UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
ÁREA DE BROMATOLOGIA

Aeromonas DO GRUPO *A. hydrophila* EM AMOSTRAS DE
HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS NA
CIDADE DE SÃO PAULO

SUSANA MARTA ISAY SAAD

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. **Sebastião Timóteo**

SÃO PAULO
1993

Ao meu marido **Roberto**
pelo carinho
e compreensão

aos meus filhos **Sandra e Fabio**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), como parte de um projeto de pesquisa envolvendo as bactérias do gênero *Aeromonas* e com auxílio de uma Bolsa de Estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. *Sebastião Timo Iaria*, pela orientação, dedicação e os momentos construtivos de convivência
- A Prof. Dra. Sirdéia Maura Ferrone Furlanetto, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo apoio e amizade
- A Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo estímulo e amizade
- Ao Prof. Dr. Omar Miguel, do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, pela análise estatística efetuada
- A Profa. Dra. Maria Lúcia Cerqueira Campos, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e à Profa. Dra. Mariza Landgraf, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio.
- A Profa. Dra. Marilene De Vuono Camargo Penteado, ao Prof. Dr. Jorge Mancini Filho e a todos os docentes, funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade e o prazer de fazer o curso de pós-graduação
- Ao Prof. Dr. Flávio Alterthum, à Profa. Dra. Heloiza R. Barbosa, à técnica Rosa Carvalho Gamba, à pós-graduanda, Fabiana Cristina Pimenta e a todos os docentes, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por inúmeras contribuições dadas durante a realização deste trabalho

- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) pela Bolsa de Estudos concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho

- As bibliotecárias Carmelina de Facio, Isabel Tereza Lopes de Andrade, Maria do Socorro B. Rocha, Marily Antonelli Graeber, Rita de Cássia Ortega Borges e Tereza Cristina Souto Maior, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e Moema Rodrigues dos Santos, do Conjunto das Químicas da USP por contribuições na busca e na enumeração correta das referências bibliográficas

- A Profa. Dra. Maria Regina Fernandes de Toledo, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina, pelo fornecimento de cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*

- A Maria José Silveira, do Laboratório de Análises Clínicas Fleury, pelo fornecimento de uma cepa hemolítica de *Staphylococcus aureus* para o CAMP-test

- A D. Norma P. Timóteia e família pela consideração

Susana Marta Isay Saad

Aeromonas DO GRUPO *A. hydrophila* EM AMOSTRAS DE HORTALIÇAS
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE SÃO PAULO

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, de de 1993

SUMARIO

	página
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Características gerais das <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i>	1
2. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> em águas e alimentos.....	6
3. Patogenicidade das <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i>	13
4. <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> como causadoras de gastroenterite.....	16
5. Fatores de virulência das <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i>	23
6. <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> e a segurança de alimentos.....	29
II. OBJETIVOS.....	35
III. MATERIAL E METODOS.....	36
1. Colheita das amostras de hortaliças para análise.....	36
2. Preparo das amostras e de suas diluições.....	36

3. Contagem e teste de presença/ausência de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i>	37
3.1 Semeadura inicial das amostras.....	37
3.2 Contagem e isolamento de colônias suspeitas.....	38
3.3 Identificação das cepas isoladas.....	39
3.3.1 Identificação presuntiva.....	39
3.3.2 Identificação definitiva.....	40
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
V. CONCLUSÕES.....	84
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	87
VII. RESUMO.....	101
VIII. SUMMARY.....	103
IX. ANEXO - Preparo dos meios de cultura, soluções e reagentes.....	105

INDICE DE FIGURAS, GRAFICOS E TABELAS

	página
Figura 1 Fluxograma de isolamento e identificação presuntiva de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> a partir de hortaliças.....	49
Tabela 1 Provas bioquímicas e microscópicas utilizadas na identificação das cepas isoladas de amostras de hortaliças comercializadas em São Paulo e resultados esperados para diferentes espécies de <i>Aeromonas</i>	50
Tabela 2 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> e espécies isoladas, em amostras de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo.....	71
Tabela 3 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> e espécies isoladas, em amostras de alface analisadas.....	74
Tabela 4 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> e espécies isoladas, em amostras de agrião analisadas.....	75
Tabela 5 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de <i>Aeromonas</i> do grupo <i>A. hydrophila</i> e espécies isoladas, em amostras de escarola analisadas.....	76
Tabela 6 Variáveis estatísticas das contagens de <i>Aeromonas</i> spp. para as diferentes hortaliças analisadas, em UFC/g.....	77
Tabela 7 Distribuição das amostras de diferentes hortaliças e respectivos percentuais segundo a contagem de <i>Aeromonas</i> spp.....	78
Gráfico 1 Distribuição dos percentuais de amostras de diferentes hortaliças segundo a contagem de <i>Aeromonas</i> spp. por grama.....	79
Tabela 8 Positividade absoluta e relativa das amostras de hortaliças analisadas frente às duas metodologias de isolamento de <i>Aeromonas</i> spp. utilizadas.....	80

Tabela 9 Cepas isoladas e confirmadas como <i>Aeromonas</i> spp. e respectiva percentagem para cada 10 amostras e para o total de amostras de hortaliças analisado.....	81
--	----

Tabela 10 Número e percentagem das amostras de hortaliças positivas para <i>Aeromonas</i> spp. e para as suas diferentes espécies isoladas, distribuídas segundo os tipos de hortaliças analisadas.....	82
--	----

Tabela 11 Positividade nos testes bioquímicos e microscópicos utilizados na identificação das 4 cepas de <i>A. hydrophila</i> e 138 de <i>A. caviae</i> isoladas de amostras de hortaliças.....	83
--	----

I. INTRODUÇÃO

1. Características gerais das *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*

As bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* têm sido alvo de reclassificação por parte de diversos pesquisadores, na tentativa de elucidar a posição desses microrganismos e sua relação com os de outros gêneros com características similares (JOSEPH et al., 1987). Segundo o Manual Bergey (POPOFF, 1984), elas são classificadas na família *Vibrionaceae*, descrita por BAUMANN & SCHUBERT (1984). No entanto, COLWELL et al. (1986), baseados em estudos sobre genética molecular, propuseram a sua inclusão em uma nova família, *Aeromonadaceae*.

Esses microrganismos são divididos, de forma geral, em dois sub-grupos, compreendendo um deles as *Aeromonas* móveis, incluindo as *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, e o outro, as imóveis, constituído pela *A. salmonicida*, sub-espécies *salmonicida*, *achromogenes* e *masoucida* (POPOFF, 1984). As três primeiras espécies citadas têm sido denominadas por vários autores como "grupo *A. hydrophila*" (BUCHANAN & PALUMBO, 1985). Entretanto, JOSEPH et al. (1988) recomendam a denominação por espécie, a fim de que informações emergentes possam ser utilizadas de uma maneira mais específica.

Cada uma das três espécies de *Aeromonas* móveis abrange mais do que um grupo de hibridização de DNA. Assim sendo, a *A. hydrophila* abrange três grupos de hibridização, a *A. caviae*, dois e a *A. sobria*, pelo menos dois grupos (POPOFF, 1984). Por outro lado, SAKAZAKI & SHIMADA (1984) consideram *A. sobria* como sinônimo de *A. hydrophila*, baseados na semelhança entre os DNA dessas duas espécies, observada em uma pesquisa não publicada, por eles realizada.

Com relação à divisão das *Aeromonas* móveis em espécies, BARER et al. (1986) sugerem a possibilidade da existência de um quarto grupo distinto dessas bactérias, o qual poderia constituir uma nova espécie ou uma subespécie.

HICKMAN-BRENNER et al. (1987, 1988), por sua vez, sugerem a inclusão de duas espécies adicionais de *Aeromonas* móveis às já existentes. A primeira dessas espécies sugeridas por HICKMAN-BRENNER et al. (1987) é a *A. veronii*, diferenciada das outras espécies de *Aeromonas* por se revelar positiva na prova de descarboxilação da ornitina e, negativa na da hidrólise da arginina. A segunda dessas espécies sugeridas por HICKMAN-BRENNER et al. (1988) é a *A. schubertii*, caracterizada pela não utilização do manitol.

Entretanto, HICKMAN-BRENNER et al. (1987) relatam que muitas cepas de referência e de coleções de laboratório eram altamente relacionadas à *A. veronii*, apesar de serem lisina e arginina positivas e ornitina negativas. Baseados neste fato, CARNAHAN et al. (1991) afirmam que as cepas de *A. sobria* de origem clínica devem ser consideradas como uma

biovariedade de *A. veronii*. Estes pesquisadores propõe que essas cepas sejam denominadas *A. veronii* bv. *sobria* e que as cepas positivas para a descarboxilação da ornitina sejam denominadas *A. veronii* bv. *veronii*.

As *Aeromonas* são bacilos Gram-negativos, com extremidades arredondadas ou cocóides, podendo se apresentar isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. As *Aeromonas* móveis podem variar, consideravelmente, de forma e tamanho, sendo que algumas cepas se apresentam como bacilos curtos, enquanto outras produzem formas finas ou até filamentosas (POPOFF, 1984).

Com exceção da *A. salmonicida*, as *Aeromonas* spp. são móveis por um único flagelo polar, podendo sob determinadas condições, como por exemplo em culturas jovens em meios sólidos, formar flagelos laterais. São facultativamente anaeróbias, produzem oxidação e fermentação da glicose, utilizam carboidratos com produção de ácido ou ácido e gás, reduzem nitrato a nitrito e são produtoras de oxidase e catalase; são resistentes ao agente vibriostático O/129 - 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (POPOFF, 1984) em testes realizados com discos de papel de filtro impregnados com 10 e 150 ug (WEST & COLWELL, 1984).

As *Aeromonas* imóveis multiplicam-se em temperaturas de 5 a 35°C, sendo a faixa ótima a de 22 a 25°C. Por outro lado, para as móveis a temperatura ótima de crescimento é de 28°C, a máxima de 38 a 41°C e algumas cepas podem desenvolver-se a 5°C (POPOFF, 1984). A esse respeito, um

$a_w \text{ mín} = 0,97$

estudo realizado por PALUMBO et al. (1985b), revelou que cepas de origem clínica de *A. hydrophila* eram, em sua maioria, capazes de crescer a 4-5°C e a 42°C.

Assim, é importante salientar que as *Aeromonas* spp. têm características de bactérias psic^{tr}ótróficas, dado que podem multiplicar-se não só em temperatura ambiente, mas também sob refrigeração. Essa constatação é bastante enfatizada por PALUMBO (1986), o qual destaca a *A. hydrophila*, assim como *Clostridium botulinum* tipo E, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Listeria monocytogenes* como patógenos que põe em risco a segurança de alimentos mantidos sob refrigeração.

Essa característica psic^{tr}ótrófica das *Aeromonas* spp. pode assumir dimensões ainda maiores, tendo em vista que, segundo BUCHANAN (1984), estimativas sugerem que 13% dos casos relatados de gastroenterite poderiam ser atribuídos à *A. hydrophila*. No caso específico dos Estados Unidos, 35 a 40% das toxinfecções alimentares são consideradas como tendo etiologia desconhecida (BUCHANAN, 1984).

Diversos meios de cultura têm sido utilizados para o isolamento de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*. JOSEPH et al. (1988) fazem uma revisão, enumerando os diferentes meios de isolamento existentes, bem como os trabalhos onde os mesmos são descritos. Pesquisadores vêm utilizando diversos meios de cultura para o isolamento dessas bactérias a partir de alimentos. O ágar amido-ampicilina, elaborado por PALUMBO et al. (1985a) tem sido muito utilizado para este fim

(CALLISTER & AGGER, 1987; OKREND et al., 1987; STERN et al., 1987; LEITAO & SILVEIRA, 1991). Outros meios que têm sido utilizados são o ágar xilose-desoxicolato-citrato (HUNTER & BURGE, 1987), o ágar Mac Conckey manitol-ampicilina ou xilose-ampicilina (OKREND et al., 1987), o ágar sangue com ampicilina (OKREND et al., 1987; FRICKER & TOMPSETT, 1989), o ágar peptona-extrato de carne-glicogênio (OKREND et al., 1987; ABEYTA et al., 1989), o meio Rimler-Shotts (TERNSTROM & MOLIN, 1987) e Rimler-Shotts modificado (ABEYTA et al., 1986, 1989), o ágar verde-brilhante com sais biliares (NISHIKAWA & KISHI, 1988), o ágar Mac Conckey (FRICKER & TOMPSETT, 1989; ABEYTA et al., 1989) e o ágar Wagatsuma modificado (ABEYTA, 1989). Podem ainda ser empregados os meios denominados para *Aeromonas*, utilizados por FRICKER & TOMPSETT (1989), KIROV et al. (1990), IBRAHIM & Mac RAE (1991) e KROVACEK et al. (1992a).

As *Aeromonas* móveis podem ser isoladas através da semeadura direta em ágar seletivo ou após enriquecimento. O caldo tripticase-soja, o caldo triptona, o caldo Rimler Shotts modificado e a água peptonada alcalina são alguns meios de enriquecimento utilizados. Segundo VARNAN & EVANS (1991), o caldo tripticase-soja adicionado de ampicilina é o mais utilizado, embora muitos pesquisadores prefiram a água peptonada alcalina, dada a possível presença de cepas sensíveis à ampicilina.

2. Ocorrência de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* em águas e alimentos

ABEYTA Jr. & WEKELL (1988) relatam que as *Aeromonas* spp. têm sido isoladas de diversas fontes, principalmente águas, incluindo águas de bebida tratadas e não tratadas. ABEYTA Jr. & WEKELL (1988) citam estudos que demonstraram que o tratamento à base de cloro, de águas de abastecimento, eliminavam coliformes e *E. coli*, mas não *Aeromonas* spp.

Segundo ABEYTA Jr. & WEKELL (1988), as *Aeromonas* spp. também podem estar presentes em águas salinas, embora sua presença no mar seja apenas transitória, penetrando nesse ambiente por meio de rios ou esgotos, onde essas bactérias têm-se demonstrado muito frequentes (MONFORT & BALEUX, 1990; ARAUJO et al., 1991; POFTE & OP de BEECK, 1991).

HAZEN et al. (1978), por outro lado, afirmam que, embora a *A. hydrophila* não seja considerada uma bactéria marinha, seu estudo em águas de diversos regiões dos Estados Unidos indica que a *A. hydrophila* é encontrada naturalmente em sistemas marinhos, na interface com águas doces.

BURKE et al. (1984c, 1984d), na Austrália, verificaram a existência de um paralelismo entre o isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de fezes de casos clínicos e sua presença na água de abastecimento, tanto clorada (BURKE et al., 1984c) quanto não clorada (BURKE et al., 1984d). No entanto, na região onde a água de abastecimento era clorada, havia uma ocorrência maior de *Aeromonas* spp. no verão, tanto nas fezes quanto na água (BURKE et al., 1984c), enquanto que

na região onde a água de abastecimento não era clorada, a obtenção de isolamento de cepas, tanto de casos clínicos quanto de amostras ambientais, continuava no outono e no inverno (BURKE et al., 1984d).

Assim, BURKE et al. (1984d) sugerem que pode haver uma relação entre a presença de cloro e a ocorrência de *Aeromonas* spp. em épocas diferentes do ano, ao invés de uma relação entre essa ocorrência e a temperatura do ambiente.

Em outra pesquisa, BURKE et al. (1984b) verificaram que, embora a distribuição de diversas características bioquímicas diferiam em cepas de origem clínica e ambiental, muitas das cepas isoladas de águas tinham propriedades relacionadas à virulência, idênticas às das cepas de origem clínica.

WADSTRÖM & LJUNGH (1991) sugerem que a alta resistência revelada por determinadas cepas de *Aeromonas* a diversos agentes desinfetantes e a outros compostos químicos e antibióticos, pode ser responsável pela seleção desse patógeno, tornando-o capaz de crescer em determinados habitats aquosos.

WADSTRÖM & LJUNGH (1991) citam um surto de gastroenterite aguda, ocorrido no sul da Suécia em 1990, causado por água de uma fonte contaminada, envolvendo, no mínimo, 180 adultos jovens.

KROVACEK et al. (1992b), também na Suécia, isolaram *Aeromonas* spp. de 23 (85%) de 27 amostras de água potável

analisadas, obtidas de três sistemas de distribuição municipal diferentes.

No Brasil, NEVES et al. (1990) analisaram 50 amostras de água doce e salgada, poluídas e não poluídas, obtendo positividade para *Aeromonas* spp. de 52% .Por outro lado, ressaltam que nas amostras de águas não poluídas não detectaram a presença dessas bactérias.

Entretanto, *Aeromonas* spp. têm sido encontradas em outras fontes, como peixes e moluscos, os quais servem de alimento ao homem (ABEYTA Jr., 1988). Com relação aos moluscos, MARTINEZ-MANZANARES et al. (1991), na Espanha, observaram maior presença de *A. hydrophila* durante a primavera, em relação às outras estações do ano.

LEUNG et al. (1992) obtiveram contagem de *Aeromonas* spp. significativamente mais alta nas vísceras de peixes (bagres, peixes-gato) do que na água e nos sedimentos de seus tanques de criação, salientando o risco que esse fato representa quanto à possível contaminação cruzada na etapa de evisceração durante o processamento.

Vários autores em diversos países têm constatado a presença de *Aeromonas* spp. em diversos tipos de alimentos de origem animal e vegetal. Assim, nos Estados Unidos, PALUMBO et al. (1985a) detectaram bactérias móveis do gênero *Aeromonas*, particularmente *A. hydrophila*, em peixes e frutos do mar, leite cru, carnes de aves e carnes vermelhas, assim como OKREND et al. (1987) em carnes bovina, suína e de aves. Um estudo realizado pela Food and Drug Administration (FDA,

1985) citado por ABEYTA Jr. & WEKELL (1988) revelou a presença de *Aeromonas* spp. em 50% das amostras de leite cru analisadas. CALLISTER & AGGER (1987) isolaram *A. hydrophila* e *A. caviae* de diversos produtos de origem vegetal, incluindo alface de 4 variedades, salsa, espinafre, chicória, aipo, escarola, brotos de alfafa, couve e brócolos.

BARNHART et al. (1989), também nos Estados Unidos, isolaram *A. hydrophila* de 98% das carcassas de aves analisadas de uma linha de processamento e de 92% das amostras de água de resfriamento. Segundo estes autores, o resfriamento com água e a lavagem resultaram em uma redução significativa do número de *A. hydrophila* nas carcassas, enquanto que o armazenamento por 48 horas sob refrigeração resultou em um aumento significativo do número dessa bactéria. Nesse estudo, os autores são de opinião de que as cepas isoladas das carcassas podem ter sido de origem intestinal e que a etapa de evisceração foi a causa provável de contaminação.

FRICKER & TOMPSETT (1989), na Inglaterra, isolaram *Aeromonas* de 286 (50,8%) amostras de um total de 563 analisadas de diversos tipos de alimentos. Com relação à positividade para cada tipo de alimento analisado, 69 (79,3%) de um total de 87 amostras de carnes de aves, 17 (38,6%) de 44 de carne bovina, 21 (32,3%) de 65 de carne suína, 107 (84,2%) de 127 de vísceras, 15 (31,9%) de 47 de peixes, 36 (37,5%) de 96 de carnes cozidas e 21 (21,6%) de

um total de 97 amostras de saladas pré-preparadas revelaram a presença de *Aeromonas* spp.

Esses pesquisadores salientam que, embora as vísceras cruas e as carnes de aves tenham apresentado maior positividade para *Aeromonas* spp., a proporção relativamente alta de amostras contaminadas de carnes cozidas e de saladas pré-preparadas leva a crer que esses alimentos podem ser importantes fontes de infecção para o homem, por não sofrerem tratamento térmico posterior. Os autores também sugerem que, como existem evidências crescentes de que algumas cepas de *Aeromonas* spp. podem causar diarreia em seres humanos, é provável que alimentos não cozidos ou que sofram contaminação cruzada atuem como fontes de infecção. X

HUNTER & BURGE (1987), também na Inglaterra, isolaram *A. caviae* de 3 (4,5%) amostras de sorvete de um total de 64 analisadas. Eles atribuíram o aparecimento dessas bactérias no sorvete possivelmente à sua presença em águas cloradas.

