

Josias Rodrigues  $\bar{n}$



Este Exemplar Corresponde a Dedicação Final  
Da Tese Defendida Pelo Candidato Josias  
Rodrigues e Aprovada Pela Comissão Julga-  
dora. 30-1192: Marlene Serafim

**Aeromonas sp - Incidência em Alimentos  
e Estudo de Características Associadas  
à Virulência**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Imunologia do Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre em Biologia  
na área de Imunologia

Orientadora: Prof. Dra. Marlene B. <sup>Maide</sup> Serafim  $\dagger$

.. Campinas SP - 1992 ..

R618a

15681/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

O auxílio financeiro para a realização deste trabalho foi concedido pelos seguintes órgãos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Assistência ao Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedico este trabalho à minha  
mãe, a quem sou especialmente  
grato pelo apoio e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados com a valiosa contribuição das seguintes pessoas:

Profª. Dra. **Marlene B. Serafim**, pela dedicação, carinho e compreensão com que conduziu a orientação deste trabalho.

Prof. Dr. **A. F. Pestana de Castro**, chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI), pelas sugestões na redação final do texto.

Prof. Dr. **Wanderley Dias da Silveira**, do Laboratório de Genética Molecular do DMI, pela extração e eletroforese do DNA plasmidial e pelas sugestões na redação final do texto.

Prof. Dr. **Oswaldo Sant`Anna**, do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantã, pela doação dos camundongos selecionados para sensibilidade diferencial ao LPS.

Profª. Dra. **Maria Silvia Viccari Gatti**, do Laboratório de Virologia do DMI, pela realização dos ensaios de alça intestinal ligada de Coelho.

Prof. Dr. **Tomomasa Yano**, do Laboratório de Antígenos bacterianos do DMI, pelas muitas críticas e sugestões recebidas e, sobretudo, pela amizade.

Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis e as técnicas Cidinha e Marta, do Departamento de Histologia, pela orientação durante o preparo e coloração dos cortes histológicos de intestino de coelho.

Prof. Dr. Paulo M. F. Araújo, Coordenador do Curso de Pós Graduação em Imunologia do DMI, pela paciente orientação de questões relacionadas com o curso, em diversas ocasiões.

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hofling e as técnicas Antônia e Terezinha do Centro de Microscopia Eletrônica, pela orientação e auxílio na observação de estruturas de superfície da parede bacteriana.

Profas. Dras. Dagmar R. S. Machado e Lucila C. Ricci pelas sugestões na redação final do texto.

Lúcia e Cleide, secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela paciência e atenção constantes, sempre que solicitadas.

Dirce Lima Gabriel, Bióloga do DMI, pela orientação nas técnicas de cultura de células.

Geneci, Evandro e Izildinha, funcionários do laboratório 1, pela colaboração e amizade.

CONTEÚDO:

página

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Habitat e Ecologia .....	2
1.2. O gênero <i>Aeromonas</i> em Infecções .....	5
1.2.1. Infecções Extraintestinais .....	6
1.2.2. Infecções Entéricas .....	8
1.3. Fatores de Virulência .....	11
1.3.1. Enzimas Extracelulares .....	12
1.3.2. Sideróforos e Resistência Sérica .....	13
1.3.3. Adesinas .....	14
1.3.4. Citolisinas .....	17
1.3.5. Enterotoxinas .....	19
2. OBJETIVO .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1. Meios de cultura .....	23
3.2. Esterilização .....	25
3.3. Isolamento e Identificação das Amostras ..	25
3.4. Determinação do Perfil plasmidial .....	27
3.4.1. Cultivo das Amostras e Extração do DNA plasmidial .....	27
3.4.2. Preparo do Gel e Eletroforese em Agarose .....	28
3.5. Teste de Hemaglutinação Manose Sensível e Manose Resistente .....	29
3.5.1. Coleta e Conservação das Hemácias .....	29
3.5.2. Cultivo das Amostras .....	29

3.5.3. Teste .....	29
3.6. Teste de Autoaglutinação .....	30
3.7. Microscopia Eletrônica .....	31
3.8. Atividade de Pirazinamidase .....	32
3.9. Ensaio de Produção de Enterotoxinas .....	32
3.9.1. Produção de Enterotoxinas .....	32
3.9.2. Tratamento Térmico dos Ext. de Cultura.	33
3.9.3. Teste em Camundongos Recém-Nascidos ...	33
3.9.4. Teste em Alça Intest. de Coelho .....	34
3.9.4.0. Histologia .....	35
3.10. Ensaio de Citotoxicidade .....	35
3.10.1. Produção de Hemolisinas .....	35
3.10.2. Atividade Citotóxica em Células HeLa .	36
3.11. Ensaio para Detecção de Sideróforos .....	37
3.12. Teste de Sensibilidade ao Soro H. Normal.	37
3.13. Ensaio de Patogenicidade em Camundongos .	38
4. RESULTADOS .....	39
4.1. Frequência de <i>Aeromonas</i> sp em Alimentos ..	39
4.2. Características Bioquímicas das Amostras .	40
4.3. Perfil Plasmidial .....	41
4.4. Padrão Hemaglutinante .....	42
4.5. Autoaglutinação .....	43
4.6. Microscopia Eletrônica .....	43
4.7. Atividade de Pirazinamidase .....	44
4.8. Produção de Toxinas .....	44
4.8.1. Meio de Cultura .....	44
4.8.2. Produção de Enterotoxinas .....	44

4.8.2.1. Atividade dos Extratos de Cultura em Camundongos Recém-Nascidos .....	44
4.8.2.2. Atividade dos Extratos de Cultura em Alça Intest. Ligada de Coelho .....	45
4.8.2.2.0. Histologia .....	46
4.8.3. Produção de Hemolisinas .....	46
4.8.4. Produção de Citotoxinas .....	46
4.9. Produção de Sideróforos .....	47
4.10. Resistência Sérica .....	48
4.11. Efeito da Inoculação de Bactérias Viáveis em camundongos Swiss Adultos .....	48
4.12. Produção de Hemolisinas, Citotoxinas e Enterotoxinas em Relação ao Biotipo ....	49
5. DISCUSSÃO .....	73
6. CONCLUSÃO .....	83
7. SUMMARY .....	86
8. BIBLIOGRAFIA .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as infecções bacterianas, as diarreias têm sido objeto de intenso estudo nos últimos anos, em função da alta frequência com que são apontadas como causa de mortalidade em humanos e animais. Os principais enteropatógenos atualmente conhecidos são *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *Yersinia* sp, *Campilobacter* sp e rotavírus (11). Entretanto, muitos casos de diarreia permanecem com etiologia desconhecida. O gênero *Aeromonas* tem recebido crescente atenção por parte da comunidade médica, sendo considerado como causa suspeita de gastroenterites bacterianas e como agente etiológico de um grande número de outras infecções, incluindo septicemia, celulite e peritonite (30).

O gênero *Aeromonas* pertence à família *Vibrionaceae* (82), sendo representado por bactérias gram-negativas, em sua maioria móveis e com forma variável de alongada à cocóide. São anaeróbias facultativas e fermentam glicose com produção ou não de gás. Apresentam algumas características bioquímicas e morfológicas em comum com as *Enterobactérias*, mas são diferenciadas destas por serem positivas no teste de oxidase, feito com o reagente dicloridrato de N,N,N,N-Tetrametil parafenileno diamino. Dentro da família *Vibrionaceae*, distinguem-se dos demais membros por mostrarem-se resistentes ao agente vibriostático O-129 (2,4-diami-

no,6,7-diisopropilpteridina) na concentração de 150 ug/ml. Com base em características bioquímicas e na relação de sequência de nucleotídeos, reconhecem-se atualmente sete espécies de *Aeromonas* (50,59), sendo cinco dotadas de motilidade (*A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. schubertii*) e duas não móveis (*A. salmonicida* e *A. media*).

O primeiro isolamento de *Aeromonas* sp em humanos foi feito por Hill et alii (44) em 1954, de um caso de septicemia. Após a caracterização das amostras isoladas de animais e do ambiente por diversos grupos e estabelecer-se uma associação com doenças diarreicas, foram produzidos meios seletivos para coprocultura, conseguindo-se isolar, desta maneira, um número maior de amostras (99). Subsequentemente, investigou-se a frequência de indivíduos portadores, a produção de toxinas e outros fatores de virulência (99). O interesse em Ecologia e Epidemiologia levou à serotipagem e caracterização das amostras (99).

### 1.1. HABITAT E ECOLOGIA

As espécies mesófilas de *Aeromonas* têm sido encontradas com uma alta frequência em ambientes aquáticos. Leclere e Buttiaux (60) conseguiram isolar *Aeromonas* sp em um terço de um total de 9036 amostras coletadas de água, e sugeriram que, no exame

microbiológico da água potável, tais bactérias eram erroneamente incluídas no grupo dos coliformes. A presença de *Aeromonas* sp na água do mar e no plâncton foi relatada por Denis em 1971 (31). Em amostras de água coletadas em 30 estados americanos, cerca de 90 por cento apresentaram o microrganismo. Com base nestes resultados, os bacteriologistas chegaram à conclusão de que a presença de *Aeromonas* sp em tantos sistemas diferentes deve indicar um papel importante para essas bactérias nos ciclos naturais da água (81).

Em peixes de água doce e em outros animais pecilotérmicos as *Aeromonas* sp são consideradas habitantes naturais do trato intestinal. Boulanger et alii (12) isolaram *A. hydrophila* e *A. sobria* tanto de peixes moribundos como de peixes sadios. O uso medicinal de sanguessuga (*Hiruda medicinalis*) para controle de congestão venosa, após enxerto de pele, tem provocado infecção por *A. hydrophila*, sendo constatada a transmissão da bactéria pelo verme (94).

As espécies móveis de *Aeromonas* ocorrem em água de esgoto e em biótopos semelhantes onde se processa a degradação de certos compostos de elevado peso molecular, como proteínas, gordura e amido (90). A capacidade de degradação de compostos simples e seu uso como fonte de carbono, por esta bactéria, é um tanto limitada, se comparada à de outros microrganismos aquáticos como as *Pseudomonas* (90). Van der Kooij et alii. (98) demonstraram que a utilização de substâncias de alto peso molecular por *Aeromonas* sp

em meio pobre em nutrientes (por ex. a água de torneira) só é possível em presença de moléculas degradáveis de baixo peso molecular, como a glicose. Este comportamento justifica a presença de *Aeromonas* sp em água de esgoto ou em outros biótopos com substâncias de alto e de baixo peso molecular. A existência destes organismos em águas de esgoto também é dependente da temperatura: a 15 °C são encontrados com uma densidade pelo menos dez vezes maior do que os coliformes (90). Ao contrário de *Escherichia coli*, porém, somente uma pequena proporção de seres humanos (entre 0,2 a 8%) é portadora de *Aeromonas* sp (88). Em encanamentos de esgoto doméstico, se multiplicam facilmente, chegando a atingir densidades de até  $10^6$  UFC/ml na água e  $10^8$  UFC/g nos sedimentos (90). O aumento na concentração de bactérias atinge um pico antes de a água alcançar a estação de tratamento, sendo subsequentemente reduzida por degradação biológica. O grau de redução é uma boa medida de purificação da água pela estação de tratamento. Como a água tratada ainda contém entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC/ml e muitos rios e lagos ainda recebem água de esgoto não tratada, assume-se que a maioria dos isolamentos de *Aeromonas* sp de água de superfície são de bactérias provenientes de água de esgoto doméstico e outras descargas (90). Sendo as *Aeromonas* mesófilas indígenas em biótopos de água doce, multiplicando-se sob condições apropriadas de temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (especialmente o fósforo), sua frequência pode ser usada como índice do estado trófico nestes ambientes (90). A frequência relativa das três principais espécies mesófilas (*A. caviae*, *A. sobria* e *A. hydrophila*) é variável em função do estado trófi-

co da água. Na água de esgoto doméstica e em outros ambientes polissapróficos, a espécie predominante é *A. caviae*. Com a diminuição da concentração de sedimentos, há um aumento na população das espécies aerogênicas (*A. hydrophila* e *A. sobria*) e diminuição na população de *A. caviae*. Nos lagos e rios oligosapróficos, a densidade das espécies aerogênicas chega a 100% do total de *Aeromonas* presentes (90).

## 1.2 O GÊNERO AEROMONAS EM INFECÇÕES

Em peixes, espécies de *Aeromonas* fazem parte da flora microbiana normal do intestino, sendo também consideradas como importantes agentes de infecções (81). *A. salmonicida* é o agente causal da furunculose em salmões e constitui-se num dos patógenos de maior interesse em piscicultura. Em outros animais, *Aeromonas* sp são reconhecidas como patógenos oportunistas, tendo-se estabelecido sua associação com doenças em moluscos, répteis, anfíbios e aves (81), suínos (33) e bovinos (102). No homem tais bactérias foram por muito tempo consideradas sem grande importância patológica, sendo na maioria dos casos envolvidas com infecções extraintestinais secundárias (55). Particularmente nas duas últimas décadas, porém, o número de relatos de infecções entéricas com etiologia suspeita de *Aeromonas* sp tem aumentado (50).

### 1.2.1 Infecções Extraintestinais

**Septicemia:** Aproximadamente 200 casos de septicemia ou bacteremia por *Aeromonas* sp foram registrados na literatura (41). Pelo menos um terço dos pacientes envolvidos são crianças e adolescentes e frequentemente apresentam outras infecções, tais como leucemias, tumores, hemoglobinopatias, cirrose, falência renal, etc (41). A fonte de infecção, em alguns casos, parece ser endógena: possivelmente o trato intestinal, pois na autópsia de alguns pacientes observou-se lesões intestinais de onde o microrganismo deve ter se disseminado para o sangue (30). Nos casos observados não se constatou nenhum defeito imunológico.

**Meningite:** Sete casos foram descritos. Um deles, tratava de um indivíduo adulto sadio que desenvolveu a doença após uma craniotomia. De sete culturas feitas com amostras do líquido cerebro-espinhal deste paciente, isolou-se *Aeromonas* sp em cinco. Em culturas feitas com amostras de sangue, todas apresentaram a bactéria. Dos sete pacientes mencionados, sobreviveram apenas quatro (41).

**Infecções da pele e outros tecidos:** Estes casos formam a segunda maior fonte de isolamentos de *Aeromonas* sp em humanos, podendo afetar tanto indivíduos normais como imunodeprimidos (30). A fonte de infecção é de particular importância, porque a maioria dos casos está diretamente associada com lesões traumáticas e exposição ao solo ou à água. A infecção progride rapidamen-

te por algumas horas em muitos indivíduos, podendo ser acompanhada por febre e leucocitose (41). Com certa frequência ocorre, nos ferimentos, a formação de gás característica do gênero *Clostridium* (41). Entre os casos descritos por Davis et alii (30), inclui-se a infecção de um paciente que teve um membro amputado devido a uma lesão neurovascular traumática. Ao formar-se a ferida de cicatrização, isolou-se *A. hydrophila* da região atingida. Lopes et alii (67) descreveram um caso de osteomielite e septicemia, causadas por *Aeromonas* sp, em uma criança leucêmica. Espécies de *Aeromonas* parecem apresentar um certo tropismo para a musculatura. Vários relatos de infecções primárias em ferimentos incluem descrições de intensa inflamação muscular e necrose (30). Alguns casos de septicemia estão associados com miosite necrotizante tendo levado o paciente à morte (30). A miosite parece ter sido provocada por instalação metastática da bactéria a partir do sangue (30). Nas septicemias de pacientes acometidos por outras patologias e apresentando ferimentos com infecções por *Aeromonas* sp, tem sido verificado que a disseminação do microrganismo se deu a partir do sítio de infecção (41). Artrite supurativa foi descrita em três pacientes com leucemia e septicemia provocadas por *Aeromonas* sp, e em alguns casos de pacientes com artrite no joelho houve o desenvolvimento de infecção na junta metacarpofalangeal durante o curso da inflamação, com o envolvimento de vários sistemas. Em todos os casos, a bactéria foi isolada de culturas do sangue e do líquido sinovial dos pacientes (41).

