As AmpCs plasmidiais são mais comuns em espécies que não possuem AmpCs cromossômicas, e os principais grupos descritos são CMY (50 variantes), MIR (5), MOX (8), LAT (1), FOX (7), DHA (2), ACT (8), ACC (4) e CFE (1) (JACOBY, 2009; BUSH e JACOBY, 2003).

A AmpC plasmidial mais comum em todo o mundo, e que foi recentemente descrita em *E.coli* no Brasil é chamada CMY-2, esta é derivada da enzima CMY-1 a qual possui ação sobre as cefalosporinas de segunda e terceira geração, incluindo ceftazidima e aztreonam (TAVARES, 2001; JACOBY, 2009; PAVEZ et al., 2008). As enzimas do grupo CMY estão disseminadas na Ásia e Europa. Existem alguns relatos de detecção de AmpCs plasmidiais na América Latina, mas estas enzimas não estão amplamente distribuídas em nossa região (GONZALEZ-LEIZA et al., 1994; CANTARELLI et al., 2007; RAPOPORT et al., 2008; JACOBY, 2009).

1.6 Resistência a antimicrobianos no gênero *Aeromonas*

Organismos do gênero *Aeromonas* podem apresentar resistência a antibióticos por carregarem intrinsecamente genes de resistência e estarem sujeitos a adquirir outros marcadores de resistência advindos de organismos carreadores desses genes (TALAVERA et al., 2006).

Muitas espécies móveis de *Aeromonas* são geralmente resistentes à penicilina,

ampicilina, carbenicilina e ticarcilina, mas continuam sendo suscetíveis à segunda e terceira geração de cefalosporinas, aminoglicosídeos, carbapenems, cloranfenicóis, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol e quinolonas (JANDA e ABBOTT, 1998b), fator normalmente relacionado com a ocorrência natural de fenótipos produtores de beta-lactamases (SINHA et al., 2004).

A prevalência do gene *cphA* ou genes relacionados, e a produção de carbapenemases já foi avaliada em diversas cepas de *Aeromonas* de interesse clínico. Os resultados demonstraram que as cepas de *A. caviae*, *A. trota* e *A. schubertii* apresentaram genes homólogos ao *cphA*, enquanto que *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *veronii* e *A. veronii* bv. *sobria* apresentaram os genes não homólogos. A transferência horizontal do gene *cphA* para espécies que aparentemente não o carregam parece possível, já que seqüências homólogas foram encontradas em outras cepas. A produção de carbapenemases é restrita às cepas que carregam o gene *chpA* ou seqüências relacionadas, embora nem sempre a presença do gene indique a expressão da atividade enzimática (ROSSOLINI et al., 1995).

KO et al. (2001) investigaram a atividade da cefotaxima e minociclina contra *Aeromonas hydrophila*. A cefotaxima e a minociclina causaram um efeito inibitório no tratamento de camundongos infectados, os quais foram tratados com ambas as drogas (91%), com cefotaxima isolada (9%) e com minociclina isolada (44%), sugerindo que ambas as drogas podem atuar em sinergismo contra *A. hydrophila*.

VIVEKANANDHAN et al. (2002) isolaram um total de 319 cepas de *Aeromonas* de 536 amostras de peixe e 278 de camarão, no sul da Índia. Todas as cepas foram testadas para resistência a 15 antibióticos e 100% das cepas foram

resistentes à meticilina e rifampicina, seguido por bacitracina e novobiocina (99%). Apenas 3% das cepas foram resistentes a cloranfenicol. Foi observada resistência múltipla a antibióticos em cepas de *A. hydrophila*.

No estudo de FOSSE et al. (2004) relatou-se a possível transferência, *in vivo*, do gene *bla*_{TEM-24} de *Enterobacter aerogenes* para *A. hydrophila*. Também foi observada a ocorrência de uma cepa de *A. hydrophila* selvagem produzindo simultaneamente β -lactamases de classe A, B, C e D.

HENRIQUES et al. (2006) pesquisaram a ocorrência e diversidade de integrons e genes de β -lactamases resistentes à ampicilina em bactérias Gram-negativas, isoladas de águas estuarinas. As análises da PCR referentes aos testes de detecção de genes codificadores de β -lactamases resultaram em 77,8% em *Enterobacteriaceae* e 10,5% em *Aeromonas*, sendo o gene *bla*_{TEM} o mais encontrado seguido por *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-B}, *bla*_{CphA/IMIS} e *bla*_{CARB}. O gene *intI1* foi presente em 29,6% das *Enterobacteriaceae* e em 21% das *Aeromonas* isoladas.

SCOARIS et al. (2008) determinaram as possíveis diferenças entre os isolados de água de torneira, de água mineral e poço artesiano, além da susceptibilidade a antibióticos, habilidade para produzir fosfolipases e DNase. Os resultados apresentaram 5 cepas de *A. jandaei*, 9 *Aeromonas* sp. e 4 *A. hydrophila* multiresistentes. O antibiótico mais ativo foi ciprofloxacina (suscetibilidade de 100% dos isolados), contrapondo com a ampicilina que foi menos ativa apresentando resistência em 92% dos isolados.

BALSALOBRE et al. (2009) determinaram a prevalência e a expressão de genes codificadores de metallo- β -lactamases (MBL), em espécies de *Aeromonas* provenientes de ambientes aquáticos. Um total de 87 cepas, sendo 41 *A.*

hydrophila e 46 *A. jandaei*, foram testadas por meio de disco combinado e inibidores. A análise da PCR mostrou que o gene *cphA* foi encontrado em 97,6% e 100% dos isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, respectivamente.

MOURA (2010) analisou o perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de resistência em 24 isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais coletadas no período de 1995 a 2000. Todos os isolados foram produtores de enzima MBL (Metallo- β -lactamase) e AmpC. Nenhuma cepa apresentou produção de ESBL. Os resultados da PCR confirmaram a presença dos genes *bla*_{MOX}, *bla*_{CHPA}, *bla*_{TEM} e *cepH*.

1.7 FATORES DE VIRULÊNCIA E SEU PAPEL NA PATOGENICIDADE

A definição de patogenicidade está em constante evolução, e as propostas mais recentes a sugerem simplesmente como sendo a capacidade de um agente microbiano poder causar danos em um hospedeiro (JANDA E ABBOTT, 2010).

A virulência pode ser definida como a habilidade de uma cepa provocar a doença em um ponto final específico. Para bactérias isso pode ser medido de várias formas, tais como estudos de letalidade (dose letal 50% (LD%)), força de patogenicidade (grau de invasividade, ou de produção de toxinas), ou outros atributos (JANDA E ABBOTT, 2010).

Os fatores de virulência são divididos em dois grupos: a) propriedades celulares; que são aderências, mobilidade e capacidade de invadir as células; b) propriedade extracelular, que consiste na secreção de substâncias com atividade hemolítica, proteolítica, endotóxica, enterotóxica e citotóxica, as quais são capazes

de provocar várias alterações bioquímicas e, conseqüentemente, distúrbios no hospedeiro (IMAMURA et al., 2006; COSTA e JUNIOR, 2007; COUTO et al., 2007).

Indivíduos do gênero *Aeromonas* apresentam fatores de virulência como enterotoxinas, hemolisinas, proteases, lipases, adesinas, hidrolases, proteínas de membrana externa, camada S, flagelo e pili, os quais podem estar envolvidos na patogênese de animais (KÜHN et al., 1997). Diversos fatores potenciais de virulência ou atributos patogênicos têm sido demonstrados em isolados de *Aeromonas* de amostras ambientais e clínicas (CHOPRA et al., 1996; FERGUSON, 1997).

1.7.1 Virulência

Espécies do gênero *Aeromonas* apresentam virulência multifatorial, o que não está completamente esclarecido. Dentre os diversos mecanismos de virulência descritos são encontradas as enterotoxinas, proteases, hemolisinas, lipases, adesinas, hidrolases, camada S, proteínas de membrana externa, pili e flagelo polar, sendo que muitos destes fatores foram identificados em cepas isoladas de água (KÜHN et al., 1997; SCHUBERT, 2000; SOLER et al., 2002; KHAJANCHI et al., 2010).

As enterotoxinas Act, Alt e Ast (CHOPRA et al., 1996; SHA et al., 2002), elastase (CASCÓN et al., 2000), flagelo polar (RABAAN et al., 2001) e flagelo lateral (GAVÍN et al., 2002), por meio da técnica de “*knockout*” de genes, mostraram estar diretamente envolvidos na patogênese de modelos animais e linhagens celulares.

A capacidade da bactéria invadir células hospedeiras, disseminar para qualquer órgão através do sangue e produzir vários fatores de virulência são elementos que contribuem para a patogênese da doença causada por *Aeromonas* (CHOPRA e HOUSTON, 1999). Embora a virulência dessas bactérias esteja associada a múltiplos fatores, algumas delas sintetizam mais fatores de virulência e com mais frequência do que outras (KOZINSKA, 2007).

1.7.2 Toxinas

Toxinas com atividades hemolíticas, citotóxicas e enterotóxicas foram descritas em diferentes espécies de *Aeromonas* (NAMDARI e BOTTONE, 1990; CHOPRA e HOUSTON, 1999; WANG et al., 2003).

Aeromonas podem produzir duas categorias de enterotoxinas: a citotônica como a toxina colérica (CT), que não causa a destruição das criptas e microvilos do intestino delgado, mas estimula eventos mediados por ciclina e adenina monofosfato (AMPc), provocando secreção de água e sal pelas células intestinais, e a citotóxica, que resulta em uma ação mais danosa para o epitélio intestinal do hospedeiro (CHOPRA e HOUSTON, 1999; EPPLE et al., 2004; COUTO et al., 2007).

WANG et al. (2003) realizaram um estudo com modelo animal, em teste de alça ligada de ratos, e concluíram que as enterotoxina citotóxica (produzidas pelo gene *act*), citotônica termo-lábil (produzidas pelo gene *alt*) e citotônica termo-estável (produzida pelo gene *ast*), contribuem para gastroenterite causada por *A. hydrophila*.

Entre as diversas toxinas produzidas pelo gênero, o grupo aerolisina-hemolisina, o qual inclui a toxina Act, ainda continua a ser o principal e mais

importante na patogenia desses microrganismos (CHOPRA et al., 1996; XU et al., 1998; ALBERT et al., 2000; SHA et al., 2002; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

1.7.3 Enterotoxinas Citotônicas

As enterotoxinas citotônicas conhecidas como Alt e Ast são formadas por uma única cadeia polipeptídica. A enzima Alt possui 44 kDa, é termo-lábil a 56°C, causa elevação de AMP cíclico (AMPC) e prostaglandina em ovário de hamster Chinês (CHO) e células epiteliais intestinais, resultando numa resposta secretória de fluido em alça ligada de rato. Ast consiste numa enterotoxina de 44 kDa, termo-estável a 56°C, que causa secreção de fluido em intestino de ratos pequenos (CHOPRA et al., 1994; CHOPRA et al., 1996; ALBERT et al., 2000; EPA, 2006).

1.7.4 Grupo *act/ aer/* β -hemolisina

Alguns autores determinam os fatores de virulência Act, aerolisina e β -hemolisina como produtos de um mesmo gene. Outros afirmam que os genes são diferentes e os produtos a partir destes genes também não são os mesmos. Devido à falta de coerência na classificação, neste estudo os fatores de virulência serão classificados dentro de um grupo denominado grupo *act/aer/* β -hemolisina.

Bactérias do gênero *Aeromonas* produzem hemolisinas denominadas aerolisina, enterotoxina citotóxica (Act) e enterotoxina citolítica que produzem uma reação cruzada com a toxina colérica. O gene *aerA* codifica a aerolisina e o gene *act* codifica a enterotoxina citotóxica (EPA, 2006).

Aerolisina e a enterotoxina citotóxica são proteínas de 50 a 52KDa, termolábeis, possuem atividades citotóxicas, enterotóxicas, hemolíticas e letais (ROSE et al., 1989; XU et al., 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999).

Pertencem a uma classe de citotoxinas formadoras de poro, que rompem a membrana celular, causando a lise da célula (CHOPRA et al., 1993; EPA, 2006; VON GRAEVENITZ, 2007). As enterotoxinas são secretadas na forma de um precursor inativo denominado proaerolisina, o qual se torna ativo quando ocorre a clivagem do peptídeo C-terminal (PARKER et al., 1996; NELSON et al., 1997; ABRAMI et al., 1998; SEN e RODGERS, 2004; EPA, 2006).

Existem dois tipos de hemolisinas, a α -hemolisina que é produzida durante a fase estacionária bacteriana, que causa um efeito citotóxico reversível e provoca a lise incompleta dos eritrócitos, e a β -hemolisina que é produzida na fase de crescimento bacteriano, que causa a lise e, conseqüentemente, a destruição completa dos eritrócitos (THELESTAM e LYUNGH, 1981; KIROV, 2000).

Portanto, a principal função da β -hemolisina é causar acúmulo de fluido no intestino e, conseqüentemente, provocar a ativação dos mediadores inflamatórios dos granulócitos favorecendo a indução da apoptose em células hospedeiras (EPPLÉ et al., 2004).

KINGOMBE et al. (1999) alinharam o gene *act* com outros genes de hemolisinas de *A. hydrophila*, inclusive com aerolisinas de *Aeromonas*, e observaram porcentagens de similaridade entre 73,1% e 96,9%.

Estudos indicam que a atividade hemolítica de *A. hydrophila* está relacionada aos genes de β -hemolisina (*hlyA*), aerolisina e enterotoxina citotóxica (WANG et al., 2003), e outras espécies de *Aeromonas* possuem atividade hemolítica pela presença

de genes denominados *hlyA* e *aerA*, sendo possível que a mesma cepa possua mais de um desses genes (HIRONO e AOKI, 1991; HEUZENROEDER et al., 1999; SEN e RODGERS, 2004).