IBRAHIM & Mac RAE (1991), na Austrália, determinaram a presença de *Aeromonas* spp. e *Listeria* spp. em 150 amostras de leite de vaca cru e em um total de 150 amostras de carne, sendo 50 de origem bovina, 50 de cordeiro e 50 de carne suína. Verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em 27% das amostras de leite, em 60% das de carne bovina, em 58% das de carne de cordeiro e em 74% das de carne suína.

MAJEED et al. (1989), também na Austrália, estudando carne de cordeiro, analisaram 15 amostras de carne picada, 17 de carne moída, 12 de rim e 10 de fígado, obtendo

positividades para *Aeromonas* spp. de 53% ,65% ,67% e 50% , respectivamente.

HUDSON & de LACY (1991), na Nova Zelândia, determinaram a presença de *Aeromonas* móveis em 396 amostras de alimentos, os quais constavam, principalmente, de carnes prontas, alimentos contendo moluscos e peixes, embutidos cárneos pré-cozidos, saladas de repolho picado e outras verduras, produtos de confeitaria e alguns alimentos crus, como peixes, moluscos e carnes. Os alimentos que apresentaram maiores positividades para *Aeromonas* móveis foram os moluscos, carnes de cordeiro prontas (cozidas), peixes, carne suína, embutidos cárneos e carnes bovinas prontas, ou seja, de 66% , 60% , 34% , 28% , 23% e 21% ,respectivamente.

Em moluscos, esses autores obtiveram positividade para *Aeromonas* móveis de 58% e 79% em 48 amostras de alimentos prontos e 19 a serem cozidos, respectivamente. Em peixes, positividades de 35% e 33% em 23 amostras de alimentos prontos e 9 a serem cozidos. Quanto à carne suína, as positividades obtidas foram de 27% em 63 amostras de alimentos prontos e 32% em 19 a serem cozidas. Em outras amostras de alimentos, constituídas de patês, saladas, frangos cozidos, verduras prontas para o consumo e mortadela, as positividades foram de 14% , 10% , 8% , 7% e 7%, respectivamente.

KNOCHEL & JEPPESEN (1990), na Dinamarca, analisaram alimentos de diversos tipos e origens. Dentre os alimentos crus, verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em 25% de 40

amostras de carne moída analisadas, em 60% de 5 de carne moída na forma de "steak tartare" e em 75% de 12 amostras de peixes moídos. Com relação aos alimentos processados e/ou submetidos ao aquecimento, eles constataram a presença de *Aeromonas* spp. em 5% de 236 amostras de carnes preparadas analisadas, em 5% de 43 de frutos do mar preparados, em 10% de 177 de saladas com maionese, em 6% de 177 de bolos e de sobremesas contendo creme, em 50% de 6 de creme batido e em 23% de 26 amostras de creme na forma de "foam pistols".

Apesar da ocorrência relativamente baixa em alimentos preparados, KNOCHEL & JEPPESEN (1990) salientam que em diversas ocasiões foram detectadas contagens maiores que 10^5 UFC/g de *Aeromonas* spp. produtoras de hemolisina.

KROVACEK et al. (1992a), na Suécia, verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em 10 das 24 amostras de alimentos analisadas (42%). Esses autores isolaram *Aeromonas* spp. de carnes de aves, peixes, carne bovina e suína e não detectaram a presença dessas bactérias em amostras de hortaliças e de leite cru.

A maioria das cepas por eles isoladas revelaram-se produtoras de diversos fatores de virulência, como hemolisina, citotoxina, toxina citotônica e proteases e 2 de 13 cepas produziram enterotoxina, com resposta positiva em alça ligada de coelho.

NISHIKAWA & KISHI (1988), no Japão, analisaram amostras de alimentos de diversos tipos, de fezes humanas diarréicas e não diarréicas e de águas. Observaram a presença de

Aeromonas spp. em 22 (66,7%) das 33 amostras de peixes de água salgada coletadas no verão, em 1 (7,7%) das 13 amostras de peixes de água salgada obtidas no inverno, em 6 (100%) das 6 amostras de peixe de água doce, em 22 (51,2%) das 43 de hortaliças e em 37 (77,1%) das 48 de produtos de carne.

No Brasil, LEITÃO & SILVEIRA (1991) isolaram *Aeromonas* spp. de 77,6% das amostras de origem marinha e 77,8% das de origem terrestre. As amostras de origem marinha analisadas foram constituídas de 19 de água, 5 de moluscos, 19 de crustáceos e 15 de peixes, sendo a positividade para essas bactérias de 63,1% , 100% , 78,9% e 86,7% , respectivamente. As amostras de origem terrestre foram compostas de 15 de água de rios, 15 de hortaliças e 15 de peixes de água doce, sendo a positividade para *Aeromonas* spp. de 100% , 66,7% e 66,7% , respectivamente.

3. Patogenicidade das *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*

Quanto à patogenicidade das bactérias do gênero *Aeromonas*, a *A. salmonicida* não é considerada patogênica para o homem, porém é o agente causal da furunculose em peixes, doença esta que aparece, particularmente, em salmões e trutas (POPOFF & LALLIER, 1984).

As *Aeromonas* móveis são bastante conhecidas como agentes patógenos para anfíbios (RIGNEY et al., 1978), peixes (SHOTTS et al., 1972; MILLER & CHAPMAN, 1976), cobras (HEYWOOD, 1968), répteis (MARCUS, 1971; SHOTTS et al., 1972;

GORDEN et al., 1979), vacas (WOHLEGEMUTH et al., 1972), pássaros (KORBEL & KOSTERS, 1989) e homem (von GRAEVENITZ & MENSCH, 1968; DAVIS et al., 1978; ALTWEGG & GEISS, 1989; GHENGHESH, 1989).

Embora as primeiras cepas de *Aeromonas* tenham sido descritas já na última década do século XIX, a *A. hydrophila* só foi isolada de material humano pela primeira vez em 1937 por Miles e Halnan e sua patogenicidade só foi estabelecida em 1955 por Caselitz, que a denominou *Vibrio jamaicensis* (von GRAEVENITZ, 1987). Com o passar do tempo, sua importância em termos de patogenicidade foi aumentando, sendo que o número de pesquisas sobre o assunto atingiu um ponto máximo nos últimos dez anos.

Von GRAEVENITZ & MENSCH (1968) e DAVIS et al. (1978) fizeram revisões bibliográficas e descrições de casos que demonstram a patogenicidade das *Aeromonas*, particularmente da *A. hydrophila*, em humanos.

Von GRAEVENITZ & MENSCH (1968) sugerem a existência de uma relação direta entre a doença diarréica e a presença de um número elevado de *Aeromonas* nas fezes, atribuindo, ainda, a esses microrganismos a capacidade de causar celulite e septicemia, além de salientarem a necessidade de se verificar o seu papel nas infecções hospitalares.

DAVIS et al. (1978) ressaltam a capacidade que as bactérias do gênero *Aeromonas*, especialmente a

A. hydrophila, possuem, de provocar sérias infecções no homem e a maior susceptibilidade de indivíduos com algum tipo de comprometimento imunológico.

KETOVER et al. (1973), por sua vez, publicaram um estudo sobre o papel da *A. hydrophila* nas septicemias nosocomiais. Segundo esses pesquisadores, 9 pacientes recebendo tratamento contra cancer no "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center" desenvolveram septicemia causada pela *A. hydrophila*, sendo que 5 apresentavam lesões na pele, 2 dos quais com lesões semelhantes às do ectima gangrenoso, normalmente causado pela *Pseudomonas aeruginosa*.

Em estudos mais recentes, ALTWEGG & GEISS (1989) e por GHENGHESH (1989) reúnem descrições de diversos casos de infecções causadas por bactérias do gênero *Aeromonas*.

JIANG et al. (1991), analisando a resposta intestinal secretória de imunoglobulina A (sIgA) de estudantes americanos em viagem ao México, observaram que 11 de um total de 12 indivíduos com diarreia por *A. sobria* ou *A. hydrophila* tinham seu título de sIgA contra a cepa infectante, no mínimo, quadruplicado.

SHILKIN et al. (1968) enumera^m três maneiras pelas quais as espécies de *Aeromonas* podem afetar os seres humanos, ou sejam: "primeira, como uma infecção entérica de variada severidade; segunda, como uma infecção localizada; terceira,

como uma septicemia, a qual é sempre séria e às vezes fatal".

ALTWEGG & GEISS (1989) enumeram infecções que podem ser causadas por bactérias do gênero *Aeromonas* a saber: "septicemia, meningite, celulite, fasciite necrotizante, ectima gangrenoso, pneumonia, peritonite, conjuntivite, úlcera da córnea, endoftalmite, osteomielite, artrite supurativa, miosite, abscesso hepático, abscesso subfrênico, colecistite e/ou colangite ascendente, infecção do trato urinário, endocardite, infecções do ouvido, nariz e garganta, balanite, etc".

4. *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* como causadoras de gastroenterite

A afirmação de que bactérias do gênero *Aeromonas* poderiam causar distúrbios intestinais foi feita pela primeira vez por CASELITZ (1958) e confirmada por MARTINEZ-SILVA et al. (1961), após um estudo das fezes de 9 recém-nascidos acometidos de gastroenterite. *Aeromonas* spp. foram isoladas de 6 casos, ocorrendo a morte de um bebê, para o qual a cultura de fezes revelou a presença exclusiva de *Aeromonas* spp. (BUCHANAN & PALUMBO, 1985).

No entanto, apenas a partir da década de 70, um número substancial de relatos feitos em muitos países, apontando as *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*, particularmente a *A. hydrophila* e a *A. sobria*, como possíveis causadoras de

gastreenterite em humanos, surgiu na literatura (SANYAL et al., 1975; WADSTROM et al., 1976; RAHMAN & WILLOWGHBY, 1980; ECHEVERRIA et al., 1981; CHAMPSAUR et al., 1982; PITARANGSI et al., 1982; BURKE et al., 1983; JANDA et al., 1983). Nesses relatos foram incluídas as espécies apontadas como agentes das diarreias infantil e do viajante, assim como aquelas suspeitas de serem causadoras de surtos de gastreenterites de origens alimentar e hídrica.

BUCHANAN & PALUMBO (1985) realizaram um estudo de revisão bibliográfica sobre as *Aeromonas* spp. como agentes causadores de gastreenterite. Segundo estes pesquisadores, as análises de amostras fecais de indivíduos com sintomas de gastreenterite confirmam a hipótese de que bactérias do gênero *Aeromonas* são patógenas entéricas significativas e indicam que a *A. hydrophila* é isolada, aproximadamente, na mesma proporção que outros importantes patógenos entéricos como *Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni*.

GRACEY et al. (1982), na Austrália, fizeram um estudo prospectivo, com a duração de 1 ano, em 1.156 crianças com gastreenterite, utilizando como controle o mesmo número de crianças sadias e com sexo e idade equivalentes. Eles isolaram *Aeromonas* spp. das fezes de 118 (10,2%) das crianças com diarreia e de apenas 7 (0,6%) das do grupo controle.

GOODWIN et al. (1983) relataram positividade para *A. hydrophila* enterotoxigênica em fezes de, aproximadamente,

10% de 500 crianças com sintomas diarreicos, enquanto que essa proporção era apenas de 0,4% em um grupo controle assintomático. Esses pesquisadores observaram um perfil semelhante em adultos, embora essas diferenças não fossem tão salientes pelo fato da taxa do microrganismo em questão entre os indivíduos assintomáticos ser maior.

ECHEVERRIA et al. (1983), por sua vez, observaram, em um estudo realizado no período de um ano, uma forte relação entre a ocorrência de gastroenterite e o isolamento de *A. hydrophila* das fezes de indivíduos com diarreia de uma vila da Tailândia e sugeriram que a mosca doméstica seria o provável vetor de transmissão desse microrganismo.

AGGER et al. (1985), em Michigan, nos Estados Unidos, em um estudo realizado num período de 18 meses, isolaram *A. hydrophila* das fezes de 20 (1,1%) dentre 1.797 pacientes com diarreia. Por outro lado, das fezes de 533 indivíduos sadios, usados como controle, não obtiveram o isolamento dessa bactéria. Embora a diarreia por *A. hydrophila* (1,1%) tenha se revelado com frequência muito menor que a causada por *Campylobacter jejuni* (8,3%), a sua ocorrência era apenas um pouco menor que a diarreia por *Salmonella* spp. (1,6%).

MOYER (1987) analisou 3.334 amostras de fezes e observou a predominância do número de isolamentos de *Aeromonas* spp. em relação aos demais patógenos pesquisados. Ele isolou 248 cepas de *Aeromonas* spp. de 238 amostras de fezes de 214 indivíduos com diarreia, sendo que 10 casos

revelaram-se positivos, simultaneamente, a duas espécies de *Aeromonas*.

NISHIKAWA & KISHI (1988) isolaram *Aeromonas* spp. de 11,1% de 262 amostras de fezes diarréicas e de 2,2% de 9.104 de fezes não diarréicas, sendo que a maioria das cepas foi isolada no verão. Paralelamente, não observaram aumento significativo no número de *Aeromonas* spp. em águas de rios e águas de torneiras no verão. Ao mesmo tempo, eles observaram altas contagens de *Aeromonas* spp. em amostras de diversos tipos de alimentos de origem animal e vegetal. Essas observações concomitantes levaram esses pesquisadores a concluir que a infecção por *Aeromonas* spp. poderia ser mais de origem alimentar do que aquática.

MORGAN & WOOD (1988), em uma revisão, enumeram sete estudos realizados em países diferentes. Em seis deles, foi demonstrada uma associação estatisticamente significativa entre a diarréia e a presença de *Aeromonas* spp. nas fezes e o único que não revelou nenhuma associação foi o de FIGURA et al. (1986), na Itália.

KOBAYASHI & OHNAKA (1989) mostraram que *A. hydrophila* e *A. sobria* ocupavam, em 1984, 1985 e 1986, o terceiro lugar como bactérias causadoras de casos esporádicos de diarréia no Japão, cabendo o primeiro lugar ao *C. jejuni* e *C. coli*, o segundo à *P. shigelloides* e os quarto, quinto e sexto lugares ao *Vibrio cholerae* não O1, *V. fluvialis* e *V. mimicus*, respectivamente. Esses autores referem que o número de pacientes com diarréia por *A. hydrophila* e *A.*

sobria aumentou de 387 em 1984 para 653 em 1985 e 799 em 1986.

Com relação aos sintomas das gastroenterites por *Aeromonas* spp., na maioria dos casos observa-se diarreia aquosa, ocorrendo, muitas vezes, dores abdominais, febre e náuseas e outros sintomas adicionais, como vômitos e muco ou sangue nas fezes (JANDA et al., 1983; AGGER et al., 1985; MOYER, 1987).

VARNAN & EVANS (1991) classificam as infecções gastrintestinais causadas por *Aeromonas* spp. em dois tipos distintos, sendo um com sintomatologia semelhante à da cólera. Este, que pode constituir 75% dos casos, é caracterizado pela ocorrência de diarreia com fezes aquosas e os pacientes apresentando febre baixa ou ausente. Crianças com menos de dois anos podem apresentar vômitos e indivíduos de qualquer faixa etária podem se mostrar com dores abdominais e cólicas. Quanto ao segundo tipo, trata-se de uma infecção semelhante à disenteria, em que as fezes apresentam-se muco-sanguinolentas, ocorrendo dores abdominais e, raramente, vômitos.

Deve-se salientar que em casos de gastroenterite por *Aeromonas* spp. podem ocorrer até 20 evacuações diárias, embora o seu número seja muito variável (MOYER, 1987). A faixa etária em que essa infecção aparece com maior frequência é a de crianças com menos de 2 anos de idade (JANDA et al., 1983; AGGER et al., 1985) e a de adultos com

idade superior a 60 anos, podendo atingir, entretanto, pessoas de todas as faixas etárias (VARNAN & EVANS, 1991).

Com relação aos períodos de incubação, são relatados períodos de, no mínimo, 12 horas (MAJEED et al., 1990) e de 6 a 36 horas (TODD et al., 1989). Quanto à sua duração, as gastroenterites por *Aeromonas* spp. são consideradas como sendo geralmente autolimitantes (DAVIS et al., 1978; HOLMBERG & FARMER, 1984). Entretanto, têm sido relatados períodos de duração de 10 dias a 2 semanas (JANDA et al., 1983), de 3 a mais de 10 dias (AGGER et al., 1985) e de 3 dias a 6 meses (MOYER, 1987). Esse último pesquisador observou em casos de gastroenterite, duração de 3 dias a 6 meses, com média de 6 semanas, em infecções por *A. caviae*, de 7 dias a 1 mês, com média de 3 semanas, por *A. hydrophila* e de 7 dias a 3 semanas, com média de 1 semana, em infecções por *A. sobria*.

TODD et al. (1989) enumeram vários episódios de gastroenterite atribuídos a *A. hydrophila*. Dentre eles, três ocorreram na Inglaterra, em 1978, 1984 e 1985, com 3, 1 e 2 casos, respectivamente. O primeiro foi associado ao consumo de ostras, cuja contagem de *A. hydrophila* foi de $2,0 \times 10^4$ UFC/g. Os dois outros, associados ao consumo de camarão cozido, sendo que no episódio de 1984, a contagem dessas bactérias no alimento foi de $5,0 \times 10^4$ UFC/g. Outro episódio, também associado ao consumo de camarões cozidos, ocorreu na Escócia, em 1980, com mais de 20 casos.

AGBONLAHOR et al. (1982), na Nigéria, descrevem um caso de infecção, associado ao consumo de cobras comestíveis que haviam sido congeladas por 3 semanas, cuja contagem de *A. hydrophila* foi de 10^9 UFC/g.

ABEYTA Jr. et al. (1986) citam o registro pela FDA, de aproximadamente 472 casos de gastroenterite, ocorridos em Louisiana em 1982, provocados pela ingestão de ostras cruas provenientes de duas regiões e sem conclusão definitiva quanto ao agente etiológico responsável. No entanto, cerca de um ano após o episódio citado, um outro surto, com 7 casos, envolvendo o consumo de ostras provenientes da mesma região ocorreu em São Petersburgo, Flórida. Tanto as ostras quanto as fezes dos indivíduos doentes revelaram-se positivas para *A. hydrophila*. Devido à semelhança de sintomas e à coincidência quanto à região de proveniência das ostras envolvidas em ambos os surtos, as ostras referentes ao surto de 1982 foram analisadas, após terem sido armazenadas por um ano e meio a -72°C . Destas ostras foram isoladas cepas potencialmente enteropatogênicas de *A. hydrophila* (ABEYTA Jr., 1986).

KOBAYASHI & OHNAKA (1989) citam dois surtos de gastroenterite por *A. hydrophila* ocorridos no Japão, sendo que esta bactéria foi isolada das fezes dos pacientes na fase aguda. O primeiro desses surtos ocorreu em 1975 e foi atribuído ao consumo de "sashimi" por 5 pessoas de uma mesma família, das quais 4 apresentaram diarreia aquosa e dores abdominais. O segundo surto, ocorrido em 1977, em uma escola

primária, envolveu 29 indivíduos de 37 que consumiram um almoço nessa escola, sendo o alimento causador do surto, desconhecido. Dos 29 indivíduos doentes, apenas 8 apresentaram diarreia, sendo a mesma não aquosa, com a presença de muco em 3 e de sangue em 2. Dos 29 indivíduos doentes, foram relatadas dores abdominais em 23, vômitos em 24, febre em 14, náuseas em 8, dores de cabeça em 5 e anorexia em 17.

5. Fatores de virulência das *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*

CALLISTER & AGGER (1987) afirmam que a *A. hydrophila* pode ser considerada um patógeno entérico, uma vez que diversos fatores extracelulares de virulência descritos sustentam as associações epidemiológicas. Através da utilização das técnicas de inoculação em alça intestinal ligada de coelho (SANYAL et al., 1975), inoculação em camundongos lactentes (BURKE et al., 1981), perfusão em jejuno de rato "in vivo" (THELEN et al., 1978) e de culturas de células (CUMBERBATCH et al. 1979), foi verificada a produção de enterotoxina por cepas de *A. hydrophila*. JIWA (1983) sugere que a hidrofobicidade da superfície da célula pode ser um determinante para que a fixação no intestino ocorra.