**Casos diversos:** Juntamente com outros microrganismos, *Aeromonas* sp foram isoladas de pacientes com infecções no trato geniturinário (30). Num caso de endoftalmite provocada por acidente com um anzol de pesca, isolou-se *A. hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides* de material retirado da câmara anterior do olho (41). Doenças pulmonares podem ocorrer durante o curso de infecções septicêmicas por *Aeromonas* sp ou como pneumonia de aspiração em indivíduos que são vítimas de quase-afogamentos (41). Peritonite provocada por *Aeromonas* sp pode complicar perfuração intestinal ou diálise, surgindo também como infecção espontânea em pacientes com cirrose hepática (41). Foram descritos dois casos incomuns de endocardite provocada por *A. hydrophila* (30,76).

### 1.2.2 Infecções Entéricas

Um número crescente de estudos sugerem que algumas espécies de *Aeromonas* causam doenças diarréicas moderadas e autolimitantes em indivíduos sadios e um espectro de doenças intestinais que varia de disenterias agudas a diarréias líquidas crônicas, persistindo por semanas ou meses (3,29,50). Champsaur et alii (25) isolaram *A. sobria* de um paciente com sintoma característico de cólera. Cultura de fezes deste paciente deu resultado negativo para *Vibrio Cholerae* e *Escherichia coli* enterotoxigênica. A associação de *Aeromonas* enterotoxigênica com gastroenterite em crianças foi bem caracterizada em Perth, na Austrália (42). Num estudo prospectivo de doze meses, realizado com 1156 crianças diarréicas, obteve-se uma frequência de 10,2% de isolamentos da

bactéria nos pacientes, contra 0,6% nos indivíduos assintomáticos. *A. hydrophila* foi incluída entre os principais agentes causadores da diarreia do viajante, num estudo feito recentemente considerando a importância relativa destes patógenos em países de primeiro e de terceiro mundo (11).

Em várias regiões do globo, a incidência de diarreias por *Aeromonas* sp apresenta uma sazonalidade mais ou menos definida, sendo mais frequente nos meses de verão (1,16,79,101). Os indivíduos mais afetados situam-se numa faixa etária inferior a sete anos e superior a sessenta anos (1). Entre os sintomas característicos, estão: fezes líquida do tipo "rice-water", diarreia mucóide com a presença ou não de sangue, flatulência, dores abdominais, vômitos e febres que atingem 38 °C (1,101). Terapia antimicrobiana com sulfa-metoxazol-timetoprim permite a regressão dos sintomas e o desaparecimento da bactéria das fezes (30).

Espécies de *Aeromonas* resistem ao tratamento da água com cloro, sendo que as principais vias de transmissão são alimentos processados com água contaminada e a ingestão da própria água (101); contribui para a infecção o tratamento com antibióticos para os quais a bactéria apresenta resistência e que, em consequência, favorecem sua colonização no intestino (101). Diversos trabalhos têm mostrado que *Aeromonas* sp são autóctones em ambientes aquáticos, tendo-se conseguido uma alta frequência de isolamentos em locais livres de descargas de dejetos humanos, descartando-se a possibilidade de contaminação destes locais por

fezes humanas (52,90). Também, não parece que espécies do gênero fazem parte da flora microbiana normal do homem. Com o objetivo de definir o momento da colonização intestinal por estes organismos, Pazzaglia *et alii* (78) investigaram sua incidência em fezes de bebês recém-nascidos por operação cesariana. Cultivando diariamente fezes de 52 bebês, estes autores obtiveram os primeiros isolamentos logo nas primeiras semanas de vida e constataram que a colonização, quando ocorria, era transitória e não associada à doença muito severa.

Parece não haver concordância na literatura quanto à importância relativa das três espécies mesófilas nas infecções entéricas. *A. hydrophila* e *A. sobria* têm sido as espécies mais frequentemente isoladas de pacientes sintomáticos do que em indivíduos controles, não havendo diferença nesses dois grupos, com relação à *A. caviae*. Algumas características associadas à virulência, tais como a produção de enterotoxinas, foram observadas em uma pequena proporção de amostras de *A. caviae* (17). Alguns autores (2,73), porém, obtiveram resultados diferentes, o que tem levado a uma revisão do papel desta última espécie na patogenia de *Aeromonas* sp. De 32 isolamentos de *Aeromonas* sp em fezes diarréicas, Altwegg (2) obteve *A. caviae* em 21 culturas, estando as mesmas associadas com os sintomas mais severos. Comparando os dados clínicos do paciente e a frequência de isolamentos, o autor considerou *A. hydrophila* como uma espécie comensal. A maioria das espécies de *A. caviae* e, numa menor proporção também *A. sobria* e *A. hydrophila*, apresenta viabilidade reduzida após

cultivo de 24 horas em caldo nutriente contendo 0,5% de glicose (72). Namdari *et alii* (70) observaram uma estreita correlação entre esta característica - denominada fenômeno suicida - e enteropatogenicidade: espécies não suicidas provocam maior acúmulo de fluído intestinal e letalidade em camundongos adultos inoculados oralmente com a bactéria. Amostras suicidas de *A. caviae*, quando crescidas em meio TSB modificado e sem glicose, são capazes de produzir enterotoxina (74). Nestas linhagens, a glicose reprime a atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs e estimula a produção de piruvato desidrogenase, resultando na ativação da via fermentativa para a produção de ácido acético. O acúmulo de ácido acético, com diminuição do pH, leva a morte da bactéria (75). Esta mesma via modulatória parece ser responsável pela inibição da produção de toxina (75).

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

*Aeromonas* sp são capazes de produzir uma diversidade de substâncias extracelulares, muitas das quais consideradas potenciais fatores de virulência. A produção de toxinas e enzimas líticas, a expressão de adesinas e enteroinvasibilidade associada com resistência sérica e produção de sideróforos têm sido verificada em amostras isoladas de casos de infecções (29,68). A produção destes fatores varia com a localização geográfica e com a fonte de isolamento (38).

### 1.3.1 Enzimas Extracelulares

A maioria (cerca de 96%) das amostras de *Aeromonas* sp secreta enzimas proteolíticas, amilases e DNAases (87). Sem considerar a espécie, um grande número também é capaz de produzir lipases (81,3%) e elastases, sendo a atividade destas últimas associadas com estafilolise e mais comum em espécies de *A. hydrophila* (87). A atividade de pirazinamidase é considerada como um marcador de virulência em *Micobacterium* sp e *Yersinia* sp (53); em *Aeromonas* sp, esta enzima tem sido identificada como marcador fenotípico, possivelmente também associado à virulência (21). *A. salmonicida* secreta uma protease de 70 Kda com especificidade para os mesmos substratos da trombina. Esta enzima reduz o tempo de coagulação do sangue em trutas e favorece a aquisição de pequenos peptídeos pela bactéria (83). Recentemente, Lee et alii (61) estudaram a toxicidade da enzima glicerofosfolipídeo colesterol acil transferase de *A. salmonicida* tendo identificado-a como a mais importante e letal citolisina secretada nesta espécie. Roffley et alii (85) clonaram o gene da quitinase de *A. hydrophila* em *E. coli*. Sendo um componente comum do exoesqueleto dos hospedeiros de sangue frio, a quitina oferece uma fonte adicional de carbono, nitrogênio e energia, favorecendo as amostras produtoras da enzima.

### 1.3.2 Sideróforos e Resistência Sérica

Fazendo parte da estrutura de macromoléculas e participando como catalisador em várias reações, o ferro é um elemento essencial em quase todos os sistemas vivos. A existência de proteínas carreadoras no sangue e nas secreções com alta afinidade para o ferro forma um sistema que exerce um estrito controle sobre sua concentração no organismo (69). Algumas evidências indicam ser uma das razões para este controle a redução de sua disponibilidade para microrganismos invasores, constituindo-se num mecanismo de resistência a infecções - a chamada imunidade nutricional (77). Grande parte dos microrganismos patogênicos desenvolveram sistemas de alta afinidade capazes de competir pelo ferro com as proteínas carreadoras do sangue e secreções. Este sistema, que funciona sob controle genético e é desreprimido em meios pobres em ferro, é formado por compostos de baixo peso molecular chamados sideróforos e seus receptores (7).

Em espécies de *Aeromonas* foram descritos dois tipos de sideróforos: amonabactina e enterobactina (8). A produção de amonabactina é predominante em linhagens de *A. hydrophila* (8). Este sideróforo é capaz de mediar a obtenção de ferro ligado à transferrina no soro humano (68). Num estudo feito com amostras produtoras de amonabactina, Massad et alii (68) verificaram que uma proporção de aproximadamente 92% (50/54) foi capaz de crescer em soro inativado pelo calor. As amostras com crescimento inibi-

do foram da espécie *A. caviae*. Amostras capazes de secretar apenas enterobactina são sensíveis à ação bacteriostática do soro inativado. *Aeromonas sp* parecem utilizar dois sistemas de obtenção de ferro do hospedeiro (68): (I) através de sideróforos, com acesso à transferina; (II) diretamente de grupos heme de moléculas como a hemoglobina e a haptoglobina. A enterobactina não parece estar envolvida em nenhum mecanismo de obtenção de ferro nas espécies de *Aeromonas*. Mesmo sendo características distintas, a produção de amonabactina tende a correlacionar com o nível de resistência sérica, em algumas amostras (68).

*A. sobria* e *A. hydrophila* são as espécies menos sensíveis à lise mediada pelo complemento, o que deve favorecer uma maior incidência de infecções em tecidos e bacteremias por estas espécies, ao contrário de *A. caviae*, que apresenta menor resistência sérica. Esta última espécie têm sido mais frequentemente associada a casos de infecções polimicrobianas cujos indivíduos já eram portadores de outras anomalias (47).

### 1.3.3. Adesinas

O primeiro passo na patogênese de parasitas sistêmicos, como certas amostras de *Aeromonas sp*, é a colonização do hospedeiro (34). Muitas das propriedades que facilitam o evento da colonização estão associadas com a superfície celular bacteriana. Estas propriedades incluem a produção de adesinas proteicas do tipo fímbria, "outer membrane proteins" (OMP), cápsulas antifago-

cíticas e arranjos paracristalinos na superfície ("S layers") (34). Em *Aeromonas* sp, a produção de fímbrias é comum, principalmente em amostras isoladas de casos de infecções (6). Sato et alii (89) purificaram e caracterizaram pela primeira vez uma fímbria isolada de *A. hydrophila*. Nesta amostra, a presença da fímbria não correlacionou com algum padrão hemaglutinante ou hidrofobicidade, devendo estar envolvida na adesão a outros tipos celulares, portadores de antígenos diferentes dos encontrados na superfície das hemácias. O papel das fímbrias na aderência de *Aeromonas* sp foi muito bem demonstrado nos trabalhos recentes de Hokama et alii (45) e Honma et alii (46), com a amostra A66 de *A. hydrophila*. Em seus estudos de purificação e caracterização, estes autores verificaram que a fímbria expressa por esta amostra é formada por duas variantes de pili, com diferenças na morfologia, densidade e papel biológico: um tipo reto (r) e um tipo ondulado (w). O primeiro tipo, de aspecto rijo, com uma subunidade proteica de 18 Kda é incapaz de aderir ao epitélio intestinal, como faz a bactéria intacta; anticorpos anti pili-r também não impedem a adesão da bactéria ao intestino. Entretanto, fragmentos Fab de anticorpos anti pili-r bloqueiam a autoaglutinação da bactéria em cultura líquida, sem inibir o crescimento. O tipo ondulado é encontrado em menor número do que o tipo reto, consiste de uma subunidade proteica de 21 Kda e é capaz de aglutinar tanto hemácias humanas quanto de coelho (45). Também foi possível promover sua aderência à mucosa intestinal humana e de coelho. Em ensaios de inibição, o tratamento da bactéria com anticorpos anti pili-w bloqueou sua adesão ao epitélio intestinal

de coelho, sendo que o grau de inibição foi dependente da dose de anticorpo. O píli-w foi identificado como fator de colonização de *Aeromonas* sp, tendo sido encontrado em amostras de *A. hydrophila* (43%) e *A. sobria* (23%), mas não em *A. caviae* (45).

Na amostra A6 de *A. hydrophila*, Atkinson (6) reconheceu um componente da OMP como responsável pela hemaglutinação da bactéria com hemácias humanas. Este elemento, de natureza proteica não fimbrial, com peso molecular aproximado de 43 Kda e presente nas bactérias cultivadas a 37 °C foi também identificado como fator de colonização em *Aeromonas* sp, sendo mais comum em *A. hydrophila*, mas também encontrado nas outras espécies mesófilas (6).

S layers são arranjos bidimensionais de monômeros de proteínas, que frequentemente compõem a camada mais externa do envelope celular de muitas bactérias (93). A presença de S layers tem estado associada a outras características comuns nestes grupos. Em *Aeromonas* sp, o papel destes elementos foi bem definido em *A. salmonicida* (49) onde foi comprovada sua ligação com patogenicidade em peixes; nesta espécie, a presença de S layers representa um fator de virulência essencial, sendo responsável pela resistência à ação lítica do complemento, hidrofobicidade e favorecendo a interação da bactéria com os macrófagos e as imunoglobulinas do hospedeiro. *A. sobria* e *A. hydrophila*, patogênicas e portadoras de S layers apresentam algumas características comuns com *Campilobacter fetus* subsp. *fetus*, capaz de expressar a mesma

estrutura. Entre estas, incluem-se a tendência de provocar infecções sistêmicas como bacteremias, resistência sérica e a presença de uma cadeia lateral polissacarídica do tipo O homogênea (57). A presença de S layers está associada à capacidade de autoaglutinação e tem sido correlacionada com patogenicidade em camundongos (49). Bactérias portadoras de S layers pertencem ao sorogrupo O (57).

#### 1.3.4. Citolisinas

Em infecções extraintestinais causadas por *Aeromonas* sp são frequentes as hemorragias e necrose tecidual (30,81). Estas manifestações devem-se à capacidade de produção de citolisinas pela maioria das espécies, sendo uma característica de distinção da bactéria a formação de uma área de hemólise em ágar sangue. Os estudos de Wretling *et alii* (103), Bernheimer e Avigad (9) e Wadstrom *et alii* (100) demonstraram a presença de dois tipos distintos de hemolisina: alfa-hemolisina e beta-hemolisina.

A alfa-hemolisina é uma proteína acídica com  $pI=4,8$  e PM de 65 Kda que é liberada pela bactéria no final da fase estacionária de crescimento (65). Em ágar sangue é responsável pelo surgimento de uma zona de hemólise incompleta com aparência opaca. Parcialmente purificada, a alfa-hemolisina é destruída por várias enzimas proteolíticas e é inativada por aquecimento a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  por dez minutos. Entre suas atividades biológicas, incluem-se dermonecrose em pele de coelho, letalidade em camundongos e toxicidade em

células HeLa e fibroblastos de pulmão humano (65). A alfa hemolisina induz a liberação de substâncias de três pesos moleculares diferentes, em ensaios de citotoxicidade com fibroblastos de pulmão humano (65). Estas alterações de permeabilidade são reversíveis se as células forem suspensas em meio de cultura fresco.

A beta-hemolisina, referida por Bernheimer (9) como aerolisina, é considerada a mais potente citolisina produzida por *Aeromonas* sp (65). Possui peso molecular de aproximadamente 50 Kda, ponto isoelétrico entre 4,2 e 5,5, surge na fase logarítmica do crescimento bacteriano e sua produção é estimulada em presença de RNA (65). A atividade hemolítica é abolida por aquecimento a 50 °C por uma hora, em pH 7,0, ou a 37 °C em pH 7,2; é bastante resistente ao tratamento com enzimas proteolíticas. Como a alfa-hemolisina, a beta-hemolisina é letal para camundongos, ratos e coelhos e é citotóxica para uma variedade de linhagens celulares cultivadas em laboratório (65). Em ágar sangue, a atividade hemolítica é total, com formação de uma zona de hemólise clara. Em ensaios de citotoxicidade com fibroblastos, induz a liberação somente de substâncias de baixo peso molecular e os poros formados na membrana são menores do que os resultantes da ação da alfa-hemolisina. Entretanto, as alterações de permeabilidade são irreversíveis.

Ljungh e Wadstrom (65) observaram que ocorre reatividade cruzada entre a alfa e a beta-hemolisina, por análise de difusão em gel; verificaram, também, que a alfa-hemolisina é parcialmente

neutrazilada por soro anti-beta-hemolisina. Há variação na sensibilidade de diferentes hemácias à lise pelas duas hemolisinas; as hemácias de carneiro são as mais resistentes e as de rato as mais sensíveis (40).