1.7.5 Protease, Lipase e Elastase

Proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, processo chamado de clivagem proteolítica, um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas (HEDSTROM, 2002).

Um exemplo de uma classe das proteases é a serina protease (ASP) uma substância importante para a área clínica, uma exotoxina liberada por algumas espécies de *Aeromonas* que pode estar envolvida no choque séptico. Esta substância é capaz de provocar a coagulação do plasma e a queda da pressão sanguínea do infectado, devido ao vazamento do líquido intravascular (NITTA et al., 2007).

Essa protease ajuda na invasão, quebrando as barreiras do hospedeiro, desativando ou quebrando substâncias importantes para o crescimento bacteriano (STEVERSON, 1988). Um estudo identificou três tipos de proteases em espécies de *Aeromonas*: serina protease termolábil e duas metaloproteases termoestáveis por serem sensíveis e suscetíveis ao EDTA, respectivamente (PEMBERTON et al., 1997).

Outros estudos sugerem que as enzimas proteolíticas excretadas por espécies de *Aeromonas* desempenham um papel importante na invasão e estabelecimento da infecção por superar defesas iniciais do hospedeiro, fornecendo nutrientes para a proliferação das células (LEUNG e STEVENSON, 1988).

Quanto aos genes de lipase (*lip* e *lipH3*), estes codificam enzimas extracelulares semelhantes às esterases. Juntamente com estes, genes codificadores da fosfolipase C (*apl-1*) e fosfolipase A1 (*pla*) foram encontrados em cepas de *A. hydrophila* (ANGUITA et al., 1993; CHUANG et al., 1997). Embora as propriedades físicas destas enzimas, tais como seu tamanho molecular, estabilidade térmica e especificidades de substratos sejam diferentes umas das outras, os genes *lip*, *lipH3*, *apl-1*, e *pla* apresentam semelhanças em suas seqüências de aminoácidos (MERINO et al., 1999).

Elastase é uma enzima da classe das proteases (peptidases), cujo papel em doenças é interromper fortes ligações peptídicas, causar danos ao tecido proteolítico, quebrar citocinas e inibidores da protease alfa, clivar imunoglobulina A e G (IgA, IgG) e unir-se tanto a C3bi, um componente do sistema complemento, como ao CR1, um receptor de neutrófilo para outro complemento, moléculas envolvidas na fagocitose. Sendo assim, a clivagem de IgA e IgG contribui para a diminuição da capacidade de neutrófilos de eliminarem bactérias por fagocitose (HORWITZ et al., 1999).

Geralmente, organismos procariontes e eucariontes sintetizam proteases como precursores inativos denominados preproenzimas, que são ativados somente após a remoção proteolítica de um propeptídeo, o qual é covalentemente anexado ao nitrogênio (N) e/ou Carbono (C) terminal da seqüência de proteases maduras. Um exemplo, é a elastase produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, uma metaloprotease de 33KDa, que é codificada pelo gene *lasB* e sintetizada como uma preproenzima de 53,4KDa, ligada covalentemente a uma peptídeo e propeptídeo aminoterminal de 18KDa (KESSLER et al., 1998).

CASCON et al. (2000) sugeriram que a interrupção do gene *ahpB* (elastase) em *A. hydrophila* resulta em um aumento de 100 vezes no DL50 de *A. hydrophila* em peixes, sugerindo que tanto a elastase, uma zinco metaloprotease, como a protease (AhpB) secretada por *A. hydrophila* com alta atividade elastolítica, sejam importantes fatores de virulência na patogênese de organismos.

1.7.6 Pili e Flagelo

Flagelos são estruturas de origem protéica, e alguns grupos de bactérias podem apresentar tanto um flagelo polar, que oferece mobilidade para natação em meio líquido, como um flagelo lateral, que oferece mobilidade invasiva em matriz sólida e altamente viscosa. Como eles estão associados com adsorção na membrana da célula hospedeira, são relatados como fatores de virulência (GAVIN et al., 2003; AGUILERA-ARREOLA et al., 2007).

A mobilidade dos flagelos também é considerada um fator de virulência para bactérias do gênero *Aeromonas*, pois com a ocorrência de mutação nos genes *fla*, conseqüentemente, há a perda completa de mobilidade e adesão às células HEp-2 humanas (RABAAN et al., 2001).

KIROV et al. (2004) relataram que flagelos laterais podem atuar como adesinas em células do epitélio intestinal humano.

A maioria das espécies de *Aeromonas* e de todas as espécies reconhecidas como patógenos humanos, são movidas por flagelo polar, o qual consiste em duas subunidades: Fla A e Fla B, codificados pelos genes *flaA* e *flaB* (SEN e RODGERS, 2004).

Do mesmo modo que o flagelo, o pili é uma estrutura de origem protéica e sua presença em microrganismos pode ter conseqüências mais danosas, já que essa estrutura está relacionada com movimentação, aderência e colonização nas células hospedeiras (KIROV et al., 2000).

1.7.7 Ocorrência dos fatores de virulência no gênero *Aeromonas*

KUHN et al. (1997) coletaram 220 amostras de água bruta e tratada de 13 sistemas de distribuição de água potável, na Suécia. As cepas características do gênero *Aeromonas* foram identificadas por método bioquímico e de *fingerprinting*, também foi analisado o potencial para produção de hemolisina, citotoxina por meio Ágar-sangue, atividade citotóxica por cultura de células Vero e aderência em células intestinais por cultura de células. No total, 117 amostras de água (53%) continham *Aeromonas*, dentre os isolados (2.117 cepas) a maioria foi identificada como *A. hydrophila*, a produção de hemolisina e citotoxina foi observada em 87% e 54% das amostras, respectivamente, e a adesão foi encontrada em 89% dos isolados que produziram citotoxina.

Em um outro estudo, foram analisadas 350 isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras clínicas, ambientais e de alimentos, das quais 65% apresentaram genes de virulência (KINGOMBE et al., 1999).

ALBERT et al. (2000) estudaram a distribuição dos genes *alt*, *ast*, *act* em 115 cepas de *Aeromonas* isoladas de 1.735 crianças com diarreia, 27 cepas de 830 pacientes do grupo controle e 120 cepas de *Aeromonas* escolhidas ao acaso, provenientes da água de superfície de diferentes pontos de Bangladesh. Os genes foram pesquisados por meio da técnica de hibridização, utilizando sondas de DNA

específicas para os alvos. Das 2.120 amostras ambientais, 600 apresentaram *Aeromonas*, das quais 120 cepas foram selecionadas para pesquisa dos genes de virulência. Quanto à distribuição dos genes nas cepas clínicas, os autores observaram que o gene *alt* e *ast* estavam presentes separadamente em 16% dos isolados, 56% tinham os dois genes e nenhum dos isolados apresentou o gene *act*, exceto um isolado de *A. hydrophila* que possuía os três genes. A distribuição dos genes nas cepas ambientais foi similar às cepas clínicas, exceto por duas cepas de *A. hydrophila* que possuíam os três genes.

ORMEN et al. (2001) pesquisaram a presença de *Aeromonas* em 77 amostras de água na Noruega, provenientes de 33 fontes diferentes. A presença do gene aerolisina foi pesquisada por meio da PCR em 445 isolados dos quais, 79% eram carreadores do gene e destes 83% apresentaram toxicidade quando testados em cultura de células Vero.

Em 2002 o estudo de GONZÁLEZ-SERRANO et al. detectou genes de virulência em *A. hydrophila* (11) e *A. veronii*(3) de amostras de água e de peixe fresco e um isolado de *A. hydrophila* proveniente de paciente com diarreia. A PCR detectou a presença dos genes hemolíticos *aerA* e *hlyA* em 11 e 9 isolados de *A. hydrophila*, respectivamente.

CHACÓN et al. (2003) investigaram a distribuição e atividade fenotípica dos genes de virulência que codificam protease serina, glicerofosfolipídeo-colesterol aciltransferase (GCAT), lipase, aerolisina/ hemolisina e Dnases, de 234 isolados de *Aeromonas*, em que 108 eram amostras clínicas (diarreia, ferida, escarro, abscesso, urina e sangue) e 126 amostras ambientais (peixe, água do mar, água doce e outras fontes). Os genes de virulência foram pesquisados por meio da PCR e testes para

atividades fenotípicas foram realizados. Os resultados mostraram que a atividade β -hemolítica de aerolisina/hemolisina e Dnase foi significativamente mais frequente em amostras clínicas do que em amostras ambientais. Genes de aerolisina/hemolisina e protease serina estavam presentes em todos isolados β -hemolíticos, sendo a protease serina um possível e importante apoio para a ativação destes genes.

Em 2004, SEN e RODGERS analisaram 205 isolados de *Aeromonas* provenientes de água tratada. A PCR foi realizada para detectar a presença dos genes de virulência elastase (*ahyB*), lipase (*pla/lip/lipH3/alp-1*), flagelo A e B (*flaA* e *flaB*) e enterotoxinas Act, Alt e Ast. Os genes de virulência estavam presentes em 88% (*ahyB*), 88% (*lip*), 59% (*fla*), 43% (*alt*), 70% (*act*) e 30% (*ast*) dos isolados testados e somente um desses isolados apresentou todos os genes de virulência, indicando que o gênero *Aeromonas* encontrado em água potável pode carrear uma série de genes relacionados à virulência.

AWAN et al. (2006) isolaram 30 cepas de *Aeromonas* ambientais e de alimentos, e nestas pesquisaram os potenciais determinantes de virulência como produção de citotoxina, toxina citotônica e hemolisina. Os testes para virulência foram realizados a partir da cultura de células Vero. Os resultados mostraram que 6 de 7 cepas de *A. hydrophila* produziram citotoxinas. A hemolisina era produzida por todas as cepas de *A. hydrophila* e *A. veronii* bv sobria, e 50% das cepas de *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. trota* também produziam citotoxina e hemolisina.

No estudo de SEN e LYE (2007) foram analisados oito fatores de virulência [elastase, lipase, flagelo polar (*flaA*, *flaB*, *flaG*), flagelo lateral (*lafA*) e enterotoxina (*alt*, *act*, *ast*), em espécies de *Aeromonas* isoladas de água, por meio da PCR e em

seguida foi realizada inoculação em camundongos imunossuprimidos. Espécies de *Aeromonas* apresentaram diferentes combinações entre os fatores de virulência, mas a presença de alguns dos genes codificadores do flagelo (*flaA*, *flaB* ou *lafA*) levaram à capacidade de causar danos aos camundongos imunossuprimidos. Portanto, os isolados provenientes de água indicam que a mesma possui potencial patogênico em hospedeiro imunossuprimido.

SCOARIS et al. (2008) investigaram a produção de diferentes fatores de virulência como hemolisina, Dnase, fosfolipase, citotoxina, hidrofobicidade e capacidade de aderir em células do epitélio. Dos 23 isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras de água, a maioria apresentou atividade hemolítica contra eritrócitos de ovelha, embora somente 7 cepas foram positivas para DNase, 4 para produção de fosfolipase e 14 para atividade citotóxica.

PABLOS et al. (2009) pesquisaram a presença de genes de virulência (*aerA*, *hlyA*, *alt*, *ast*, *laf*, *stx₁*, *stx₂*) e a associação entre esses fatores presentes em bactérias do gênero *Aeromonas*. De 132 amostras de água de consumo humano provenientes de estação de tratamento e poço artesiano, foram detectados 35 isolados de *Aeromonas*. Os genes *alt* e *laf* estavam presentes em todos os isolados, o gene *aerA* foi detectado em seis isolados, enquanto que os genes *hlyA*, *ast*, *stx₁*, *stx₂* estavam ausentes. A associação entre os genes de virulência [*aerA*⁻/*hlyA*⁻/*alt*⁺/*ast*⁻/*laf*⁺/*stxI*⁻/*stx2*⁻] foi de 82,9% e [*aerA*⁺/*hlyA*⁻/*alt*⁺/*ast*⁻/*laf*⁺/*stxI*⁻/*stx2*⁻] foi de 17,1%. Os resultados evidenciam que isolados de *Aeromonas* que contém dois ou mais genes de virulência associados, têm o potencial de causar doença.

BALSALOBRE (2009) selecionou 100 isolados provenientes de ambiente aquático, destas 46 eram *A. jandaei* e 41 *A. hydrophila*. Pesquisou por meio da PCR

genes de virulência e observou a ocorrência dos genes *act*, *alt*, *ast* respectivamente em 70% (29), 97% (40) e 26% (11) em *A. hydrophila* e 4% (2), 0% (0) e 32% (15) em *A. jandaei*.

MOURA (2010) pesquisou por meio da PCR genes de virulência em *Aeromonas* sp. provenientes de amostras ambientais coletadas no período de 1995 a 2000. Os resultados da PCR demonstraram pelo menos um gene de virulência em 41% dos isolados.

KHAJANCHI et al. (2010) analisaram a presença de 11 genes de virulência e a relação clonal de um grande número de isolados clínicos e ambientais de diferentes espécies de *Aeromonas*, isoladas de vários lugares nos Estados Unidos e outras partes do mundo. Os resultados mostraram que *A. hydrophila* e grupo *A. veronii* – *A. sobria* apresentaram mais genes de virulência e maior atividade citotóxica e hemolítica do que membros do grupo *A. caviae* - *A. media*.

Estes dados sugerem que há uma transmissão da água para humanos e que a exposição a *Aeromonas* na água pode levar à gastroenterite e outras infecções em seres humanos. Embora existam poucos estudos que relacionem a biologia molecular com a pesquisa de genes de resistência e virulência em bactérias do gênero *Aeromonas*, com base nos estudos descritos acima, é possível sugerir que este gênero tem potencial de produzir e adquirir resistência a antibióticos de diversas classes incluindo β -lactâmicos, assim como genes de virulência e produção de toxinas, fatores que tornam o gênero uma preocupação para a Saúde Pública e alertam para outros estudos de surtos e infecções hospitalares.