SANYAL et al. (1975), utilizando o teste em alça intestinal de coelho adulto, verificaram um acúmulo de

fluido de 1,0 a 2,0 ml/cm de comprimento de alça, usando um inóculo de apenas 10^4 *A. hydrophila* viáveis e concluíram que essa bactéria era enteropatogênica. ANNAPURNA & SANYAL (1977) retomaram esse estudo e verificaram que 47 de 50 cepas isoladas do homem e de seu ambiente produziam acúmulo de fluido. As três cepas restantes eram também positivas, porém, após duas passagens seriadas em alça ligada de coelho.

LJUNGH et al. (1977) sugeriram a classificação das enterotoxinas das *Aeromonas* spp. como citotônicas e não como citotóxicas, o que foi evidenciado por CHAKRABORTY et al. (1984) e por CHOPRA et al. (1986).

CUMBERBATCH et al. (1979) testaram 96 cepas de *A. hydrophila* e observaram que 69% eram produtoras de citotoxina e hemolisina e as restantes, negativas.

LJUNGH et al. (1981) afirmaram que a *A. hydrophila* produz uma enterotoxina e duas hemolisinas (alfa e beta), sendo a beta antes denominada aerolisina ou proteína citotóxica.

O teste do camundongo lactente, para a detecção da enterotoxina termooestável da *E. coli* (DEAN et al., 1972), foi considerado, por BURKE et al. (1981), adequado para a pesquisa da produção de enterotoxina por cepas de *A. hydrophila*.

Enquanto ASAO et al. (1984) purificaram uma toxina e a descreveram como hemolisina com atividade enterotóxica e citotóxica, NOTERMANS et al. (1986) concluíram que a *A. hydrophila* produz um outro fator citotóxico sem atividade hemolítica.

BURKE et al. (1984a) observaram relação entre a hemaglutinação e a presença de diarreia em crianças. Assim, esses pesquisadores sugeriram que as hemaglutininas fossem consideradas como fatores de virulência das *Aeromonas* spp., ao lado das enterotoxinas.

HONDA et al. (1985) verificaram a produção de um fator imunologicamente relacionado à enterotoxina colérica por cepas de *A. hydrophila* e de *A. sobria*, que era diferente da hemolisina e da toxina ativa no teste do camundongo lactente. A presença de uma toxina semelhante à colérica também foi demonstrada por SCHULTZ & McCARDELL (1988), utilizando provas genéticas específicas.

CHOPRA et al. (1986) sugeriram a existência de duas enterotoxinas diferentes quanto à sensibilidade térmica, sendo a termolábil interreativa com a anti-toxina da cólera.

STELMA Jr. (1988) sugere que essa toxina não seja denominada de "toxina semelhante à colérica", mas de "fator interreativo com a toxina colérica", como denominado por CAMPBELL & HOUSTON (1985), uma vez que a semelhança dessa

toxina com a colérica pode ser pequena, envolvendo apenas um sítio antigênico em comum.

NISHIKAWA & KISHI (1988) afirmam que a hemolisina não é um fator único de virulência, tendo em vista que, no estudo de MORGAN et al. (1985), cepas hemolíticas não provocaram diarreia em voluntários humanos. Segundo NISHIKAWA & KISHI (1988), embora a maioria das cepas de *A. hydrophila* e de *A. sobria* produzam beta-hemolisina, poucas possuem adesina e apenas uma pequena proporção de humanos possuem células epiteliais intestinais sensíveis à adesina. Segundo os autores, isso poderia explicar a rara ocorrência de surtos por essas bactérias.

CARRELLO et al. (1988) verificaram uma relação entre diarreia e um alto grau de adesão a células HEp-2 e concluíram que a aderência de *Aeromonas* spp. pode ser mediada por pilus.

GRAY et al. (1990) constataram uma relação entre a produção de citotoxina e o efeito de alongamento de células CHO-KI, para cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de animais de criação e de seu ambiente.

BORREGO et al. (1991) verificaram que mais de 90% das cepas de *A. hydrophila* isoladas de peixes, moluscos, água do mar e água doce, eram hemolíticas e produziam sideróforos. Eles sugerem, como um possível papel das hemolisinas na patogenicidade da *A. hydrophila*, o aumento da

biodisponibilidade do ferro para essa bactéria através da lise dos eritrócitos.

CHOPRA et al. (1992) sugerem que o mecanismo de ação da enterotoxina citotônica da *A. hydrophila* envolve a ativação da adenilciclase, resultando na elevação dos níveis intracelulares de AMP cíclico, a exemplo da toxina colérica (CT) e da LT-I da *E. coli*.

Quanto à capacidade de invasão do epitélio intestinal pelas *Aeromonas* spp., LAWSON et al. (1985) e WATSON et al. (1985) verificaram que diversas cepas de *A. hydrophila*, isoladas de fezes, eram invasivas em células HEp-2.

Muitas evidências clínicas e epidemiológicas conduzem à idéia afirmativa sobre a enteropatogenicidade das *Aeromonas* móveis, particularmente de *A. hydrophila*, o que é confirmado em muitos estudos sobre a produção de fatores de virulência, entre eles o de PALUMBO et al. (1989). MORGAN & WOOD (1988), entretanto, sugerem a necessidade da reprodução do quadro de gastroenterite em modelos experimentais, envolvendo primatas ou voluntários humanos. Deve ser salientado que PITARANGSI et al. (1982) e MORGAN et al. (1985), em estudos em primatas e em voluntários humanos, respectivamente, não obtiveram o resultado esperado, após a ingestão de *Aeromonas* spp., mesmo em números elevados (10^7 e até 10^{10} , respectivamente).

MAJEED et al. (1990) aventam a possibilidade das *Aeromonas* enterotoxigênicas causarem gastroenterite, após a

ingestão de toxina pré-formada em alimentos contaminados. Isso explicaria, não apenas os resultados não satisfatórios, tanto em macacos quanto no homem, mas também o curto período de incubação, de até 12 horas, em alguns casos. Os autores salientam, também, o fato da maioria dos casos de gastroenterite por *Aeromonas* spp. terem sido associados à ingestão de alimentos congelados, manipulados de maneira incorreta. Entretanto, TODD et al. (1989), enumeraram casos em que o período de incubação variava de 6 a 36 horas, considerando-os mais longos do que o esperado para intoxicações por toxina pré-formada.

KROVACEK et al. (1991) observaram que cepas de *A. hydrophila* e de *A. sobria*, isoladas de peixe e de água potável, cresciam e produziam citotoxina, enterotoxina e hemolisina a 4°C.

MAJEED & Mac RAE (1991) obtiveram a produção de enterotoxina e hemolisina em extrato de carne a baixas temperaturas por cepas de *A. hydrophila* e *A. sobria*. Eles salientam a importância desses resultados, uma vez que o armazenamento de alimentos sob refrigeração não impede a produção de toxinas pelas *Aeromonas* spp. e um pequeno aumento de temperatura possibilita tal produção mais rapidamente.

ARCHER & KVENBERG (1988) comentam que, apesar das *Aeromonas* spp. possuírem muitos dos mesmos fatores de virulência que outras bactérias patogênicas possuem, falta

alguma peça nesse "quebra-cabeça", que pode estar relacionada a um possível potencial invasivo ou à presença de um fator de colonização.

TODD et al. (1989), por outro lado, consideram que a *A. hydrophila* pode diferir de muitos microrganismos tradicionais, causadores de toxinfecções de origem alimentar. Segundo os autores, é possível que as toxinas e enzimas por ela elaboradas não causem gastroenterite, mas sim, produzam condições de superfície apropriadas que podem facilitar o estabelecimento desses microrganismos no intestino delgado e auxiliar sua adesão e/ou invasão.

WADSTRÖM & LJUNGH (1991), por sua vez, comparam a complexidade do potencial patogênico das *Aeromonas* spp. ao da *E. coli*, sugerindo a existência de microrganismos enterotoxigênicos, enteroinvasivos e enteroaderentes. No entanto, as *Aeromonas* spp. diferem da *E. coli* na medida em que os fatores de virulência podem manifestar-se em conjunto, de uma maneira bastante complexa. Os autores ilustram essa observação através da comparação das manifestações clínicas variadas de gastroenterite causada por *Aeromonas* spp. com as produzidas por *Campylobacter jejuni*.

6. *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e a segurança de alimentos

BUCHANAN e PALUMBO (1985) salientam a necessidade de se verificar o significado da *A. hydrophila* e da *A. sobria* no que se refere à segurança de alimentos. Ao mesmo tempo,

destacam o fato de 56 a 70% das toxinfecções de origem alimentar nos Estados Unidos serem classificadas como sendo de etiologia desconhecida. Segundo esses pesquisadores, o aumento do conhecimento sobre as causas das doenças diarréicas, particularmente no que se refere ao papel das enterotoxinas e a outros fatores de virulência, levou a uma expansão significativa da lista de bactérias classificadas como causadoras em potencial de toxinfecções alimentares. Esses mesmos autores propõe a inclusão de *A. hydrophila* e *A. sobria* como patógenos de importância no que se refere à segurança de alimentos.

Com uma preocupação visível em termos de vida útil de produtos industrializados e o risco que podem representar, particularmente os mantidos sob refrigeração, diversos pesquisadores vêm testando novas maneiras de inibir, injuriar ou destruir diversos tipos de bactérias, especificamente as consideradas psicotró^{sv}ficas. E o que X ocorre no caso das *Aeromonas* spp.

Assim, PALUMBO et al. (1985b) verificaram que a maioria das cepas de *A. hydrophila* por eles testadas resistia a 4% de cloreto de sódio a 28°C e que apenas um pequeno número de cepas crescia a 4°C a uma concentração de cloreto de sódio de 3% . Também verificaram que as cepas de *A. hydrophila* testadas toleravam condições ácidas a 28°C mais do que a 4°C. Os autores comentam que cepas de *A. hydrophila* associadas à gastroenterite humana possuem a capacidade de crescer em alimentos mantidos a temperaturas de

refrigeração, normalmente consideradas adequadas para a prevenção do crescimento de patógenos de origem alimentar. Por outro lado, PALUMBO (1986) ressalta a importância das bactérias psicotróficas, dentre as quais a *A. hydrophila*, salientando a necessidade de uma revisão quanto ao conceito de que uma refrigeração adequada (5°C) garante a segurança de um alimento. A conservação a 5°C apenas retarda o crescimento de vários patógenos que podem estar presentes nos alimentos, assim como ocorre com os microrganismos deteriorantes. O mesmo autor salienta a necessidade de se levar em conta esses conceitos durante a formulação de produtos que serão mantidos sob refrigeração.

PALUMBO et al. (1987), em um estudo sobre a resistência térmica da *A. hydrophila*, concluíram que os tratamentos térmicos recomendados para eliminar *Salmonella* spp. devem ser suficientes para *A. hydrophila*, mas admitiram a necessidade de investigações sobre o significado de subpopulações termoresistentes.

CONDON et al. (1992) estudaram os efeitos da idade da cultura, da pré-incubação a baixas temperaturas e do pH sobre a resistência térmica da *A. hydrophila*. Eles salientam que, apesar dos dados de inativação térmica sugerirem que as etapas normais de processamento de alimentos, como a pasteurização ou o cozimento, são suficientes para eliminar *A. hydrophila*, é recomendável não negligenciar a importância prática da população viável residual.

PALUMBO & BUCHANAN (1988) fizeram uma revisão das diversas medidas de controle do crescimento de *A. hydrophila* em alimentos e de sua destruição através do calor, da irradiação e do uso de produtos químicos.

Trabalhando com verduras contaminadas experimentalmente, BERRANG et al. (1989) verificaram que o armazenamento sob atmosfera controlada, apesar de prolongar o tempo de aceitabilidade subjetiva para o consumo, não afetou significativamente a população de *A. hydrophila*, a qual sobreviveu ou cresceu nas verduras mantidas nessas condições.

FARBER (1991) verificou que a *A. hydrophila* é capaz de crescer a temperaturas de refrigeração a determinados tipos de acondicionamento sob atmosfera modificada. Anteriormente, BLICKSTAD & MOLIN (1983) já haviam observado que o armazenamento sob CO₂ a temperaturas de refrigeração mais elevadas pode aumentar o risco quanto ao desenvolvimento de *Aeromonas* spp.

PALUMBO et al. (1991, 1992b) realizaram uma pesquisa sobre o crescimento de uma cepa de *A. hydrophila* (K144) em condições de aerobiose e anaerobiose. Verificaram que o pH, o cloreto de sódio e o nitrito de sódio podem reduzir o crescimento de *A. hydrophila* quando combinados a baixas temperaturas de incubação e anaerobiose. Porém constataram que algumas variáveis de cultivo que não permitiam o crescimento da *A. hydrophila* em anaerobiose o permitiam em aerobiose (PALUMBO et al., 1992b).

O efeito de conservantes químicos sobre o comportamento da *Aeromonas* spp., por sua vez, também tem sido estudado (GRAM, 1991; MOIR & EYLES, 1992; PALUMBO & WILLIAMS, 1992a).

ARCHER & KVENBERG (1988) salientam a necessidade de se considerar níveis detectáveis de *A. hydrophila* em alimentos destinados a pacientes hospitalizados, portadores de cancer ou a pessoas recebendo tratamento quimioterápico contra o cancer, como perigosos e, provavelmente, pondo em risco a vida dessas pessoas.

No que diz respeito a alimentos destinados a indivíduos sadios, ARCHER & KVENBERG (1988) afirmam que a patogenicidade das *Aeromonas* necessita ser melhor estabelecida, a fim de que se possa tomar medidas regulatórias baseadas em riscos à saúde. No entanto, esses pesquisadores admitem a preocupação, tanto para órgãos fiscalizadores, como para a indústria de alimentos, em termos de potencial de crescimento dessas bactérias à temperatura de refrigeração, frente à alta probabilidade dessas bactérias causarem gastroenterite.

De qualquer modo, por maior que seja a controvérsia em relação ao mecanismo de ação das *Aeromonas* spp. como causadoras de distúrbios gastrintestinais, as diversas linhas de pesquisadores são unânimes em considerar que essas bactérias podem ser agentes potenciais de gastroenterite veiculada por alimentos, devido à sua larga distribuição, aliada à sua natureza psicrotrófica.

O problema das *Aeromonas* spp. serem capazes de crescer a temperaturas de refrigeração, outrora consideradas adequadas para o armazenamento de muitos produtos alimentícios, pode ser ainda mais agravado pela possibilidade dessas bactérias serem capazes de produzir toxinas também a essa temperatura, conforme observado por diversos autores, entre eles MAJEED et al. (1990, 1991) e KROVACEK et al. (1991).

Essa natureza psicrotrofia das *Aeromonas* spp. X produtoras de citotoxinas é de grande interesse para os microbiologistas de alimentos e para os sanitaristas. Isto se deve à ampla presença dessas bactérias em alimentos que podem ser consumidos crus, como verduras, vendidos no varejo, que são armazenados sob refrigeração por um longo período de tempo, inclusive durante seu transporte e comercialização (BEUCHAT, 1991).

II. OBJETIVOS

Com base no exposto no capítulo anterior, pode-se depreender que as bactérias do gênero *Aeromonas*, sobretudo as do grupo *A. hydrophila*, têm sido consideradas, por muitos autores, patógenos emergentes causadores de infecções por vezes graves, incluindo gastroenterites, conferindo a esses microrganismos uma crescente importância.

Assim, tendo em vista que no Brasil, o número de estudos a respeito é extremamente escasso e o risco que hortaliças frequentemente consumidas cruas e em larga escala, como alface, agrião e escarola, podem oferecer, planejou-se a presente investigação, que tem como objetivos:

- 1) Verificar a ocorrência de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* em amostras de alface, agrião e escarola, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, através da contagem dessas bactérias em placas e a sua detecção pelo teste de presença/ausência.
- 2) Comparar as positivities obtidas por ambos os processos de isolamento empregados.
- 3) Identificar as espécies das cepas de *Aeromonas* spp. isoladas.

III. MATERIAL E METODOS

1. Colheita das amostras de hortaliças para análise

Nas condições de consumidor, foram obtidas, no período de fevereiro de 1991 a maio de 1992, 90 amostras de hortaliças, sendo 30 de alface, 30 de agrião e 30 de escarola. Na maioria das vezes, foram colhidas amostras dos três tipos de hortaliças, simultaneamente, no mesmo ponto de venda. Tais amostras foram adquiridas em locais de venda no varejo, incluindo 10 supermercados, 4 feiras-livres, 3 sacolões e 3 quitandas, de 7 bairros situados, em grande parte, na zona oeste da cidade de São Paulo.

Logo após a sua obtenção, as amostras foram levadas para o laboratório e o tempo decorrido entre a sua colheita e o início da análise, na quase totalidade das vezes, não excedeu de 2 horas. Excepcionalmente eram obtidas amostras para serem analisadas na manhã do dia seguinte.

2. Preparo das amostras e de suas diluições

Para a realização das análises, para cada amostra, inicialmente, eram pesados 25 g de folhas visualmente aceitáveis para o consumo e obtidas de várias camadas e colocados em um copo esterilizado de liquidificador, seguido

da adição de 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% esterilizada. Procedia-se a liquidificação por cerca de 3 minutos e, a partir do homogeneizado inicial a 10^{-1} , era preparada uma série de diluições decimais até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente (CALLISTER & AGGER, 1987).

3. Contagem e teste de presença/ausência de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*

3.1 Semeadura inicial das amostras

A fim de proceder a contagem dessas bactérias, na semeadura inicial, eram depositados na superfície de ágar amido-ampicilina (PALUMBO et al., 1985), em placas, 0,1 mL X de cada diluição. Posteriormente, o inóculo era espalhado por toda a superfície do meio, empregando-se um bastão de vidro em "L" esterilizado. O espalhamento do inóculo era feito inicialmente na placa relativa à diluição 10^{-6} e, em seguida, nas diluições subsequentes. As placas, assim semeadas, eram incubadas a 28°C por 24 horas.

Paralelamente, para as mesmas amostras, realizava-se o teste de presença/ausência de *Aeromonas* spp., adicionando 10 mL da primeira diluição de cada amostra (10^{-1}) a um tubo de ensaio correspondente, contendo 10 mL de caldo tripticase-soja em concentração dupla, adicionado de 2 mg/100 mL de ampicilina. Após a inoculação da diluição 10^{-1} da amostra, a concentração de ampicilina era de

1 mg/100 mL de meio. Em seguida, os tubos semeados eram incubados a 28°C por 18-24 horas.

Após a incubação, a partir de cada tubo, era realizada, com alça de níquel-cromo, a passagem em placas de ágar amido-ampicilina por esgotamento, seguida de incubação a 28°C por 24 horas.

3.2 Contagem e isolamento de colônias suspeitas

Após a incubação, realizou-se, em placas com 30 a 300 colônias, a contagem do número de colônias suspeitas, ou seja, de cor amarela a mel e circundada por um halo amarelo no ágar amido-ampicilina e revelando um halo de transparência ao seu redor após a adição de lugol, verificando-se, assim, a utilização do amido e a produção de ácido.

O cálculo presuntivo do número de UFC de *Aeromonas* spp. por grama do alimento foi realizado, multiplicando-se o número de colônias contado pelo fator de diluição correspondente à placa de contagem. A confirmação desse resultado ou a sua correção era feita após a identificação das cepas referentes às colônias isoladas. De cada placa de contagem e de cada placa proveniente do pré-enriquecimento para o teste de presença/ausência, eram isoladas até 5 colônias, com as características descritas.

3.3 Identificação das cepas isoladas

As provas de identificação das cepas isoladas foram selecionadas com base nas recomendações de diversos autores (POPOFF, 1984; BUCHANAN & PALUMBO, 1985; OKREND et al., 1987; ABEYTA Jr. et al., 1989).

3.3.1 Identificação presuntiva

Cada uma das colônias suspeitas isoladas do ágar amido-ampicilina era semeada em tubos com ágar tripticase-soja inclinado e em ágar triplice-açúcar-ferro, os quais eram incubados a 28°C por 18-24 horas.