### 1.3.5. Enterotoxinas

A produção de enterotoxinas por *Aeromonas* sp foi inicialmente sugerida por Sanyal *et alii* (88) em 1975, com a inoculação de células bacterianas em alça intestinal ligada de coelho, resultando no acúmulo de líquido. Seus resultados foram confirmados por Wadstrom *et alii* (101), com a inoculação de sobrenadantes de cultivo livres de célula.

Conforme os critérios de Keusch e Donta (56), as enterotoxinas podem ser classificadas como citotônicas ou citotóxicas, de acordo com sua atividade em culturas de célula HeLa e células Y-1 (linhagem de tumor adrenal de camundongo). Enterotoxinas citotônicas apresentam pouca ou nenhuma atividade citotóxica em células HeLa e, em células adrenal Y-1, induzem esteroidogênese, provocam arredondamento e elevam os níveis de AMP cíclico; enterotoxinas citotóxicas não provocam alterações morfológicas em células adrenal Y-1, não apresentam efeito esteroidogênico e não induzem aumento nos níveis de AMP cíclico; em células HeLa produzem efeito citotóxico. Exemplos de enterotoxina do tipo citotóxico são as toxinas de *Shigella dysenteriae* e de *Clostridium perfringens* e do tipo citotônico a toxina colérica e a toxina termolábil

de *E. coli*, *Aeromonas* sp produzem enterotoxinas citotóxicas e citotônicas (65). O papel de cada uma como fator de patogenicidade tem sido uma questão de disputa, havendo variações nos resultados de alguns trabalhos. A produção de enterotoxina citotônica imunologicamente distinta da toxina colérica foi demonstrada por Ljungh et alii (64) em extratos de cultivo bacteriano do qual foi separado o componente com atividade citotóxica. Asao et alii (7) purificaram uma hemolisina capaz de provocar acúmulo de fluido intestinal em camundongos recém-nascidos e em alça intestinal ligada de coelho, com efeito citotóxico em células Vero e letal para camundongos. Vários autores (19,23,95) demonstraram haver uma correlação entre a produção de hemolisinas, citotoxinas e enteropatogenicidade. Chakraborty et alii (22) clonaram em *E. coli* o gene responsável pela produção de enterotoxina em *A. hydrophila* e sugeriram que a atividade de hemolisina, citotoxina e enterotoxina são codificadas por segmentos diferentes de DNA. Anticorpos monoclonais produzidos por duas linhagens celulares diferentes reagiram com um mesmo epítipo responsável pela atividade citotóxica e enterotóxica de uma hemolisina produzida por *A. hydrophila* (58). Numa análise recente (26), feita com enterotoxinas e aerolisinas citotóxicas produzidas por linhagens diferentes e estudadas anteriormente por outros autores, foi verificado que apesar de apresentarem semelhanças estruturais e físico-químicas, estas toxinas diferem entre si com relação a alguns determinantes antigênicos, composição de aminoácidos e sequência de nucleotídeos dos genes envolvidos na sua produção. Algumas destas variações estão associadas com a atividade biológica.

## 2. OBJETIVO

Os dados de literatura têm apresentado um grande número de evidências que chamam a atenção para a importância das espécies mesofílicas de *Aeromonas* como patógenos humanos. Em nossa região, poucos estudos foram realizados e algumas informações, principalmente no que diz respeito à Epidemiologia e vias de transmissão destas espécies, são escassas. Deste modo, este trabalho foi designado com o propósito de favorecer o conhecimento de alguns aspectos de Epidemiologia e características associadas à virulência, sendo definidos os seguintes tópicos como objeto de estudo:

- Verificar a frequência da bactéria em alimentos de vários espécimes, ao longo de um período definido de tempo; identificar as amostras isoladas à nível de espécie, procurando correlacionar com o alimento de origem.
- Verificar a frequência de amostras portadoras de plasmídios.
- Investigar a capacidade de produção de toxinas pelas amostras: (a) enterotoxinas: através do teste do camundongo recém-nascido e do ensaio de alça intestinal ligada de coelho; (b) hemolisinas: teste da atividade dos sobrenadantes de cultivo frente a várias hemácias; (c) citotoxinas: teste do efeito do sobrenadante de cultivo em culturas de células HeLa e Vero.

- Estudar o padrão de hemaglutinação das amostras, testando-as com vários tipos de hemácia, tanto em presença, quanto na ausência de D-manose. Verificar a existência de estruturas do tipo fímbria em algumas das amostras, através de microscopia eletrônica de transmissão.
  
- Verificar o nível de resistência sérica e a capacidade de produção de sideróforos.
  
- Investigar a presença de certos marcadores de virulência como a atividade de pirazinamidase, autoaglutinação e o fenômeno suicida.
  
- Estudar o efeito biológico in vivo de produtos de secreção das amostras: (1) análise do efeito dos sobrenadantes de cultivo em cortes histológicos de intestino de coelho. (2) avaliar o potencial de letalidade da bactéria em camundongos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Meios de Cultura

3.1.1 - Para isolamento, identificação e manutenção das amostras.

3.1.1.1 - Água Peptonada Alcalina: meio de enriquecimento (92)

3.1.1.2 - Agar Sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado) com ampicilina na concentração de 10 ug/ml (54)

3.1.1.3 - Agar Simples.

3.1.1.4 - EPM: provas de fermentação da glicose e produção de gás, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano desaminase (96).

3.1.1.5 - MILI: provas de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase (97).

3.1.1.6 - Citrato de Simmons (Difco): prova de utilização de citrato.

3.1.1.7 - Caldo Nutriente com NaCl: prova de sensibilidade do crescimento em concentrações variáveis de NaCl (92).

3.1.1.8 - Caldo Nutriente glicosado I (CNG I): observação do fenômeno suicida (72).

3.1.1.9 - Meio de Clark Lubs: utilizado nas provas de vermelho de metila (VM) e produção de acetofina (VP) (37).

3.1.1.10- Meio para prova de fermentação de açúcares - de acordo com Ewings (37): foram testados os seguintes carboi-

dratos: sacarose, arabinose, manitol, salicina e inositol.

3.1.1.11- HIA (Heart Infusion Agar)-esculina: prova de hidrólise da esculina (39).

3.1.1.12- Agar Lignieres: utilizado para a manutenção das amostras (92)

### **3.1.2 - Empregados no teste de hemaglutinação:**

3.1.2.1 - Agar Sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado) (54)

3.1.2.2 - Agar Glicose (51)

3.1.2.3 - TSA (Tryptic Soy Agar) (Difco)

3.1.2.4 - CFA (Colonizing Factor Agar) (43)

3.1.2.5 - Minca (36)

### **3.1.3 - Empregados nos ensaios de produção de enterotoxinas**

3.1.3.1 - Caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco)

3.1.3.2 - TSB (tryptic Soy Broth) (Difco) suplementado com 0,6% de extrato de levedura

3.1.3.3 - Meio de Evans (35)

### **3.1.4 - Empregado no teste de detecção de Sideróforos**

- Cromoazurol S em Agar (CASA) (91)

### 3.1.5 - Empregado no teste de sensibilidade ao soro humano normal

- Caldo Nutriente Glicosado II (CNG II) (47)

### 3.1.6 - Empregado nos ensaios de citotoxicidade e manutenção das células em cultura

- Meio Essencial Mínimo de Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (MEME-SFB) (84)

3.2 - Esterilização: Salvo nos casos indicados, todos os meios, soluções e vidraria foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante quinze minutos.

### 3.3 - Isolamento e Identificação das Amostras

Entre 05/07/89 e 27/03/90 foram coletados 100 espécimes de alimentos de origem animal e vegetal (a maioria "in natura") na linha de processamento do Restaurante I da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para isolamento de *Aeromonas* sp. Inicialmente, foi feita uma pré-cultura com aproximadamente 5 g do material coletado em água peptonada alcalina, pH 8,0, a 37°C, durante 8 a 9 horas. Em seguida, uma alçada deste crescimento foi semeada, por esgotamento, em uma placa de ágar sangue com ampicilina

(na concentração de 10 ug/ml). Após incubação a 37 °C por 24 horas, 12 colônias foram selecionadas e transferidas individualmente para uma placa quadriculada de ágar simples e incubadas durante uma noite a 37°C. Em seguida, estas colônias foram submetidas ao teste de oxidase, com o reagente dicloridrato de N,N,N,N-tetrametil parafenileno diamino. Colônias oxidase positivas foram transferidas simultaneamente para os meios EPM (96) (provas de fermentação da glicose, L-triptofano desaminase, urease e H<sub>2</sub>S), Citrato de Simmons (prova de utilização de citrato), MILI (97), (provas de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase) e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. Bactérias com fenótipo característico de *Aeromonas* sp (82), foram submetidas às provas adicionais de sensibilidade a concentrações variáveis de NaCl, fermentação de açúcares (sacarose, arabinose, inositol, manitol, esculina e salicina), VM, VP e resistência ao agente vibriostático O-129 (2,4-diamino 6,7-diisopropilpteridina), na concentração de 150 ug/ml para confirmação do gênero e identificação a nível de espécie. Como complemento dos testes de identificação, procurou-se classificar as amostras isoladas com base no caráter suicida (71). As bactérias foram semeadas em tubos 16 x 160 mm, com 6 ml de caldo nutriente glicosado (0,5% de glicose e 0,05% de azul de bromotimol) (CNG I) e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C. Após este período, foi observado o aproveitamento da glicose pelas amostras, através da mudança de coloração do meio e produção de gás em tubos de Duran. A viabilidade da cultura foi observada pela variação de turbidez e confirmada com a transferência de uma alíquota do crescimento para placas de ágar simples que

foram subseqüentemente incubadas a 37 °C por 24 horas e efetuada a contagem das colônias.

### 3.4 - Determinação do Perfil Plasmidial

#### 3.4.1 - Cultivo das Amostras e Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído segundo a técnica de Birboim e Doly (10) modificada, e analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7 %. Aproximadamente 1 ml de uma cultura bacteriana crescida por 18 a 20 horas, a 37°C em caldo BHI, foi centrifugado a 12000 g por 2 minutos em tubo eppendorf estéril. Após este período, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspendido com o auxílio de uma micropipeta, em 100 ul da solução I, a 4°C. O tubo foi mantido no gelo durante 15 minutos e adicionou-se, em seguida, 200 ul da solução II. Homogenizou-se vagarosamente até a suspensão ficar clara e levemente viscosa e manteve-se novamente no gelo por 5 minutos. Um volume de 150 ul da solução III foi então acrescentado ao tubo, sendo este mais uma vez homogenizado e mantido no gelo durante 15 minutos. Centrifugou-se, em seguida, a 12000 g por 6 minutos e uma alíquota de 400 ul do sobrenadante foi cuidadosamente transferida para outro tubo eppendorf estéril. Adicionou-se 1 ml de etanol 100 % a -20 °C, homogenizou-se e manteve-se o tubo no freezer a -20 °C por uma hora ou entre 12 a 18 horas. Centrifugou-se a 12000 g por 6 minutos, descartou-se rapidamente o sobrenadante e manteve-se o tubo aberto para evaporação

completa do etanol. O sedimento formado pelo DNA plasmidial foi ressuscitado em 50  $\mu$ l da solução I gelada e mantido em gelo. Uma alíquota de 20  $\mu$ l deste volume foi transferida para um tubo eppendorf estéril, contendo 5  $\mu$ l da solução de ressuspensão, sendo em seguida homogenizada. Nesta solução o DNA plasmidial foi aplicado e submetido à eletroforese em gel de agarose submerso.

#### 3.4.2 - Preparo do Gel e Eletroforese em Agarose

Para a confecção dos géis, empregou-se agarose de baixa eletroosmose. Em géis de 3 mm de espessura, as concentrações de agarose foram de 0,5% a 0,7% dissolvida em tampão TEB. Depois de fundida em forno de microondas, a solução foi resfriada a 60 °C e vertida cuidadosamente, evitando a formação de bolhas, na placa de vidro suporte, com o pente de acrílico já posicionado. Após completa gelificação e formação da matriz, o gel foi submerso em tampão TEB na cuba e as amostras de DNA plasmidial foram aplicadas nas canaletas. Até a entrada das amostras na matriz, aplicou-se uma carga de 2,5 V/cm e, em seguida 5 V/cm até o final da corrida. Depois de submetido à corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma outra cuba e efetuada a coloração com solução de brometo de etídio por pelo menos 20 minutos à temperatura ambiente, ou entre 12-18 horas a 4 °C. As bandas foram visualizadas no escuro, em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com filme Kodak preto e branco 100 ASA.

### 3.5 - Teste de Hemaglutinação Manose-Sensível e Man.-Resistente

#### 3.5.1 - Coleta e Conservação das Hemácias:

Foram empregadas hemácias humanas do tipo O e dos seguintes animais: boi, carneiro, cavalo, cobaio e galinha. A coleta foi realizada com o uso de seringas ou equipos estéreis, contendo solução de Alsever (previamente esterilizada por filtração em filtro Zeiss) num volume equivalente à quantidade de sangue desejada (1:1). Hemácias humanas e de galinha foram utilizadas imediatamente após a coleta e as demais foram armazenadas em tubos 16 x 160 mm com solução de Alsever, a 5 °C, durante um período máximo de 20 dias.

#### 3.5.2 - Cultivo das Amostras:

Bactérias mantidas em ágar Lignieres foram ativadas numa pré-cultura de aproximadamente 8 horas a 37 °C em caldo BHI. Uma alíquota de 0,1 ml do crescimento foi, a seguir, semeada em placas contendo os meios a serem testados (ágar sangue, ágar glicose, minca, TSA e CFA) e espalhadas com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

#### 3.5.3 - Teste:

Raspados do crescimento bacteriano foram transferidos para os pocinhos de uma placa de microtítulo contendo 50 ul de PBS com

ou sem 1% de D-manose. Após a diluição, com uma micropipeta, acrescentou-se um mesmo volume de hemácia lavada três vezes e padronizada numa concentração de 3% em PBS contendo ou não 1% de D-manose. Em seguida, a placa foi agitada e mantida à temperatura ambiente durante uma hora. Após leitura dos resultados, as hemácias de cada pocinho foram ressuspensas com um palito e a placa foi mantida por mais uma hora a 4 °C, para observação do comportamento hemaglutinante nesta temperatura.

### 3.6 - Teste de Autoaglutinação

Certas amostras de *Aeromonas* sp, quando cultivadas por um período de aproximadamente 12 horas, a 37 °C em caldo BHI esterilizado por filtração, precipitam formando um pellet no fundo do tubo (49). A autoaglutinação pode se manifestar espontaneamente (SP) ou após ferver-se a cultura durante uma hora (PAB). Esta característica é considerada importante marcador de virulência, estando associada ao potencial de letalidade da bactéria em peixes e animais de laboratório. Bactérias cultivadas por uma noite a 37°C em tubos 16 x 160 mm contendo 6 ml de caldo BHI filtrado foram observadas quanto à capacidade de autoaglutinação; amostras positivas foram agitadas para ressuspensão do pellet. Em seguida, o volume das culturas foi separado em duas partes iguais, sendo uma parte aquecida até a fervura por uma hora e a outra mantida em temperatura ambiente. Depois de resfriado por quinze minutos à temperatura ambiente, foi comparada a turbidez do volume aquecido

com o tubo mantido em temperatura ambiente.

### 3.7 - Microscopia Eletrônica

Dentre as bactérias produtoras de enterotoxina, foram selecionadas as amostras portadoras de plasmídios, para observação de estruturas de superfície em microscópio eletrônico de transmissão. Amostras cultivadas durante 8 horas em caldo BHI a 37 °C foram semeadas em duas placas de TSA. Uma placa foi incubada a 37°C por 24 horas e a outra a 16 °C por 48 horas. As bactérias crescidas nas placas foram diluídas em tampão fosfato 0,06 M pH 6,8, com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Em seguida, a suspensão foi transferida para caçapas de plástico e centrifugadas por 3000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em tampão fosfato. Após ajuste da concentração bacteriana para a escala 10 de McFarland, uma gota da suspensão foi colocada em papel parafilm. Em seguida, uma telinha de cobre forrada com carbono foi colocada e mantida sobre a suspensão durante 2 minutos. Decorrido este tempo, a telinha foi lavada com tampão fosfato e corada negativamente com ácido fosfotúngstico a 1%, para observação ao microscópio eletrônico.