2. OBJETIVO GERAL

Isolar, quantificar e identificar fenotipicamente e genotipicamente a espécie *Aeromonas hydrophila* presente em esgoto e lodo tratados, e pesquisar os genes de virulência e resistência associados à espécie.

2.1 Objetivos Específicos

1. Utilizar a técnica de membrana filtrante com meio seletivo diferencial para o isolamento e quantificação de *A. hydrophila*.
2. Identificar os isolados por meio de testes fenotípicos e realizar a identificação genotípica utilizando iniciadores específicos, por meio da PCR e a partir desta confirmação, aplicar as metodologias a seguir somente em isolados de *A. hydrophila*.
3. Pesquisar genes de virulência *act*, *ast*, *alt*, *fla*, *lip* e *ela*.
4. Caracterizar o perfil fenotípico de sensibilidade aos antibióticos e produção de enzimas β -lactamases.
5. Pesquisar genes de resistência *bla*_{CphA}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{MOX}, *bla*_{FOX}.
6. Com base nos resultados obtidos, correlacionar a importância da espécie *A. hydrophila* presente em esgoto e lodo tratado aos fatores de resistência e virulência relacionados à patogenia desses microrganismos, e demonstrar sua importância para a saúde pública e para o saneamento ambiental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 15 amostras, seis de esgoto tratado e nove de lodo tratado, coletadas no período de março a dezembro de 2009 em Estações de Tratamentos de Esgoto (ETEs) do Estado de São Paulo, obtidas em parceria com a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo- Secretaria de Estado do Meio Ambiente/SP), dentro do projeto “Detecção e genotipagem de *Aeromonas*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais”.

3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *A. hydrophila*

As amostras de esgoto e lodo foram coletadas pela CETESB e fornecidas em frascos plásticos estéreis de 1L (esgoto tratado) e 500g (lodo tratado), devidamente identificados com etiquetas que informavam o local e data da coleta. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Prática de Saúde Pública onde foram mantidas sob refrigeração entre 1 e 5°C até o momento da análise, por no máximo 30 horas após a coleta.

As análises foram iniciadas pelo processo de pesagem do lodo (10g) ou pipetagem do esgoto (10mL) em 90mL de salina. Em seguida, foi realizado o processo de diluição seriada, filtração, incubação, enumeração, triagem das colônias, identificação fenotípicas das colônias e armazenamento das cepas (Figura 2).

3.1.1 Enumeração por Filtração em Membrana Filtrante

Todos os frascos de diluição foram filtrados através de membranas com 0,45µm de porosidade e 47mm de diâmetro em sistema de filtração a vácuo esterilizado. Cada membrana foi transferida para uma placa de petri contendo o meio de cultura seletivo para *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas* Agar Base (Rayan, 1985) contendo ampicilina (1g/ml) e incubada por 24 horas a 37°C (Figura 2). As colônias com característica típicas de *A. hydrophila* (verde escuro) foram selecionadas na última diluição contendo colônias bem distribuídas e separadas, de forma que permitissem a contagem e a seleção de colônias isoladas. Esta técnica foi realizada em triplicata.

3.1.2 Leitura das placas e Isolamento

As colônias sugestivas de *Aeromonas hydrophila* (colônias verde escuro) foram contadas e selecionadas para triagem em meio Kligler para verificar a fermentação de glicose e produção da enzima citocromo oxidase. Todas as colônias que apresentaram reação positiva para os dois testes foram semeadas em Ágar Amido para visualização das colônias com características típicas do gênero *Aeromonas*: colônias lisas e brilhantes, de borda bem definida, com 2 a 3 milímetros de diâmetro, brancas ou acastanhadas envoltas por halo transparente causado pela hidrólise do amido. As cepas positivas para estes testes foram consideradas *Aeromonas* e os resultados foram expressos em UFC/100mL (Unidades Formadoras de Colônias). Após o reisolamento e identificação das colônias, as cepas foram armazenadas em Ágar Lúria semi-sólido contendo 0,5%

NaCl. Posteriormente, foram semeadas em caldo Lúria 0,5%, incubadas a 37°C por 24hs para o processo de extração de DNA e armazenamento em freezer -80°C.

As colônias sugestivas de *A. hydrophila* foram submetidas a testes moleculares para confirmação da espécie e pesquisa dos genes de virulência e resistência.

Figura 2: Esquema da técnica de membrana filtrante, isolamento e triagem dos isolados.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

A extração por choque-térmico foi realizada para as cepas sugestivas de *Aeromonas hydrophila*, segundo CHAPMAN et al. (2001), a qual permite a obtenção do material genético cromossômico e plasmidial. As cepas reisoladas e armazenadas em Ágar Lúria (0,5% NaCl) foram semeadas em 10 mL de Caldo Lúria (0,5% NaCl) e incubadas a 37°C por 18-24h. Os tubos foram centrifugados a 5000rpm, a 24°C por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento (*pellet*) foi ressuspensão em 1mL de água ultrapura estéril, homogeneizado e transferido para microtubo tipo eppendorf. Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 3min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 200µL de água ultrapura estéril. A suspensão foi colocada em banho-maria a 95°C, por 10 minutos, e em seguida colocada em freezer -20°C, por 30 minutos. Os microtubos foram retirados do freezer e mantidos em repouso em temperatura ambiente até o descongelamento. Foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 10min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf. Os tubos contendo o DNA foram armazenados em freezer a -20°C.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Reação em cadeia pela Polimerase (PCR)

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador Martercyclergradient Eppendorf®. Cada microtubo de reação continha um volume final de 25µL, nos quais havia os seguintes reagentes: 5µL de DNA; tampão 10X; 200uM de

DNTPs; 0,2uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA polimerase. Em todas as reações de PCR utilizamos como controle positivo a cepa-tipo *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) e como controle negativo cepas-tipo de *Aeromonas* disponíveis até o momento da pesquisa e que são pertencentes à coleção de cultura do laboratório de Prática de Saúde Pública.

3.3.1 Confirmação do gênero *Aeromonas* por meio da PCR

A amplificação por PCR foi realizada a partir do DNA extraído pelo método de choque térmico. Para confirmação do gênero *Aeromonas* foram utilizados iniciadores gênero-específicos, ciclos e condições descritos por UEHARA et al. (2008), apresentados no Quadro 4.

3.3.2 Desenho dos iniciadores para identificação da espécie

Os iniciadores desenhados neste estudo foram baseados na região do 16S rRNA de espécies de *Aeromonas* disponíveis no Genbank. Todas as sequências do 16S rRNA disponíveis no Genbank foram alinhadas manualmente no software BioEdit (version 5.0.6) (HALL, 1999) e as pesquisas foram realizadas para os iniciadores a fim de testar a especificidade teórica usando a ferramenta BLAST. Uma vez alinhadas as sequências de todas as espécies do gênero *Aeromonas*, a etapa seguinte foi pesquisar as regiões comuns e conservadas em todas as espécies do gênero. Quando localizada uma sequência comum e conservada entre todas as espécies, contendo entre 20 e 30 pares de bases, essa sequência foi testada no programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>), que tem a função de desenhar iniciadores para a sequência desejada, apresentando dados como:

número de pares de bases, valor de TM (ponto de fusão) e porcentagem de G/C (guanina e citosina) do iniciador desenhado. Depois da seleção dos iniciadores, os mesmos foram sintetizados pela Bioneer Oligo Synthesis Reports (KOREA).

3.3.3 Confirmação da espécie

Para confirmação da espécie *Aeromonas hydrophila* foram utilizados iniciadores específicos, ciclos e condições desenvolvidos neste estudo, os quais estão apresentados no Quadro 4.

3.4 CEPAS TIPO DO GÊNERO *AEROMONAS*

Todas as cepas-tipo disponíveis no Laboratório de Prática de Saúde Pública foram submetidas a testes fenotípicos no meio base seletivo para *A. hydrophila* para caracterização e também foram submetidas às análises de PCR para a confirmação da espécie. As cepas são: *Aer. hydrophila* ATCC 7966, *Aer. allosaccharophila*; *Aer. piscicola* ATCC 24783; *Aer. media* ATCC 9073; *Aer. bivalvium* ATCC 23376; *Aer. encheleia* ATCC 16330; *Aer. jandaei* ATCC 12221; *Aer. popoffi* ATCC 17J41; *Aer. simiae* ATCC 22269; *Aer. trota* ATCC 12123; *Aer. bestiarium* ATCC 13444; *Aer. molluscorum* ATCC 22214; *Aer. aquariorum* ATCC 24688; *Aer. fluvialis* ATCC 24881; *Aer. caviae* ATCC 3755; *Aer. sanarelli* ATCC 24682; *Aer. eucrenophila* ATCC 37741; *Aer. salmonicida* ATCC 3780; *Aer. tawarensis* ATCC 24683; *Aer. schubertii* ATCC 9074; *Aer. tecta* ATCC 24874 e *Aer. culicicola* ATCC 21852, foram obtidas de LMG (BCCM/LMG, UGent, Europe).

Quadro 4- Sequência dos iniciadores (5'-3'), condições dos ciclos, tamanho dos produtos esperados para a identificação dos organismos e referência utilizadas.

	Gene	Sequência de iniciadores	Condições da PCR					Tamanho da banda	Referência	
			DI	NC	D	A	E			EF
Identificação	Aero16S-F	TGTGACGTTACTCGCAGAAGA	95°C	25	95°C	65°C	72°C	72°C	797pb	UEHARA et al. (2008)
	Aero16S-R	AGCTTGCAGCCCTCTGTACG	7 min		1 min	1 min	1 min	5 min		
	AHF	TAATACGTATCAACTGTGACGTTACTC	95°C	30	95°C	68°C	72°C	72°C	553pb	Este estudo
	AHR	CATCTCTGCAGGATTCCAGAC	7 min		1 min	1 min	1 min	5 min		

DI: Temperatura e tempo da denaturação inicial; **NC:** número de ciclos utilizados; **D:** temperatura e tempo de denaturação; **A:** temperatura e tempo de anelamento; **E:** temperatura e tempo de extensão; **EF:** temperatura e tempo de extensão final.

3.5 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

3.5.1 Genes *act*, *alt*, *ast*, *fla*, *lip* e *ela*

Para pesquisa dos genes de virulência foram utilizados iniciadores, ciclos e condições de acordo com BALSALOBRE et al. (2009) e SEN e RODGERS (2004), descritos no Quadro 5.

3.6 PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

3.6.1 Genes *bla*_{CphA}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{MOX}, *bla*_{FOX}

Para pesquisa dos genes de resistência foram utilizados iniciadores, ciclos e condições de acordo com BALSALOBRE et al. (2009); PÉREZ-PERÉZ e HANSON (2002) e CAO et al. (2002), descritos no Quadro 5.

3.7 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

Para visualização dos produtos da PCR, um gel de agarose (Amersham Biosciences) a 1,8%, preparado com tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1x) e corado com brometo de etídio (1µg/ml), foi submetido à eletroforese com a intensidade de corrente elétrica 6V/cm. Em cada poço do gel foram adicionados 5µL das amostras previamente coradas com tampão carregador de amostra (glicerina e azul de bromofenol), e foram utilizados 2µL de marcador de peso molecular de 100pb (MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas). O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302nm, por meio de um transiluminador e as imagens foram capturadas pelo sistema Epi Chemi II Darkroom (UVP) e Software Labworks.

Quadro 5- Sequência dos iniciadores (5'-3'), condições dos ciclos e tamanhos dos produtos esperados na pesquisa dos genes de virulência e resistência.

	Gene	Sequência de iniciadores	Condições de PCR						Tamanho da banda	Referência
			DI	NC	D	A	E	EF		
Virulência	<i>act/aerA/hlyA</i> F	AGAAGGTGACYACCAAGAACA	95°C 5 min	30	95°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	400pb	BALSALOBRE et al. (2009)
	<i>act/aerA/hlyA</i> R	CCACTTCACTTCACCCGGGA							764pb	
	<i>alt</i> F	ATCGGGGTGACCCTCACCTC								
	<i>alt</i> R	GGCAGGAACCTCGTTGACGAAGC								
	<i>ast</i> F	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	95°C 5 min	25	95°C 25 seg	55°C 30 seg	72°C 1 min	72°C 5 min	331pb	SEN e RODGERS (2004)
	<i>ast</i> R	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG								
	<i>Fla</i> F	TCCAACCGTYTGACCTC							608pb	
	<i>Fla</i> R	GMYTGTTGCGRATGGT								
Resistência Carbapenem (MBL)	<i>Lipase (Lip)</i> F	ATCTTCTCCGACTGGTTCCG	95°C 5 min	30	95°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	382pb	BALSALOBRE et al. (2009)
	<i>Lipase</i> R	CCGTGCCAGGACTGGGTCTT								
	<i>Elastase (Ela)</i> F	ACACGGTCAAGGAGATCAAC							513pb	
	<i>Elastase</i> R	CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG								
	<i>bla_{IMP}</i> F	GGAATAGRRTGGCTTAAYT	95°C 10 min	30	95°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	232pb	PÉREZ-PERÉZ e HANSON (2002)
	<i>bla_{IMP}</i> R	GGTTTAAAYAAARCAMCCACC								
Resistência Cefamicinas (AmpC)	<i>bla_{VIM}</i> F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC							590pb	
	<i>bla_{VIM}</i> R	GAGCAAKTCYAGACCGCCC								
	<i>bla_{CphA}</i> F	TCTATTTCGGGGGCCAAGGG	95°C 10 min	30	95°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	230pb	CAO et al. (2002)
	<i>bla_{CphA}</i> R	TCTCGGCCCCAGTCGCTCTTCA								
Resistência Cefalosporina (ESBL)	<i>bla_{MOX}</i> F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT							520pb	
	<i>bla_{MOX}</i> R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC								
	<i>bla_{FOX}</i> F	AACATGGGGTATCAGGGAGATGCAA							190pb	
	<i>bla_{FOX}</i> R	AGCGCGTAACCGGATTGG								
	<i>bla_{TEM}</i> F	TCGGGGAAATGTGCGCG	94°C 2 min	30	94°C 45 seg	52°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	972pb	CAO et al. (2002)
	<i>bla_{TEM}</i> R	TGCTTAATCAGTGAGGCACC								
	<i>bla_{SHV}</i> F	TTATCTCCCTGTTAGGCACC							795pb	
	<i>bla_{SHV}</i> R	GATTTGCTGATTCGCTCGG								
	<i>bla_{CTX-M}</i> F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	94°C 2 min	30	94°C 45 seg	52°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	543pb	CAO et al. (2002)
	<i>bla_{CTX-M}</i> R	CCGCRATATGRTTGGTGGTG								

DI: temperatura e tempo de denaturação inicial; **NC:** número de ciclos utilizados; **D:** temperatura e tempo de denaturação; **A:** temperatura e tempo de anelamento; **E:** temperatura e tempo de extensão; **EF:** temperatura e tempo de extensão final.