Após a incubação no ágar triplice-açúcar-ferro, as cepas suspeitas de *Aeromonas* spp. produzem acidificação do ápice, por serem sacarose-positivas, e acidificação da base, por serem glicose-positivas, com ou sem produção de gás. Assim, as colônias que apresentavam esse comportamento no ágar triplice-açúcar-ferro, eram testadas para a produção de oxidase e catalase a partir da cultura em ágar tripticase-soja.

3.3.1.1 Prova da oxidase

Empregando uma alça de platina, transferia-se uma porção da cultura de 24 horas em ágar tripticase-soja, para tiras de papel impregnadas com reagente para oxidase (Difco). A prova era considerada positiva quando havia formação de uma coloração violeta na região da tira onde havia sido aplicada a porção de cultura.

3.3.1.2 Prova da catalase

Por meio de uma alça de níquel-cromo, transferia-se uma porção da cultura de 24 horas em ágar tripticase-soja para uma gota de água oxigenada a 3% , previamente depositada em uma lâmina de vidro. A prova era considerada positiva quando, após suave homogeneinização, observava-se a formação de bolhas de gás.

As cepas positivas para a produção de oxidase e catalase e se revelando com comportamento característico no ágar triplice-açúcar-ferro eram consideradas suspeitas de serem *Aeromonas*. Estas cepas eram cultivadas em ágar tripticase-soja a 28°C por 24 horas e, em seguida, mantidas em temperatura ambiente a fim de serem, posteriormente, submetidas às provas de identificação definitiva.

3.3.2 Identificação definitiva

A partir de culturas em ágar tripticase-soja inclinado a 28°C por 18-24 horas eram feitos esfregaços corados pelo método de Gram e os testes de motilidade, redução de nitrato, produção de indol em água peptonada a 1% , fermentação/oxidação da glicose, coloração de flagelo em cultura em meio sólido, crescimento em caldo nutriente a 37°C, crescimento em meio contendo 0, 3 e 6% de cloreto de sódio, utilização de sacarose, manitol, inositol, salicina e arabinose, produção de gás a partir da glicose, produção de

acetoina (prova de Voges-Proskauer), hidrólise da esculina e utilização da arginina, ornitina e lisina.

3.3.2.1 Coloração de Gram

De cada cepa isolada, partindo-se das culturas em ágar tripticase-soja inclinado a 28°C por 18-24 horas, eram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, a fim de se observar a morfologia bacteriana microscópica, assim como verificar a sua pureza.

As cepas isoladas de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* apresentavam-se como bacilos Gram-negativos de forma e tamanho variáveis, sendo, na maioria das vezes, curtos a cocóides, mas podendo se apresentar como células mais longas e até filamentosas (POPOFF, 1984).

3.3.2.2 Prova da motilidade (TITSLER & SANDHOLZER, 1936)

Para a realização desta prova, as cepas isoladas eram semeadas, por meio de uma agulha de níquel-cromo, em ágar semi-sólido para a detecção da motilidade. O inóculo era introduzido por picada até uma altura equivalente à metade da altura da coluna de ágar. A prova era considerada positiva quando, após a incubação a 28°C, por 24 horas, se observava um crescimento difuso.

3.3.2.3 Prova da redução de nitrato (ICMSF, 1978)

As cepas em identificação eram inoculadas em caldo nitrado, seguido de incubação a 28°C por 48 horas. A seguir, adicionava-se 0,5 mL de solução de ácido sulfanílico (A) e 0,5 mL de solução de alfa-naftilamina (B). A prova era considerada positiva quando ocorria o desenvolvimento de cor vermelha, indicando a presença de nitrito. Em caso de prova negativa, a mesma era repetida, utilizando-se um tempo maior de incubação, de 3 a 5 dias.

3.3.2.4 Prova da produção de indol (ICMSF, 1978)

A verificação da síntese de indol a partir do triptofano, era realizada adicionando-se, vagarosamente, uma pequena quantidade de reativo de Ehrlich, a uma cultura de 24 horas a 28°C em água peptonada a 1%. A prova positiva era indicada pela formação de um anel de cor púrpura.

3.3.2.5 Prova da fermentação / oxidação da glicose (HUGH & LEIFSON, 1953)

Para a realização desta prova, as cepas isoladas eram semeadas, simultaneamente, em dois tubos contendo meio basal OF adicionado de 1% de D-glicose. Um deles era previamente aquecido em banho-maria fervente por

15 minutos e, em seguida, esfriado e adicionado de uma camada de vaselina líquida estéril, a fim de se manter as condições de anaerobiose. A semeadura era feita por picada do meio em profundidade, empregando-se para isto uma agulha de níquel-cromo longa, e a leitura da prova era feita após a incubação a 28°C, por 24 horas.

A utilização da glicose, tanto por mecanismo oxidativo quanto fermentativo, era indicada pela mudança de coloração do meio de cultura de verde para amarelo, consequente à formação de ácido proveniente da degradação da glicose.

3.3.2.6 Coloração de flagelo em cultura em meio sólido (HEIMBROOK et al., 1989)

A fim de que a presença de flagelos polares monotríquios pudesse ser detectada nas *Aeromonas* móveis isoladas, encostava-se, leve e cuidadosamente, uma agulha de níquel-cromo na borda do crescimento bacteriano em ágar tripticase-soja. Em seguida, transferia-se esse material, delicadamente, para uma gota de água destilada, depositada sobre uma lâmina nova, limpa e desengordurada e, a seguir, cobrindo-se, com todo o cuidado, com uma laminula, também nova e limpa.

Após um intervalo de pelo menos 15 minutos de repouso, com seringa e agulha fina, depositava-se o corante de Ryu na borda da laminula, sendo que o mesmo penetrava por capilaridade. Decorrido um intervalo de pelo

menos 30 minutos após a injeção de corante, a preparação era examinada em microscópio óptico comum, com objetiva de imersão, utilizando-se um aumento de 1200 vezes.

3.3.2.7 Crescimento em caldo nutriente a 37°C

As cepas em teste eram inoculadas em caldo nutriente, seguido de incubação a 37°C por 24 horas. A prova era tida como positiva, quando ocorria crescimento.

3.3.2.8 Crescimento em 0, 3 e 6% de cloreto de sódio

As cepas em identificação eram semeadas em tubos com caldo tripticase-soja contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio, a fim de verificar a interferência da ausência (0%) do sal e de sua presença em concentrações de 3% e 6% ,sobre o crescimento da bactéria. No caso da concentração 0% ,foram utilizados também tubos com caldo nutriente, uma vez que este meio de cultura não possui cloreto de sódio, ao contrário do que ocorre com o caldo tripticase-soja, que contém em sua formulação 0,5% desse sal.

Os tubos inoculados eram incubados a 28°C por 24 horas, sendo que na presença de crescimento a uma determinada concentração de cloreto de sódio, a prova em questão era considerada como sendo positiva. Caso contrário era tida como negativa.

3.3.2.9 Utilização de sacarose, manitol, inositol, salicina e arabinose

As cepas isoladas eram cultivadas em tubos contendo caldo base vermelho de fenol adicionado de 0,5% dos diferentes açúcares. A utilização do carboidrato em questão (prova positiva) era detectada pela acidificação do meio, visualizada pela mudança de coloração do meio de vermelha para amarela. As leituras eram realizadas após a incubação a 28°C, por 24 horas.

3.3.2.10 Produção de gás a partir da glicose

As cepas isoladas eram inoculadas em tubos de caldo vermelho de fenol adicionado de 0,5% de glicose contendo, no seu interior, tubos de Durham invertidos. Essa prova era considerada positiva quando, além da mudança de coloração de vermelha para amarela, havia a formação de gás no interior do tubo de Durham. A leitura da prova também era feita após a incubação a 28°C, por 24 horas.

3.3.2.11 Prova de Voges-Proskauer (APHA, 1992)

As cepas em identificação eram inoculadas em meio Clark-Lubs e incubadas a 28°C, por 48 horas. Na leitura da prova, a 1,0 mL de meio de cultura, adicionava-se 0,6 mL de solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% ,seguido de leve aquecimento e agitação. A prova era considerada positiva, quando ocorria

o aparecimento de uma coloração avermelhada, indicando a presença de acetoina.

3.3.2.12 Hidrólise da esculina (Mac FADDIN, 1976)

Na realização desta prova, as cepas em identificação eram estriadas na superfície de ágar bile-esculina inclinado, também denominado meio Pfizer. A capacidade de hidrolizar a esculina por parte de determinadas bactérias e, portanto, a positividade para essa prova, era revelada pelo escurecimento do ágar, passando à cor marrom escura ou preta, na superfície ou, na maioria dos casos, também em profundidade. Essa leitura era feita após a incubação a 28°C, por 24 horas.

3.3.2.13 Utilização da arginina, ornitina e lisina (Mac FADDIN, 1976)

Nestes testes, as cepas isoladas eram inoculadas em tubos com meio de Falkow adicionado de 0,5% de L-arginina, L-ornitina e L-lisina, respectivamente. Simultaneamente, realizavam-se as provas controle, utilizando-se tubos contendo apenas a base de Falkow, sem a adição dos amino-ácidos. Todos os tubos contendo meios de prova e controle eram adicionados de uma camada de vaselina líquida, a fim de impedir a oxidação alcalina do meio. Os tubos inoculados eram incubados a 28°C e as leituras eram realizadas após 48 e 96 horas.

As provas eram consideradas positivas quando a cor do meio controle passava de violeta para amarelo, revelando a utilização de glicose com consequente acidificação do meio, enquanto que o tubo contendo o amino-ácido em questão passava novamente à cor violeta pela neutralização do pH ácido por aminas resultantes da descarboxilação do amino-ácido. A prova era considerada negativa, quando o meio controle e o meio contendo o amino-ácido, mostravam-se de cor amarela, devido apenas à utilização da glicose.

3.3.2.14 "CAMP-TEST"

Após a realização das provas de identificação descritas, as cepas caracterizadas como sendo de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e classificadas numa das espécies deste grupo de bactérias, foram submetidas ao "CAMP-TEST" (CHRISTIE, ATKINS & MUNCH-PETERSON, 1944; KONEMAN et al., 1988), para a pesquisa da produção de um fator semelhante ao de CAMP, com base no estudo realizado por FIGURA & GUGLIELMETTI (1987).

Para a realização do teste, eram utilizadas placas de ágar sangue constituído de ágar Colúmbia adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Em cada placa de ágar sangue, era semeada em uma única estria, uma cultura em caldo tripticase-soja a 37°C por 24 horas, de uma cepa alfa-hemolítica de *Staphylococcus aureus*. Em seguida, cada cepa de *Aeromonas* spp. a ser

testada era semeada em uma estria perpendicular à de *S. aureus*, sem que esta fosse tocada. A leitura era procedida após a incubação de cada placa a 37°C, por 24 horas.

Para essa prova, eram inoculadas duas placas de ágar sangue, sendo uma incubada em aerobiose e a outra, em anaerobiose. Segundo FIGURA & GUGLIELMETTI (1987), *A. hydrophila* produz o fator por eles denominado "semelhante ao CAMP" tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, enquanto que *A. sobria* só o faz em aerobiose e *A. caviae*, por sua vez, não produz esse fator em nenhuma das duas condições.

A figura 1 mostra o fluxograma seguido para as contagens e os testes de presença ou ausência de *Aeromonas* spp. a partir das amostras de hortaliças analisadas e na tabela 1 são apresentados os comportamentos esperados para diferentes espécies, nos testes de identificação das cepas isoladas.

Figura 1 Fluxograma de isolamento e identificação presuntiva de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* a partir de hortaliças.

Tabela 1 Provas bioquímicas e microscópicas utilizadas na identificação das cepas isoladas de amostras de hortaliças comercializadas em São Paulo e resultados esperados para diferentes espécies de *Aeromonas*.*

Testes	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
Bacilo				
Gram -	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+
Glicose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+
Flagelo polar	+	+	+	+
Crescimento a 37°C	+	+	+	+
Crescimento em NaCl a 0% e 3% 6%	+	+	+	+
	-	-	-	-
Utilização de				
Sacarose	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-
Salicina	+	+	-	+
Arabinose	+	+	-	-
Esculina	+	+	-	+
Produção de gás a partir da glicose	+	-	+	+
Voges-Proskauer	+	-	variável	+
Utilização de				
Arginina	+	+	+	-
Ornitina	-	-	-	+
Lisina**	variável	variável	variável	+

* Segundo POPOFF (1984), HICKMAN-BRENNER et al.(1987), e CARNAHAN et al.(1991).

** CARNAHAN et al.(1991) consideram as cepas de origem clínica de *A. hydrophila*, *A. sobria* (ou *A. veronii* bv. *sobria*) e *A. veronii* (ou *A. veronii* bv. *veronii*) positivas para a utilização da lisina e *A. caviae*, negativas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da determinação da presença ou ausência e da contagem das *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* nas 90 amostras de hortaliças analisadas, assim como as espécies isoladas de cada uma, encontram-se distribuídos na tabela 2.

Enquanto a tabela 2 agrupa os resultados obtidos de acordo com a ordem das amostragens, alternando os três tipos de hortaliças, nas tabelas 3, 4 e 5 são apresentados os resultados obtidos para as 30 amostras de alface, 30 de agrião e 30 de escarola, respectivamente.

As referidas tabelas mostram que os três tipos de hortaliças analisados revelaram a presença de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* por uma ou por ambas as metodologias utilizadas. Essas bactérias foram encontradas em 43 (47,8%) das 90 amostras de hortaliças analisadas. Das 30 amostras de cada tipo de hortaliça analisado, 13 (43,3%) de alface, 21 (70%) de agrião e 9 (30%) de escarola revelaram-se positivas para *Aeromonas* spp. Com relação a essas positivities obtidas para os diferentes tipos de hortaliças analisado e aplicando-se o teste de duas proporções com aproximação pela distribuição normal, a nível de 5% ($z_{\alpha/2} = 1,96$) (BERQUO et al., 1981), verificou-se que a presença de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* revelou-se significativamente maior no agrião, quando comparada à escarola e à alface. Por outro lado, para as amostras de alface e escarola, a diferença

entre os percentuais de positividade não se mostrou estatisticamente significativa, também a nível de 5% .

Conforme pode ser observado nas tabelas 2 a 5 e, sobretudo, na 6, a contagem de *Aeromonas* spp. nos diferentes tipos de hortaliças analisados variou de $< 10^2$, correspondendo ao limite mínimo de detecção da metodologia utilizada para a contagem dessas bactérias, a $2,0 \times 10^6$ UFC/g. Com relação aos diferentes tipos de hortaliças, essa contagem variou de $< 10^2$ a $2,0 \times 10^5$, de $< 10^2$ a $2,0 \times 10^6$ e de $< 10^2$ a $2,1 \times 10^4$ UFC/g nas amostras de alface, agrião e escarola, respectivamente. Essas variações de contagens são ressaltadas na tabela 6, a qual mostra, também, os valores da mediana e das médias aritmética e geométrica dos resultados, para cada tipo de hortaliça analisado.

Pode-se observar, nessa tabela, uma acentuada discrepância entre as diversas variáveis estatísticas das contagens obtidas para os diferentes tipos de hortaliças, bem como para o total de amostras analisado. Esse fato pode ser explicado pelo grande número de amostras com resultados de contagens $< 10^2$ (68,9%), ao lado de números de UFC/g mais elevados e, em alguns casos (3,3%), iguais ou superiores a 10^6 /g (tabela 7). É sabido que a média aritmética é influenciada pela variação dos valores extremos, podendo, portanto, não ser representativa do significado real das médias de contagens de *Aeromonas* spp. obtidas nas amostras dos diferentes tipos de hortaliças. Nesse caso, a variável que melhor reflete o valor real das contagens é a mediana,

uma vez um número igual de amostras tem seus valores de contagens abaixo e acima da mesma, podendo ser utilizada, também, a média geométrica. Assim, pode-se constatar que para as amostras de agrião o valor da mediana das contagens de *Aeromonas* spp. foi de $< 1,2 \times 10^3$ UFC/g e, portanto, maior em relação aos obtidos para as amostras de alface e de escarola, que foram de $< 10^2$.

Levando-se em consideração apenas as amostras positivas para a contagem, isto é, aquelas que se revelaram com a presença de pelo menos 10^2 UFC/g, a média aritmética torna-se um parâmetro útil para se avaliar a contagem dessas amostras. Nessas condições, a contagem média foi de $3,0 \times 10^4$ UFC/g para as amostras de alface, de $1,5 \times 10^5$ para as de agrião e de $7,7 \times 10^3$ UFC/g para as de escarola, sendo que a média do total de hortaliças foi de $9,4 \times 10^4$ UFC/g. Baseado nesses dados, verifica-se que, tanto a média como o valor máximo das contagens, observado na tabela 6, é 1 log maior nas amostras de agrião em relação às de alface e das de alface em relação às de escarola.

A tabela 7 apresenta as amostras de hortaliças analisadas distribuídas segundo os resultados das contagens de UFC/g de *Aeromonas* spp., em intervalos de classe, o que pode ser, também, visualizado no gráfico 1. Nessa tabela, pode-se observar que a maior parte das amostras de hortaliças analisadas apresentou contagens $< 10^2$, correspondendo a 68,9% do total analisado. Pode-se, ainda, depreender da referida tabela, assim como do gráfico 1, que

a escarola foi a hortaliça que apresentou a maior proporção de amostras (86,7%) localizadas nessa faixa de contagem, seguido da alface (73,4%) e, por último, do agrião (46,7%). A faixa de contagem que englobou a segunda maior proporção de amostras de hortaliças (14,5%) foi a de 10^4 a $< 10^5$, sendo de importância ressaltar que 30% das amostras de agrião apresentaram contagens compreendidas nessa faixa.

CALLISTER & AGGER (1987), nos Estados Unidos, empregando o método da semeadura direta em ágar amido-ampicilina, obtiveram uma positividade para *Aeromonas* spp. de 38,1% em um total de 21 amostras de diferentes hortaliças analisadas.

Na presente investigação, verifica-se na tabela 8 que a positividade para essas bactérias revelou-se maior (47,8%) do que a obtida por esses autores. Isto poderia ser explicado pelo fato de terem sido utilizados dois processos analíticos, sendo um deles o de semeadura direta em ágar amido-ampicilina e o outro, o de plaqueamento após enriquecimento seletivo em caldo tripticase-soja com ampicilina. Se fossem consideradas apenas as amostras positivas para *Aeromonas* spp. pelo método da semeadura direta, a positividade seria reduzida para 31,1%, uma vez que apenas 28 (e não 43) do total de 90 amostras analisadas seriam consideradas positivas (tabela 8).

CALLISTER & AGGER (1987) obtiveram, para as hortaliças analisadas, contagens de *Aeromonas* spp. que variaram de 10^2

a $2,3 \times 10^4$ UFC/g. O menor valor observado nessas contagens equivaleu ao limite inferior de detecção dessas bactérias pela metodologia utilizada.

No presente estudo, o valor máximo de contagens observado, mostrou-se muito maior do que o verificado por esses pesquisadores e o agrião contribuiu para as contagens mais altas observadas. Assim, das 60 amostras de hortaliças diferentes do agrião, analisadas neste trabalho, apenas uma de alface (amostra 46) apresentou contagem de $2,0 \times 10^5$ /g e, portanto, acima do valor máximo observado por CALLISTER & AGGER (1987); a segunda maior contagem, excluindo-se as amostras de agrião, foi de $2,1 \times 10^4$ /g, obtida em uma de escarola (amostra 54), valor este semelhante ao observado por aqueles pesquisadores.

NISHIKAWA & KISHI (1988), no Japão, analisaram 43 amostras de diferentes alimentos de origem vegetal, incluindo repolhos, cenouras, pepinos, berinjelas, alfaces, ervilhas, cebolas, massas, batatas, rabanetes, arroz, espinafres, "tofu", tomates e saladas de hortaliças, e obtiveram uma positividade de 51,2% para *Aeromonas* spp.

FRICKER & TOMPSETT (1989), na Inglaterra, examinaram 97 amostras de saladas pré-preparadas e obtiveram positividade de 21,6% .