### 3.8 - Atividade de Pirazinamidase

Para o ensaio da atividade de pirazinamidase foi seguido o método de Kandolo e Wauters (53). As amostras foram inicialmente cultivadas em TSA por uma noite a 37 °C e transferidas para tubos de 160 x 16 mm contendo 5 ml de meio TSA-Pirazinamida inclinado (3% de TSA, 0,3% de extrato de levedura e 0,1% de pirazinamida dissolvidos em tampão Tris-maleato 0,02 M pH 6,0). Após cultivo de 48 horas a 37 °C, foi adicionado 1 ml de uma solução de sulfato de amônio ferroso a 1% em cada tubo e observada a mudança de coloração, após quinze minutos. Resultados positivos foram indicados pelo surgimento de uma coloração rosa no meio de cultura.

### 3.9 - Ensaio de Produção de Enterotoxinas

#### 3.9.1 - Produção de Enterotoxina

Um volume de 0,1 ml de uma cultura de 8 horas a 37 °C em caldo BHI foi semeado em frascos erlenmeyers de 125 ml contendo 10 ml de um dos seguintes meios: meio de Evans (35), TSB suplementado com 0,6% de extrato de levedura ou caldo BHI. Os frascos foram incubados a 37°C e sob agitação a 100 rpm, durante 18 a 24 horas. As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e, em seguida, a 10000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram passados em filtros millipore de 0,45 um, utilizados ime-

diatamente ou armazenados em recipientes de 25 ml durante um período máximo 48 horas. Estes extratos foram empregados nos ensaios de citotoxicidade e de produção de enterotoxinas.

### 3.9.2 - Tratamento Térmico dos Extratos de Cultura

Os extratos de cultura utilizados no teste dos camundongos recém-nascidos, alça intestinal ligada de coelho e nos ensaios de citotoxicidade foram submetidos a tratamento térmico em tempos de 10 e 30 minutos nas temperaturas de 56, 65, 70 e 100 °C, em banho maria.

### 3.9.3 - Teste em Camundongos Recém-Nascidos

Os camundongos utilizados foram da linhagem Swiss, com 3 a 5 dias de idade; Cada amostra foi testada num lote de três animais. Volumes de 0,1 ml do extrato de cultura, contendo 0,05% de azul de Evans foi inoculado intragastricamente, através de um tubo de polietileno com 0,6 mm de diâmetro, conectado a uma seringa de 1 ml. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e sacrificados três horas após a inoculação. O intestino foi retirado e, feita a pesagem, calculou-se a relação entre o peso do intestino e o peso da carcaça. Os resultados foram expressos de acordo com a escala elaborada por Burke *et alii* (14).

### 3.9.4 - Teste da Alça Intestinal Ligada de Coelho

Foram testadas sete amostras, cujos resultados em camundongos recém-nascidos já eram conhecidos, sendo cinco positivas e duas negativas. As amostras controles positivo e negativo foram respectivamente as amostras 40T e K12 de *E. coli*. Coelhos albinos, com idade não superior a 2 meses e pesando aproximadamente 2 kg foram mantidos em jejum, ingerindo apenas água, durante as últimas 24 horas que antecederam o teste. Os animais foram anestesiados por inalação de éter embebido em algodão. Após a tricotomia e antissepsia, foi feita a incisão cirúrgica na linha mediana abdominal, sendo exposto o intestino delgado numa extensão de 60 cm, medidos a partir do apêndice íleo-cecal. A extremidade proximal foi amarrada e todo o segmento foi lavado com salina 0,15 M estéril. Em seguida, o intestino foi amarrado em alças de 5 cm de comprimento separadas por inter-alças de 2 cm. As amostras foram inoculadas num volume de 0,5 ml em cada alça e o intestino foi recolocado na cavidade abdominal, suturando-se o peritônio e a pele. Mantido em temperatura ambiente (28 °C) e decorridas 16 horas após o teste, o animal foi sacrificado. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino foi observado, quanto à presença de líquido. Foram consideradas positivas as amostras capazes de induzir dilatação intestinal num volume de líquido igual ou superior a 1 ml/cm.

#### 3.9.4.0 - Histologia

Porções do intestino inoculadas com amostras positivas foram cortadas, numa extensão do tamanho de uma alça e colocadas em formol a 10 % durante mais ou menos 2 horas. Em seguida, estes cortes foram reduzidos para aproximadamente 0,5 cm e fixados novamente em formol durante 24 horas. Após este período, o material foi lavado extensivamente por meia hora em água corrente e incluído em parafina. Cortes em micrótomo com uma espessura de 5  $\mu$ m foram corados pelo método de HE (hematoxilina-eosina) e montados em lâmina.

### 3.10 - Ensaio de Citotoxicidade

#### 3.10.1 - Produção de Hemolisinas

A atividade hemolítica dos extratos de cultura foi testada frente a hemácias de carneiro, de coelho e humanas, diluídas a 1% em PBS 0,05 M pH 7,4. Diluições seriadas em PBS foram feitas com 100  $\mu$ l de amostra em uma placa de microtítulo mantida em banho de gelo, sendo em seguida, acrescentado um mesmo volume da suspensão de hemácias. As placas foram então incubadas a 37 °C e a 4 °C, durante uma hora e, logo após, foi observada a lise celular pela liberação de hemoglobina na suspensão.

### 3.10.2 - Atividade citotóxica em cultura de células

Foram utilizadas células HeLa e células Vero mantidas em garrafas de 75 ml, contendo aproximadamente 15 ml de MEME-SFB (meio essencial mínimo de Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino) (84) e 1% de penicilina-streptomicina e cultivadas em estufa a 37 °C com atmosfera de CO<sub>2</sub>. A manipulação das culturas e os testes de citotoxicidade foram efetuados em câmara asséptica de fluxo laminar. Para os ensaios da atividade citotóxica, as células das garrafas-estoque foram transferidas para placas de microtítulo estéreis, onde foram cultivadas. Depois de descartado o meio de cultura das garrafas, o tapete celular foi lavado com solução de Hanks (84) e desfeito com a adição de 2 ml de tripsina. As células foram lavadas centrifugando-se a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em MEME-SFB. Esta suspensão foi ajustada para uma concentração de 10<sup>5</sup> células/ml em MEME-SFB e um volume de 0,1 ml foi adicionado em cada pocinho das placas de cultura. As placas foram incubadas na estufa a 37 °C durante 24 horas, quando então foram adicionadas diluições dos extratos das amostras a serem testadas. Os extratos foram diluídos em MEME-SFB e 0,1 ml de cada diluição foi acrescentado aos pocinhos. As placas foram incubadas novamente na estufa e observadas após 24 horas.

### 3.11 - Ensaio para detecção de sideróforos

Foi empregada a técnica de Schwyn e Neilands (91), cujo princípio se baseia na capacidade da bactéria de utilizar ferro complexado com uma substância quelante (HDTMA) associado com o corante cromoazurol S. O complexo HDTMA-CAS-FeCl<sub>3</sub> possui cor azul, mudando para amarelo, com a retirada do FeCl<sub>3</sub>. As amostras foram semeadas com o auxílio de uma alça de platina em meio CASA (ágar cromoazurol S), incubadas a 37 °C durante 48 horas e, após este período, observada a mudança de coloração do meio.

### 3.13 - Teste de sensibilidade ao soro humano normal (SHN)

O SHN foi obtido de sangue coletado à fresco em seringas estéreis, mantido em repouso à temperatura ambiente até completa coagulação. O coágulo foi retirado e o soro foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, sendo em seguida distribuído esterilmente em alíquotas de 1 ml. As amostras foram cultivadas em ágar sangue por 12 horas a 37 °C e um pequeno raspado do crescimento foi transferido esterilmente para os pocinhos de uma placa de microtítulo contendo 100 ul de CNG II (1% de peptona, 1% de glicose e 0,07% de azul de bromotimol). A placa foi incubada por uma noite a 37 °C e 20 ul do crescimento de cada amostra foram transferidos para os pocinhos de outra placa contendo 200 ul do mesmo meio. Após cultivo por 2 a 3 horas, volumes de 20 ul (contendo entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC, confirmadas por contagem em ágar simples) da cultura foram simultaneamente semeados em dois pocinhos

distintos de outra placa sendo um com 100 ul de CNG com 20% de SHN e o outro, o mesmo volume do meio adicionado com 20% de SHN inativado por aquecimento a 56 °C por meia hora. A placa foi incubada por um período entre 4 a 5 horas e a sensibilidade ou resistência ao SHN foi determinada pela observação de inibição no crescimento bacteriano, através da mudança ou permanência da coloração do meio.

### 3.14 - Ensaio de patogenicidade em camundongos

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI durante 24 horas a 37 °C e diluídas em solução salina 0,15 M estéril até uma concentração final entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/ml. Os camundongos utilizados foram da linhagem Swiss, com uma idade média de 21 dias e selecionados para sensibilidade (Hgp) e resistência (Lgp) ao LPS de *Salmonella typhimurium* (86). Estes animais foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Oswaldo Sant'Ana do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantã, São Paulo SP. Os animais foram separados em grupos de cinco, em gaiolas individuais. Para o teste, foram escolhidas amostras das três espécies isoladas (uma de *A. caviae* e uma de *A. hydrophila* não enterotoxigênicas e duas de *A. sobria* e uma de *A. hydrophila* enterotoxigênicas). Os animais foram inoculados intraperitoneamente com 1 ml da suspensão bacteriana, na concentração acima indicada. Como controle do teste, um grupo de animais foi injetado com salina e outro com caldo BHI. Os animais foram alimentados normalmente e observados durante uma semana.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Frequência de *Aeromonas* sp em alimentos

Os vários espécimes de alimentos analisados são aqui separados em dois grupos: alimentos de origem animal são referidos como alimentos do grupo I e os de origem vegetal, alimentos do grupo II. No primeiro grupo estão incluídas as carnes - bovina, suína, de frango e de peixe (alimentos não processados) e alguns embutidos (linguiças) e hambúrgueres. O grupo II é formado pelas verduras e legumes (alface, chicórea, acelga, pepino, cenoura, vagem, etc.). A maior parte destes alimentos não sofreu qualquer tipo de tratamento térmico. *Aeromonas* sp cresceram em 31% de um total de 100 amostras testadas, sendo 13% em alimentos do grupo I e 18% em alimentos do grupo II. Nenhuma amostra da bactéria foi obtida em alimentos que sofreram algum tipo de tratamento térmico. Conforme é mostrado na figura 1, a maioria das amostras foram isoladas entre os meses de Dezembro/89 e Março /90 (em janeiro o estudo não foi realizado) A menor frequência de isolamentos ocorreu no mês de Novembro; neste período, entre 14 espécimes coletados, foi isolada apenas uma amostra em chuchu (grupo II), na fase de pré-processamento. A espécie mais frequentemente isolada foi *A. hydrophila* (tabela 1). A proporção de isolamentos de *A. caviae* foi equivalente à de *A. sobria*. Esta última espécie esteve mais frequentemente associada a alimentos do grupo I (tabela 2), ao contrário de *A. caviae*, que foi isolada principalmente de le-

gumes e verduras (grupo II). Não houve diferença significativa na proporção de isolamentos de *A. hydrophila* em ambos os grupos (tabela 2).

#### 4.2 - Características Bioquímicas das Amostras

Os resultados das provas bioquímicas utilizadas para identificação bacteriana estão relacionados na tabela 3. Foram identificadas 50 amostras de *Aeromonas* sp, entre os alimentos estudados, sendo 13 de *A. caviae*, 25 de *A. hydrophila* e 12 de *A. sobria*. Em muitos espécimes, foram identificadas amostras com características bioquímicas diferentes, sendo frequente o isolamento de mais de uma espécie de uma mesma amostra de alimento. Todas as amostras apresentaram resultados positivos nas provas de oxidase, fermentação da glicose, sacarose, manitol, aproveitamento de citrato, motilidade, produção de indol, crescimento em caldo nutriente com NaCl na concentração de 1%, mas não a 7,5%, e resistência ao agente vibriostático 0-129 na concentração de 150 ug/ml. Resultados 100% negativos foram obtidos nas provas de urease e inositol. O fenômeno suicida não foi observado em nenhuma amostra. Os resultados da prova de produção de gás em EPM e CNG I não coincidiram. Algumas amostras de *A. caviae* foram aerogênicas em CNG I, mas não em EPM; no caso de *A. hydrophila*, também houve variação: 100% das amostras produziram gás em EPM, mas apenas 80% em CNG I. Todas as amostras foram hemolíticas em ágar sangue. *A. caviae* apresentou hemólise

do tipo alfa e *A. hydrophila* e *A. sobria*, hemólise do tipo beta.

#### 4.3 - Verificação da Presença de DNA Plasmidial

O perfil plasmidial das amostras de *Aeromonas* sp foi analisado por eletroforese em gel de agarose, tendo como referência de peso molecular os plasmídeos p 307 (54 Md) da amostra K12 de *E. coli* e os plasmídeos com os seguintes pesos moleculares da amostra v 517 de *E. coli*: 32,04; 5,19; 3,48; 3,03; 2,24; 1,69; 1,51 e 1,25 Md. A presença de DNA extracromossômico foi detectada em 38% das amostras testadas, tendo peso molecular variando entre aproximadamente 1,2 e 50 Md (figuras 2 e 3). Nas espécies *A. caviae* e *A. hydrophila*, a proporção de amostras com plasmídios foi respectivamente de 15,3% e 36%. Na espécie *A. sobria* foi encontrada uma maior proporção de amostras portadoras de plasmídios (66%) (tabela 4). O perfil plasmidial foi feito logo após o isolamento das amostras e em seguida à execução da maioria dos estudos. Nesta segunda extração verificou-se que uma grande parte das amostras portadoras perdeu o DNA plasmidial. Não pudemos verificar alguma relação das características investigadas com a presença de plasmídios; amostras que perderam o DNA plasmidial continuaram a expressar as características de virulência estudadas. As figuras 2 e 3 apresentam a eletroforese do DNA plasmidial na última extração.

#### 4.4 - Padrão Hemaglutinante

Para o ensaio de hemaglutinação, as amostras foram cultivadas nos seguintes meios: ágar sangue, ágar glicose, minca, TSA, e CFA e testadas frente às hemácias de boi, de carneiro, de cavalo, de cobaio, de galinha e humana. Foram consideradas apenas amostras com título hemaglutinante igual ou superior a 1/8. Os dados da tabela 5 mostram que houve uma tendência de reação da maioria das amostras com as hemácias de cobaio e de galinha, tanto à temperatura ambiente como a 5 °C; este comportamento foi observado principalmente com o crescimento das amostras em ágar sangue. O meio de ágar glicose aparentemente aumentou a capacidade de hemaglutinação e de reação cruzada das amostras com outras hemácias. Em todas as amostras, as reações foram sensíveis ao tratamento das hemácias com D-Manose, visto que em sua presença houve uma diminuição do título ou perda da capacidade de hemaglutinação (tabela 5). *A. sobria* foi a espécie onde se observou uma maior atividade de hemaglutinação. Apenas 3 amostras (25%) foram incapazes de reagir com alguma das hemácias testadas (tabela 8). Somente amostras da espécie *A. caviae* (tabela 6) e da espécie *A. sobria* (tabela 8) reagiram com hemácias humanas. A tabela 7 apresenta o padrão hemaglutinante da espécie *A. hydrophila*.

#### 4.5 - Autoaglutinação

O teste de autoglutinação contribui para o conhecimento das estruturas de superfície das bactérias, frequentemente permitindo uma correlação com o seu potencial de patogenicidade. Após cultivo de 24 horas em caldo BHI filtrado, as amostras são observadas, fervidas durante uma hora e, após resfriarem à temperatura ambiente, são novamente observadas. Associados à esta característica existem dois fenótipos: (I) autoaglutinação durante o crescimento bacteriano (SP) e (II) autoaglutinação após a fervura (PAB). Entre as bactérias isoladas de alimento, apenas a amostra S4 (*A. sobria*) apresentou o fenótipo PAB.