3.8 ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

3.8.1 Antibiógrama

O teste de sensibilidade aos antibióticos foi realizado segundo o método de disco-difusão de acordo com o manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2006.

Foram utilizadas placas de ágar Müller-Hinton e 13 antibióticos: Imipenem (10µg), Ertapenem (10µg), Cefotetan (30µg), Cefoxitina (30µg), Cefalotina (30µg), Ceftazidina (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefepime (30µg), Aztreonam (30µg), Ciprofloxacina (05µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg), Sulfametoxazol + trimetoprim (1,25/23,75µg).

Para a preparação do inóculo, o isolado que permanecia armazenado a -70°C em microtubo contendo glicerol 70%, foi semeado em caldo Luria 1% NaCl e em seguida incubado a 37°C por 18 a 24 horas. Deste ponto, a cultura foi semeada em placa de Petri contendo Ágar Amido, os quais foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Após o crescimento, uma colônia isolada foi inoculada em solução salina (2mL) seguindo o padrão de turvação de 0,5 da escala McFarland. Com o auxílio de um swab estéril embebido da solução, o inóculo foi semeado na superfície de uma placa de Ágar Mueller-Hinton. Após a inoculação, os discos de antibióticos selecionados para o estudo foram dispostos na placa, as quais foram incubadas por 24h a 37°C.

Após 24 horas de incubação, a interpretação dos resultados baseou-se na medida dos halos de inibição de crescimento de acordo com o CLSI de 2010 para *Aeromonas hydrophila*. Na ausência de breakpoints para *A. hydrophila*, foi utilizado o CLSI para *Enterobacteriaceae*.

3.9 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS β -LACTAMASES

Os testes para detecção da produção de enzimas foram realizados para todas as cepas que apresentaram tamanho do halo intermediário ou resistente, com base nos valores apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 - Critério de interpretação para teste de disco difusão, determinação da sensibilidade aos antibióticos em isolados de *Aeromonas hydrophila*.

Grupo	Antibiótico	Sensível (halo em mm)	Intermediário (halo em mm)	Resistente (halo em mm)
Cefamicinas	Cefotaxima (30 μ g)	≥ 23	15-22	≤ 14
	Cefotetan (30 μ g)		13-15	12
	Cefoxitina (30 μ g)	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefalotina (30 μ g)		15-17	≤ 14
	Ceftazidima (30 μ g)	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefepime (30 μ g)	≥ 18	15-17	≤ 14
Carbapenems	Imipenem (10 μ g)	≥ 16	14-15	≤ 13
	Ertapenem (10 μ g)	≥ 19	16-18	≤ 15
Monobactâmico	Aztreonam (30 μ g)	≥ 22	16-21	≤ 15
Aminoglicosídeos	Gentamicina (10 μ g)	≥ 15	13-14	≤ 12
Tetraciclina	Tetraciclina (30 μ g)	≥ 19	15-18	≤ 14
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina (5 μ g)	≥ 21	16-20	≤ 15
Inibidor da via do folato	Sulfametoxazol-trimetoprim (10 μ g)	≥ 16	11-15	≤ 10

Fonte: CLSI 2006 e 2009.

3.9.1 Produção de MBL (Metallo- β -lactamase)

A produção de MBL foi avaliada pelo método de discos combinados dispostos em placa contendo Ágar Mueller-Hinton, como descrito por PITOUT et al. (2005). Discos de Imipenem (10 μ g) e Ertapenem (10 μ g), com e sem adição de inibidor (5 μ L de EDTA 0,5M), foram colocados na placa, lado a lado, para o teste da produção de

enzima. Após a incubação de 18 horas, foi realizada a leitura dos halos. O aumento de 7mm ou mais na zona de inibição do disco contendo EDTA em relação ao disco sem o inibidor foi considerado teste positivo para a produção de MBL (ARAKAWA et al. 2000).

3.9.2 Produção de AmpC

A produção de AmpC foi avaliada pelo método de discos combinados, dispostos em placa contendo Ágar Mueller-Hinton. Os discos de antibióticos Cefoxitina (30µg) e Cefotetan (30µg), com e sem adição de inibidor (20µL de ácido fenilborônico (APB)), foram colocados na placa lado a lado para o teste da produção de enzima. Após a incubação de 18 horas, foi realizada a leitura dos halos. O aumento de 5mm ou mais na zona de inibição do disco contendo APB em relação ao disco sem inibidor, foi considerado teste positivo para a produção de AmpC (COUDRON, 2005).

3.9.3 Produção de ESBL (β-lactamase de espectro estendido)

A produção de ESBL foi avaliada pelo método de sinergismo descrito por BRADFORD (2001). O teste foi realizado em Ágar Mueller-Hinton e o método consistiu na combinação de discos dos antibióticos Ceftazidima (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefpodoxima (10µg), Aztreonam (30µg), colocados a 2-3cm centro a centro de um disco contendo Amoxicilina/Ácido Clavulânico (20/10mg). Após a incubação de 18h, foi observada a formação de uma “zona fantasma” entre o halo de inibição de AMC e pelo menos um dos demais discos, o que indica o sinergismo do antimicrobiano pelo clavulanato e teste positivo para produção de ESBL (BRADFORD, 2001). Nos

isolados produtores de AmpC, foram colocados 400µL/ml de cloxacilina no meio Müller-Hinton (WELDHAGEN et al., 2004).

4. RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *A. hydrophila*

4.1.1 Isolamento

No total de 15 amostras analisadas, 60% (9) apresentaram crescimento em meio seletivo para *A. hydrophila*, sendo 4 amostras de esgoto e 5 amostras de lodo (Tabela 1).

Tabela 1- Número de amostras coletadas de esgoto e lodo tratados, provenientes de ETs do estado de São Paulo, que apresentaram ou não crescimento na triagem dos isolados.

Amostra	Tipo de amostra tratada	<i>A. hydrophila</i> que cresceram em meio seletivo	<i>A. hydrophila</i> que não cresceram em meio seletivo
1	Esgoto	x	
2	Lodo	x	
3	Esgoto	x	
4	Esgoto		x
5	Esgoto	x	
6	Esgoto		x
7	Lodo		x
8	Lodo	x	
9	Lodo	x	
10	Lodo	x	
11	Lodo		x
12	Lodo	x	
13	Esgoto	x	
14	Lodo		x
15	Lodo		x

A série de diluições realizadas para as amostra de esgoto e lodo tratado utilizando o meio de cultura *Aeromonas* Agar Base (Ryan, 1985) para isolamento de *Aeromonas hydrophila*, está ilustrada na figura 3.

Figura 3- Placa de Ágar Base com membrana filtrante e colônias sugestivas de *A. hydrophila*, após 24 horas de incubação a 37°C.

4.1.2 Quantificação e Identificação fenotípica

Após 24 horas de incubação a 37°C das placas, foi realizada a contagem das colônias. Quanto à presença de colônias características para *A. hydrophila* no meio de cultura seletivo selecionado, o estudo revelou que, quando um maior número de colônias por placa é selecionado para identificação, a confluência de colônias não permite que as características típicas sejam observadas e, portanto, outras espécies de *Aeromonas* são capturadas para confirmação. Se a contagem for feita na última placa de crescimento, contendo número menor que 10 colônias, as características ficam mais claras.

Nosso interesse foi obter maior número de colônias para o estudo, por isso selecionamos as placas com maior número de colônias, o que forneceu resultados discrepantes entre colônias e identificação positiva para *A. hydrophila*. Porém, os resultados foram todos considerados com a identificação final e, portanto, o número de *A. hydrophila* foi concordante com os valores observados na diluição em que apenas um número inferior a 10 colônias era obtido.

A enumeração de *Aeromonas hydrophila* foi realizada em triplicata para que fosse determinada a reprodutibilidade da análise. A Tabela 2 apresenta a contagem obtida na Técnica de Membrana Filtrante, valores de pH e tipo de tratamento final das amostras.

Tabela 2 – Concentração de *A. hydrophila*, obtida na contagem de colônias típicas, pH e tipo de tratamento final das amostras de esgoto e lodo tratado.

Amostra	Tipo de amostra tratada	Membrana filtrante - triplicata (UFC/g ou mL)			pH	Tipo de tratamento final
		A	B	C		
1	Esgoto	$9,0 \times 10^5$	-	-	7	FeCl ₃ / Polímero
2	Lodo	$2,0 \times 10^3$	-	-	7	FeCl ₃ / Polímero
3	Esgoto	$1,3 \times 10^3$	-	-	7	-
4	Esgoto	<1	<1	<1	6	Hipoclorito de sódio
5	Esgoto	$7,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	6	FeCl ₃ / Polímero
6	Esgoto	<1	<1	<1	5	Cloro
7	Lodo	<1	<1	<1	11	Cal/FeCl ₃
8	Lodo	$6,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	6	Polímero
9	Lodo	$2,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	6	FeCl ₃ / Polímero
10	Lodo	$6,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	7	Polímero
11	Lodo	<1	<1	<1	5	Polímero
12	Lodo	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	5	Polímero
13	Esgoto	$3,8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	5	-
14	Lodo	<1	<1	<1	9	Cal/FeCl ₃
15	Lodo	<1	<1	<1	12	Cal/FeCl ₃

Os valores das colônias que foram quantificadas e positivas para: fermentação em Ágar Kligler, oxidase positiva e que apresentaram características típicas em Ágar Amido estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Número de colônias típicas selecionadas na placa contendo meio seletivo de *A. hydrophila*, confirmadas fenotipicamente nos teste da triagem de *Aeromonas*.

Amostra	Tipo de amostra tratada	Nº de colônias *
1	Esgoto	16
2	Lodo	25
3	Esgoto	45
5	Esgoto	23
8	Lodo	74
9	Lodo	40
10	Lodo	47
12	Lodo	54
13	Esgoto	87
Total		441

* Colônias verde escuro triadas em meio seletivo de *A. hydrophila*.

4.2 CEPAS-TIPO

4.2.1 Crescimento das diferentes espécies de *Aeromonas* em meio seletivo

Foram utilizadas cepas-tipo como controle positivo e negativo do crescimento e características fenotípicas das colônias no meio de cultura seletivo utilizado para o isolamento de *Aeromonas hydrophila*. De acordo com as instruções do fabricante do meio (Ryan, 1985) seriam sugestivas de *A. hydrophila* colônias verdes escuras e as demais espécies do gênero seriam representadas por colônias amarelas ou diferentes de verde escuras. A partir destas informações 22 cepas-tipo foram semeadas no meio seletivo e destas somente nove cepas cresceram: *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. simiae*, *A. bestiarium*, *A. sanarelli*, *A. eucrenophila*, *A. tawarensis*, *A. schubertii* e *A. tecta*, porém somente *A. hydrophila* apresentou a colônia com características sugestivas.

4.2.2 Reação de PCR para identificação de *A. hydrophila*

Para o presente estudo foram desenhados iniciadores específicos para identificação da espécie *A. hydrophila*, e para testar a especificidade destes foram utilizadas cepas-tipo de *Aeromonas* na reação de PCR (Figura 4).

Foram realizadas várias reações, em diferentes condições de temperaturas e ciclos que fossem capazes de separar *A. hydrophila* das demais espécies. No entanto, não foi possível a separação de *A. hydrophila*, *A. encheleia* e *A. molluscorum*, por apresentaram semelhanças na região dos iniciadores desenhados (gene 16S rRNA), tendo como diferença entre elas apenas dois nucleotídeos, e demonstrando que a reação de PCR sozinha não seria capaz de fornecer a identificação da espécie de *Aeromonas*.

4.2.3 Associação da técnica de membrana filtrante utilizando meio seletivo e a PCR com iniciadores específicos

Considerando que as duas espécies que foram positivas para a PCR juntamente com *A. hydrophila* não apresentaram crescimento no meio de cultura seletivo para *A. hydrophila* utilizado na técnica de membrana filtrante, foi possível observar que a associação das duas técnicas permite uma clara diferenciação de *A. hydrophila* das demais espécies do gênero. O resultado obtido na reação da PCR a partir de colônias provenientes do meio de cultura seletivo utilizado foi submetido ao sequenciamento e os resultados demonstraram 100% de similaridade com a sequência da cepa tipo de *A. hydrophila* disponível no banco de dados GenBank (número de acesso no GenBank: HQ189118 a HQ189121).

Figura 4 - Alinhamento das seqüências de espécies de *Aeromonas* disponíveis no GenBank e seqüências de *A. hydrophila* encontradas neste estudo (*A. hydrophila* 490, 491, 492 e 493). AHF e AHR (par de iniciadores desenhados neste estudo).