KNOCHEL & JEPPESEN (1990), na Dinamarca, analisaram 177 amostras de saladas com maionese contendo, geralmente, cebola ou cebolinha, e obtiveram positividade de 10,2% para

Aeromonas spp., com níveis máximos de contagem excedendo 10^6 UFC/g. A maioria das saladas positivas para essas bactérias continham presunto, mas as amostras de presunto revelaram-se, geralmente, negativas.

HUDSON & de LACY (1991), na Nova Zelândia, estudaram 44 amostras de produtos contendo vegetais, incluindo saladas de repolho picado ("coleslaws") e outras e obtiveram positividade de 9,1% para *Aeromonas* spp.; a salada de repolho picado que não continha maionese foi a única positiva para essas bactérias. Segundo esses pesquisadores, a maionese e outros molhos para saladas podem reduzir o pH, impedindo o crescimento ou eliminando as *Aeromonas* spp. presentes. De acordo com esses autores, isso poderia explicar a baixa positividade para essas bactérias por eles observada nas amostras de alimentos de origem vegetal analisadas, assim como as verificadas por KNOCHEL & JEPPESEN (1990) e por FRICKER & TOMPSETT (1989), além da possibilidade de muitas dessas saladas terem sido preparadas com alguns vegetais pré-cozidos.

KROVACEK et al. (1992a), na Suécia, analisaram 24 amostras de vários alimentos, incluindo 4 de hortaliças, as quais revelaram-se negativas para *Aeromonas* spp., em semeadura direta e após enriquecimento em água peptonada

Em Campinas, Brasil, LEITÃO & SILVEIRA (1991) examinaram 15 amostras de alface e obtiveram positividade para *Aeromonas* spp. de 66,7%, cujas contagens variaram de $2,3 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^6$, sendo a média de $7,9 \times 10^4$ UFC/g.

RODRIGUES (1992), também em Campinas, Brasil, analisou um total de 100 amostras de alimentos de origem vegetal e animal obtidas na linha de processamento em um restaurante universitário. Os alimentos de origem vegetal incluíam alface, chicória, acelga, pepino, cenoura, vagem e outras hortaliças não especificadas. A positividade para *Aeromonas* spp. observada nesses alimentos foi de 18% do total de amostras de alimentos de origem vegetal e de 13% para os de origem animal.

Na presente investigação, a positividade para *Aeromonas* spp. foi significativamente maior nas amostras de agrião, quando comparada às de alface e de escarola. Pode-se depreender que o agrião foi a hortaliça que, dentre as analisadas, pode representar maior risco em relação à saúde humana.

Essa diferença de resultados, também foi observada por OLIVEIRA & GERMANO (1992) em um estudo envolvendo a pesquisa de enteroparasitas em diferentes tipos de hortaliças, comercializadas na região metropolitana de São Paulo. Nesse estudo foram analisados os mesmos tipos de hortaliças empregados no presente estudo, isto é, alface lisa, agrião e escarola, além de alface crespa. O tipo de hortaliça que apresentou maior contaminação com enteroparasitas também foi o agrião. Os autores atribuem essas diferenças de contaminação às variadas condições sanitárias do ambiente onde essas hortaliças são cultivadas. Assim, o cultivo de

agrição ocorre normalmente em brejos ou seja, em terrenos permanentemente úmidos, o que, segundo esses pesquisadores, poderia justificar as frequências superiores de helmintos nesse tipo de hortaliça, uma vez que a sobrevivência de seus ovos é mais propícia nesse ambiente.

Essa explicação sugerida por OLIVEIRA & GERMANO (1992) poderia também justificar a maior positividade para *Aeromonas* spp. observada nas amostras de agrição, quando comparada às de outras hortaliças analisadas neste estudo, uma vez que diversos autores verificaram a presença dessas bactérias em diversos tipos de águas (HAZEN et al., 1978; RIPPEY & CABELLI, 1979; BURKE et al., 1984c, 1984d, NEVES et al., 1990; LEITÃO & SILVEIRA, 1991).

A tabela 8 mostra o número e a percentagem de amostras positivas para *Aeromonas* spp. por uma ou por ambas as metodologias utilizadas. Analisando-se os dados dessa tabela, verifica-se que um certo número de amostras de hortaliças revelaram-se positivas para essas bactérias, apenas por uma das metodologias de isolamento utilizadas. Esse fato é facilmente explicável quando a presença desses microrganismos é detectada pelo método de presença/ausência, envolvendo o enriquecimento seletivo antes do plaqueamento e não pela semeadura direta em ágar seletivo, como ocorreu com 5 (16,7%) amostras de cada tipo de hortaliça. Nesse caso, as *Aeromonas* spp. podem estar presentes em número inferior ao do limite mínimo de detecção dessas bactérias pela semeadura

direta (10^2) ou, ainda, elas podem estar presentes em números maiores, porém injuriadas. Neste caso, o enriquecimento poderá favorecer a sua recuperação e multiplicação e, conseqüentemente, a sua detecção.

Entretanto, o fato de 4 (13,3%) amostras de alface e de agrião terem se revelado positivas para *Aeromonas* spp. apenas pela metodologia da semeadura direta em ágar amido-ampicilina e negativas pelo método empregando o enriquecimento prévio, não parece ser tão facilmente explicável. Uma possibilidade é a de que o inóculo transferido da cultura em caldo de enriquecimento para o ágar seletivo possa não conter *Aeromonas* spp., embora tenha havido crescimento dessas bactérias. O referido inóculo pode conter *Aeromonas* spp., porém misturadas com outros microrganismos, também resistentes à ampicilina, que podem estar presentes em números elevados. Assim, a possibilidade do inóculo em questão conter *Aeromonas* spp. não é total, uma vez que essa passagem é feita através de uma única alçada. Outra explicação possível é a da competitividade das *Aeromonas* spp. com outros microrganismos que podem estar presentes no caldo de enriquecimento, provenientes das hortaliças analisadas.

A esse respeito, PALUMBO & BUCHANAN (1988) verificaram, em carne suína moída mantida a 5°C, que a *A. hydrophila* atingia números mais elevados quando na ausência da microbiota normal e KIROV et al. (1990) observaram que uma

cepa de *A. sobria* isolada de frango não demonstrou crescimento significativo à temperatura de refrigeração em competição com uma cepa de *Pseudomonas fragi*.

Nesta investigação, embora a temperatura utilizada no enriquecimento tenha sido a de 28°C, a seleção de outros microrganismos em detrimento das *Aeromonas* spp. poderia também ter ocorrido nas amostras de hortaliças positivas pelo método da semeadura direta e negativas no de presença/ausência.

Utilizando o teste de duas proporções ($z_{1-\alpha}=1,96$) (BERQUO et al., 1981), verificou-se que para a alface ($z = 1,498$) e o agrião ($z = 0,066$) não houve diferença significativa dos resultados obtidos com relação à metodologia aplicada. Por outro lado, no caso da escarola ($z = 3,580$), houve diferença significativa entre os resultados obtidos com as metodologias utilizadas, o que poderia ser explicado pelo valor 0 (zero) do número de amostras com resultado negativo na contagem e positivo no teste de presença/ausência.

De qualquer modo, na determinação de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* em hortaliças, é recomendável utilizar a semeadura direta em ágar amido-ampicilina e após o enriquecimento, simultaneamente, uma vez que diversas amostras analisadas neste trabalho revelaram a presença dessas bactérias por apenas uma das metodologias.

OKREND et al. (1987) fizeram um estudo comparativo entre diversas metodologias de isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de amostras de carnes de aves, bovinas e suínas. Os autores concluíram que a utilização de meios de enriquecimento facilitava a recuperação dessas bactérias e que isso ocorria, principalmente, no caso de amostras contendo *Aeromonas* spp. injuriadas pelo congelamento ou quando em números baixos ($< 10^2$).

MAJEED et al. (1989) analisaram 54 amostras de carne e miúdos de cordeiro e obtiveram positivities de 26% e de 59% , através da semeadura direta em ágar amido-ampicilina e após enriquecimento em água peptonada alcalina a 0,1% ,respectivamente. Concluíram que o enriquecimento facilitou bastante a recuperação de *Aeromonas* spp.

GHENGHESH (1989) analisou amostras de fezes através da semeadura direta em ágar sangue de carneiro adicionado de ampicilina (1 mg/100 mL) e após enriquecimento em água peptonada alcalina (pH 9). Observou que o enriquecimento propiciou um aumento significativo da taxa de isolamento do total de *Aeromonas* spp. e, em particular, de *A. caviae*.

HUDSON & de LACY (1991) não obtiveram positividade para *Aeromonas* spp. em produtos de origem vegetal e saladas, através da inoculação direta em ágar amido-ampicilina, seguida de incubação a 28°C por até 48 horas, mas apenas após o pré-enriquecimento em água peptonada alcalina a 0,1% .

A tabela 9 mostra o número de cepas isoladas e o número e percentagem de cepas confirmadas como sendo de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* em cada grupo de 10 amostras de hortaliças analisadas. No total, foram isoladas do ágar amido-ampicilina 187 cepas que se revelaram com comportamento característico no ágar triplice-açúcar-ferro e com reação positiva nas provas de oxidase e catalase, sendo que 143 (76,5%) foram confirmadas como sendo *Aeromonas* spp. Entretanto, se as cepas provenientes das 10 primeiras amostras forem excluídas desse cálculo, a percentagem de cepas confirmadas passa de 76,5% para 83,5%. Esta diferença ocorre devido à baixa percentagem de cepas confirmadas nas 10 primeiras amostras analisadas (26,1%). Esse fato pode ser atribuído a dificuldades ocorridas no início da pesquisa, com relação à caracterização visual do aspecto das colônias suspeitas desenvolvidas no ágar amido-ampicilina.

PALUMBO et al. (1985a), CALLISTER & AGGER (1987) e MAJEED et al. (1989), utilizando o ágar amido-ampicilina, isolaram 65, 61 e 73 cepas, a partir de amostras de alimentos de origem animal, vegetal e de carne e miúdos de cordeiro, respectivamente. Obtiveram confirmação de *Aeromonas* spp. em 80% , 74% e 100% das cepas isoladas, respectivamente.

LEITÃO & SILVEIRA (1991), também utilizando o ágar amido-ampicilina como meio de isolamento de *Aeromonas* spp., confirmaram 79,4% de um total de 136 cepas isoladas de água

do mar, frutos do mar, água de rios, peixes de água doce e hortaliças. Com relação a 54 cepas isoladas das amostras de água de rios, peixes de água doce e hortaliças, esses pesquisadores confirmaram 44 (81,5%) como sendo *Aeromonas* spp.

Com relação às diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas das amostras de hortaliças analisadas, do total de 143 cepas confirmadas como sendo do gênero *Aeromonas*, 138 (96,5%) foram identificadas como sendo *A. caviae*, 4 (2,8%) como *A. hydrophila* e 1 (0,7%), embora tenha se revelado com características de *Aeromonas* spp., é referida como *Aeromonas* atípica, tendo em vista o seu comportamento bioquímico.

Na tabela 10, pode-se constatar que, das 43 amostras de hortaliças positivas para *Aeromonas* spp., 39 (90,7%) revelaram a presença exclusiva de *A. caviae*, 1 (2,3%), de *A. caviae* e *Aeromonas* atípica simultaneamente e 3 (7,0%) se mostraram com a presença exclusiva de *A. hydrophila*. Com relação às diferentes hortaliças analisadas, das 13 (30,2% do total de amostras positivas) amostras de alface positivas para *Aeromonas* spp., 11 (84,6%) revelaram a presença exclusiva de *A. caviae* e 2 (15,4%), de *A. hydrophila*; das 21 (48,8% do total de positivas) amostras de agrião positivas, 19 (90,4%) revelaram a presença exclusiva de *A. caviae*, 1 (4,8%), de *A. caviae* e *Aeromonas* atípica, simultaneamente, e 1 (4,8%) foi positiva somente para *A. hydrophila* e as 9 (20,9% do total de positivas) amostras de escarola revelaram a presença exclusiva de *A. caviae* (tabela 10).

Com base nos dados descritos, pode-se constatar que a *A. caviae* foi a espécie significativamente mais isolada das hortaliças analisadas, sendo que a *A. hydrophila* estava presente apenas em algumas delas. Não se obteve o isolamento de *A. sobria*.

CALLISTER & AGGER (1987), nos Estados Unidos, também não isolaram *A. sobria* a partir de amostras de hortaliças. Esses pesquisadores, em 45 cepas de *Aeromonas* móveis, confirmaram 29 como sendo de *A. hydrophila* e 16, de *A. caviae*, respectivamente.

NISHIKAWA & KISHI (1988), no Japão, não isolaram cepas de *A. sobria* e observaram a predominância de *A. caviae* em amostras de alimentos de origem vegetal, assim como ocorreu na presente investigação. De um total de 27 cepas confirmadas como sendo *Aeromonas* spp., 17 (63%) e 10 (37%) eram de *A. caviae* e *A. hydrophila*, respectivamente. De um total de 15 tipos de alimentos de origem vegetal, obtiveram o isolamento de *A. caviae* de 11 e *A. hydrophila* de 5. Esses pesquisadores sugeriram uma relação entre a presença predominante de *A. caviae* nas fezes e o consumo desses alimentos, no Japão.

GHENGHESH (1989), em São Paulo, Brasil, analisou fezes de 100 crianças e 69 adultos com diarreia e 100 crianças e 17 adultos assintomáticos (controle) e verificou que, de forma geral, *A. caviae* foi a espécie mais detectada. Esse autor isolou 40 (59,7%) cepas de *A. caviae*, 15 (22,4%) de

A. sobria e 12 (17,9%) de *A. hydrophila* de um total de ⁶⁷47 X
cepas confirmadas como *Aeromonas* spp.

NEVES et al. (1990), no Rio de Janeiro, Brasil, analisando 50 amostras de água salgada e doce, também observaram uma predominância de *A. caviae*. Assim, das 100 cepas por eles isoladas, 60 eram de *A. caviae*, enquanto que 14 eram de *A. veronii* e apenas 1 era de *A. hydrophila* e 1 de *A. sobria*. Os autores verificaram, também, ~~que~~ a presença de X
24 cepas que eles classificaram como *Aeromonas* spp. por não terem conseguido distinguir em espécies através dos testes bioquímicos por eles utilizados.

LEITÃO & SILVEIRA (1991), em 45 amostras de água doce, peixes de água doce e alface, obtiveram 44 cepas de *Aeromonas* spp. Destas, 19 (43,2%) foram de *A. hydrophila*, 17 (38,6%) de *A. caviae*, 1 (2,3%) de *A. sobria* e 7 (15,9%) de *Aeromonas* spp. imóveis.

RODRIGUES (1992), isolou 28 cepas de *Aeromonas* spp. a partir de alimentos de origem vegetal, sendo 15 (53,6%) de *A. hydrophila*, 11 (39,3%) de *A. caviae* e 2 (7,1%) de *A. sobria*. Apesar desse pesquisador ter isolado *A. caviae* de hortaliças em menor proporção do que *A. hydrophila*, ao contrário do que ocorreu na presente investigação, ele concluiu que *A. caviae* foi isolada significativamente mais de amostras de hortaliças e *A. sobria*, de carnes.

HAVELAAR et al. (1992), na Holanda, observaram que a *A. caviae* era a espécie mais frequentemente isolada tanto de fezes de pacientes com diarreia aquosa, sanguinolenta ou

fezes de pacientes com diarreia aquosa, sanguinolenta ou mucosa como de água potável. Esses pesquisadores isolaram 181 (46,8%) cepas de *A. caviae*, 126 (32,5%) de *A. hydrophila* e 80 (20,7%) de *A. sobria* de um total de 387 cepas.

A tabela 11 mostra o número e a percentagem de cepas segundo a positividade frente aos diferentes testes bioquímicos e microscópicos utilizados na identificação das 4 cepas de *A. hydrophila* e das 138 cepas de *A. caviae* isoladas. Deve ser ressaltado que o número de cepas de *A. hydrophila* é muito reduzido para que se possa fazer uma análise do comportamento destas bactérias frente a alguns testes bioquímicos, cujos resultados foram diferentes dos esperados para cepas de *A. hydrophila*.

A cepa denominada *Aeromonas* atípica demonstrou positividade para a prova de descarboxilação da ornitina, o que seria esperado para a *A. veronii* (HICKMAN-BRENNER et al., 1987; CARNAHAN et al., 1991). Entretanto, essa cepa foi positiva na prova de utilização da arginina e negativa na da lisina, o contrário do esperado para a *A. veronii*. A cepa em questão apresentou-se, ainda, positiva nas provas de utilização da arabinose e esculina e negativa nas provas de produção de gás a partir da glicose e de produção do fator semelhante ao CAMP em aerobiose, também contrário do esperado para *A. veronii* (CARNAHAN, 1991). A *Aeromonas* atípica, com exceção das provas de utilização de amino-ácidos e da prova de Voges-Proskauer, apresentou as mesmas características de *A. caviae*.

Embora a referida cepa tenha sido a única denominada de atípica, outras apresentaram algumas características contrárias ao esperado, apesar de terem sido consideradas como pertencentes a uma determinada espécie. Ao mesmo tempo, 2 cepas que apresentaram características de *A. caviae*, inclusive sendo móveis e crescendo a 37°C, produziam pigmentação marrom com apenas 24 horas de incubação em ágar tripticase-soja, característica esta associada a *A. salmonicida*. Ambas foram classificadas como *A. caviae*.

Conforme pode ser constatado na tabela 11, dentre as cepas de *A. caviae* isoladas, 4 eram indol negativas, 2 eram salicina negativas (positividades de 97,1% e de 98,6%, respectivamente) e 2 (1,4%) eram positivas para a prova de Voges-Proskauer, contrário do esperado para *A. caviae*. Das 4 cepas de *A. hydrophila* isoladas, 1 revelou-se negativa na prova de Voges-Proskauer (positividade de 75%), sendo que essa prova é considerada positiva para *A. hydrophila*.

A detecção de flagelo polar em meio sólido foi considerada negativa para 4 cepas de *A. caviae* após 5 tentativas. No entanto, não se pode afirmar que as cepas em questão não produzam flagelos, mas apenas que não foram detectados.

Os resultados na prova de utilização de arginina foram muito variáveis para as cepas de *A. caviae* isoladas, sendo que essa espécie é considerada geralmente positiva (tabela 1). Assim, conforme pode ser observado na tabela 11, do total de 138 cepas de *A. caviae* isoladas, apenas 43

revelaram-se positivas para a utilização desse amino-ácido. Com relação à utilização da lisina, com exceção de uma cepa, todas se revelaram negativas no teste. Por outro lado, as cepas de *A. hydrophila* isoladas revelaram-se positivas para a prova da utilização de arginina e negativas para a da ornitina, conforme o esperado (tabela 1), sendo que apenas 1 cepa revelou-se positiva no teste de utilização da lisina.

KUIJPER et al. (1989), em 124 cepas de *A. caviae* isoladas de fezes humanas, verificaram uma positividade de 97% na prova do indol e de 96% na de utilização da salicina; em 31 cepas de *A. hydrophila*, também isoladas de fezes humanas, observaram uma positividade de 65% na prova de Voges-Proskauer.

GHENGHESH (1989) observou uma positividade de 96,7% na prova do indol e de 3,3% na prova de Voges-Proskauer, em um total de 30 cepas de *A. caviae* isoladas de fezes humanas. Em 8 cepas de *A. hydrophila* por ele isoladas, também de fezes humanas, esse pesquisador observou uma positividade de 87,5% na prova de Voges-Proskauer e de 87% de utilização da lisina.

ALTWEGG et al. (1990) em 78 cepas de *A. caviae*, na maioria isoladas de fezes humanas, obtiveram uma positividade de 90% para a prova do indol, de 91% e 86% no teste de utilização de salicina nos sistemas "API 50E" e "API ATB 32GN", respectivamente, de 8% na prova de Voges-Proskauer e de 85% no teste de utilização de arginina no sistema "API 20E". Esses autores verificaram, também, que 28

82% de um total de 28

cepas de *A. hydrophila*, na maioria isoladas de fezes humanas, revelaram-se positivas na prova de Voges-Proskauer.