#### 4.6 - Microscopia Eletrônica

Entre as 15 amostras enterotoxigênicas, 10 apresentaram plasmídios e foram escolhidas para observação ao microscópio eletrônico. Estas amostras foram cultivadas em TSA a 16 °C e a 37 °C e foram coradas negativamente com o ácido fosfotúngstico. Não foi encontrada nenhuma estrutura de superfície em nove destas amostras, cultivadas em ambas as temperaturas. Na amostra H13 (*A. hydrophila*) cultivada a 37 °C foi observada a presença de fímbrias em toda a superfície bacteriana. O cultivo a 16 °C inibiu a produção destes pili; uma característica marcante nas bactérias cultivadas a 16 °C foi a produção de flagelos e cápsulas (figura 4).

#### 4.7 - Atividade de Pirazinamidase

A atividade de pirazinamidase foi evidenciada na grande maioria das amostras testadas. Somente uma amostra (S1 - A. sobria) apresentou resultado negativo.

#### 4.8 - Produção de Toxinas

##### 4.8.1 - Meio de Cultura

Com o objetivo de definir o meio que melhor estimulasse a produção de toxina, foram empregados os meios de Evans, BHI e TSB suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE), no teste do camundongo recém-nascido. Resultados positivos só foram obtidos nestes dois últimos meios. Foi então escolhido o meio BHI para a produção dos extratos utilizados em todos os ensaios de toxicidade (produção de enterotoxinas, hemolisinas e citotoxinas).

##### 4.8.2 - Produção de Enterotoxinas

###### 4.8.2.1 - Atividade dos Extratos de Cultura em Camundongos recém-nascidos

Como parâmetro de avaliação da atividade dos extratos de cultura, em camundongos recém-nascidos, foi utilizada uma escala

que associa um valor numérico de 0 a 4+ à relação entre o peso do intestino (i) e o peso da carcaça do animal (c). 32% (16/50) das amostras apresentaram atividade variando entre 1+ e 4+. Dentre estas, o valor 1+ (associado a um resultado negativo) foi encontrado em apenas uma amostra (tabela 10). A proporção de amostras enterotoxigênicas entre as espécies é apresentada na tabela 9. Quase todas as amostras (83%) de *A. sobria* foram positivas. Em *A. caviae* nenhuma amostra apresentou atividade. O aquecimento dos extratos das amostras positivas a 56 °C, por 10 minutos, aboliu completamente a atividade enterotoxigênica.

#### 4.8.2.2 - Atividade dos extratos de cultura em alça intestinal ligada de coelho

Foram testadas três amostras de *A. hydrophila* (H2, H10, e H13) e quatro amostras de *A. sobria* (S4, S6, S8 e S11). As amostras H2 e H10 foram negativas no teste dos camundongos recém-nascidos e as amostras H13, S4, S6, S8 e S11 foram positivas (tabela 10). Os extratos de cada amostra foram separados em dois volumes, sendo um deles aquecido a 56 °C por 10 minutos. Os resultados do teste em alça ligada confirmaram os obtidos em camundongos. As amostras H2 e H10 não provocaram acúmulo de fluido intestinal. Todas as outras amostras apresentaram resultados positivos. O aquecimento dos extratos neutralizou a atividade enterotoxigênica.

#### 4.8.2.2.0 - Histologia

Os cortes histológicos do intestino de coelho expostos 16 horas aos extratos de cultura apresentaram as seguintes alterações (figuras 5 e 6): destruição total das criptas, deformação das vilosidades e a presença de um infiltrado leucocitário com predomínio de células polimorfonucleares na camada de tecido conjuntivo.

#### 4.8.3 - Produção de hemolisinas

A capacidade de produção de hemolisinas foi evidenciada em 32% (16/50) das amostras estudadas, com efeito em pelo menos um dos tipos de hemácia testadas (humana, de carneiro e de coelho), sendo 9 *A. hydrophila*, 6 *A. sobria* e 1 *A. caviae* (tabela 11). Nem todas estas amostras deram resultados positivos em camundongos recém-nascidos. A proporção de amostras enterotoxigênicas e hemolíticas foi de 56% (9/16). A hemácia humana mostrou-se mais sensível à ação dos extratos de cultura.

#### 4.8.4 - Produção de Citotoxinas

A atividade citotóxica dos extratos de cultura foi avaliada em células HeLa. As amostras enterotoxigênicas foram também testadas em células Vero. Mais de 50% das amostras produziram citotoxinas, com títulos variando de 1/32 a 1/2048 (tabela 13). Como nos testes de produção de hemolisinas e enterotoxinas, a

maior frequência de amostras com atividade citotóxica foi observada na espécie *A. sobria* (tabela 12). O efeito letal dos sobrenadantes se manifestou pela perda total da refringência e do contorno celular e desprendimento do tapete dos pocinhos da microplaca (figura 7). Foram considerados positivos os títulos dos pocinhos com mais de 50% de células alteradas. Quando os extratos foram aquecidos a 56 °C por 10 minutos, as alterações foram do tipo citotônico, manifestas pelo surgimento de vacúolos, arredondamento celular e alongamento (figura 7). Estas alterações osmóticas também foram observadas em células sob a ação das maiores diluições positivas dos extratos não aquecidos de algumas amostras. A atividade dos extratos aquecidos foi testada somente nas amostras enterotoxigênicas. O efeito dos sobrenadantes não aquecidos em células Vero foi semelhante aos observados com as células HeLa. Entretanto, as alterações de natureza osmótica observadas após o aquecimento destes extratos persistiram em diluições maiores, em células Vero (tabela 14).

#### 4.9 - Produção de sideróforos

O meio CASA permite o crescimento apenas de microrganismos cuja dependência do ferro é facultativa ou daqueles que possuem algum sistema capaz de retirar o ferro complexado com o corante cromoazurol S ligado ao HDTMA (brometo de hexadecil trimetil amônio) (91). Os sideróforos são produzidos pela maioria dos organismos adaptados em ambientes com deficiência de ferro na

forma solúvel, sendo possível sua detecção no meio CASA. Por semeadura direta em placas de CASA e incubação durante 48 horas a 37 °C, a presença de sideróforos foi detectada em 100 % das amostras.

#### 4.10 - Resistência Sérica

Nos ensaios de sensibilidade ao soro humano normal a 20 % em CNG II, foi observado crescimento normal de todas as amostras, comparável ao controle. Este teste foi repetido três vezes, sendo confirmados os resultados.

#### 4.11 - Efeito da Inoculação de bactérias viáveis em camundongos Swiss Adultos

Os animais utilizados neste ensaio foram produzidos através de seleções sucessivas, em várias gerações, sendo formados dois grupos com diferenças na capacidade de produção de anticorpos e na sensibilidade à endotoxina de *Salmonella typhimurium* (86). Os animais resistentes ao LPS (Lgp) produzem baixos títulos de anticorpos, ao contrário dos animais sensíveis (Hgp), que produzem anticorpos em títulos elevados. Foram escolhidas para o teste duas amostras de *A. hydrophila*, sendo uma enterotoxigênica (H13) e a outra não (H10), uma amostra de *A. caviae* (C1) e duas amostras enterotoxigênicas de *A. sobria* (S5 e S6). Após a inoculação, os animais foram observados durante uma semana. A tabela 15 apresenta o número de animais vivos 24 horas após a

inoculação. Os grupos controles (inoculados com BHI e salina) sobreviveram por períodos superiores a uma semana. A capacidade letal foi observada apenas nas amostras enterotoxigênicas, não havendo diferenças significativas com relação ao grupo de seleção, nem ao sexo dos animais.

#### 4.12 - Produção de hemolisinas, citotoxinas e enterotoxinas em relação ao biotipo

Alguns trabalhos (15,17,18,48) têm mostrado haver uma associação entre certas características de virulência e o fenótipo, em espécies de *Aeromonas*. A ausência do fenômeno suicida tem sido relacionada com amostras enteropatogênicas (70,71). A produção de hemolisinas, citotoxinas e enterotoxinas foram associadas com resultados positivos nas provas de VP e lisina descarboxilase e não fermentação de arabinose (15,28). Entre as espécies isoladas de alimento não foi encontrada nenhuma amostra suicida. Em *A. sobria*, a espécie com maior frequência de amostras produtoras de hemolisinas, citotoxinas e enterotoxinas foi observada uma maior proporção de amostras LDC positivas e menor frequência de amostras capazes de fermentar a arabinose (tabela 16). Somente uma amostra produtora de toxina (52) foi positiva na prova de arabinose. Por outro lado, em *A. caviae* observou-se uma alta frequência de bactérias fermentadoras de arabinose associada a uma baixa frequência de fenótipos LDC+ e VP+

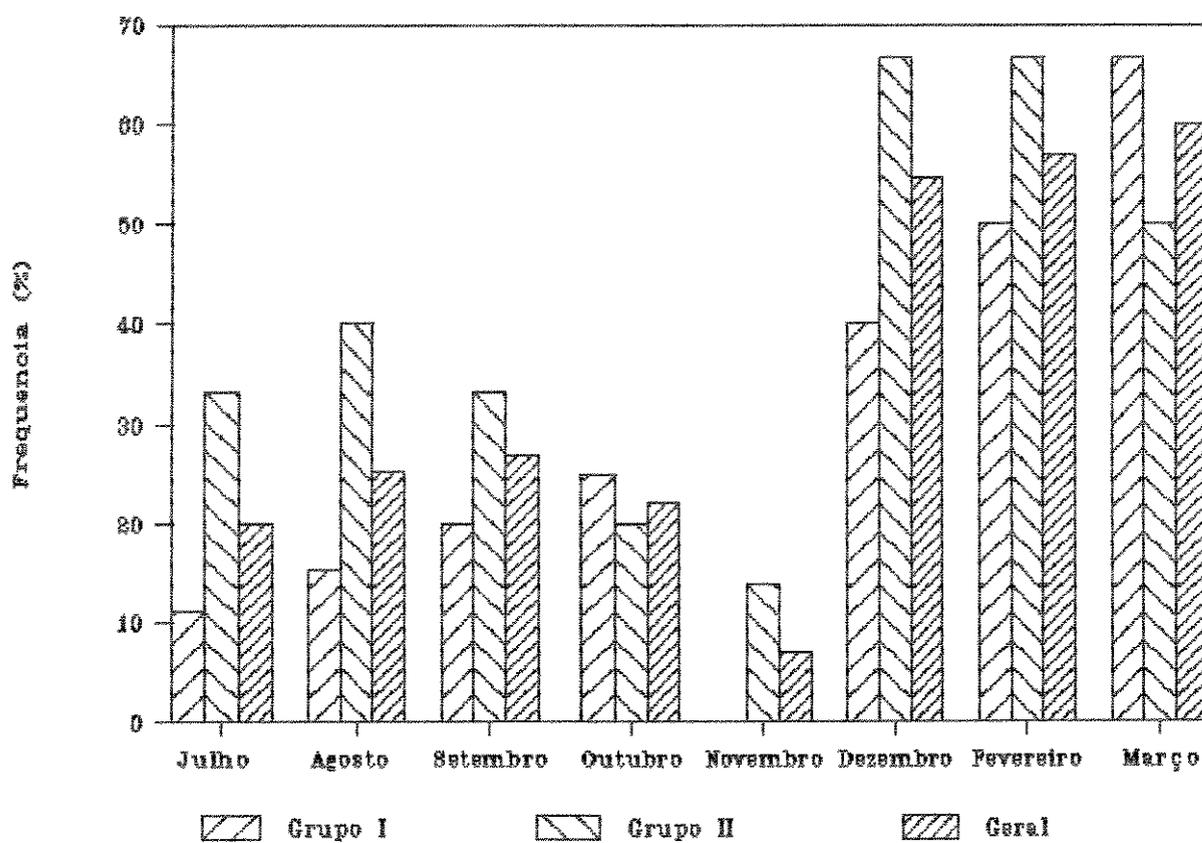


Figura 1 - Frequência mensal de isolamentos de *Aeromonas* sp

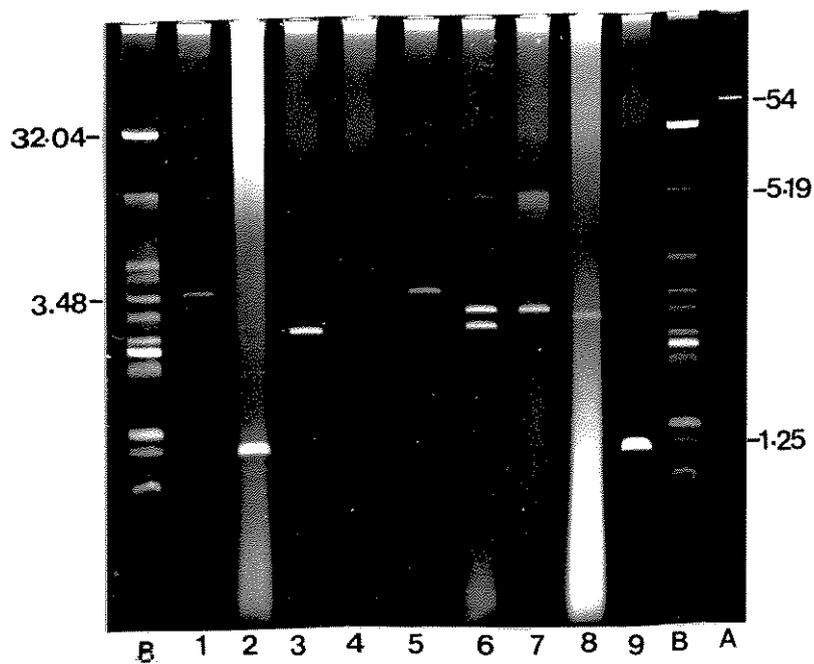


Figura 2 - Eletroforese do DNA plasmidial em gel de agarose a 0,7%.  
 A. sobria: S2=1, S5=3, S6=5e6, S9=7, S11=8, S12=9;  
 A. hydrophila: H13=2e4; p307=A, V517=B.

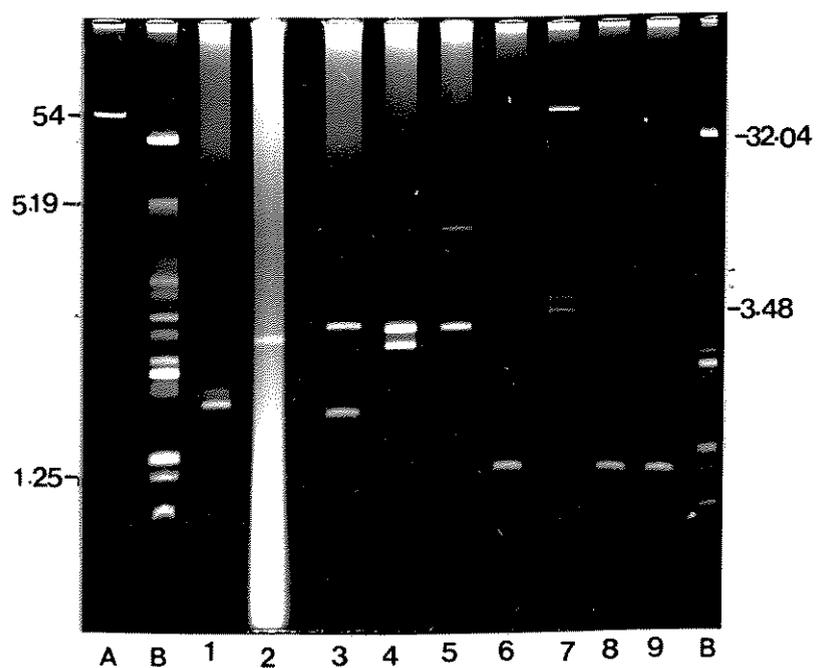


Figura 3 - Eletroforese do DNA Plasmidial em gel de agarose a 0,7%.  
*A. sobria*: S6=3, S7=5e9, S11=2; *A. hydrophila*: H13=8,  
H14=7, H23=6; *A. caviae*: C6=1, C10=4; p307=A, v517=B.