4.3 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS PROVENIENTES DE ESGOTO E LODO TRATADO

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, a triagem fenotípica selecionou 441 colônias típicas e destas 79% (348) foram confirmadas na PCR de identificação do gênero e 47% (209) na identificação da espécie (Tabela 4). Com base nestes resultados, um total de 209 isolados, sendo 92 de esgoto tratado e 117 de lodo tratado, foram identificados como *A. hydrophila*, portanto os resultados posteriores foram calculados utilizando um total de 209 isolados.

Tabela 4 – Número de colônias selecionadas na placa contendo meio seletivo de *A. hydrophila* e número de isolados que foram positivos na PCR de identificação do gênero e espécie, provenientes de amostras de esgoto e lodo tratados do estado de São Paulo.

Amostra	Tipo de amostra tratada	Nº de colônias verde escuro selecionada	PCR (gênero)	PCR (espécie)
1	Esgoto	16	13	10
2	Lodo	25	20	14
3	Esgoto	45	28	23
5	Esgoto	22	21	21
8	Lodo	74	59	43
9	Lodo	40	39	27
10	Lodo	47	33	2
12	Lodo	54	49	31
13	Esgoto	87	86	38
Total		441	348	209

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

4.4.1 Sensibilidade e especificidade da técnica de membrana filtrante associada ao meio de cultura específico para *A. hydrophila*

Com base nas análises realizadas com o isolamento das cepas-tipo no meio de cultura seletivo para *A. hydrophila* empregado no presente estudo, foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade do meio de cultura, utilizando os

resultados de isolamento das colônias provenientes das amostras de esgoto e lodo tratados.

Quadro 7- Sensibilidade e especificidade da técnica de membrana filtrante associada ao meio de cultura específico para *A. hydrophila*.

	PCR para <i>Aeromonas hydrophila</i>	
	Positivo	Negativo
Positivo ^a (colônia verde)	209 (verdadeiro positivo)	139 (falso positivo)
Negativo ^b (colônia amarela)	0 (falso negativo)	100 (verdadeiro negativo)

a: colônias verde com centro escuro; b: colônias amarelas; número de colônias verde escuro triadas: 348; número de colônias amarelas triadas: 100.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiro positivo (209)}}{\text{falso negativo+verdadeiro positivo (0+209)}} = 100\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiro negativo (100)}}{\text{falso positivo+verdadeiro negativo (100+139)}} = 41\%$$

4.4.2 Sensibilidade e especificidade da associação da técnica de membrana filtrante com meio seletivo e os iniciadores desenhados neste estudo para identificação de *A. hydrophila*

Com base nos resultados obtidos na padronização dos iniciadores para *A. hydrophila* frente às diferentes cepas-tipo de *Aeromonas*, foram realizados os cálculos de sensibilidade e especificidade da associação entre as técnicas para as colônias provenientes das amostras de esgoto e lodo tratados.

Quadro 8- Sensibilidade e especificidade da associação da técnica de membrana filtrante com meio seletivo e os iniciadores desenhados neste estudo para identificação de *A. hydrophila*.

	PCR para <i>Aeromonas hydrophila</i>*	
	Positivo	Negativo
Positivo	209 (verdadeiro positivo)	0 (falso positivo)
Negativo	0 (falso negativo)	232 (verdadeiro negativo)

Número de colônias verde escuro triadas=441.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiro positivo (209)}}{\text{falso negativo+verdadeiro positivo (0+209)}} = 100\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiro negativo (232)}}{\text{falso positivo+verdadeiro negativo (0+232)}} = 100\%$$

4.5 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Do total de 209 isolados analisados, todos (100%) apresentaram pelo menos um dos genes de virulência pesquisado, sendo que 36% apresentaram o gene *act*, 40% *ast*, 78% *alt*, 82% *fla*, 86% *lip* e 87% *ela*, respectivamente (Figura 5). Além disso, 16% dos isolados apresentaram todos os genes de virulência pesquisados neste estudo simultaneamente.

O número de isolados positivos para a presença de cada gene de virulência encontrados nos dois tipos de amostra está apresentado na Tabela 5. A ocorrência de

mais de um gene no mesmo isolado foi observada em 1,4% dos isolados, os quais possuíam pelo menos um dos genes e 37,3% possuíam quatro genes de virulência (Figura 6).

O seqüenciamento permitiu a confirmação dos produtos amplificados, utilizando a ferramenta BLAST, mostrando a especificidade dos iniciadores *act*, *alt*, *ast*, *fla*, *ela* e *lip*, e enfatizando a capacidade da técnica de detectar genes de aerolisina, β hemolisina e enterotoxina citotóxica. As seqüências estão disponíveis no GenBank através dos números de acesso JF812993/ JF812994 (*lip*), JF812995/ JF812996 (*ela*).

Tabela 5 – Número de isolados positivos para a presença de cada gene de virulência.

Amostra	Tipo de amostra tratada	Nº total de isolados	<i>act</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>fla</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>
1	Esgoto	10	0	0	8	7	10	7
2	Lodo	14	3	2	11	11	12	12
3	Esgoto	23	9	13	14	20	21	16
5	Esgoto	21	3	1	17	10	20	21
8	Lodo	43	23	35	29	38	41	41
9	Lodo	27	9	10	25	24	27	26
10	Lodo	2	1	0	1	2	2	2
12	Lodo	31	5	5	30	23	30	30
13	Esgoto	38	23	19	30	37	18	27
Total		209	76	85	165	172	181	182

Figura 5 – Ocorrência (%) dos genes de virulência em isolados de *A. hydrophila* (n=209).

Figura 6 – Ocorrência (%) de isolados de *A. hydrophila* correspondentes a quantidade de genes de virulência encontrados em cada um dos isolados (n=209).

4.6 ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS, PRODUÇÃO DE ENZIMA β -LACTAMASE E PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.

Os resultados do antibiograma realizado neste estudo demonstraram que do total de 209 isolados (92 esgoto tratado/ 117 lodo tratado) foram respectivamente resistentes aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos em ordem decrescente: **Cefalosporina de 1ª geração:** cefalotina (79,1%/91,7%); **2ª geração (Cefamicinas):** cefoxitina (44,5%/68,3%) e cefotetan (35,8%/60,6%); **Carbapenems:** imipenem (30,7%/27,2%) e ertapenem (30,7%/27,2%); **3ª geração:** ceftazidima (2,1%/0,8%) e cefotaxima (2,1%/0,8%); **4ª geração:** cefepime (2,1%/0,8%); **Monobactâmico:** aztreonam (1,0%/0,8%) (Figura 7).

Para as demais classes de antibióticos os resultados dos 209 isolados de esgoto e lodo tratado, foram resistentes, respectivamente a sulfametoxazol-trimetoprim (18,4%/26,4%); tetraciclina (15,2%/20,5%); gentamicina (14,1%/14,5%); ciprofloxacina (2,1%/2,5%) (Figura 7).

Figura 7 – Gráfico representando a porcentagem (%) de isolados em ordem decrescente resistentes aos antibióticos utilizados (n=209).

Dos 209 isolados estudados, 186 (88%) foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos avaliados e dentre estes somente um isolado foi resistente a nove antibióticos, ao contrário de 23 isolados (11%) que foram sensíveis aos treze antibióticos utilizados no teste de sensibilidade aos antibióticos.

Os testes fenotípicos para produção de enzimas β -lactamases foram realizados a partir dos resultados de disco difusão, em seguida foi realizada a pesquisa dos genes de resistência.

A produção de MBL foi detectada fenotipicamente em 30,7% nos isolados do esgoto tratado e 27,2% no lodo tratado, enquanto que o gene *cphA* foi detectado em 80,2% e 71,9% em esgoto tratado e lodo tratado, respectivamente. Os resultados mostraram que todos os isolados que expressaram a resistência e produziram a enzima MBL, apresentaram o gene *cphA*, no entanto, nem todos os isolados que possuíam o gene foram resistentes ou produtoras da enzima (Figura 8).

Com relação à produção de ESBL foi detectada em 2,1% dos isolados de esgoto tratado e 0,8% no lodo, enquanto que o gene *bla_{TEM}* foi encontrado em 35,5% e 5,7%, respectivamente (Figura 8).

A produção de AmpC foi detectada em 44,5% e 68,3% os isolados de esgoto e lodo tratado, respectivamente enquanto que o gene *bla_{MOX}* foi encontrado em 9,8% dos isolados de esgoto e 4,9% dos isolados do lodo (Figura 8).

Os genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* e *bla_{FOX}* não foram detectados.

Figura 8 – Porcentagem de isolados produtores de enzimas (MBL, ESBL e AmpC) e presença do genes de resistência em isolados de *A. hydrophila*, presentes no esgoto e lodo tratados (n=209).

5. DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Apesar do gênero *Aeromonas* ter sido descoberto há mais de 100 anos, as dificuldades em identificar e diferenciar as espécies ainda permanecem. O fato de vários estudos utilizando testes bioquímicos revelaram-se subjetivos e pouco confiáveis levou ao declínio no interesse de pesquisadores e médicos quanto ao gênero *Aeromonas* e suas espécies (ABBOTT et al., 2003).

A enumeração e isolamento de *Aeromonas* em fontes de água é frequentemente realizada pela técnica de membrana filtrante com diferentes meios, como Ampicilina dextrina-ágar (ADA), Ryan, PADE Ágar, com parâmetros seletivo e de diferenciação, a fim de obter a identificação da *A. hydrophila*, mas todos os estudos concluíram que as espécies devem ser isoladas por testes fenotípicos e confirmadas por PCR ou outros métodos moleculares (HAVELAAR et al., 1986; HOLMES e SARTORY, 1993; IMZLIN et al., 1996).

No presente estudo realizamos o isolamento por meio da técnica de membrana filtrante e meio seletivo para *A. hydrophila*, o que nos proporcionou um número significativo de colônias isoladas que foram quantificadas e posteriormente analisadas. Os dados demonstraram que utilizando somente essa técnica, obteve-se sensibilidade de 100%, porém especificidade de apenas 41%, pois colônias típicas não foram confirmadas com sendo *A. hydrophila*, ou seja, falso positivas.

O resultado da contagem das colônias do presente estudo (Tabela 2) corroborou com os resultados de outros trabalhos científicos cujos valores das

concentrações de *Aeromonas* em efluente tratado esteve entre 10^3 e 10^5 UFC/mL ou mais, enquanto que no esgoto bruto ou lodo a concentração chegou a 10^8 UFC/mL (WHO, 2002; JANDA e ABBOTT, 2010). O presente estudo, além de apresentar dados inéditos devido a falta de trabalhos científicos nacionais semelhantes a este, é de grande importância pelos valores encontrados neste tipo de amostras (esgoto e lodo tratados), que serão reutilizados para fins urbanos ou agrícolas.

A presença de *A. hydrophila* nas amostras de esgoto e lodo tratados confirmam os achados observados por MARTONE-ROCHA et al. (2010) que realizaram o primeiro estudo sobre a dinâmica da *Aeromonas* no esgoto tratado destinado à reutilização, no Brasil.

A utilização da PCR e outras ferramentas moleculares na identificação de *A. hydrophila* também é discutida na literatura. Devido ao crescente interesse pelo gênero e especialmente em *A. hydrophila*, diversas pesquisas em todo o mundo mostraram métodos moleculares como uma necessidade essencial para a identificação do gênero e suas espécies (BORRELL et al., 1997; SEN, 2005; LEE et al., 2008; TRAKHNA et al., 2009).

Atualmente, os métodos mais modernos como a PCR em tempo real, são ferramentas precisas para identificação de *A. hydrophila*, no entanto estas tecnologias ainda são caras e trabalhosas devido ao longo tempo necessário para sua padronização (CHU e PU, 2005; SEN, 2005; POLLARD et al., 1990; BORRELL et al., 1997; TRAKHNA et al., 2009).

No presente estudo a PCR para identificação da espécie apresentou resultado limitado quando utilizada sozinha, por não conseguir amplificar somente a espécie *A. hydrophila*. Em contrapartida, a PCR quando associada à técnica de membrana

filtrante e meio de cultura seletivo para *A. hydrophila* apresentou incremento nos resultados de especificidade que foi de 100%.

Em nosso estudo *A. encheleia* e *A. molluscorum* foram agrupados com a *A. hydrophila*, pois estas espécies apresentam grande similaridade na região do primer desenhado, e a diferença entre elas é de apenas dois nucleotídeos (Figura 4). Comparando os resultados obtidos neste trabalho com aqueles presentes na literatura, encontramos uma alta similaridade (99,7%) entre a *A. molluscorum* e *A. encheleia* ao comparar a sequência do gene 16S rRNA (MIÑANA-GALBIS et al., 2004; JANDA e ABBOTT, 2010). Além da confirmação do sequenciamento das cepas, nossos resultados de pesquisa também confirmaram que os isolados apresentaram o perfil típico de virulência encontrados em *A. hydrophila* (SEN & RODGERS, 2004; BALSALOBRE et al., 2009).

Considerando que as duas espécies positivas para a PCR juntamente com *A. hydrophila* não apresentaram crescimento no meio de cultura seletivo para *A. hydrophila* utilizado na técnica de membrana filtrante, foi possível observar que a associação das duas técnicas permite uma clara diferenciação de *A. hydrophila* das demais espécies do gênero.

A utilização de um método confiável para o isolamento de *Aeromonas* presentes em amostras ambientais deve ser possível na maioria dos laboratórios de rotina e deve permitir a utilização de técnicas associadas que gerem resultados satisfatórios não só na identificação da espécie, como na quantificação dos microrganismos e pesquisa de genes de virulência e resistência, o que seria essencial para melhor compreensão da epidemiologia dessas bactérias.