ALABI & ODUGBEMI (1990) relataram positivities de 75% ,22% e 75% frente às provas de produção de indol e da utilização ornitina e da lisina, respectivamente, num total de 55 cepas de *Aeromonas* spp isoladas de fezes humanas.

RODRIGUES (1992) verificou que de 13 cepas de *A. caviae* isoladas de alimentos de origem animal e vegetal, 84% ,15% e de 8% eram positivas nas provas de utilização de salicina, de Voges-Proskauer e a utilização de lisina, respectivamente. Em 25 cepas de *A. hydrophila* isoladas dos mesmos tipos de alimentos, o autor constatou que 84% eram positivas na prova de Voges-Proskauer e de 76% na de utilização de lisina.

Dentre as publicações existentes, dependendo dos autores, a *A. caviae* é considerada como não patogênica e a *A. hydrophila* e a *A. sobria* são tidas como potencialmente patogênicas (DAILY et al., 1981; GRACEY et al., 1982; JANDA et al., 1983; JANDA et al., 1984; BUCHANAN, 1984; BUCHANAN & PALUMBO, 1985; WATSON et al., 1985). Entretanto, têm surgido publicações sobre a patogenicidade de cepas de *A. caviae* (TURNBULL et al., 1984; MOYER, 1987; CARRELLO et al., 1988; NAMDARI & BOTTONE, 1990a, 1990b, 1991).

Diante do exposto, os resultados obtidos nesta investigação indicam que hortaliças, particularmente o agrião, podem representar risco aos consumidores, tendo em

vista o fato das verduras analisadas serem consumidas cruas em larga escala, em nosso meio.

E recomendável a adoção de medidas de higiene apropriadas, a fim de que se possa evitar a ingestão direta de hortaliças contaminadas com *Aeromonas* spp., cuja contagem nesses alimentos pode aumentar durante a sua manutenção sob refrigeração (CALLISTER & AGGER, 1987). Deve-se, através de medidas de higiene, evitar a contaminação cruzada com outros tipos de alimentos, particularmente aqueles previamente submetidos a tratamento térmico e, portanto, isentos ou com números baixos de outros microrganismos.

Tabela 2 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e espécies isoladas, em amostras de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, 1993.

AMOSTRA*	PRESEÇA/AUSENCIA	CONTAGEM	ESPECIES
Nº TIPO	em 1 g	UFC/g	ISOLADAS
1 alface 1	ausência	< 100	-
2 agrião 1	ausência	< 100	-
3 escarola 1	ausência	< 100	-
4 alface 2	presença	< 100	<i>A. hydrophila</i>
5 agrião 2	ausência	< 100	-
6 escarola 2	ausência	< 100	-
7 alface 3	ausência	< 100	-
8 agrião 3	ausência	< 100	-
9 escarola 3	ausência	< 100	-
10 alface 4	presença	$1,0 \times 10^2$	<i>A. caviae</i>
11 agrião 4	presença	$2,4 \times 10^4$	<i>A. caviae</i> e <i>Aeromonas</i> spp.**
12 escarola 4	presença	$2,0 \times 10^2$	<i>A. caviae</i>
13 alface 5	ausência	< 100	-
14 agrião 5	ausência	< 100	-
15 escarola 5	ausência	< 100	-
16 alface 6	ausência	< 100	-
17 agrião 6	ausência	$1,0 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
18 escarola 6	ausência	< 100	-
19 alface 7	ausência	< 100	-
20 agrião 7	ausência	$1,4 \times 10^3$	<i>A. hydrophila</i>
21 escarola 7	ausência	< 100	-
22 alface 8	ausência	< 100	-
23 agrião 8	presença	$2,0 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
24 escarola 8	ausência	< 100	-
25 alface 9	ausência	< 100	-
26 agrião 9	ausência	$2,0 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
27 escarola 9	ausência	< 100	-
28 alface 10	ausência	$1,0 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
29 agrião 10	ausência	< 100	-
30 escarola 10	ausência	< 100	-

UFC/g unidades formadoras de colônias por g

* Primeira coluna - enumeração das amostras de hortaliças analisadas.

Os números correspondentes à segunda coluna referem-se à numeração das amostras de cada tipo de hortaliça.

** Cepa atípica que não foi classificada como pertencente a uma determinada espécie, pois, embora não tenha apresentado as características de *A. veronii*, revelou-se positiva para a utilização da ornitina.

Tabela 2 Resultados do teste presença/ausência e da (contagem de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e espécies isoladas, em amostras de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, 1993.

AMOSTRA* Nº	TIPO	PRESEÇA/AUSENCIA em 1 g	CONTAGEM UFC/g	ESPECIES ISOLADAS
31	alface 11	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
32	agrião 11	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
33	escarola 11	ausência	< 100	-
34	alface 12	ausência	< 100	-
35	agrião 12	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
36	escarola 12	ausência	< 100	-
37	alface 13	ausência	< 100	-
38	agrião 13	presença	$1,2 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
39	escarola 13	ausência	< 100	-
40	alface 14	ausência	< 100	-
41	agrião 14	presença	$1,2 \times 10^5$	<i>A. caviae</i>
42	escarola 14	ausência	< 100	-
43	alface 15	ausência	< 100	-
44	agrião 15	presença	$4,4 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
45	escarola 15	ausência	< 100	-
46	alface 16	presença	$2,0 \times 10^5$	<i>A. caviae</i>
47	agrião 16	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
48	escarola 16	ausência	< 100	-
49	alface 17	ausência	< 100	-
50	agrião 17	ausência	< 100	-
51	escarola 17	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
52	alface 18	ausência	$1,0 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
53	agrião 18	presença	$4,8 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
54	escarola 18	presença	$2,1 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
55	alface 19	presença	$2,0 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
56	agrião 19	ausência	< 100	-
57	escarola 19	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
58	alface 20	ausência	< 100	-
59	agrião 20	presença	$1,0 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
60	escarola 20	ausência	< 100	-

UFC/g unidades formadoras de colônias por g

* Primeira coluna - enumeração das amostras de hortaliças analisadas.

Os números correspondentes à segunda coluna referem-se à numeração das amostras de cada tipo de hortaliça.

Tabela 2 Resultados do teste presença/ausência e da (contagem de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e espécies isoladas, em amostras de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, 1993.

AMOSTRA* Nº	TIPO	PRESEÇA/AUSENCIA em 1 g	CONTAGEM UFC/g	ESPECIES ISOLADAS
61	alface 21	ausência	< 100	-
62	agrião 21	presença	$2,8 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
63	escarola 21	presença	$9,6 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
64	alface 22	ausência	$3,2 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
65	agrião 22	presença	$3,0 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
66	escarola 22	ausência	< 100	-
67	alface 23	ausência	< 100	-
68	agrião 23	ausência	< 100	-
69	escarola 23	ausência	< 100	-
70	alface 24	ausência	$1,0 \times 10^4$	<i>A. hydrophila</i>
71	agrião 24	ausência	$3,2 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
72	escarola 24	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
73	alface 25	ausência	< 100	-
74	agrião 25	presença	$2,8 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
75	escarola 25	ausência	< 100	-
76	alface 26	ausência	< 100	-
77	agrião 26	ausência	< 100	-
78	escarola 26	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
79	alface 27	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
80	agrião 27	presença	$1,0 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
81	escarola 27	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
82	alface 28	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
83	agrião 28	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
84	escarola 28	presença	$1,4 \times 10^2$	<i>A. caviae</i>
85	alface 29	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
86	agrião 29	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
87	escarola 29	ausência	< 100	-
88	alface 30	presença	$1,1 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
89	agrião 30	presença	$4,8 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
90	escarola 30	ausência	< 100	-

UFC/g unidades formadoras de colônias por g

* Primeira coluna - enumeração das amostras de hortaliças analisadas.

Os números correspondentes à segunda coluna referem-se à numeração das amostras de cada tipo de hortaliça.

Tabela 3 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e espécies isoladas, em amostras de alface analisadas, São Paulo, 1993.

AMOSTRA Nº	ALFACE Nº	PRESEÇA/AUSENCIA em 1 g	CONTAGEM UFC/g	ESPECIES ISOLADAS
1	1	ausência	< 100	-
4	2	presença	< 100	<i>A. hydrophila</i>
7	3	ausência	< 100	-
10	4	presença	1,0x10 ²	<i>A. caviae</i>
13	5	ausência	< 100	-
16	6	ausência	< 100	-
19	7	ausência	< 100	-
22	8	ausência	< 100	-
25	9	ausência	< 100	-
28	10	ausência	1,0x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
31	11	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
34	12	ausência	< 100	-
37	13	ausência	< 100	-
40	14	ausência	< 100	-
43	15	ausência	< 100	-
46	16	presença	2,0x10 ⁵	<i>A. caviae</i>
49	17	ausência	< 100	-
52	18	ausência	1,0x10 ³	<i>A. caviae</i>
55	19	presença	2,0x10 ³	<i>A. caviae</i>
58	20	ausência	< 100	-
61	21	ausência	< 100	-
64	22	ausência	3,2x10 ³	<i>A. caviae</i>
67	23	ausência	< 100	-
70	24	ausência	1,0x10 ⁴	<i>A. hydrophila</i>
73	25	ausência	< 100	-
76	26	ausência	< 100	-
79	27	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
82	28	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
85	29	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
88	30	presença	1,1x10 ⁴	<i>A. caviae</i>

UFC/g unidades formadoras de colônias por grama

Tabela 4 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e espécies isoladas, em amostras de agrião analisadas, São Paulo, 1993.

AMOSTRA Nº	AGRIÃO Nº	PRESEÇA/AUSENCIA em 1 g	CONTAGEM UFC/g	ESPECIES ISOLADAS
2	1	ausência	< 100	-
5	2	ausência	< 100	-
8	3	ausência	< 100	-
11	4	presença	2,4x10 ⁴	<i>A. caviae</i> e <i>Aeromonas</i> spp.*
14	5	ausência	< 100	-
17	6	ausência	1,0x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
20	7	ausência	1,4x10 ³	<i>A. hydrophila</i>
23	8	presença	2,0x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
26	9	ausência	2,0x10 ⁶	<i>A. caviae</i>
29	10	ausência	< 100	-
32	11	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
35	12	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
38	13	presença	1,2x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
41	14	presença	1,2x10 ⁵	<i>A. caviae</i>
44	15	presença	4,4x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
47	16	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
50	17	ausência	< 100	-
53	18	presença	4,8x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
56	19	ausência	< 100	-
59	20	presença	1,0x10 ³	<i>A. caviae</i>
62	21	presença	2,8x10 ³	<i>A. caviae</i>
65	22	presença	3,0x10 ³	<i>A. caviae</i>
68	23	ausência	< 100	-
71	24	ausência	3,2x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
74	25	presença	2,8x10 ³	<i>A. caviae</i>
77	26	ausência	< 100	-
80	27	presença	1,0x10 ⁴	<i>A. caviae</i>
83	28	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
86	29	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
89	30	presença	4,8x10 ⁴	<i>A. caviae</i>

UFC/g unidades formadoras de colônias por grama

* Cepa atípica que não foi classificada como pertencente a uma determinada espécie, pois, embora não tenha apresentado as características de *A. veronii*, revelou-se positiva para a utilização de ornitina.

Tabela 5 Resultados do teste presença/ausência e da contagem de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* e espécies isoladas, em amostras de escarola analisadas, São Paulo, 1993.

AMOSTRA	ESCAROLA	PRESEÇA/AUSENCIA	CONTAGEM	ESPECIES
Nº	Nº	em 1 g	UFC/g	ISOLADAS
3	1	ausência	< 100	-
6	2	ausência	< 100	-
9	3	ausência	< 100	-
12	4	presença	$2,0 \times 10^2$	<i>A. caviae</i>
15	5	ausência	< 100	-
18	6	ausência	< 100	-
21	7	ausência	< 100	-
24	8	ausência	< 100	-
27	9	ausência	< 100	-
30	10	ausência	< 100	-
33	11	ausência	< 100	-
36	12	ausência	< 100	-
39	13	ausência	< 100	-
42	14	ausência	< 100	-
45	15	ausência	< 100	-
48	16	ausência	< 100	-
51	17	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
54	18	presença	$2,1 \times 10^4$	<i>A. caviae</i>
57	19	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
60	20	ausência	< 100	-
63	21	presença	$9,6 \times 10^3$	<i>A. caviae</i>
66	22	ausência	< 100	-
69	23	ausência	< 100	-
72	24	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
75	25	ausência	< 100	-
78	26	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
81	27	presença	< 100	<i>A. caviae</i>
84	28	presença	$1,4 \times 10^2$	<i>A. caviae</i>
87	29	ausência	< 100	-
90	30	ausência	< 100	-

UFC/g unidades formadoras de colônias por grama

Tabela 6 Variáveis estatísticas das contagens de *Aeromonas* spp. para as diferentes hortaliças analisadas, em UFC/g, São Paulo, 1993.

HORTALIÇA	VARIAÇÃO DA CONTAGEM	MEDIANA	MEDIA ARITMETICA	MEDIA GEOMETRICA
ALFACE	$<10^2$ a $2,0 \times 10^5$	$<10^2$	$<7,98 \times 10^3$	$<2,74 \times 10^2$
AGRIÃO	$<10^2$ a $2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^3$	$<7,94 \times 10^4$	$<1,49 \times 10^3$
ESCAROLA	$<10^2$ a $2,1 \times 10^4$	$<10^2$	$<1,12 \times 10^3$	$<1,44 \times 10^2$
TOTAL	$<10^2$ a $2,0 \times 10^6$	$<10^2$	$<2,95 \times 10^4$	$<3,98 \times 10^2$

UFC/g - unidades formadoras de colônias/grama

Tabela 7 Distribuição das amostras de diferentes hortaliças e respectivos percentuais segundo a contagem de *Aeromonas* spp., São Paulo, 1993.

CONTAGEM UFC/g	ALFACE		AGRIÃO		ESCAROLA		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10 ²	22	73,4	14	46,7	26	86,7	62	68,9
10 ² + 10 ³	1	3,3	-	-	2	6,7	3	3,3
10 ³ + 10 ⁴	3	10,0	5	16,7	1	3,3	9	10,0
10 ⁴ + 10 ⁵	3	10,0	9	30,0	1	3,3	13	14,5
10 ⁵ + 10 ⁶	1	3,3	1	3,3	-	-	2	2,2
10 ⁶ ou >	-	-	1	3,3	-	-	1	1,1
TOTAL	30	100%	30	100%	30	100%	90	100%

UFC/g - unidades formadoras de colônias/grama

Gráfico 1 Distribuição dos percentuais de amostras de diferentes hortaliças segundo a contagem de *Aeromonas* spp. por grama, São Paulo, 1993.

Tabela 8 Positividade absoluta e relativa das amostras de hortaliças analisadas frente às duas metodologias de isolamento de *Aeromonas* spp. utilizadas, São Paulo, 1993.

AMOSTRAS	ALFACE	AGRIÃO	ESCAROLA	TOTAL
ANALISADAS	30	30	30	90
POSITIVAS(+)	13 43,3%	21 70,0%	9 30,0%	43 47,8%
PRES/AUS +	9 30,0%	17 56,7%	9 30,0%	35 38,9%
CONTAGEM +	8 26,7%	16 53,3%	4 13,3%	28 31,1%
PRES/AUS + CONTAGEM -	5 16,7%	5 16,7%	5 16,7%	15 16,7%
CONTAGEM + PRES/AUS -	4 13,3%	4 13,3%	0 0%	8 8,9%
PRES/AUS + CONTAGEM +	4 13,3%	12 40,0%	4 13,3%	20 22,2%
PRES/AUS + CONTAGEM + em rel.ao total de +	30,8%	57,1%	44,4%	46,5%

PRES/AUS teste da presença/ausência
 + amostras positivas
 - amostras negativas

Tabela 9 Cepas isoladas e confirmadas como *Aeromonas* spp. e respectiva percentagem para cada 10 amostras e para o total de amostras de hortaliças analisado, São Paulo, 1993.

AMOSTRAS Nº	Nº DE CEPAS ISOLADAS	CEPAS Nº	CONFIRMADAS %
1 a 10	23	6	26,1
11 a 20	11	9	81,8
21 a 30	11	11	100,0
31 a 40	9	6	66,7
41 a 50	18	12	66,7
51 a 60	30	26	86,7
61 a 70	23	22	95,6
71 a 80	26	21	80,8
81 a 90	36	30	83,3
TOTAL	187	143	76,5
TOTAL EXCLUINDO AMOSTRAS 1 a 10	164	137	83,5

Tabela 10 Número e percentagem das amostras positivas para *Aeromonas* spp. e para as suas diferentes espécies isoladas, distribuídas segundo os tipos de hortaliças analisadas, São Paulo, 1993.

HORTA- LIÇAS	AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Aeromonas</i>							
	<i>Aeromonas</i> spp.		<i>A. hydro-</i> <i>phila</i>		<i>A. caviae</i>		<i>A. caviae</i> + <i>Aeromonas</i> atípica	
	Nº	%*	Nº	%**	Nº	%**	Nº	%**
ALFACE	13	30,2	2	15,4	11	84,6	-	-
AGRIÃO	21	48,9	1	4,8	19	90,4	1	4,8
ESCA- ROLA	9	20,9	-	-	9	100,0	-	-
TOTAL	43	100,0	3	7,0	39	90,7	1	2,3

* Percentagem em relação ao total de amostras positivas.

** Percentagem em relação às amostras positivas para *Aeromonas* spp., total e de cada tipo de hortaliça.

Tabela 11 Positividade nos testes bioquímicos e microscópicos utilizadas na identificação das 4 cepas de *A. hydrophila* e 138 de *A. caviae* isoladas de amostras de hortaliças, São Paulo, 1993.

Testes	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
Oxidase	4 (100,0)*	138 (100,0)*
Catalase	4 (100,0)	138 (100,0)
Bacilo Gram -	4 (100,0)	138 (100,0)
Motilidade	4 (100,0)	138 (100,0)
Nitrato	4 (100,0)	138 (100,0)
Indol	4 (100,0)	134 (97,1)
Glicose O/F	4 (100,0)	138 (100,0)
Flagelo polar	4 (100,0)	134 (97,1)
Crescimento a 37°C	4 (100,0)	138 (100,0)
Crescimento em NaCl		
a 0% e 3%	4 (100,0)	138 (100,0)
a 6%	0 (0,0)	0 (0,0)
Utilização de		
Sacarose	4 (100,0)	138 (100,0)
Manitol	4 (100,0)	138 (100,0)
Inositol	0 (0,0)	0 (0,0)
Salicina	4 (100,0)	136 (98,6)
Arabinose	4 (100,0)	138 (100,0)
Esculina	4 (100,0)	138 (100,0)
Produção de gás		
a partir da glicose	4 (100,0)	0 (0,0)
Voges-Proskauer	3 (75,0)	2 (1,4)
Utilização de		
Arginina	4 (100,0)	43 (31,2)
Ornitina	0 (0,0)	0 (0,0)
Lisina	1 (25,0)	1 (0,7)
"CAMP-TEST" em		
aerobiose	4 (100,0)	0 (0,0)
anaerobiose	4 (100,0)	0 (0,0)

* Número (%) de cepas com resposta positiva nos diferentes testes.

V. CONCLUSÕES

1. Os três tipos de hortaliças analisados, alface, agrião e escarola, revelaram-se com a presença de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* por uma ou ambas as metodologias utilizadas. Essas bactérias foram encontradas em 43 (47,8%) de 90 amostras de hortaliças analisadas, positividade esta que pode ser considerada alta.

2. A presença de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* foi significativamente maior nas amostras de agrião (70,0%), quando comparada às de alface (43,3%) e às de escarola (30,0%), aplicando-se o teste de 2 proporções com aproximação pela distribuição normal a nível de 5% .

3. Observou-se uma grande variação dos números de *Aeromonas* spp. detectados nas diferentes amostras de hortaliças, cujos valores oscilaram de $< 10^2$ a 2×10^6 UFC/g.

4. Dentre as 43 amostras de hortaliças positivas para *Aeromonas* spp., 9 (21,0%) apresentaram contagens destas bactérias superiores a 10^4 UFC/g, sendo que 7 eram de agrião. Para as demais amostras positivas os números encontrados foram de $< 10^2$ a $< 10^4$ UFC/g.