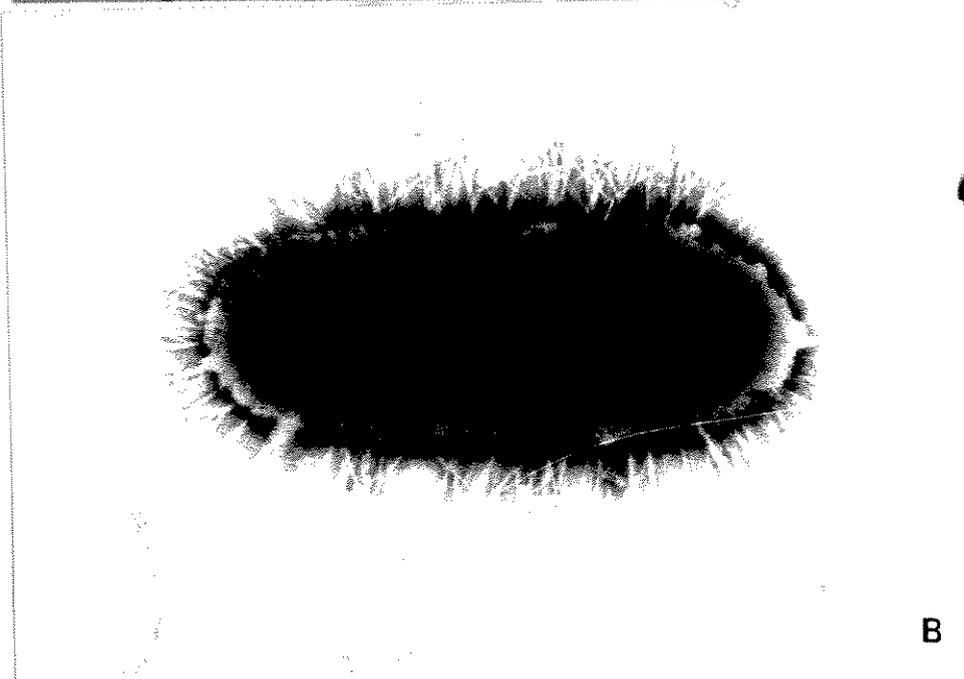
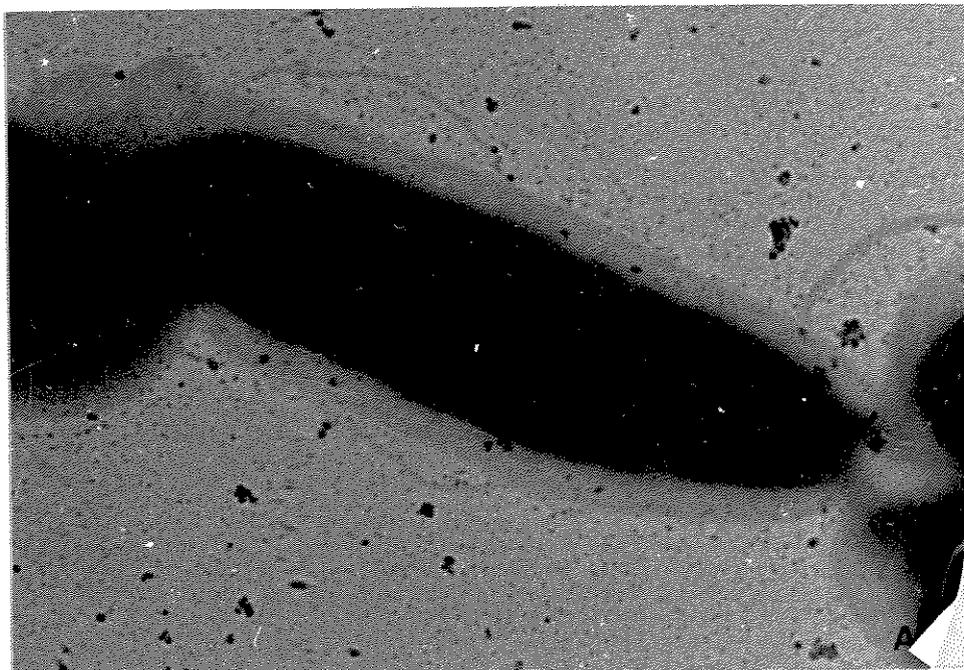


Figura 4 - Fotomicrografia eletrônica da amostra H13 (*A. hydrophila*), cultivada em TSB a 16° C/48 h (A) e a 37° C/24 h (B). Aumento: 26.200 x

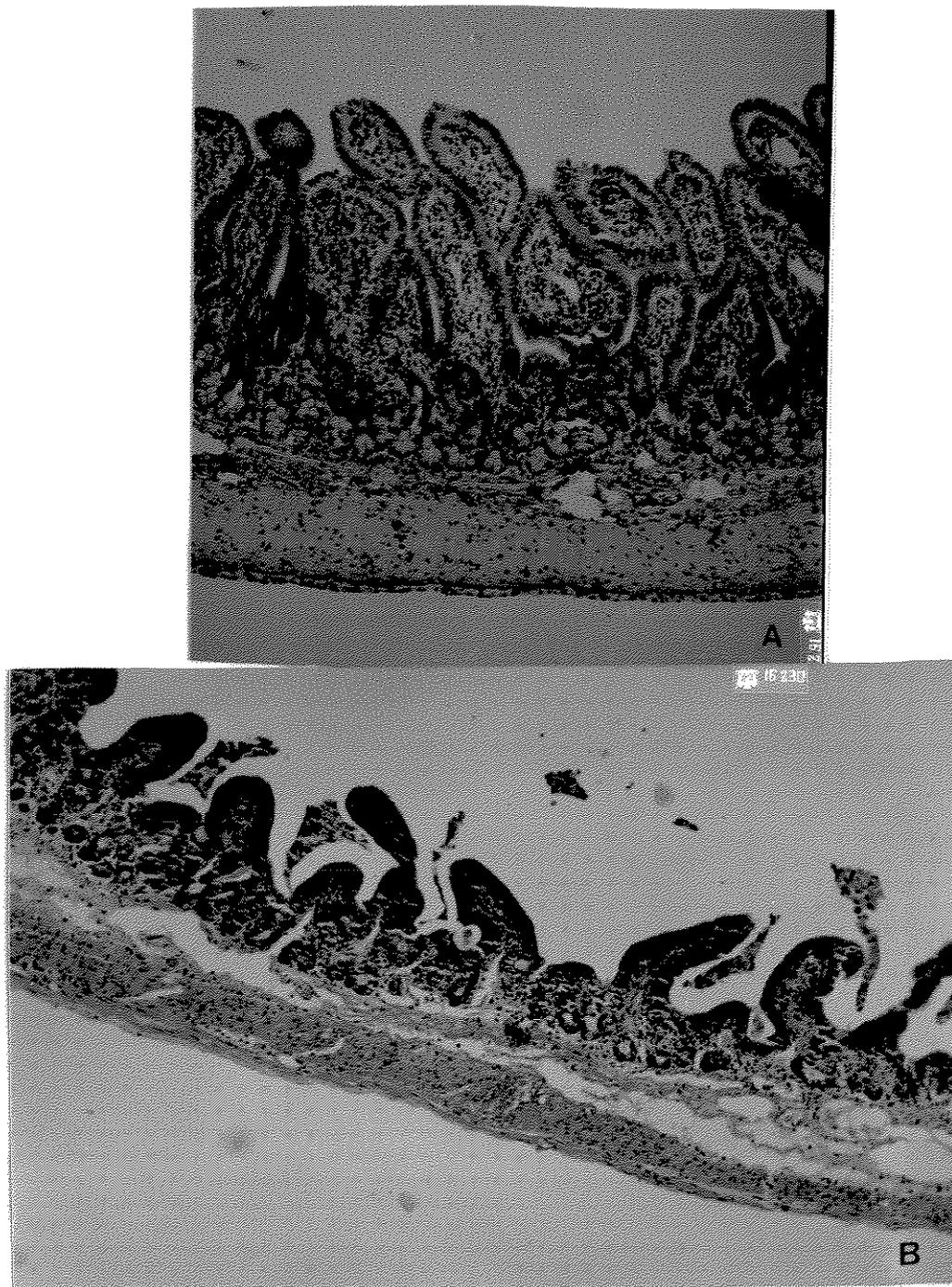


Figura 5 - Cortes histológicos de intestino de coelho. A: inoculado com salina; B: inoculado com sobrenadante de cultivo de uma amostra enterotoxigênica de *A. hydrophila*. Técnica de coloração: HE. Aumento: 100 x.

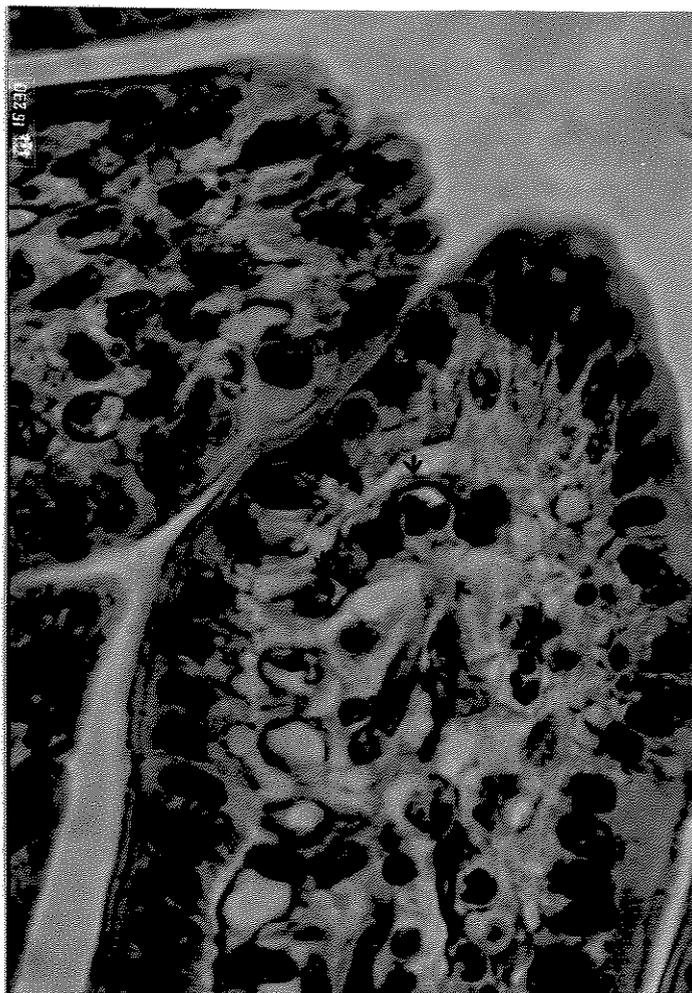


Figura 6 - Detalhe de uma vilosidade intestinal de coelho inoculado com sobrenadante de cultivo de uma amostra enterotoxigênica de *A. hydrophila*, mostrando infiltrado leucocitário (setas).  
Técnica de coloração: HE. Aumento: 1000 x.

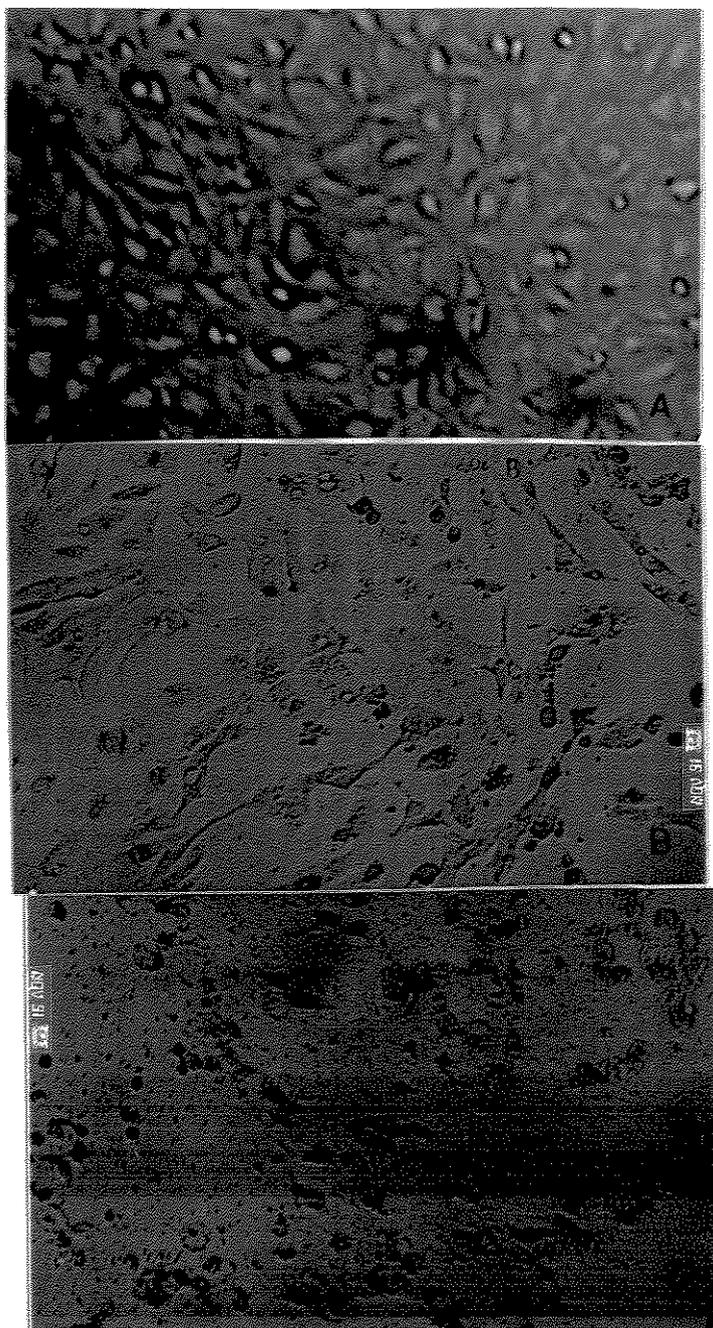


Figura 7 - Cultura de células HeLa sob efeito de sobrenadantes de cultivo de *Aeromonas* sp, 18 hs após a inoculação: A: Controle (cultura inoculada com caldo BHI); B: cultura inoculada com sobrenadantes aquecidos a 56°C por 10 minutos; C: cultura inoculada com sobrenadantes não aquecidos. Aumento: 400x

Tabela 1

Frequência de espécies de *Aeromonas* sp  
em alimentos

espécie	%	N (a)
<i>A. caviae</i>	26	13
<i>A. hydrophila</i>	50	25
<i>A. sobria</i>	24	12
Total	100	50

(a) N = número de amostras isoladas

Tabela 2

Frequência relativa de espécies de *Aeromonas* isoladas em alimentos de origem animal (grupo I) e vegetal (grupo II)

	<i>A. caviae</i>		<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>		Total	
	%	N (a)	%	N	%	N	%	N
Grupo I	9	2	45,5	10	45,5	10	44	22
Grupo II	39,2	11	7,1	2	53,7	15	56	28
Total		13		12		25	100	50

(a) N = número de amostras isoladas

Tabela 3

Resultados das Provas Bioquímicas de amostras  
de *Aeromonas* sp isoladas de alimentos (a)

Provas	<i>A. caviae</i> (13) <sup>(b)</sup>	<i>A. sobria</i> (12)	<i>A. hydrophila</i> (25)
Motilidade	100	100	100
Oxidase	100	100	100
Indol	100	100	100
Lisina	8	91	76
CN-NaCl (0%)	100	100	100
CN-NaCl (1%)	100	100	100
CN-NaCl (7,5%)	0	0	0
Citrato	100	100	100
H <sub>2</sub> S	0	8	0
Fenilalanina	0	0	12
Urease	0	0	0
V.M.	92	91	52
V.P.	15	75	84
Glicose (ácido)	100	100	100
Glicose (gás)	0	100	100
Sacarose	100	100	100
Arabinose	92	25	64
Manitol	100	100	100
Inositol	0	0	0
Esculina	100	0	100
Salicina	84	0	60
Res. Ag. 0-129	100	100	100
Aerogenicidade (CNG I)	8	100	80
Suicida	0	0	0
Hemólise em AS (*)	100 (A)	100 (B)	100 (B)

(a) Frequência (%) de amostras com resultado positivo

(b) Entre parênteses = número de amostras isoladas de cada espécie

(\*) A = hemólise do tipo alfa; B = hemólise do tipo beta

Tabela 4

Frequência de amostras com plasmídeos (a)

espécie	1a.extração		2a.extração	
	%	N (a)	%	N
<i>A. caviae</i> (13)(b)	15,3	2	15,3	2
<i>A. hydrophila</i> (25)	36,0	9	12,0	3
<i>A. sobria</i> (12)	66,0	8	58,3	7

(a) N = número de amostras portadoras

(b) Entre parênteses = total de amostras analisadas

Tabela 5

Frequência (%) de amostras hemaglutinantes entre as espécies de *Aeromonas* isoladas de alimento (a)

Hemácia	Agar Sangue				Agar Glicose			
	Manose Sens.		Manose Res.		Manose Sens.		Manose Res.	
	TA (b) 5°C	TA 5°C	TA 5°C	TA 5°C	TA 5°C	TA 5°C	TA 5°C	TA 5°C
Boi	6	4	0	2	12	16	12	4
Carneiro	0	4	0	2	8	12	4	4
Cavalo	2	8	0	2	12	12	4	0
Cobaio	18	20	2	2	16	24	10	6
Galinha	18	10	18	4	26	24	20	4
Humana	4	4	2	2	6	6	0	2

(a) Total de amostras testadas: *A. caviae*, 13; *A. sobria*, 12; *A. hydrophila*, 25.