5.2 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

O gênero *Aeromonas* têm sido associado à diarreia e outras doenças, como infecções de feridas, doenças hepatobiliares e uma variedade de infecções extra-intestinais desde 1961, quando uma cepa foi isolada pela primeira vez de fezes humanas (LAUTROP, 1961; SEN e RODERS, 2004; TENA et al., 2007).

A patogenicidade de *Aeromonas* sp. ocorre devido à interação de vários fatores de virulência (PEMBERTON et al., 1997). Como há uma necessidade prática para a determinação do potencial de virulência de *Aeromonas* em isolados clínicos e ambientais, muitas pesquisas têm desenvolvido métodos de PCR usando genes de virulência como biomarcadores para as espécies patogênicas (KINGOMBE et al., 1999; ALBERT et al., 2000; CHACON et al., 2003; SEN e RODGERS, 2004; YU et al., 2008).

BALSALOBRE et al. (2009) estudou 41 cepas de *A. hydrophila* provenientes de água superficial e observou a ocorrência dos genes *ast* (26%), *act* (70%) e *alt* (97%) nos isolados. Da mesma forma, os resultados deste estudo também apresentaram altos valores (78%) para ocorrência do gene *alt*.

Entre os genes de virulência pesquisados neste estudo, a presença do flagelo (*fla*) também foi significativa e faz um alerta, uma vez que SEN e LYE (2007) pesquisaram esse gene em *Aeromonas* e inocularam os isolados em camundongos imunossuprimidos, detectaram que os mesmos são potencialmente patogênicos e que podem causar doença em pacientes imunossuprimidos.

Outro resultado importante deste estudo foi a presença de mais de um gene de virulência encontrado no mesmo isolado, 37,3% dos isolados de *A. hydrophila*

apresentaram quatro genes de virulência. Este dado corrobora com outros estudos que investigaram a ocorrência de mais de um gene no mesmo isolado e as diferentes combinações entre os genes, evidenciando que isolados de *Aeromonas* que contêm dois ou mais genes de virulência associados, têm o potencial de causarem doença (SEN e RODGERS, 2004; SEN e LYE, 2007; PABLOS et al., 2009).

Além disso, outro estudo em Bangladesh mostrou que certos clones de *Aeromonas* persistiram em diferentes estações de tratamento de água e que os clones foram encontrados no mesmo tipo de peixe e em crianças com diarreia (RAHMAN et al., 2007). A pesquisa mostrou que certas linhagens clonais de *Aeromonas* podem propagar-se de crianças hospitalizadas com diarreia para os peixes produzidos para consumo humano através do sistema de tratamento de esgoto. Mais um dado que reforça a ideia da transmissão dos fatores de virulência entre amostras ambientais e clínicas.

KHAJANCHI et al. (2010) analisaram a presença de 11 genes de virulência e a relação clonal para um grande número de amostras de água e clínicas, de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de diversas regiões nos Estados Unidos e outras partes do mundo. Os resultados mostraram que os membros da espécie *A. hydrophila* e *A. veronii*- grupos *A. sobria* continham mais genes de virulência e tinham maior atividade citotóxica e hemolítica quando comparados as outras espécies. Estes dados sugerem que há transmissão da água para humanos e que a exposição a *Aeromonas* presentes na água pode levar à gastroenterite e outras infecções em seres humanos.

Estudos sobre a virulência em bactérias do gênero *Aeromonas* são de suma importância, uma vez que esses microrganismos já foram encontrados em um único

surto relatado no Brasil, em 2004 em São Bento do Urna, Pernambuco (HOFER et al., 2006).

Muitos estudos têm procurado novos fatores de virulência em espécies de *Aeromonas* para melhor estabelecer a relação entre a presença de fatores de virulência e o estado da doença no hospedeiro. Assim, faz-se necessária a análise da distribuição de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas e ambientais, bem como estudos epidemiológicos e a pesquisa de seus fatores de virulência com objetivo de caracterizar o seu papel na patogenicidade.

Os isolados pesquisados neste estudos são provenientes de amostras de esgoto e lodo tratados e a porcentagem de isolados positivos para a pesquisa dos genes de virulência encontrados alerta sobre a ocorrência desta espécie no ambiente, uma vez que diversos estudos descrevem o potencial patogênico de isolados ambientais (GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2002; SEN e RODGERS, 2004; SEN e LYE, 2007; BALSALOBRE et al., 2009b; MOURA et al., 2010).

5.3 ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

O uso indiscriminado de antibióticos no campo da medicina e ambiental é uma prática que contribui para a seleção e disseminação da resistência em microrganismos, com isso, nas últimas décadas, a emergência da resistência entre bactérias patogênicas em ambientes clínicos tornou-se um grande problema no mundo todo (FRENCH, 2005; HENRIQUES et al., 2006).

Bactérias podem desenvolver resistência por meio de três mecanismos principais: a) produção de uma enzima que inativa ou destrói o antibiótico; b) alteração do sítio alvo do antibiótico impedindo a ação da droga; ou c) a prevenção

do acesso do antibiótico ao sítio alvo (SHLAES et al., 1997). No presente estudo foi avaliado o mecanismo de produção de enzima.

Os resultados observados no teste do perfil de sensibilidade aos antibióticos mostraram que a maioria (88%) dos isolados foi resistente a pelo menos um dos antibióticos e um isolado foi resistente a nove antibióticos, ou seja, um isolado multiresistente. Esse dado pode representar uma ameaça à saúde pública, uma vez que essas amostras são reutilizadas no ambiente e conseqüentemente a resistência pode ser transportada por elementos móveis como plasmídeos para outras bactérias reconhecidas como patógenos (RAHMAN et al., 2009).

A resistência a Cefalosporina de 1^a geração cefalotina e 2^a geração (cefamicinas) (cefoxitina e cefotetan) foram as mais encontradas no presente estudo, estes dados corroboram com o estudo de MOURA (2010) que também investigou a sensibilidade de β -lactâmicos em *Aeromonas* provenientes do ambiente de diferentes anos. Alguns estudos demonstram que as cefalosporinases são encontradas nos cromossomos de diversas bactérias Gram-negativas, ao contrário disto, estudos mais recentes observaram o aumento dos genes produtores destas enzimas em plasmídeos de bactérias resistentes a cefalosporinas em amostras clínicas (REISBIG e HANSON, 2004).

Em relação aos antibióticos além dos β -lactâmicos, que foram utilizados somente no teste de sensibilidade, os isolados foram mais resistentes a sulfametazol+trimetoprima, tetraciclina e gentamicina. Deste, destaca-se a tetraciclina um antibiótico frequentemente utilizado na aquicultura para tratamento de infecções bacterianas em peixes (AGERSO et al., 2007).

O estudo de JACOBS e CHENIA (2007) mostrou a prevalência de resistência à tetraciclina em *Aeromonas*, uma vez que se trata de uma droga de amplo espectro e que está sendo muito utilizada na veterinária, agricultura e clínica. Também é conhecida a existência dos genes *tet*, os quais podem codificar o mecanismo de bomba de efluxo, realizar a proteção ribossomal ou inativação dos antibióticos (BALASSIANO et al., 2007). Mas, não podemos de fato afirmar quais desses mecanismos foram utilizados pelos isolados neste estudo, pois não foram realizadas pesquisas dos genes que conferem resistência à tetraciclina.

5.4 PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES (MBL, ESBL, AMPC) E PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

A produção de metalo- β -lactamases está entre os diversos mecanismos que as bactérias possuem para se defender da ação dos antibióticos, elas já foram encontradas em diversas espécies patogênicas responsáveis por infecções em humanos e são codificadas por genes localizados no cromossomo ou plasmídeos nas bactérias (QUEENAN e BUSH, 2007; ABRIATA et al., 2008; NAUTON et al., 2008).

No presente estudo a porcentagem de resistência aos carbapenems (imipenem e ertapenem) ocorreu em média em 30% dos isolados, e tais antibióticos são considerados agentes terapêuticos de escolha para tratamento de infecções graves causadas por bactérias resistentes aos demais β -lactâmicos (TAVARES, 2001).

Bactérias do gênero *Aeromonas* possuem uma metalo- β -lactamase localizada no cromossomo, chamada CphA, que pode ser expressa em isolados mutantes de

certas espécies do gênero quando em contato com o antibiótico (IACONIS e SANDERS, 1990; KO et al., 1998).

Os isolados do esgoto e lodo tratados que apresentaram resistência aos antibióticos imipenem e ertapenem foram submetidos ao teste de produção de MBL (metalo- β -lactamase), no qual todos isolados resistentes a droga produziram a enzima, mas o número de isolados que apresentaram o gene *cphA* foi muito maior, ou seja, 80% dos isolados continham o gene mas nem todos expressaram a produção da enzima. Estes resultados corroboram com os de outros estudos (ROSSOLINI et al., 1995; WALSH et al., 1998; BALSALOBRE et al., 2009; MOURA, 2010), os quais indicam que o gene pode ser encontrado em isolados de *A. hydrophila*, no entanto nem todas são capazes de expressar a resistência.

Recentemente, estudos identificaram os genes codificadores das MBL *bla_{IMP-19}* e *bla_{VIM-4}* associados a integrons em *A. caviae* e *A. hydrophila* respectivamente (NEUWIRTH et al., 2007; LIBISCH et al., 2008). No presente estudo os genes *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* não foram detectados, dados que corroboram com os de outros estudos (HENRIQUES et al., 2006; BALSALOBRE, 2009) que também pesquisaram a presença destes genes em *Aeromonas* isoladas de amostras ambientais e não detectaram os genes.

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são capazes de hidrolisar penicilinas, 1^a, 2^a e 3^a geração de cefalosporinas e aztreonam, mas não hidrolisam cefamicinas nem carbapenens (SHANMUGANATHAN et al., 2004; TURNER, 2005; BABIC et al., 2006; POIREL et al., 2008).

São frequentemente relatadas em enterobactérias, mas podem ser encontradas em outras espécies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*

enterica, *Aeromonas spp.*, entre outras (PFALLER e SEGRETI, 2006; KOLAR et al., 2006).

Nos isolados de *A. hydrophila* presentes neste estudo não houve a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), nem a presença dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}, somente foi possível detectar o gene *bla*_{TEM-116} em 35,5% dos isolados do esgoto e 5,7% dos isolados do lodo tratado. Este gene codifica uma enzima que não expressa o fenótipo ESBL. A expressão de ESBL pode estar relacionada com o tipo de promotor que antecede a sequência do gene *bla*_{TEM} e regula a intensidade da expressão (TRISTRAM et al., 2005; ENNE et al., 2006).

Estes resultados corroboram os de outros estudos referentes a espécies de *Aeromonas* (HENRIQUES et al., 2006; BALSALOBRE et al., 2009; MOURA, 2010), que só conseguiram detectar a presença do gene *bla*_{TEM}.

No estudo de SAYEED et al. (1996) relatou-se um isolado de *A. caviae* carreadora de plasmídeo contendo o gene *bla*_{TEM-12}, mas a ESBL só passou a ser expressa após a transferência do plasmídeo para *E. coli* K12, o que indica a possibilidade do gene estar presente em isolados de *Aeromonas*, porém não expressarem o fenótipo ESBL.

No Brasil o estudo de BALSALOBRE et al. (2010) investigou a produção de ESBL e a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX} em *A. hydrophila* provenientes de água superficial. O resultado confirmou que 97,7% dos isolados foram positivos para pesquisa do gene *bla*_{TEM-116}, mas em contrapartida nenhum dos isolados foi produtor da enzima ESBL. Fato que também ocorreu em outro estudo no Brasil, com isolados de *Klebsiella pneumoniae* de amostras clínicas, a qual apresentava o gene

*bla*_{TEM-116} e ausência da produção de ESBL (DROPA et al., 2010).

Bactérias que possuem AmpC β -lactamases, que são cefalosporinas, são pouco inibidas pelo ácido clavulânico e são clinicamente importantes porque conferem resistência a uma grande variedade de β -lactâmicos como cefoxitina, cefotetan, cefalotina, cefazolina, cefalexina, 3^a geração de cefalosporinas, penicilinas, inibidores de β -lactamases e aztreonam (COUDRON et al., 2000), e não conferem resistência a cefepime, cefpiroma e carbapenems (PÉREZ-PÉREZ e HANSON, 2002).

Isolados resistentes a cefamicinas e β -lactâmicos de 3^a geração (ceftazidima) são normalmente um indicativo de produção de AmpC (DOI e PATERSON, 2007). Sendo assim os resultados encontrados neste estudo indicam a presença de AmpC já que grande porcentagem dos isolados apresentaram resistência a pelo menos uma das cefamicinas testadas.

A produção de AmpC no presente estudo foi detectada por meio da técnica de discos combinados, utilizando como inibidor o Ácido fenilborônico. Os resultados corroboram com outros estudos que também utilizaram Ácido fenilborônico como inibidor para a detecção da enzima (TAN et al., 2007; JEONG et al., 2008; BALSALOBRE, 2009).

Em relação à pesquisa dos genes de resistência, os resultados deste estudo apresentaram 9,8% dos isolados de esgoto e 4,9% dos isolados do lodo contendo o gene *bla*_{MOX}, enquanto que o gene *bla*_{FOX} não foi detectado em nenhum isolado. Ainda são poucos os estudos que investigam genes produtores de AmpC presentes em *Aeromonas*, tornando-se pertinente a investigação de mais genes de resistência e

o desenvolvimento de iniciadores e técnicas que elucidem o mecanismo de resistência deste microrganismos.

A presença de antibióticos no ambiente e outros poluentes contribuem para a permanência e disseminação de genes relacionados à resistência bacteriana (KRUSE e SORUM, 1994; GOÑI-URRIZA et al., 2005; HUDDLESTON et al., 2006) e o fato de determinantes genéticos terem sido encontrados em organismos de comunidades de ambientes naturais, assim como os resultados encontrados neste estudo, aumentam a preocupação sobre o risco que estes reservatórios de resistência possam constituir em fonte disseminação dos genes para o ambiente, mas principalmente para o homem (CHEE-SANFORD et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003; HENRIQUES et al., 2006).