5. Verificou-se que os valores de positividade obtidos através da semeadura direta em placas e do teste de presença/ausência não foram significativamente diferentes para as amostras de alface e de agrião. Por outro lado, relativamente às amostras de escarola, tal diferença foi significativa, revelando-se o teste de presença/ausência mais eficiente, possivelmente devido ao fato de nenhuma das amostras desta hortaliça ter se mostrado positiva na contagem e negativa em teste de presença/ausência.

6. Em um total de 187 cepas suspeitas isoladas, obteve-se a confirmação de *Aeromonas* spp. de um número relativamente alto, ou seja, de 143 (76,5%), sobretudo se forem excluídas as cepas provenientes das 10 primeiras amostras analisadas, elevando-se a percentagem de confirmadas para 83,5% .

7. Das 143 cepas confirmadas como sendo de *Aeromonas* spp., 138 (96,5%) eram de *A. caviae*, 4 (2,8%) de *A. hydrophila* e 1 (0,7%) que, embora tenha sido classificada como *Aeromonas*, foi atípica, levando em conta as suas características bioquímicas.

8. Do total de 43 amostras positivas para *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*, 39 (90,7%) revelaram-se com a presença exclusiva de *A. caviae*, 1 (2,3%) de *A. caviae* e *Aeromonas* atípica e 3 (7,0%) mostraram-se positivas somente para *A. hydrophila*, observando-se, portanto, grande predominância de contaminação com *A. caviae*.

9. Frente aos resultados obtidos, pode-se concluir que as hortaliças, dos tipos que foram analisados, podem representar risco à saúde, dado que as mesmas são consumidas cruas em larga escala em nosso meio.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS *

- ABEYTA Jr., C., KAYSNER, C.A., WEKELL, M.M., SULLIVAN, J.L., STELMA Jr., G.N. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. **J. Food Prot.**, Ames, v.49, n.8, p.643-646, 1986.
- ABEYTA Jr., C., WEAGANT, S.D., KAYSNER, C.A., WEKELL, M.M., STOTT, R.F., KRANE, M.H., PEELER, J.T. *Aeromonas hydrophila* in shellfish growing waters: incidence and media evaluation **J. Food Prot.**, Ames, v.52, n.1, p.7-12, 1989.
- ABEYTA Jr., C., WEKELL, M.M. Potential sources of *Aeromonas hydrophila*. **J. Food Saf.**, Westport, v.9, p.11-22, 1988.
- AGBONLAHOR, D.E., SHONEKAN, R.A.O., KAZAK, W.H., COKER, A.O. *Aeromonas* food poisoning in Nigeria: a case report. **Cent. Afr. J. Med.**, Salisbury, v.28, n.2, p.36-38, 1982.
- AGGER, W.A., McCORMICK, J.D., GURWITH, M.J. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, p.21, n.6, p.909-913, 1985.
- ALABI, S.A., ODUGBEMI, T. Biochemical characteristics and a simple scheme for the identification of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. **J. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v.93, n.3, p.166-169, 1990.
- ALTWEGG, M.S., GEISS, H.K. *Aeromonas hydrophila* as a human pathogen. **C R C -Crit. Rev. Microbiol.**, Cleveland, v.16, n.4, p.253-286, 1989.
- ALTWEGG, M., STEIGERWALT, A.G., ALTWEGG-BISSIG, R., LÜTHY-HOTTENSTEIN, J., BRENNER, D.J. Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.2, p.258-264, 1990.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington, 1992. 1219p.

* De acordo com a NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990 .

- ANNAFURNA, E., SANYAL, S.C. Enterotoxigenicity of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v.10, p.317-323, 1977.
- ARAUJO, R.M., ARRIBAS, R.M., PARES, R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.71, p.182-186, 1991.
- ARCHER, D.L., KVENBERG, J.E. Regulatory significance of *Aeromonas* in foods. *J. Food Saf.*, Westport, v.9, p.53-58, 1988.
- ASAO, T., KINOSHITA, Y., KOSAKI, S., UEMURA, T., SAKAGUCHI, G. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.*, Washington, v.46, n.1, p.122-127, 1984.
- BARER, M.R., MILLERSHIP, S.E., TABAQCHALI, S. Relationship of toxin production to species in the genus *Aeromonas*. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v.22, p.303-309, 1986.
- BARNHART, H.M., PANCORBO, O.C., DREESEN, D.W., SHOTTS Jr., E.B. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from carcasses and processing water in a broiler processing operation. *J. Food Prot.*, Ames, v.52, n.9, p.646-649, 1989.
- BAUMANN, P., SCHUBERT, R.H.W. Vibrionaceae. In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.516-517.
- BERQUO, E.S., SOUZA, J.M.P., GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo: E.P.U., 1981. 350p.
- BERRANG, M.E., BRACKETT, R.E., BEUCHAT, L.R. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.55, n.9, p.2167-2171, 1989.
- BEUCHAT, L.R. Behavior of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.13, n.3, p.217-224, 1991.
- BLICKSTAD, E., MOLIN, G. Carbon dioxide as a controller of the spoilage flora of pork, with special reference to temperature and sodium chloride. *J. Food Prot.*, Ames, v.46, n.9, p.756-763, 1983.
- BORREGO, J.J., MORINIGO, M.A., MARTINEZ-MANZANARES, E., BOSCA, M., CASTRO, D., BARJA, J.L., TORANZO, A.E. Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v.35, p.264-269, 1991.

- BUCHANAN, R.L. The "new" pathogens: an update of selected examples. *Assoc. Food Drug Off.*, Philadelphia, v.48, p.142-155, 1984.
- BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *J. Food Saf.*, Westport, v.7, p.15-29, 1985.
- BURKE, V., COOPER, M., ROBINSON, J., GRACEY, M., LESMANA, M., ECHEVERRIA, P., JANDA, J.M. Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.19, n.1, p.39-43, 1984a.
- BURKE, V., GRACEY, M., ROBINSON, J., PECK, D., BEAMAN, J., BUNDELL, C. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.148, n.1, p.68-74, 1983.
- BURKE, V., ROBINSON, J., BERRY, R.J., GRACEY, M. Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a suckling-mouse test. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v.14, p.401-408, 1981.
- BURKE, V., ROBINSON, J., COOPER, M., BEAMAN, J., PARTRIDGE, K., PETERSON, D., GRACEY, M. Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.47, n.5, p.1146-1149, 1984b.
- BURKE, V., ROBINSON, J., GRACEY, M., PETERSON, D., MEYER, N., HALEY, V. Isolation of *Aeromonas* spp. from an unchlorinated domestic water supply. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.48, n.2, p.367-370, 1984d.
- BURKE, V., ROBINSON, J., GRACEY, M., PETERSON, D., PARTRIDGE, K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.48, n.2, p.361-366, 1984c.
- CALLISTER, S.M., AGGER, W.A. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.53, n.2, p.249-253, 1987.
- CAMPBELL, J.D., HOUSTON, C.W. Effect of cultural conditions on the presence of a cholera-toxin cross-reactive factor in culture filtrates of *Aeromonas hydrophila*. *Curr. Microbiol.*, New York, v.12, n.2, p.101-106, 1985.

- CARNAHAN, A.M., BEHRAM, S., JOSEPH, S.W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.29, n.12, p.2843-2849, 1991.
- CARRELLO, A., SILBURN, K.A., BUDDEN, J.R., CHANG, B.J. Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEP-2 cells. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v.26, p.19-27, 1988.
- CASELITZ, F.H. Zur Frage von *Pseudomonas aeruginosa* und verwandten Microorganismen als Enteristiserreger. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, Stuttgart, v.9, p.269-276, 1958.
- CHAKRABORTY, T., MONTENEGRO, M.A., SANYAL, S.C., HELMUTH, R., BULLING, E., TIMMIS, K.N. Cloning of enterotoxin from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.*, Washington, v.46, n.2, p.435-441, 1984.
- CHAMPSAUR, H., ANDREMONT, A., MATHIEU, D., ROTTMAN, E., AUZEPY, P. Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.145, n.2, p.248-254, 1982.
- CHOPRA, A.K., VO, T.N., HOUSTON, C.W. Mechanism of action of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.91, p.15-20, 1992.
- CHOPRA, A.K., HOUSTON, C.W., GENAUX, C.T., DIXON, J.D., KUROSKY, A. Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.24, n.4, p.661-664, 1986.
- CHRISTIE, R., ATKINS, N.E., MUNCH-PETERSEN, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, Adelaide, v.23, p.197-200, 1944.
- COLWELL, R.R., MacDONELL, M.T., DE LEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v.36, n.3, p.473-477, 1986.
- CONDON, S., GARCIA, M.L., OTERO, A., SALA, F.J. Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.72, p.322-326, 1992.
- CUMBERBATCH, N., GURWITH, M.J., LANGSTON, C., SACK, R.B., BRUNTON, J.L. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect. Immun.*, Washington, v.23, n.3, p.829-837, 1979.

- DAILY, O.P., JOSEPH, S.W., COOLBAUGH, J.C., WALKER, R.I., MERRELL, B.R., ROLLINS, D.M., SEIDLER, R.J., COLWELL, R.R., LISSNER, C.R. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.13, n.4, p.769-777, 1981.
- DAVIS, W.A., KANE, J.G., GARAGUSI, V.F. Human *Aeromonas* infections: a review of the literature and a case report of endocarditis. *Medicine*, Baltimore, v.57, n.3, p.267-277, 1978.
- DEAN, A.G., CHING, Y.C., WILLIAMS, R.G., HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.125, n.4, p.407-411, 1972.
- ECHEVERRIA, P., BLACKLOW, N.R., SANFORD, L.B., CUKOR, G.G. Travelers' diarrhea among American Peace Corps volunteers in rural Thailand. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.143, n.6, p.767-771, 1981.
- ECHEVERRIA, P., HARRISON, B.A., TIRAPAT, C., McFARLAND, A. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.46, n.1, p.32-36, 1983.
- FARBER, J.M. Microbiological aspects of modified - atmosphere packaging technology - a review. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.1, p.58-70, 1991.
- FDA. 1985. Pathogen surveillance sampling of *Aeromonas hydrophila* in foods. Food Safety Compliance Program 7303-030 Apud: ABEYTA Jr., C., WEKELL, M.M. Potential sources of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Saf.*, Westport, v.9, p.11-22, 1988.
- FIGURA, N., GUGLIELMETTI, P. Differentiation of motile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for a CAMP-like factor. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.25, n.7, p.1341-1342, 1987.
- FIGURA, N., MARRI, L., VERDIANI, S., CECCHERINI, C., BABERI, A. Prevalence, species differentiation, and toxigenicity of *Aeromonas* strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.23, n.3, p.595-599, 1986.
- FRICKER, C.R., TOMPSETT, S. *Aeromonas* spp. in foods: a significant cause of food poisoning? *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.9, p.17-23, 1989.

- GHENGHESH, K.S. *Aeromonas: epidemiological aspects and virulence factors.* São Paulo, 1989. 192 p. [Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina].
- GOODWIN, C.S., HARPER, W.E.S., STEWART, J.K., GRACEY, M., BURKE, V., ROBINSON, J. Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* and diarrhoea in adults. *Med. J. Aust.*, Sydney, v.1, p.25-26, 1983.
- GORDEN, R.W., HAZEN, T.C., ESCH, G.W., FLIERMANS, C.B. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the american alligator, *Alligator mississippiensis*. *J. Wildl. Dis.*, Iowa, v.15, n.2, p.239-43, 1979.
- GRACEY, M., BURKE, V., ROBINSON, J. *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Lancet*, London, v.2, p.1304-1306, 1982.
- GRAM, L. Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp. on fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.6, p.436-442, 1991.
- GRAY, S.J., STICKLER, D.J., BRYANT, T.N. The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from animals and their environment. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v.105, p.277-294, 1990.
- HAVELAAR, A.H., SCHETS, F.M., van SILFHOUT, A., JANSEN, W.H., WIETEN, G., van der KOOIJ, D. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.72, p.435-444, 1992.
- HAZEN, T.C., FLIERMANS, C.B., HIRSCH, R.P., ESCH, G.W. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.36, n.5, p.731-738, 1978.
- HEIMBROOK, M.E., WANG, W.L.L., CAMPBELL, G. Staining bacterial flagella easily. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.27, n.11, p.2612-2615, 1989.
- HEYWOOD, R. *Aeromonas* infection in snakes. *Cornell Vet.*, Ithaca, v.58, p.236-241, 1968.
- HICKMAN-BRENNER, F.W., FANNING, G.R., ARDUINO, M.J., BRENNER, D.J., FARMER III, J.J. *Aeromonas schubertii*, a new manitol-negative species found in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.26, n.8, p.1561-1564, 1988.

- HICKMAN-BRENNER, F.W., MacDONALD, K.L., STEIGERWALT, A.G., FANNING, G.R., BRENNER, D.J., FARMER III, J.J. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.25, n.5, p.900-906, 1987.
- HOLMBERG, S.D., FARMER III, J.J. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.6, n.5, p.633-639, 1984.
- HONDA, T., SATO, M., NISHIMURA, T., HIGASHITSUTSUMI, M., FUKAI, K., MIWATANI, T. Demonstration of cholera toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.*, Washington, v.50, n.1, p.322-323, 1985.
- HUDSON, J.A., de LACY, K.M. Incidence of motile aeromonads in New Zealand retail foods. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.9, p. 696-699, 1991.
- HUGH, R., LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, Washington, v.66, p.24-26, 1953.
- HUNTER, P.R., BURGE, S.H. Isolation of *Aeromonas caviae* from ice-cream. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.4, p.45-46, 1987.
- IBRAHIM, A., Mac RAE, I.C. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.12, p.263-270, 1991.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganisms in foods*. 2.ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. v.1, 434p.
- JANDA, J.M., BOTTONE, E.J., SKINNER, C.V., CALCATERRA, D. Phenotypic markers associated with gastrointestinal *Aeromonas hydrophila* isolates from symptomatic children. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.17, n.4, p.588-591, 1983.
- JANDA, J.M., DIXON, A., RAUCHER, B., CLARK, R.B., BOTTONE, E.J. Value of blood agar for primary plating and clinical implication of simultaneous isolation of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* from a patient with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.20, n.6, p.1221-1222, 1984.

- JIANG, Z.D., NELSON, A.C., MATHEWSON, J.J., ERICSSON, C.D., DuPONT, H.L. Intestinal secretory immune response to infection with *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* among students from the United States in Mexico. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.164, p.979-982, 1991.
- JIWA, S.F.H. Enterotoxigenity, hemagglutination and cell-surface hydrophobicity in *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* and *A. salmonicida*. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v.8, p. 17-34, 1983.
- JOSEPH, S.W., COLWELL, R.R., MacDONELL, M.T. *Aeromonas* taxonomy. *Experientia*, Basel, v.43, n.4, p.349-350, 1987.
- JOSEPH, S.W., JANDA, M., CARNAHAN, A. Isolation, enumeration and identification of *Aeromonas* sp. *J. Food Saf.*, Westport, v.9, p.23-35, 1988.
- KETOVER, B.P., YOUNG, L.S., ARMSTRONG, D. Septicemia due to *Aeromonas hydrophila*: clinical and immunological aspects. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.127, n.3, p.284-290, 1973.
- KIROV, S.M., ANDERSON, M.J., McMEEKIN, T.A. A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.68, p.327-334, 1990.
- KNOCHEL, S., JEPPESEN, C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.10, n.4, p.317-322, 1990.
- KOBAYASHI, K., OHNAKA, T. Food poisoning due to newly recognized pathogens. *Asian Med. J.*, Tokyo, v.32, n.1, p.1-12, 1989.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL Jr., V.R., JANDA, W.M., SOMMERS, H.M., WINN Jr., W.C. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 3.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1988. p. 343-344.
- KORBEL, R., KÖSTERS, J. Seuchenhaftes Sterben von Wildvögeln nach *Aeromonas hydrophila* Infektion. *Tierärztl. Prax.*, Stuttgart, v.17, n.3, p.297-298, 1989.
- KROVACEK, K., FARIS, A., BALODA, S.B., LINDBERG, T., PETERZ, M., MANSSON, I. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol.*, London, v.9, n.3, p.215-222, 1992b.

- KROVACEK, K., FARIS, A., BALODA, S.B., PETERZ, M., LINDBERG, T., MANSSON, I. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. **Food Microbiol.**, London, v.9, n.1, p.29-36, 1992a.
- KROVACEK, K., FARIS, A., MANSSON, I. Growth of and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.13, n.2, p.165-176, 1991.
- KUIJPER, E.J., STEIGERWALT, A.G., SCHOENMAKERS, B.S.C.I.M., PEETERS, M.F., ZANEN, H.C., BRENNER, D.J. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27, n.1, p. 132-138, 1989.
- LAWSON, M.A., BURKE, V., CHANG, B.J. Invasion of HEp-2 cells by fecal isolates of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, Washington, v.47, n.3, p.680-683, 1985.
- LEITAO, M.F.F., SILVEIRA, N.F.A. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no estado de São Paulo. **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, n.1, p.90-99, 1991.
- LEUNG, C.K., HUANG, Y.W., PANCORBO, O.C. Bacterial pathogens and indicators in catfish and pond environments. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.6, p.424-427, 1992.
- LJUNGH, A., POPOFF, M., WADSTRÖM, T. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.6, n.2, p.96-100, 1977.
- LJUNGH, A., WRETLIND, B., MÖLLEBY, R. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B**, Copenhagen, v.89, p.387-397, 1981.
- MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312p.
- MAJEED, K.N., EGAN, A.F., MACRAE, I.C. Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.67, p.165-170, 1989.
- MAJEED, K.N., EGAN, A.F., MACRAE, I.C. Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.69, p.332-337, 1990.

- MAJEED, K.N., Mac RAE, I.C. Experimental evidence for toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in a meat extract at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.12, p.181-188, 1991.
- MARCUS, L.C. Infectious diseases of reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Chicago, v.159, n.11, p.1626-1631, 1971.
- MARTINEZ-MANZANARES, E., MORINIGO, M.A., CORNAX, R., EGEA, F., BORREGO, J.J. Relationship between classical indicators and several pathogenic microorganisms involved in shellfish - borne diseases. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.9, p.711-717, 1991.
- MARTINEZ-SILVA, R., GUZMANN-URREGO, M., CASELITZ, F.H. Zur Frage der Bedeutung von *Aeromonas*stämmen bei Säuglingsenterites. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, Stuttgart, v.12, p.445-451, 1961.
- MILLER, R.M., CHAPMAN, W.R. *Epistylis* sp. and *Aeromonas hydrophila* infections in fishes from North Carolina reservoirs. *Prog. Fish Cult.*, v.38, p.165-168, 1976
Apud: BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potencial food poisoning species: a review. *J. Food Saf.*, Westport, v.7, p.15-29, 1985.
- MOIR, C.J., EYLES, M.J. Inhibition, injury and inactivation of four psychrotrophic foodborne bacteria by the preservatives methyl p-hydroxybenzoate and potassium sorbate. *J. Food Prot.*, Ames, v.55, n.5, p.360-366, 1992.
- MONFORT, P., BALEUX, B. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.56, n.7, p.1999-2006, 1990.
- MORGAN, D.R., JOHNSON, P.C., DuPONT, H.L., SATTERWHITE, T.K., WOOD, L.V. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect. Immun.*, Washington, v.50, n.1, p.62-65, 1985.
- MORGAN, D.R., WOOD, L.V. Is *Aeromonas* sp. a foodborne pathogen? Review of the clinical data. *J. Food Saf.*, Westport, v.9, p.59-72, 1988.
- MOYER, N.P. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.25, n.11, p.2044-2048, 1987.