(b) TA = temperatura ambiente

Tabela 6  
Padrão homaglutinante das amostras de *A. caviae* (a)

Amostras	Homácias / Meios de Cultura (b)												
	Boi		Carneiro		Cavalo		Cobaio		Galinha		Humana		
	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	
C1	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA (°C)	-	-	4	-	-	-	-	-	6 <sup>o</sup>	-	-	5
C2	5°C	-	-	4 <sup>o</sup>	4	-	-	-	-	4	-	-	-
	TA	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	-	-	-	-	6	4	-	6*	6*	-	-
C7	5°C	4 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	-	-	6	-	-	-	4	6	-	-
	TA	6	-	-	-	-	-	-	-	6*	5 <sup>o</sup>	6	-
C10	5°C	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	5°C	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	-	-	-	4*	-	-	-	-	-	-	3*
		-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	3

(a) Resultados expressos pelo log<sub>2</sub> da recíproca da maior diluição positiva (log<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>)  
 (b) Meios de cultura: AS (agar sangue), AG (agar glicose), NI (minca), CFA (cofenziling factor agar), TSA (tryptic soy agar)  
 (c) TA - temperatura ambiente  
 (o) Hemaglutinação manose-resistente  
 (\*) Hemaglutinação manose-sensível e manose-resistente

Tabela 7

Padrão Hemaglutinante das amostras de *A. hydrophila* (a)

## Hemácias / Meios de Cultura (b)

Amostras	Boi			Carneiro			Cavalo			Cobaio			Galinha			Humana				
	AS	AG	NI	CFA	TSA	AS	AG	NI	CFA	TSA	AS	AG	NI	CFA	TSA	AS	AG	NI	CFA	TSA
H4	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	-	6*	-	-	-	-
	TA (°C)	-	-	-	4	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	6*	-	-	-	-
H8	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	-	-	-	-	30	-	-	-	40	5	-	-	-	40	4	-	-	-
H9	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	40	-	-	40	-	3	4	-	-	50	5	-	-	50	3	-	-	-	-
H11	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	-	30	-	-	-	-	3	-	4	-	-	-	4	5*	-	-	-	-
H12	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	3*	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
H13	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	5	30	-	-	-	-	-	-	6	3	-	-	-	5	6*	-	-	-	-
H15	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	40	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	40	-	-	3	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H16	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4*	-	-	-	-	-
H17	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	3	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	30	-	-
H18	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TA	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-

(a) Resultados expressos pelo log<sub>2</sub> da recíproca da maior diluição positiva (log<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>)

(b) Meios de cultura: AS (ágar sangue), AG (ágar glicose), NI (minca), CFA (colenizing factor agar), TSA (Tryptic soy agar)

(c) TA = temperatura ambiente

(o) Hemaglutinação manose-resistente

(\*) Hemaglutinação manose-sensível e manose-resistente

Tabela 8

Padrão hemaglutinante de amostras de *A. sobria* (a)

Amostras	Hemácias / Meios de cultura (b)											
	Boi		Carneiro		Cavalo		Cobaio		Galinha		Humana	
	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA	AS	AG NI CFA TSA
S2	5	-	4	-	-	-	-	-	6 <sup>x</sup>	6	-	-
TA (°C)	-	-	-	-	5	5	-	-	6 <sup>x</sup>	6	-	-
S3	-	3 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	5 <sup>o</sup>	6 <sup>x</sup>	-	-
TA	-	3 <sup>x</sup>	-	-	6	6	-	-	6	6	-	-
S4	-	-	-	-	6 <sup>x</sup>	3	4	4	5 <sup>x</sup>	6	6	3 <sup>o</sup>
TA	-	-	-	-	6	4	4	-	6	6	5	-
S5	4	5	-	-	6	6	4	4	5	6	-	-
TA	-	-	-	-	6	6	4	4	6	6	-	-
S6	4	-	3	4	5	6	-	6	4	6	6	5
TA	-	-	-	6	6	-	6	-	6	6	6	5
S7	4	-	-	-	-	-	-	4	4 <sup>x</sup>	6	6	-
TA	4	-	-	-	3	-	-	6	6	6	-	-
S8	-	-	-	-	-	-	-	5	-	6	-	5
TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S11	3 <sup>x</sup>	-	4	-	6	-	-	6	6	6	6	-
TA	-	-	-	-	3	-	-	6	-	-	6	-
S12	-	-	5	-	4	-	-	4	6 <sup>x</sup>	-	-	-
TA	-	-	-	-	4	-	-	4	-	-	-	-

(a) Resultados expressos pelo log<sub>2</sub> da recíproca da maior diluição positiva (log<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>)  
 (b) Meios de cultura: AS (ágar sangue), AG (ágar glicose), NI (minca), CFA (colonizing factor agar), TSA (tryptic soy agar)  
 (c) TA = temperatura ambiente  
 (o) Hemaglutinação manose-resistente  
 (x) Hemaglutinação manose-sensível e manose-resistente

Tabela 9

Frequência de amostras produtoras de enterotoxina  
(teste do camundongo recém-nascido)

espécie	%	N (a)
<i>A. caviae</i> (13)(b)	0	0
<i>A. hydrophila</i> (25)	20	5
<i>A. sobria</i> (12)	83	10

(a) N = número de amostras positivas

(b) Entre parênteses = total de amostras testadas

Tabela 10  
 Atividade enterotóxica dos extratos de cultura em camundongos swiss recém-nascidos

		Amostras																
		H13	H16	H18	H22	H23	H24	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
Resultados (*)		4+	1+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	3+	4+	2+	4+	3+	4+

(\*) Escala - relação i/c: 1+ = entre 0,070 e 0,080; 2+ = entre 0,080 e 0,090;  
 3+ = entre 0,090 e 0,100; 4+ > 0,100

Tabela 11

Atividade hemolítica dos extratos de cultura (a)

Amostras	Hemácias		
	Carneiro	Coelho	Humana
C8	8	64	64
H3	-	16	16
H4	-	16	-
H11	64	-	64
H12	-	-	32
H13	16	16	64
H14	-	16	64
H15	-	8	8
H18	16	32	64
H22	-	-	64
S2	16	16	64
S4	64	-	64
S5	32	-	64
S6	-	8	16
S7	8	32	64
S10	-	-	32

(a) Resultados expressos pela recíproca da maior diluição positiva. Entre as 50 amostras de *Aeromonas* sp isoladas, somente as relacionadas na tabela foram hemolíticas.

Tabela 12

Frequência de amostras que apresentaram atividade citotóxica em células HeLa

espécie	%	N (a)
A. caviae (13)(b)	23	3
A. hydrophila (25)	56	14
A. sobria (12)	91	11

(a) N = número de amostras positivas

(b) Entre parênteses = total de amostras testadas

Tabela 13  
 Atividade dos extratos de cultura em células HeLa (a)

Tratamento	Amostras																											
	C5	C6	C8	H3	H4	H8	H9	H11	H13	H14	H15	H16	H18	H21	H22	H23	H24	S1	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Aquecido (1)	NT(*)	NT	3	4	NT	NT	4	NT	NT	2	2	NT	7	4	2	1	2	7	2	3	2	3						
N/aquecido (2)	7	6	7	7	7	5	5	7	7	7	10	7	11	4	11	7	5	10	7	7	9	7	9	7	6	9	8	7

(a) Resultados expressos pelo log2 da recíproca da maior diluição positiva (log2 d<sup>-1</sup>)  
 (1) Efeito citotônico  
 (2) Efeito citotóxico  
 (\*) NT = não testado

Tabela 14  
 Atividade em células Vero dos extratos de cultura das amostras enterotoxigênicas (a)

Tratamento	Amostras															
	H13	H14	H18	H22	H23	H24	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Aquecido (1)	3	4	7	7	7	7	7	4	7	7	4	7	7	7	7	7
N/Aquecido (2)	10	10	8	8	7	7	8	11	11	7	7	10	7	7	7	7

(a) Resultados expressos pelo log<sub>2</sub> da recíproca da maior diluição positiva (log<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>)

(1) Efeito citotônico

(2) Efeito citotóxico

Tabela 15

Resultado dos Testes da Atividade de culturas bacterianas em camundongos swiss adultos, inoculados i.p. com  $10^6$  -  $10^7$  UFC das amostras C1, H10, H13, S5 e S6 (a)

Inóculo	Animais	
	Hgp	Lgp
Salina	10	10
BHI	10	10
C1	10	10
H10	10	10
H13	5	3
S5	6	5
S6	1	6

(a) Número de animais que sobreviveram, 24 horas após a inoculação, entre 10 inoculados.

Tabela 16

Relação entre fenótipo (provas de VP, LDC e arabinose) e produção de toxinas

Espécie	T <sup>(O)</sup>	Arabinose		LDC		VP		Enterotoxinas (*)		Citotoxinas (#)	
		%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
<i>A. caviae</i>	(13)	92	12	8	1	15	2	0	0	23	3
<i>A. hydrophila</i>	(25)	64	16	76	19	84	21	20	5	56	14
<i>A. sobria</i>	(12)	25	3	91	9	75	9	83	10	91	11

(<sup>O</sup>) T = total de amostras testadas de cada espécie.

(\*) Atividade enterotoxigênica: avaliada pelo teste do camundongo recém-nascido.

(#) Efeito citotóxico: observado em cultura de células HeLa

## 5. DISCUSSÃO

A incidência de *Aeromonas* sp em alimentos foi maior nos meses de verão. Entre Julho e Outubro, a média de isolamentos ficou próxima de 23%, tendo caído para 7% em Novembro (fig. 1). Mais de 50% das amostras foram isoladas entre Dezembro/89 e Março/90. Esta mesma variação sazonal foi observada em outras regiões tropicais, com o isolamento da bactéria em fezes de indivíduos diarreicos e sadios (32,80,101). Neste trabalho, 50% das amostras isoladas foram identificadas como *A. hydrophila*. A frequência de *A. hydrophila* em ambos os grupos de alimento foi aproximadamente igual; *A. caviae* foi encontrada principalmente em legumes e verduras e *A. sobria* foi isolada predominantemente nos alimentos do grupo I (tabela 2). Os dados de literatura indicam ser *A. hydrophila* a espécie mais frequente no ambiente (52), principalmente na água. Namdari et alii (72) estudaram a Ecologia das três espécies mesófilas coletando amostras de água de rios, lagos e esgotos, nos E.U.A. e Israel. *A. caviae* foi encontrada com alta frequência nos locais de maior disponibilidade de nutrientes. Em locais pobres em nutrientes, a espécie predominante foi *A. hydrophila*. Além do nível trófico, outro fator que influenciou no biotipo encontrado foi o pH. A frequência de isolamentos de *A. caviae* foi maior nos locais onde o pH da água foi inferior a 5,8. Valores de pH acima de 6,5 tornam algumas amostras de *Aeromonas* sp autolimitantes; este fenômeno é observado principalmente em *A. caviae*. O fato de a maioria dos

isolamentos terem sido em amostras do grupo II, com uma alta frequência de *A. hydrophila* parece indicar uma contaminação através da água. Espécies de *Aeromonas* são resistentes ao tratamento da água com hipoclorito de sódio (52). Alguns autores têm observado uma associação do fenômeno suicida com certos biotipos, sendo esta característica de valor na identificação de algumas espécies. O caráter suicida também tem sido relacionado a espécies não portadoras de certas características de virulência (70).

Resultado de certo modo surpreendente foi a estreita associação de espécies de *A. sobria* com amostras de carne bovina "in natura". Das treze amostras de *A. sobria* isoladas, apenas duas foram encontradas em verduras e uma em carne de peixe. As demais foram isoladas de carne bovina. A disseminação de espécies de Enterobactérias portadoras de determinados fatores de colonização, em alimentos de origem animal, foi recentemente investigada na Alemanha (62). A contaminação parece ser favorecida para bactérias portadoras de certos fatores de aderência. No caso de infecções de ferimentos e septicemias, alguns estudos (30) mostraram haver uma preferência de certas amostras de *Aeromonas* em colonizar o tecido muscular. Entre as três espécies mesófilas, *A. caviae* é isolada com a maior frequência de fezes tanto de indivíduos sadios como de pacientes com infecções intestinais (38); esta espécie também é predominante em encanamentos de esgoto, principalmente onde contém alta concentração de resíduos de alimentos. Uma possível

explicação para a alta frequência de *Aeromonas* sp (a maioria *A. caviae* e *A. hydrophila*) em legumes e verduras seria a contaminação pelo manuseio em condições inadequadas de higiene durante o processamento e através da água de irrigação da cultura na horta.

Na análise da eletroforese de DNA extracromossômico, foi verificado que a maioria das amostras isoladas não apresentaram plasmídios. A eletroforese do DNA plasmidial foi efetuada em dois momentos: logo após o isolamento e identificação das amostras e no fim do trabalho. As figuras 2 e 3 apresentam o perfil das amostras portadoras de plasmídios, na última eletroforese. Somente amostras de *A. hydrophila* perderam o DNA plasmidial. Tem sido observado (24,65) que muitas características associadas à virulência, como resistência antimicrobiana e produção de toxinas, são codificadas por genes cromossômicos, em espécies de *Aeromonas*. No presente trabalho, é interessante notar que a espécie com a maior proporção de amostras portadoras de plasmídios (*A. sobria*) apresentou maior frequência de resultados positivos no teste do camundongo recém-nascido (tabelas 4 e 9). Entretanto, os experimentos realizados não permitem fazer uma afirmação segura quanto à importância dos genes plasmidiais na expressão das características de virulência destas amostras. Dentre as amostras destituídas de plasmídeos, a maioria não apresentou resultados positivos nos experimentos realizados, mesmo antes da perda do DNA extracromossômico. Por outro lado, amostras positivas nestes testes, mantiveram suas características

quando perderam o DNA plasmidial.

A procura de marcadores fenotípicos associados com certos fatores de virulência têm sido frequente no estudo de alguns microrganismos. Em *Aeromonas* sp, a ausência de pirazinamidase é uma característica comum de amostras de *A. sobria*. Este carácter tem sido sugerido como marcador de virulência da espécie (21). Entre as amostras isoladas de alimento, somente uma apresentou resultado negativo no teste de pirazinamidase. Não pudemos verificar nenhuma correlação deste fenótipo com os prováveis fatores de virulência estudados.