6. CONCLUSÕES

- A técnica de membrana filtrante utilizando meio de cultura seletivo para isolamento de *A. hydrophila* foi uma ferramenta sensível para o isolamento e quantificação dos microrganismos isolados de esgoto e lodo tratados, além de ser uma técnica de baixo custo e fácil aplicação em rotina de laboratório. Porém, com baixa especificidade (41%).
- A associação da técnica da membrana filtrante e meio de cultura seletivo com a PCR para identificação da espécie dos microrganismos isolados no presente estudo incrementou a especificidade do teste, confirmando o posicionamento taxonômico dos microrganismos, objeto de estudo.
- Isolados de *A. hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados podem ser carreadores dos genes de virulência *act*, *ast*, *alt*, *fla*, *lip* e *ela*, o que demonstra seu potencial patogênico ao homem.
- Isolados de *A. hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados podem ser resistentes a diversos β -lactâmicos e outros grupos de antibióticos, bem como apresentarem produção de enzimas capazes de impedirem a ação da droga. Também podem ser portadoras dos genes de resistência *cphA*, *bla*_{TEM} e *bla*_{MOX}. Tais isolados podem servir como reservatório de resistência aos antibióticos para outros microrganismos responsáveis por infecções em humanos.
- Amostras de esgoto e lodo tratados que serão reutilizadas para fins urbanos ou agrícolas, quando não tratadas da forma correta, representam risco à Saúde Pública, uma vez que microrganismos como *A. hydrophila* podem persistir após o tratamento e, além disso, serem carreadores de genes de virulência e resistência a antibióticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott SL, Wendy KWC, Janda JM. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. J Clin Microbiol. 2003; 41(6):2348-57.
- Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Parton RG, van der Goot FG. A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 1998;140(3):525-40.
- Abriata LA, González LJ, Llarrull LI, Tomatis PE, Myers WK, Costello AL, Tierney DL, Vila AJ. Engineered mononuclear variants in *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamase Bcll are inactive. Biochemistry. 2008; 19;47(33):8590-9.
- Agerso Y, Bruun MS, Dalsgaard IE, Larsen JL. The tetracycline resistance gene *tet(E)* is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. From fish farms. Aquaculture. 2007;266:47-52.
- Aguilera-Arreola M G, Hernandez-Rodriguez C, Juniga G, Figueras MJ, Garduno RA, Castro-Escarpulli G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. Can J Microbiol. 2007;53:877-887.
- Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. J Clin Microbiol. 2000;38(10): 3785-90.
- Anguita J, Rodríguez Aparicio LB, Naharro G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. Appl Environ Microbiol. 1993;59:2411–2417.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fugiwara H et al. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 2000;38:40-43.
- Avison MB, Niumsup P, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM. Role of the ‘cre/blr-tag’ DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* β-lactamase regulator, BlrA. J Antimicrob Chemother 2004;53:197–202.
- Awan MB, Ahmed MM, Bari A, Krovacek K. Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. Isolated from food and environment in Abu Dhabi United Arab Emirates. J Food Prot. 2006;69:1713-1716.

- Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006;9(3):142-56.
- Balassiano IT, Bastos MD, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. In press. 2007; Nov;102(7):861-6.
- Balsalobre LC. Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e β -lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* provenientes de ambientes aquáticos. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.
- Balsalobre LC, Dropa M, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR, Matté M.H. Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49:142-145.
- Balsalobre LC, Dropa M, Matté GR, Matté MH. Molecular detection of enterotoxins in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. *J Water Health*. 2009b;7(4):685-91.
- Balsalobre LC, Dropa M, Oliveira DE, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR, Matté MH. Presence of bla_{TEM-116} gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* (Impresso) v. 41, p. 718-719, 2010.
- Bauab TM, Levy CE, Rodrigues J, Falcão DP. Niche-specific association of *Aeromonas* ribotypes from human and environmental origin. *Microbiol. Immunol*. 2003;47(1) 7-16.
- Bomo AM, Stevik TK, Hovi I, Hanssen JF. Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters. *J Environ Qual*. 2004;33(3):1041-1047.
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martinez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 1997;35(7):1671-4.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):933-51.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211-33.

- Bush K e Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969-76.
- Bush K e Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet]; c2003. [acesso em 28 de janeiro de 2010]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/>.
- Bush k e Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet]; c2010 [acesso em 26 de abril de 2011]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/>.
- Cabral A. Diversidade e perfil plasmidial de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.
- Cabrera LER, Castro GE, Ramírez MMA, Liop AH, Llnaes RC, Castañeda NE et al. Aislamiento e identificación de espécies pertenecientes a los gêneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales em Cuba. *Rev Chil Infect*. 2007;24(3):204-208.
- Cansian RL, Floriani STR, Valduga E. Microbiological analysis of critical points in the chicken industry. *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48:403-6.
- Cantarelli VV, Inamine E, Brodt TC, Secchi C, Cavalcante BC, Pereira FS. Utility of the ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT) to detect and confirm the presence of inducible AmpC beta-lactamases among enterobacteriaceae. *Braz J Infect Dis*. 2007; 11(2): 237-239.
- Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemoter* 2002;46:3739-3743.
- Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II. A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol*. 1991;29(12):2843-9.
- Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Hernanz C, Luengo JM et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*. 2000;68(6):3233-3241.
- Caselitz FH. How the *Aeromonas* story started in medical microbiology. *Med Microbiol Lett*. 1996;5:46–54.

- Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44(3):221-5.
- Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003;84(4):269-278.
- Chao K-K, Chao C-C, Chao W-L. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36:288-293.
- Chapman P, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001;68:11-20.
- Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microb*. 2001;67:1494-02.
- Choi JP, Lee SO, Kwon HH, Kwak YG, Choi SH, Lim SK et al. Clinical Significance of Spontaneous *Aeromonas* Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Patients: A Matched Case-Control Study. *Clin Infect Dis*. 2008;47:66-72.
- Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect*. 1999;1(13):1129-1137.
- Chopra AK, Peterson JW, Xu X-J, Coppenhaver DH, Houston CW. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog*. 1996;21:357-377.
- Chopra AK, Houston CW, Peterson JW, Jin GF. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can J Microbiol*. 1993;39:513-23.
- Chopra AK, Pham R, Houston CW. Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 1994;139:87-91.
- Chuang YC, Chiou SF, Su JH, Wu ML, Chang MC. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology* 1997;143:803-812.

- Chu WH, Lu CP. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. J Fish Dis. 2005 Jul;28(7):437-41.
- Colwell RR, MacDonell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. Int J Syst Bacteriol. 1986;36:473-477.
- Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier J-D et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int J Antimicrob Agents 2007;29:380–388.
- Costa FN, Junior ODR. Enterotoxigenicidade de espécies de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate de frango. Arq Inst Biol. 2007; 74(1):5-9.
- Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4163-7.
- Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and Detection of AmpC Beta-Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates at a Veterans Medical Center. J Clin Microbiol 2000;38:1791-1796.
- Couto CRA, Oliveira SS, Queiroz MLP, Freitas-Almeida AC. Interactions of clinical and environmental *Aeromonas* isolates with caco-2 and HT29 intestinal epithelial cells. Lett Appl Microbiol. 2007; 45:405-410.
- Cunliffe DA, Adcock P. Isolation of *Aeromonas* spp. from water by using anaerobic incubation. Appl Environ Microbiol. 1989;55:2138–2144.
- Cutolo SA. Reúso de águas residuárias e saúde pública. São Paulo. Annablume. Fapesp. 2009.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLS). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, M45-A. Wayne, PA:CLSI: 2006.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLS). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing ; Eighteenth International Supplement. CLSI Publication M100-S19, Wayne, PACLSI: 2009.
- Delamare APL, Artico LA, Grazziotin FG, Echeverrigaray S, Costa SOP. Total protein electrophoresis and RAPD fingerprinting analysis of the identification of *Aeromonas* at the species level. Braz J Microbiol 2002;33:358-62.

- Deodhar LP, Saraswathi M, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. J Clin Microbiol. 1991;29(5):853-856.
- Djuikom E, Njiné T, Nola M, Kemka N, Zébazé Togouet SH, Jugnia LB. Significance and suitability of *Aeromonas hydrophila* vs. fecal coliforms in assessing microbiological water quality. World J Microbiol Biotechnol. 2008;24:2665-2670.
- Dropa, M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.
- Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matté GR, Matté MH. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron-associated bla(GES-7) in Brazil. Clin Microbiol Infect. 2010 Jun;16(6):630-2.
- Environmental Protection Agency (EPA). *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington; 2006.
- Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):3003-10.
- Epple HJ, Mankertz J, Ignatius R, Liesenfeld O, Fromm M, Zeitz M et al. *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). Infect Immun. 2004;72(8):4848-4858.
- Ewing WH, Hugh R, Johnson JG. Studies on the *Aeromonas* group. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA; 2006.
- Ewing WH, Hugh R, Johnson JG. Studies on the *Aeromonas* group. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA; 1961.
- Falcão DP, Lustri WR, Bauab TM. Incidence of non-O1 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. Curr Microbiol. 1998;37(1):28-31.
- Ferguson MR, Xu X-J, Houston CW, Peterson JW, Coppenhaver DH, Popov VL et al. Hyperproduction, Purification, and Mechanism of Action of the Cytotoxic Enterotoxin Produced by *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1997;65(10):4299-4308.

- Figueiras MJ, Suarez-Franquet A, Chacón MR, Soler L, Navarro M, Alexandre C et al. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(1):538-541.
- Fosse T, Giraud-Morin C, Madinier I, Mantoux F, Lacour JP, Ortonne JP. *Aeromonas hydrophila* with plasmid-borne class A extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and three chromosomal class B, C, and D beta-lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2342-3.
- French GL. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:1514–27.
- Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère JM, Dideberg O. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol.* 2005;345(4):785-95.
- Gavín R, Rabaan AA, Merino S, Tomás JM, Gryllos I, Shaw JG. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2002;43(2):383-97.
- Gavin R, Merino S, Altarriba M, Canals R, Shaw JG, Tomas JM. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003;224:77-83.
- Gerba CP. Domestic Wastes and Waste Treatment. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. *Environmental Microbiology*. Canadá: Academic Press; 2000. 505-533.
- Gibotti A, Saridakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). *J Appl Microbiol.* 2000;89(1):70-5.
- Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2005;66:125–32.
- Gonzalez-Leiza M, Perez-Diaz JC, Ayala J et al. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(9): 2150-2157.
- González-Serrano CJ, Santos JA, Garcia-Lopez ML, Otero A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhea case. *J Appl Microbiol.* 2002;93(3):414-19.

- Habash M, Johns R. Comparison study of membrane filtration direct count and an automated coliform and *Escherichia coli* detection system for on-site water quality testing. *J Microb Methods* 2009;79:128–130.
- Havelaar AH, During M, Versteegh JFM. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J Appl Bacteriol* 1986;62, 279–287.
- Hedstrom L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem Rev* 2002;102:4501–4523.
- Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res Microbiol.* 2006;157:938–47.
- Heuzenroeder MW, Wong CY, Flower RL. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;174:131–6.
- Hiransuthikul N, Tantisiriwat W, Lertutsahakul, K, Vibhagool A, Boonma P. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. *Clin Infect Dis.* 2005;41:93–6.
- Hirono I, Aoki T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog.* 1991;11:189–97.
- Hofer E, Reis C M, Theophilo GN, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques MF. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(2):217–20.
- Holmes P, Sartory D. An evaluation of media for the membrane filtration enumeration of *Aeromonas* from drinking-water. *Letters in Applied Microbiology.* 1993;17:58–60.
- Holmes P e Nicolls IM. Aeromonads in Drinking-Water Supplies: Their Occurrence and Significance. *J Ciwem.* 1996(9):464–469.
- Horsfall LE, Garau G, Liénard BM, Dideberg O, Schofield CJ, Frère JM et al. Competitive inhibitors of the CphA metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2136–42.
- Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. "Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis". *Nat Genet.* 1999;23(4):433–6.

- Huddleston JR, Zak JC, Jeter RM. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from environmental sources. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7036-7042.
- Huguet JM & Ribas F. SGAP-10C agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* from water. *J Appl Bacteriol* 1991;70:81-88.
- Iaconis JP, Sanders CC. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(1):44-51.
- Imamura T, Kobayashi H, Khan R, Nitta H, Okamoto K. Induction of vascular leakage and blood pressure lowering through kinin release by a serine proteinase from *Aeromonas veronii* bv *sobria*. *J Immunol.* 2006;177:8723-8729.
- Imzilen B, Lafdal OMY, Barakate M et al. Pril-ampicillin-dextrin-ethanol agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* spp. from polluted environmental waters. *J Appl Microbiol* 1996;82:557–566.
- Janda JM e Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:35-73.
- Janda JM e Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species. Disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis.* 1998;27:332-44.
- Jacobs L e Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. Isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol.* 2007;114:295-306.
- Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microb Ver.* 2009; 22(1): 161-182.
- Joseph SW e Carnahan AM. Update on the Genus *Aeromonas*. *ASM News.* 2000;66(4):218-21.
- Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Ohman DE. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J Biol Chem.* 1998;273:30225–30231.
- Khajanchi BK, Fadl AA, Borchardt MA, Berg RL, Hornem AJ, Stemper ME, Joseph SW, Moyer NP, Sha J and Chopra AK. Distribution of virulence factor and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(7):2313-2325.