- NAMDARI, H., BOTTONE, E.J. Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, n.5, p.837-840, 1990a.
- NAMDARI, H., BOTTONE, E.J. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, n.8, p.1796-1798, 1990b.
- NAMDARI, H., BOTTONE, E.J. *Aeromonas caviae*: Ecologic adaptation in the intestinal tract of infants coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity. *Experientia*, Basel, v.47, p.434-436, 1991.
- NEVES, M.S., NUNES, M.P., RICCIARDI, I.D. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro; Brazil. *J. Food Prot.*, Ames, v.53, n.1, p.78-80, 1990.
- NISHIKAWA, Y., KISHI, T. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v.101, p.213-223, 1988.
- NOTERMANS, S., HAVELAAR, A., JANSEN, W., KOZAKI, S., GUINEE, P. Production of "Asao Toxin" by *Aeromonas* strains isolated from feces and drinking water. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.23, n.6, p.1140-1142, 1986.
- OLIVEIRA, C.A.F., GERMANO, P.M.L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. I- Pesquisa de helmintos. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.26, n.4, p.283-289, 1992.
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., BENNETT, B. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas* species in retail poultry, beef and pork. *J. Food Prot.*, Ames, v.50, n.6, p.509-513, 1987.
- PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *J. Food Prot.*, Ames, v.49, n.12, p.1003-1009, 1986.
- PALUMBO, S.A., BENCIVENGO, M.M., DEL CORRAL, F., WILLIAMS, A.C., BUCHANAN, R.L. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.27, n.5, p.854-859, 1989.

- PALUMBO, S.A., BUCHANAN, R.L. Factors affecting growth or survival of *Aeromonas hydrophila* in foods. *J. Food Saf.*, Westport, v.9, p.37-51, 1988.
- PALUMBO, S.A., MAXINO, F., WILLIAMS, A.C., BUCHANAN, R.L., THAYER, D.W. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.50, n.4, p.1027-1030, 1985a.
- PALUMBO, S.A., MORGAN, D.R., BUCHANAN, R.L. Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Sci.*, Chicago, v.50, p.1417-1421, 1985b.
- PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C. Growth of *Aeromonas hydrophila* K144 as affected by organic acids. *J. Food Sci.*, Chicago, v.57, n.1, p.233-235, 1992a.
- PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J.G. Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Prot.*, Ames, v.50, n.9, p.761-764, 1987.
- PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J.G. Model for the aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.6, p.429-435, 1991.
- PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J.G. Model for the anaerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Prot.*, Ames, v.55, n.4, p.260-265, 1992b.
- PITARANGSI, C., ECHEVERRIA, P., WHITMIRE, R., TIRAPAT, C., FORMAL, S., DAMMIN, G.J., TINGTALAPONG, M. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. *Infect. Immun.*, Washington, v.35, n.2, p.666-673, 1982.
- POFFE, R., OP de BEECK, E. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.71, p.366-370, 1991.
- POPOFF, M. *Aeromonas*. In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1. p.545-548.
- POPOFF, M., LALLIER, R. Characterization of *Aeromonas*. *Methods Microbiol.*, London, v.16, p.128-145, 1984.
- RAHMAN, A.F.M.S., WILLOUGHBY, J.M.T. Dysentery-like syndrome associated with *Aeromonas hydrophila*. *Brit. Med. J.*, London, v.281, p.976, 1980.

- RIGNEY, M.M., ZILINSKY, J.W., ROUF, M.A. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red leg disease in frogs. **Curr. Microbiol.**, v.1, p.1175-1179, 1978. Apud: BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Saf.**, Westport, v.7, p.15-29, 1985.
- RIPPEY, S.R., CABELLI, V.J. Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.38, n.1, p.108-113, 1979.
- RODRIGUES, J. *Aeromonas* sp. - Incidência em alimentos e estudo de características associadas à virulência. Campinas, 1992. 104 p. [Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas].
- SAKAZAKI, R., SHIMADA, T. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, Tokyo, v.37, p.247-255, 1984.
- SANYAL, S.C., SINGH, S.J., SEN, P.C. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.8, n.1, p.195-199, 1975.
- SCHULTZ, A.J., MCCARDELL, B.A. DNA homology and immunological cross-reactivity between *Aeromonas hydrophila* cytotoxic toxin and cholera toxin. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.1, p.57-61, 1988.
- SHILKIN, K.B., ANNEAR, D.I., ROWETT, L.R., LAURENCE, B.H. Infection due to *Aeromonas hydrophila*. **Med. J. Aust.**, Sydney, v.1, n.9, p.351-353, 1968.
- SHOTTS, E.B., GAINES, J.L., MARTIN, L., PRESTWOOD, A.K. *Aeromonas*-induced deaths among fish and reptiles in an eutrophic inland lake. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Chicago, v.161, n.6, p.603-607, 1972.
- STELMA Jr., G.N. Virulence factors associated with pathogenicity of *Aeromonas* isolates. **J. Food Saf.**, Westport, v.9, p.1-10, 1988.
- STERN, N.J., DRAZEK, E.S., JOSEPH, S.W. Low incidence of *Aeromonas* sp. in livestock feces. **J. Food Prot.**, Ames, v.50, n.1, p.66-69, 1987.
- TERNSTROM, A., MOLIN, G. Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **J. Food Prot.**, Ames, v.50, n.2, p.141-146, 1987.

- THELEN, P., BURKE, V., GRACEY, M. Effects of intestinal micro-organisms on fluid and electrolyte transport in the jejunum of the rat. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v.11, n.4, p.463-470, 1978.
- TITSLER, R.P., SANDHOLZER, L.A. The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. *J. Bacteriol.*, Washington, v.31, n.6, p.575-580, 1936.
- TODD, L.S., HARDY, J.C., STRINGER, M.F., BARTHOLOMEW, B.A. Toxin production by strains of *Aeromonas hydrophila* grown in laboratory media and prawn purée. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.9, p.145-156, 1989.
- TURNBULL, P.C.B., LEE, J.V., MILIOTIS, M.D., VAN DE WALLE, S., KOORNHOF, H.J., JEFFERY, L., BRYANT, T.N. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.19, n.2, p.175-180, 1984.
- VARNAM, A.H., EVANS, M.G. *Aeromonas*. In: VARNAM, A.H., EVANS, M.G. *Foodborne pathogens*. Aylesbury: Wolfe, 1991. p.185-200.
- Von GRAEVENITZ, A. Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*: introduction. *Experientia*, Basel, v.43, n.4, p.348, 1987.
- Von GRAEVENITZ, A., MENSCH, A.H. The genus *Aeromonas* in human bacteriology. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.278, p.245-249, 1968.
- WADSTRÖM, T., LJUNGH, A. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food and waterborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.12, n.4, p.303-312, 1991.
- WADSTRÖM, T., LJUNGH, A., WRETLIND, B. Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect. B, Copenhagen, v.84, p.112-114, 1976.
- WATSON, I.M., ROBINSON, J.O., BURKE, V., GRACEY, M. Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.22, n.1, p.48-51, 1985.
- WEST, P.A., COLWELL, R.R. Identification and classification of *Vibrionaceae* - an overview. In: COLWELL, R.R., ed. *Vibrios in the environment*. New York: John Wiley, 1984. p.334-335.
- WOHLGEMUTH, K., PIERCE, R.L., KIRKBRIDE, C.A. Bovine abortion associated with *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Chicago, v.160, n.7, p.1001-1002, 1972.

VII. RESUMO

Em um total de 90 amostras de hortaliças, incluindo 30 de alface, 30 de agrião e 30 de escarola, foi verificada a ocorrência de *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila*, empregando-se os métodos de semeadura direta em ágar amido-ampicilina (contagem) e após enriquecimento em caldo tripticase-soja adicionado de ampicilina (teste de presença/ausência). As incubações foram feitas a 28°C, durante 24 horas. A presença dessas bactérias foi detectada em 43 (47,8%) das amostras analisadas, com contagens variando de $< 10^2$ a $2,0 \times 10^6$ UFC/g. As amostras de agrião foram as que se revelaram, na contagem, com maiores números de *Aeromonas* spp. Das 43 amostras positivas para *Aeromonas* spp., 9 (21,0%) revelaram-se com números superiores a 10^4 UFC/g, sendo que 7 eram de agrião. Dentre as amostras de hortaliças analisadas, as de agrião revelaram-se com positividade para *Aeromonas* do grupo *A. hydrophila* (70,0%) significativamente maior em relação às de alface (43,3%) e de escarola (30,0%) a nível de 5% . Não foram

observadas diferenças significativas entre as positivities obtidas através do método de semeadura direta em placas e do teste de presença/ausência para as amostras de alface e de agrião. Para as amostras de escarola, a positividade foi significativamente mais alta no teste de presença/ausência. Do total de 143 cepas confirmadas como sendo do gênero *Aeromonas*, 138 (96,5%) eram de *A. caviae*, 4 (2,8%) de *A. hydrophila* e 1 (0,7%) que, pelas suas características, foi considerada como *Aeromonas* atípica. Dos resultados obtidos, pode-se depreender que as hortaliças dos tipos analisados, alface, agrião e escarola, dado os níveis de contaminação observados, podem representar risco aos consumidores.

VIII. SUMMARY

A total of 90 retail vegetable samples, including 30 of lettuce, 30 of water-cress and 30 of escarole were examined for the presence of *Aeromonas* of the *A. hydrophila* group, using two different isolation methods. One of the methods involved direct plating on starch-ampicillin agar for the purpose of enumeration and the other one, after enrichment in trypticase-soy broth with ampicillin, for detection, both using 24 hour incubation at 28°C. *Aeromonas* spp. were detected in 43 (47.8%) samples and their numbers varied from less than 10^2 up to 2.0×10^6 CFU/g. The water-cress samples were the ones to show greater numbers of *Aeromonas* spp. The counts of 9 (21%) of the 43 positive samples exceeded 10^4 CFU/g, 7 of them consisting of water-cress. The number of water-cress positive samples (70.0%) was significantly higher at 5% than those of lettuce (43.3%) and those of escarole (30.0%). No significant differences were found in relation to positivity for *Aeromonas* spp. between both

isolation methods used, regarding the lettuce and the water-cress samples. On the other hand, with respect to the escarole samples, positivity was significantly superior for the isolation method involving enrichment. In terms of species level identification, among 143 strains confirmed as being *Aeromonas* spp., 138 (96.5%) were *A. caviae*, 4 (2.8%) were *A. hydrophila* and 1 (0.7%) was considered as atypical due to its different biochemical profile. The results show that the vegetables examined may represent risk to consumers in terms of presence and numbers of *Aeromonas* of the *A. hydrophila* group.

IX. ANEXO

PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E REAGENTES

1. Solução salina peptonada (ICMSF, 1978)

Peptona	1,0 g
Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1000 mL

Após a dissolução dos ingredientes, esta solução era esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos, após ter seu pH ajustado a $7,2 \pm 0,2$.

2. Agar amido-ampicilina (PALUMBO et al., 1985)

Caldo base vermelho de fenol	16,0 g
Agar	15,0 g
Vermelho de fenol	0,007 g
Amido solúvel	10,0 g
Água destilada	1000 mL

O caldo base vermelho de fenol (Difco 0092) era adicionado de ágar e de corante vermelho de fenol, em substituição ao ágar base vermelho de fenol (Difco 0098) recomendado por PALUMBO et al. (1985). A adição de corante

se fez necessária, uma vez que a quantidade de vermelho de fenol presente no caldo é 0,007 g menor do que no ágar vermelho de fenol. Os ingredientes eram dissolvidos por aquecimento e o pH era ajustado a $7,4 \pm 0,2$, sendo esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Após o resfriamento do meio de cultura a aproximadamente 50°C , adicionava-se certo volume de uma solução de ampicilina estéril de modo a obter uma concentração final de 10 ug/mL no meio de cultura, ou seja, adicionava-se 1 mL de uma solução de ampicilina a 10 mg/mL para cada litro de meio de cultura a ser preparado. A ampicilina utilizada para esse fim foi uma ampicilina vendida no comércio, de marca Benzotal 1000, fabricada pelo laboratório Biossintética. A ampicilina em questão, comercializada estéril por ser injetável, era diluída a uma concentração de 10 mg/mL em água esterilizada por em autoclave a 121°C , por 20 minutos e armazenada em pequenas porções sob congelamento até o momento de sua utilização.

Após a adição de ampicilina seguida de homogeinização suave, o meio era distribuído em volumes de 15 a 20 mL em placas de Petri esterilizadas e, após sua solidificação, mantido sob refrigeração por, no máximo, 3 dias, quando era utilizado.

3. Caldo tripticase-soja em concentração dupla com ampicilina

O caldo (Difco 0370) era preparado em concentração dupla à recomendada pelo fabricante, isto é, para cada litro de meio, eram necessários 60 g ao invés de 30 g. Após a sua dissolução, o meio de cultura era distribuído em tubos de ensaio com capacidade para 30 mL, em volumes de 10 mL e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. No momento da análise, era adicionado um volume de solução estéril de ampicilina em cada tubo, de maneira a se obter, após a adição de 10 mL da amostra diluída a 10^{-1} , uma concentração final de 10 ug/mL.

4. Agar tripticase-soja (Oxoid)

Esse meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante. Os tubos contendo o ágar eram inclinados posteriormente à sua esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5. Agar triplice-açúcar-ferro (Difco 0265)

O meio era preparado conforme as instruções do fabricante. Assim, após a sua dissolução, era distribuído em volumes de 4 mL em tubos de ensaio 12x120 mm e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos inclinados em temperatura ambiente, até a sua solidificação e, em seguida, mantidos sob refrigeração, a cerca de 4°C.

6. Agar semi-sólido para teste de motilidade (TITSLER & SANDHOLZER, 1936)

Triptose	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Após a dissolução dos ingredientes por aquecimento, o meio era distribuído em tubos 12x120 mm, em volumes de 3 mL e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio era mantido em posição vertical até a sua solidificação e, em seguida, mantido sob refrigeração a cerca de 4°C. O pH final era de 7,2.

7. Caldo nitrado (Difco 0268)

Esse meio de cultura era preparado e esterilizado conforme as instruções do fabricante. Assim, após a sua dissolução, o meio era distribuído em volumes de 3 mL em tubos de 12x120 mm e esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido sob refrigeração a cerca de 4°C.

8. Água peptonada a 1% para a prova do indol (ICMSF, 1978)

Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Os ingredientes eram dissolvidos, o pH era ajustado em $7,2 \pm 0,1$ e, após sua distribuição em tubos 12x120 mm, o meio era esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido sob refrigeração a, aproximadamente, 4°C.

9. Meio para a prova de oxidação/fermentação da glicose

Meio-base para O/F	9,4 g
D-glicose	10,0 g
Água destilada	1000 mL

Esse meio era preparado, utilizando-se a base de Hugh e Leifson para O/F (Difco 0688). Os ingredientes eram dissolvidos por aquecimento, o pH era ajustado a $6,8 \pm 0,2$ e, após sua distribuição em volumes de 4 mL em tubos de 12x120 mm, o meio era esterilizado por autoclavação a 121°C durante 10 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido sob refrigeração a, aproximadamente, 4°C.

10. Caldo nutriente

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Após a dissolução dos ingredientes, o meio era distribuído em volumes de 2mL em tubos de 12x120mm. O pH final da solução era de $6,8 \pm 0,2$. Os tubos contendo o meio eram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido sob refrigeração a cerca de 4°C.

11. Caldo tripticase-soja - sem e com a adição de cloreto de sódio

O caldo tripticase-soja (Difco 0370) era preparado conforme as instruções do fabricante. Para a obtenção de caldo com 3% e 6% de cloreto de sódio, 2,5 g e 5,5% desse sal eram adicionados, respectivamente, para cada 100 mL de meio, uma vez que o próprio meio contém, em sua formulação, 0,5% de cloreto de sódio.

12. Meio para as provas de utilização dos açúcares sacarose, manitol, inositol, salicina e arabinose

Preparava-se o caldo-base vermelho de fenol (Difco 0092) de acordo com as recomendações do fabricante. Assim,

após a dissolução dos ingredientes por aquecimento, o meio era distribuído em volumes de 100 mL, em frascos de Erlenmeyer, os quais eram esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, os frascos eram esfriados e em cada um eram adicionados, assepticamente, 10 mL de solução a 5% do açúcar correspondente, esterilizado por filtração em membrana filtrante (Millipore). Em seguida, em capela de fluxo laminar, cada meio era distribuído em volumes de 3 mL em tubos 12x120 mm esterilizados e mantido sob refrigeração a cerca de 4% .

13. Meio para a prova da produção de gás a partir da glicose

O caldo-base vermelho de fenol (Difco 0092) era adicionado de glicose de modo a se obter uma concentração final deste açúcar de 0,7% .Após a dissolução dos ingredientes e o ajuste do pH a 7,4 ,o meio era adicionado de 0,7% de glicose e distribuído, em volumes de 3 mL, em tubos 12x120 mm, contendo um tubo de Duhran invertido em cada um. Em seguida, o meio era esterilizado em autoclave a 121°C durante 10 minutos. Após a esterilização, os tubos eram esfriados e mantidos em temperatura ambiente.

14. Meio Clark-Lubs para a prova de Voges-Proskauer (Meio MR-VP-Difco 0016)

Esse meio de cultura era preparado e esterilizado conforme as instruções do fabricante. Assim, o meio era dissolvido e distribuído, em volumes de 4 mL em tubos 12x120

mm. Em seguida, o meio era esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido sob refrigeração a, aproximadamente, 4°C.

15. Agar bile-esculina (Mac FADDIN, 1976)

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Bile de boi (Oxgall, Difco)	40,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Os ingredientes eram dissolvidos por aquecimento, o meio, após ter seu pH ajustado a $6,6 \pm 0,2$, era distribuído em volumes de 3 mL, em tubos 12x120 mm e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição inclinada, em temperatura ambiente até a sua solidificação e, em seguida, mantidos sob refrigeração a cerca de 4°C.

16. Meio-base de Falcow para as provas de utilização dos amino-ácidos arginina, lisina e ornitina (Difco 0872)

O meio era preparado conforme instruções do fabricante, tendo sido adicionados 5 g de L-arginina, L-

lisina ou L-ornitina para cada litro de meio. Paralelamente, foi preparada base sem a adição de amino-ácido, como controle. O pH do meio era ajustado a $6,8 \pm 0,2$. A cada tubo de 12x120 mm, contendo 4 mL de base de Falkow, contendo ou não amino-ácido, foi adicionada vaselina líquida previamente à autoclavação, feita a 121°C durante 15 minutos.

17. Agar sangue de carneiro

Foi preparado, adicionando-se 5 mL de sangue estéril desfibrinado de carneiro a 95 mL de ágar base de Colúmbia (Difco 0792), previamente preparada e esterilizada seguindo instruções do fabricante e esfriada a 45°C. Após homogeneinização, o ágar sangue foi distribuído em placas de Petri estéreis, em volumes de 10 a, no máximo, 15 mL, de maneira a formar uma camada bem fina em cada placa.

18. Lugol (ICMSF, 1978)

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300 mL

19. Tiras para oxidase (Difco 007)

20. Reagente para a prova da catalase (ICMSF, 1978)

Água oxigenada a 3%

21. Reagentes A e B para nitritos (ICMSF, 1978)**21.1 Reagente A**

Acido sulfanílico 1,0 g

Acido acético 5 N 125 mL

Dissolvia-se o ácido sulfanílico no ácido acético e filtrava-se.

21.2 Reagente B

Alfa-naftilamina 1,0 g

Acido acético 5 N 200 mL

22. Reagente de Ehrlich para indol (Mac Faddin, 1976)

p-dimetilaminobenzaldeído 2,0 g

Alcool absoluto 190 mL

Acido clorídrico concentrado..... 40 mL

Dissolvia-se o aldeído no álcool e adicionava-se o ácido.

23. Reagentes A e B para VP (APHA, 1992)**23.1 Reagente A**

Alfa-naftol 5,0 g

Alcool absoluto 100 mL

23.2 Reagente B

Hidróxido de potássio 40,0 g
Água destilada 100 mL

24. Corante de Ryu para flagelos (HEIMBROOK et al., 1989)**- Solução I (mordente)**

Solução aquosa de fenol a 5% 10 mL
Ácido tânico 2,0 g
Solução sat. de 12-hidrato de
sulfato potássico de alumínio 10 mL

**- Solução II (corante) - solução saturada de cristal
violeta**

Cristal violeta 12 g
Etanol a 95% 100 mL

- Mistura final

1 parte de solução II : 10 partes de solução I