- Kingombe CIB, Huys G, Tonolla M, Albert MJ, Swings J, Peduzzi R et al. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(12):5293-5302.
- Kirov SM, Castrisios M, Sha JG. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesions that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect Immun.* 2004;72:1939-1945.
- Kirov SM, Barnett TC, Pepe CM, Strom MS, Albert MJ. Investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infect Immun.* 2000;68(7):4040-4048.
- Ko WC, Wu HM. Chang TC, Yan JJ, Wu JJ. Inducible β -lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: Therapeutic Challenge for Antimicrob therapy. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3188-3192.
- Ko W-C, Lee H-C, Chuang Y-C, Ten S-H, Su C-Y, Wu J-J. In Vitro and in Vivo Combinations of Cefotaxime and Minocycline against *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, p. 1281–1283.
- Kolar M, Latal T, Cermak P, Bartonikova N, Chmelarova E, Sauer P, Kesselova M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28(1):49-53.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. Prova de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos; p.795-865.
- Kozinska A. Dominant Pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis.* 2007;30:293-301.
- Kruse H e Sorum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:4015–21.
- Kuhn I, Huys G, Coopman R, Kersters K, Janssen P. A 4-year study of the diversity and persistence of coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well. *Can J Microbiol.* 1997;43(1):9-16.
- Lautrop, H. *Aeromonas hydrophila* isolated from human faeces and its possible pathological significance. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* (Suppl.). 1961; 51, 299-301.
- Lee DY, Lauder H, Cruwys H, Falletta P, Beaudette LA. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR

- for detection of wastewater bacterial pathogens. *Sci Total Environ.* 2008;398:203-211.
- Leung KY, Stevenson RM. Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J Gen Microbiol.* 1988;134:151–160.
- Libisch B, Giske CG, Kavács B, tóth TG, Füzi M. Identification of the first metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1878-1880.
- Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557–584.
- Marín M, Gudiol F. Beta-Lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(1):42-55.
- Martin-Carnahan A, Joseph SW. Order XII. Aeromonadales ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed. New York: Springer; v.2, parte B, 2005.p 556.
- Martinez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Alvarez M, Lara E, Figueras MJ. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(3):189-99.
- Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16s ribosomal DNA sequencing lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42(3):412-21.
- Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* 2007;35(6):457-60.
- Martone-Rocha S. Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização no Município de Lins-SP. São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.
- Martone-Rocha S, Piveli RP, Matté GR, Dória MCO, Dropa M, Morita M et al. Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment System. *J Water Health.* doi: 10.2166/wh.2010.40.
- Matté MH, Matte GR, Nitrini SMO. *Aeromonas* relacionadas com infecções no homem: Aspectos epidemiológicos, ecológicos, laboratoriais, de virulência e relativos à Saúde Pública. *Laes & Haes.* 1996;104:62-74.

- Matté MH. Aplicação de métodos moleculares no estudo de organismos do gênero *Aeromonas*. São Paulo [Tese de Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.
- Matté MH. Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da represa de Guarapiranga destinados a recreação e captação para abastecimento publico, São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1995.
- Matté MH, Matté GR, Gil AI, Lanata CF, Huq A, Colwell RR. Molecular epidemiology of *Aeromonas arequipensis* isolated from diarrhea, in Arequipa, Peru. 6th Internatinal Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Chicago; 1999.
- McMahon MAS, Wilson IG. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol*. 2001;70:155-62.
- Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42 (2): 103-113.
- Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomas, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol*. 1995;28(2):157-68.
- Merino S, Aguilar A, Nogueras MM, Regue M, Swift S, Toma's JM. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun*. 1999;67:4008–4013.
- Minana-Galbis D, Farafan M, Fuste MC, Loren JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(6):2073-78.
- Montelli AC, Sadatsune T. Antibioticoterapia para o clínico. *Soc Bras Microbiol*. Rio de Janeiro, p. 7, 2001.
- Moura EMM. Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Publica da USP; 2010.
- Muga HE e Mihelcic JR. Sustainability of wastewater treatment technologies. *J Environ Management*. 2008;88: 437-447.

- Mukhopadhyay C, Chawla K, Sharma Y, Bairy I. Emerging extra-intestinal infections with *Aeromonas hydrophila* in coastal region of southern Karnataka. J Postgrad Med. 2009;54:199-202.
- Namdari H e Bottone EJ. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. J Clin Microbiol. 1990;28:1796–98.
- Nauton L, Kahn R, Garau G, Hernandez JF, Dideberg O. Structural insights into the desing of inhibitors for the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. J Mol Biol. 2008;375(1):257-69.
- Nelson KL, Raja SM, Buckley JT. The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. J Biol Chem. 1997;272(18):12170-74.
- Neuwirth C, Siebor E, Robin F, Bonnet R. First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(12):4486-8.
- Nitta H, Kobayash H, Irie A, Baba H, Keinosuke O, Imamura T. Activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from *Aromonas sobria*. FEBS Lett. 2007;581(30):5935-5939.
- Nojimoto IT, Bezana CS, do Carmo C, Valadão LM, Carrijo Kde M. The prevalence of *Aeromonas* spp. in the diarrheal feces of children under the age of 5 years in the city of Goiânia, Goiás in the 1995-1996 biennium. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(5):385-8.
- Nordmann P e Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002;8(6):321-31.
- Ormen O e Ostensvik O. The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas* spp. and their cytotoxicity in Norwegian water sources. J Appl Microbiol. 2001;90(5):797-802.
- Pablos M, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-Lopez M-L. Occurence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. Int J Food Microbiol. In press 2009.
- Palú AP, Gomes LM, Miguel MAL, Balassiano IT, Queiroz MLP, Freitas-Almeida AC et al. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. Food Microbiol. 2006;23:504-509.
- Palumbo SA, Maxino F, Williams AC et al. Starchampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. Appl Environ Microbiol. 1985;50:1027–1030.

- Parker MW, Van Der Goot FG, Buckley JT. Aerolysin - the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol*. 1996;19(2):205-12.
- Parker JL e Shaw JG. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J Infect*. 2011;62(2):109-18.
- Pavez M, Neves P, Dropa M et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC β -lactamase in Brazil. *J med Microbiol*. 2008; 57(Pt12): 1590-1592.
- Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. Secreted enzymes of *Aeromonas* FEMS Microbiol Lett 1997;152:1-10.
- Pereira CS e Possas CA. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;24(4):562-66.
- Pérez-Pérez FJ and Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2153–2162.
- Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis*. 2006;42(s4):S153-63.
- Philippon A, Arlet G. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork. *Ann Biol Clin*. 2006;64(1):37-51.
- Pianetti A, Sabatini L, Bruscolini F, Chiaverini F, Cecchetti G. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. *Epidemiol Infect*. 2004;132:231–238.
- Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3129-35.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Cli Microbiol Infect* 2008; 14 (s1):75-81.
- Popoff MY, Coynault C, Kiredjian M, Lemelin M. Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr Microbiol*. 1981;5:109–114.
- Queenan AM e Bush K. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. *Clin. Microbiol Rev*. 2007;20(3):440–458.

- Rabaan AA, Gryllos I, Tomás JM, Shaw JG. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun*. 2001;69(7):4257-67.
- Rahman M, Huys G, Rahman M, Albert MJ, Kuhn I, Mollby R. Persistence, Transmission and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1444-51.
- Rahman M, Huys EG, Kuhn EI, Rahman EM, Möllby ER. Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from a duckweed based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009;96(3):313-21.
- Rapoport M, Monzani V, Pasteran F et al. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. In *J Antimicrob Agents*. 2008; 31(4): 385-387.
- Razzolini MT, Bari MD, Zanoli Sato MI, Sanchez PS. *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *J Water Health*. 2008;6(1):117-123.
- Reisbig MD, Hanson ND. Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated AmpC β -lactamase gene *bla*_{MIR-1}. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 2004; 48 (11): 4177-4182.
- Rippey SR, Cabelli VJ. Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. *Appl Environ Microbiol* 1979;38:108–113.
- Rose JM, Houston CW, Kurosky A. Bioactivity and immunological characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*. 1989;57:1170–76.
- Rossolini GM, Zanchi A, Chiesurin A, Amicosante G, Satta G, Guglielmetti P. Distribution of *cphA* or related carbapenemase-encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus *Aeromonas*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(2):346-9.
- Ruppé E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler Class C 1 AmpC β -Lactamase in *Citrobacter freundii* by a New, Simple Double-Disk Synergy Test. *J Clin Microbiol*. 2006;44(11):4204-4207.
- Ryan N. (1985) Personal Comunicaton.
- Saavedra MJ, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:2481-87.

- Saha P, Chakrabarti T. *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:1905-9.
- Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*. 2003;327(7425):1209-13.
- Sayeed S, Saunters JR, Edwards C, Corkill JE e Hart AC. Expression of *Aeromonas caviae bla* genes in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996;38, 435-441.
- Schubert RH. Intestinal cell adhesion and maximum growth temperature of psychrotrophic aeromonads from surface water. *Int J Hyg Environ Health*. 2000;203(1):83-5.
- Schwartz T, Kohnen W, Janses B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;43:325–35.
- Scoaris O, Colacite J, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, de Abreu Filho BA, Dias Filho BP. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008;93(1-2):111-22.
- Scoglio ME, DiPietro A, Picerno I, Delia S, Mauro A, Lagana P. Virulence factors in vibrios and aeromonads isolated from seafood. *Microbiologica*. 2001;24(3):273-280.
- Sen K, Lye D. Importance of flagella and enterotoxins for *Aeromonas* virulence in a mouse model. *Can J Microbiol*. 2007;53(2):261-9.
- Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J Appl Microbiol*. 2004;97(5):1077-86.
- Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can J Microbiol*. 2005;51:957-66.
- Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol*. 2006;188(23):8272-82.
- Sha J, Kozlova EV, Chopra AK. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*. 2002;70:1924–35.

- Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol*. 2004;155(6):409-21.
- Shanmuganathan C, Ananthakrishnan A, Jayakeerthi SR, Kanungo R, Kumar A, Bhattacharya S et al. Learning from an outbreak: ESBL- the essential points. *Indian J Med Microbiol*. 2004;22(4):255-7.
- Shannon KE, Lee D-Y, Trevors JT, Beaudette LA. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci Total Environ*. 2007;382:121–129.
- Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA et al. *Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Clin Infect Dis*. 1997;25(3):584-99.
- Silva ML, Matte GR, Matte MH, Germano P. Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in Sao Paulo, Brazil. *J Food Safety*. 2008;30(1):94-110.
- Singh L, Ram MS, Argawal MK, Alam SI. Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains and their evaluation for biodegradation of night soil. *World J Microbiol Biotechnol* 2001;16:625-630.
- Sinha S, Shimada T, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Takeda Y et al. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrheal cases in Kolkata, India. *J Med Microbiol* 2004;53:527-534.
- Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ et al. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;32:243–247.
- Souza JA, Silva-Souza AT. *Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. Braz Arch Biol Technol*. 2001;44(4):373-81.
- Stanier RY. A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus*. *J. Bacteriol*. 1943;46:213–214.
- Sturenburg E, Mack D. Extend-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47:273-295.

- Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos. São Paulo: Atheneu; 2001.
- Talavera BMM, Benassi FO, Von Specht MH, Quiroga MI, Garcia MA, Pucciarelli AB et al. Susceptibilities to carbapenems and presence of *cphA* gene on food-borne *Aeromonas*. Braz Arch Biol Technol. 2006;49(4):677-82.
- Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Gumeno C, Perez-Pomata MT, Bisquert J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25(4):235-41.
- Thelestam M, Lyungh A. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha- and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. Inf. Immunity. 1981;34(3):949-956.
- Tokajian S, Hashwa F. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* spp. isolated from a chlorinated intermittent water distribution system in Lebanon. J Water Health. 2004;2(2):115-22.
- Trakhna F, Harf-Monteil C, AbdelNour A, Maaroufi A e Gadonna-Widehem P. Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method. Letters in Applied Microbiology. 2009;49:186–190.
- Tristram SG, Hawes R, Souprounov J. Variation in selected regions of blaTEM genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):481-4.
- Tulsidas H, Ong YY, Chan KC. *Aeromonas hydrophila* bacteraemia and portal pyaemia. Singapore Med J. 2008;49(4):346.
- Turner PJ. Use of a program-specific website to disseminate surveillance data obtained from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;53(4):273-9.
- Uehara FI. Concordância entre perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2008.
- Vally H, Whittle A, Cameron S, Dowse GK, Watson T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Wound Infections Associated with Mud Football. Clin Infect Dis. 2004;38(8):1084-9.

- Villari P, Pucino A, Santagata N, Torre I. A comparison of different culture media for the membrane filter quantification of *Aeromonas* in water. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29:253–257.
- Villarruel-López A, Fernández-Rendón E, Mota-de-la-Garza L, Ortigoza-Ferado J. *Water Environment Research*. 2005. Volume 77, Number 7, p. 3074-3079.
- Vivekanandha G, Savithamani K, Hatha AAM, Lakshmanaperumalsamy P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology* 76 (2002) 165–168.
- Von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*. 2007;35 (2):59-64. Review.
- Von Graevenitz A, Mensch AH. The genus *Aeromonas* in human bacteriology: report of 30 cases and review of the literature. *N Engl J Med*. 1968;278:245–249.
- Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol*. 2004;50(3):137-65.
- Walsh TR, Neville WA, Haran MH, Tolson D, Payne DJ, Bateson JH, MacGowan AP, Bennett PM. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo- β -lactamase. *Imis*, from *Aeromonas veronii* bv *sobria*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:436-439.
- Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TM et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1048-54.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P, Ambler class A extended-spectrum betalactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;47(8):2385-92.
- Williams JD. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*. 1999;12:3-7.
- Xu XJ, Ferguson MR, Popov VL, Houston CW, Peterson JW, Chopra AK. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infect Immun*. 1998;66:3501–9.
- Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(6):1148-1151.

- Yu CP, Farrell SK, Robinson B e Chu KH. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and aerolysin genecontaining *Aeromonas* in source, intermediate, and finished drinking water. *Environmental Science and Technology*. 2008;42(4), 1191–1200.