Neste trabalho, o padrão de aderência foi avaliado pelo cultivo das amostras em diferentes meios, utilizando-se o teste de hemaglutinação frente a cinco tipos de hemácia. Independente da temperatura empregada, a aglutinação foi mais frequente com hemácias de cobaio e de galinha (tabela 5). A adição de D-manose à suspensão de hemácias reduziu ou aboliu o título hemaglutinante das amostras. A menor proporção de amostras hemaglutinantes foi verificada na espécie *A. caviae* (tabela 6). Nos testes feitos com amostras de origem humana, Sifaw (92) encontrou três padrões de hemaglutinação: aglutinação manose-sensível com hemácias humanas, aglutinação manose-sensível com hemácias de carneiro e aglutinação manose-resistente com hemácias humanas. O primeiro padrão foi o mais comum. Poucas das amostras estudadas neste trabalho aglutinaram hemácias humanas (tabelas 5 a 8). A única amostra com fímbrias (H13), dentre as analisadas ao microscópio

eletrônico, aglutinou hemácias de galinha, tanto em presença quanto na ausência de D-manose, e hemácias de cobaio na ausência de D-manose (tabela 7). Seis padrões de aglutinação com hemácias humanas foram observados por Atkinson *et alli* (4), entre amostras de *Aeromonas* sp isoladas de indivíduos com diarreia e amostras de *A. hydrophila* enterotoxigênicas. Estas amostras aglutinavam intensamente hemácias humanas, e a aglutinação poderia ser inibida por L-fucose, D-galactose ou D-manose. Em alguns casos, a aglutinação era mediada por pili (4), sendo que os meios que melhor estimulavam a produção de hemaglutininas eram TSA e ágar sangue (feito com hemácias humanas). A presença de fímbrias é comum em espécies de *Aeromonas*, tanto em amostras isoladas de casos de infecções intestinais, como em amostras do ambiente (5). Em alguns casos, a presença de pili não está associada à hemaglutinação e amostras não fimbriadas aglutinam certas hemácias (5), indicando a presença de outros prováveis fatores de aderência que não as fímbrias. A capacidade de autoaglutinação, em *Aeromonas* sp, está ligada a presença de S-layers, aderência e resistência sérica. Amostras SP-PAB+ (49) apresentam forte resistência sérica e letalidade para camundongos. Este fenótipo é comum em amostras de *A. sobria* (49). Das 50 amostras estudadas, apenas a amostra S4 (*A. sobria*) apresentou esta característica.

A alta frequência de produção de sideróforos e resistência ao soro humano normal, observada nas amostras, coincide com os resultados obtidos em outros trabalhos (47,68,87). Em *Aeromonas* sp, parece haver uma associação entre estas duas características.

O papel dos sideróforos como fatores de virulência tem sido bastante estudado. Entretanto, não se sabe precisamente até que ponto sua presença é decisiva para colonização e, eventualmente invasão do tecido do hospedeiro. Outros sistemas de obtenção de ferro, como as hemolisinas, podem ser encontrados em espécies produtoras de sideróforos (68). Estudos adicionais serão necessários para estabelecer o verdadeiro papel dos sideróforos como fatores de virulência.

Entre os fatores que atestam o potencial enteropatogênico de *Aeromonas* sp, inclui-se a capacidade de produção de enterotoxinas por amostras isoladas de diferentes origens, em regiões geográficas distintas. Entretanto, a natureza do componente ativo nos ensaios de alça intestinal ligada de coelho e no teste de camundongo recém-nascido permanece desconhecida. Grande parte dos estudos são envoltos em controvérsia; uma das questões não respondidas refere-se à ação dos extratos de cultivo de amostras enterotoxigênicas sobre algumas linhagens de células cultivadas em laboratório, e a relação do componente enterotoxigênico com hemolisinas (95). Em um dos trabalhos pioneiros sobre toxinas de *Aeromonas* sp, Cumberbatch *et alii* (28), estabeleceram uma estreita correlação entre a produção de citotoxinas, hemolisinas e enterotoxinas. Nos estudos de Ljungh *et alii* (64), demonstrou-se a purificação de um componente termolábil do sobrenadante de cultura com atividade em alça intestinal ligada de coelho, não hemolítico e com efeito esteroidogênico em células Y-1. Baseado na classificação de

Keusch e Donta (56), os autores identificaram a enterotoxina como sendo do tipo citotônico. Em um trabalho mais recente, Stelma et alii (95) conseguiram neutralizar a atividade enterotoxigênica de sobrenadantes de cultura de *Aeromonas* sp com antissoro contra beta-hemolisina, e sustentam que apesar de haver um componente enterotoxigênico com efeito citotônico nestes sobrenadantes, trata-se de um determinante patogênico menos comum do que a beta-hemolisina. Algumas explicações foram propostas para justificar estas divergências de resultados. *Aeromonas* sp produzem uma diversidade de substâncias extracelulares e, frequentemente, tem sido difícil separar os componentes responsáveis por cada efeito biológico. Além disto, aparentemente ocorrem variações genéticas entre amostras isoladas de diferentes regiões (26) e a taxonomia do gênero não parece bem definida (3,27). No presente trabalho, os resultados dos ensaios feitos com os extratos de cultura, não nos permitem estabelecer uma associação entre a produção de enterotoxinas, hemolisinas e citotoxinas com todas as amostras. Houve uma variação no comportamento toxigênico. Embora a frequência de produção de hemolisinas e enterotoxinas tenha sido igual, houve tanto amostras não produtoras de hemolisinas e enterotoxigênicas como amostras hemolíticas não enterotoxigênicas (tabelas 10 e 11). Praticamente todas as amostras hemolíticas lisaram hemácias humanas, o mesmo não ocorrendo com as hemácias de coelho e carneiro (tabela 11). Estas últimas têm sido identificadas como as mais resistentes às toxinas de *Aeromonas* sp (40). A atividade enterotoxigênica dos extratos de cultura foi abolida com o seu aquecimento a 56 °C por 10 minutos. Em cultura

de células HeLa, todos os sobrenadantes das amostras enterotoxigênicas apresentaram forte efeito citotóxico, com total desprendimento do tapete celular da superfície da placa de cultura. Algumas amostras não enterotoxigênicas também apresentaram efeito citotóxico - entre elas as amostras C5, C6 e C8 de *A. caviae* (tabela 13). A aplicação de sobrenadantes aquecidos (56 ° C por 10 minutos) em cultura de células HeLa induzia alterações que se manifestavam de várias maneiras: arredondamento, alongamento, perda de refringência, etc. Este mesmo aspecto foi observado nas maiores diluições dos extratos das amostras positivas. Provavelmente esta multiplicidade de efeitos deve-se à presença de mais de um fator ativo no sobrenadante das culturas. Não foi avaliada a viabilidade das células sob a ação dos sobrenadantes aquecidos; aparentemente o aquecimento dos extratos resultou em efeito do tipo citotônico. O componente com efeito citotóxico e termolábil deve ser o elemento responsável pela atividade enterotoxigênica.

A validade do teste do camundongo recém-nascido, para detecção de amostras enterotoxigênicas de *Aeromonas* sp tem sido colocada em dúvida. Alguns autores (28,33) obtiveram resultados positivos somente no teste de alça ligada de coelho. Burke et alii (14), sugerem que, além da relação peso do intestino/peso da carcaça, deve ser levado em consideração a formação de fezes diarréicas pelos animais. O autor aponta a não observação desta variável como razão dos resultados negativos obtidos em outros trabalhos. No presente estudo, procuramos verificar o efeito dos

sobrenadantes de algumas amostras positivas em alça ligada de coelho. Os resultados do Teste do camundongo recém nascido foram confirmados no teste de alça ligada (dados não apresentados). O quadro histológico do intestino de coelho exposto a 0,5ml/5cm de uma amostra enterotoxigênica durante 16 horas apresentou as mesmas alterações demonstradas por Ljungh et alii (63), exceto no que diz respeito à descamação do epitélio (fig. 5 e 6): deformação de vilosidades, alteração de "brush-borders" e presença de infiltrado leucocitário. Não foi observada sensível descamação do epitélio.

Seguido da análise das características associadas à virulência, algumas amostras foram selecionadas para avaliação do seu potencial de patogenicidade em camundongos. Os animais utilizados apresentam sensibilidade diferenciada para LPS de *Salmonella* *tiphimurium*. O LPS é um produto ubíquo das bactérias gram-negativas, responsável por um grande número de propriedades inflamatórias e imunomodulantes, sendo considerado importante fator de virulência das bactérias septicêmicas (20). No caso de *Aeromonas* sp, tem sido creditado ao LPS o aumento de infecções em anfíbios (66); o seu papel em infecções humanas ainda é obscuro. Em nossos experimentos, as amostras de *A. hydrophila* e *A. sobria* enterotoxigênicas foram letais tanto para camundongos Lgp como Hgp (tabela 15). A amostra H10 (*A. hydrophila*) e C1 (*A. caviae*), não produtoras de enterotoxina não foram patogênicas para nenhum dos dois grupos. A inexistência de variação na resposta dos dois grupos pode indicar um papel pouco relevante do LPS na

patogenicidade da bactéria para os animais, tendo importância decisiva outros determinantes, juntamente com as enterotoxinas; adicionalmente, o processo de seleção pode ter afetado algum componente do sistema imune essencial para a resposta a outros fatores de virulência da bactéria, que não a endotoxina, aumentando a susceptibilidade destes animais.

Certas características bioquímicas, referidas por alguns autores (15, 17, 18) como importantes para identificação de espécies enteropatogênicas foram encontradas em estreita associação com a capacidade de produção de enterotoxinas (tabela 16). Estes resultados confirmam a possibilidade de identificação de espécies portadoras de certos fatores de virulência pela análise de apenas alguns marcadores fenotípicos.

O isolamento de *Aeromonas* sp de alimentos não tem sido incomum; numa recente revisão sobre o assunto, Buchanan *et alii* (13) chegam a sugerir a inclusão de *A. sobria* e *A. hydrophila* entre as bactérias potencialmente causadoras de intoxicação alimentar. Entre os fatores que justificam a frequência relativamente alta de *Aeromonas* sp em alimentos, o mais importante talvez seja a resistência ao tratamento da água com sais de cloro. Sendo a maioria das bactérias sensíveis a estes compostos, a possibilidade de colonização de ambientes clorinados representa grande vantagem adaptativa.

## 6. CONCLUSÃO

A despeito do grande número de referências na literatura sobre *Aeromonas* sp, as evidências parecem ainda insuficientes para considerá-las como agentes primários de infecções. Esta observação é válida especialmente no caso de infecções intestinais. Não se tem estabelecida uma associação estreita entre certos fatores de virulência e patogenicidade, como no caso dos enteropatógenos clássicos como *E. coli* e *Vibrio cholerae*. Muitos trabalhos apresentam resultados conflitantes e favorecem interpretações diferentes contribuindo para uma certa confusão. O papel das adesinas e enterotoxinas não está completamente elucidado. As primeiras são encontradas tanto em amostras do ambiente como em amostras isoladas de casos de infecções. Sobrenadantes de cultura de *Aeromonas* apresentam uma diversidade de produtos extracelulares. Uma questão persistente refere-se à natureza da atividade destes elementos em cultura de célula e em ensaios como o teste de alça intestinal ligada de coelho e o teste do camundongo recém-nascido. Tem sido difícil identificar quantos e quais os agentes com atividade de enterotoxina. Dados de Epidemiologia ainda são escassos. No Brasil muito pouco trabalhos têm sido feitos. O conhecimento da Ecologia e vias de transmissão é de particular interesse na caracterização de uma espécie enteropatogênica. Baseado nos resultados deste trabalho, as seguintes observações podem ser feitas:

- 1- Conforme mencionado na literatura, *Aeromonas* sp são

ubíquas, sendo presentes com relativa frequência em alimentos. Entre as três espécies mesófilas, *A. hydrophila* foi encontrada em maior proporção nos espécimes de alimentos analisados; A espécie *A. caviae* esteve associada principalmente a legumes e verduras e *A. sobria* a alimentos de origem animal. A frequência de *Aeromonas* sp foi maior nos meses quentes.

2- Uma grande proporção das amostras isoladas de alimentos apresentam fatores de virulência característicos das bactérias enteropatogênicas clássicas: produção de enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, resistência aos fatores séricos do complemento e produção de sideróforos.

3- Nem todas as amostras foram portadoras de plasmídios; apesar de a maior frequência de amostras portadoras de DNA extracromossômico coincidir com a espécie com a maior proporção de amostras enterotoxigênicas, não foi realizado nenhum experimento que permitisse estabelecer uma correlação positiva entre estas características.

4- A presença de fímbrias foi verificada em apenas uma entre dez amostras portadoras de plasmídios, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

5- Um padrão hemaglutinante definido foi observado entre as amostras: a maioria aglutinou hemácias de cobaio e galinha, tanto na presença como na ausência de D-manose. A amostra portadora de fímbria mencionada no item anterior aglutinou hemácia de boi (manose-resistente), de cobaio (manose-sensível) e de galinha (manose-sensível e manose-resistente).

A identificação destas amostras como patógenos em potencial exige estudos adicionais. De fundamental importância seria o conhecimento da frequência de portadores de amostras capazes de expressar alguns destes fatores de virulência, na população local.

## 7. "*Aeromonas* sp - Incidence in Retail Foods and Study of Some Virulence Associated Characteristics"

In a survey carried out between mid 1989 and early 1990, at the food processing plant of the University of Campinas (UNICAMP) Restaurant, *Aeromonas* sp could be isolated in 31 out of 100 grocery specimens collected. The organisms, mostly isolated in the Summer, were classified at species level. The species isolated at the higher frequency was *A. hydrophila*. *A. caviae* was cultured mainly from vegetable foods and *A. sobria* from specimens of animal origin. All isolates were submitted to plasmid extraction and DNA electrophoresis. Plasmid DNA was shown to be present in 38 % of the isolates. Upon identification and characterization, the stocked cultures were tested for the following virulence related characteristics: haemagglutinating ability and fimbriae expression, toxin and siderophore production, serum resistance and mouse lethality. In addition, some tests were performed in an attempt to identify virulence markers commonly associated with the genus: autoagglutination, pyrazinamidase activity and the suicide phenomenon. Most isolates agglutinated chicken- and guinea pig red blood cells, in presence and absence of D-mannose. Horse, human, sheep and bovine erythrocytes were also tested. Fimbriae was present in one out of ten plasmids expressing isolates observed. Enterotoxins tests was performed by the suckling mouse assay; some isolates were also submitted to the rabbit ileal loop test. The ability to produce enterotoxin was detected in 32% of the isolates. The enterotoxin

activity was abolished by heating the culture supernatants at 56°C for 10 minutes. Four enterotoxigenic and two non-enterotoxigenic isolates as detected by the suckling mouse test were also assayed in rabbit ileal loop. The results of the suckling mouse test were confirmed by the rabbit ileal loop assay. Sections of the rabbit intestine inoculated with positive supernatants were submitted to histological analysis. The following alterations could be observed: villus deformation, destruction of the crypts and presence of a predominant polymorphonuclear infiltrate. The supernatants were also added to HeLa and Vero cell cultures. The activity of culture extracts in cell monolayers manifested through complete detachment of the cells from the microplate wells. This effect lasted in dilutions as high as 1/2048. Under action of heated (56 ° C/ 10 min.) extracts the alterations observed seemed to result from osmotic imbalance: rounding, vacuolation and shrinking. Serum resistance and siderophore production were detected in all isolates. Test in vivo was conducted by the i.p. inoculation of viable counts in high responder (Hgp) and Low responder (Lgp) mice. These animals are sensitive (Hgp) and resistant (Lgp) to *Salmonella tiphimurium* LPS. Enterotoxigenic isolates killed about 5 out of 10 animals inoculated with 10<sup>7</sup> CFU of bacteria, in up to 24 hrs. Non-enterotoxigenic isolates were not lethal to mice. It was found that virulence markers such as autoagglutination, suicide phenomenon and pyrazinamidase activity were not associated with the virulence characteristics studied in this research.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Agger, A. W.; J. D. McCormick; and M. J. Gurwith. 1985. Clinical and Microbiological Features of *Aeromonas hydrophila* Associated Diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **21**:909-913.
2. Altwegg, M. 1985. *Aeromonas caviae*: An Enteric Pathogen ? *Infection.* **13**:228-230.
3. Altwegg, M. and H. K. Geiss. 1989. *Aeromonas* as a Human Pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* **16**:253-285.
4. Atkinson, H. M. and T. J. Trust. 1980. Hemagglutination Properties and Adherence Ability of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **27**:938-946.
5. Atkinson, H. M.; D. Adams; R. S. Savvas and T. J. Trust. 1987. *Aeromonas* adhesins antigens. *Experientia.* **43**:372-374.
6. Asao, T.; Y. Kinoshita; S. Kozaki; T. Uemura and G. Sakaguchi. 1984. Purification and Some Properties of *Aeromonas hydrophila* Hemolysin. *Infect. Immun.* **46**:122-127.
7. Bagg, A. and J. B. Neilands. 1987. Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**:509-518.

8. Barghouti, S.; R. Young; M. O. J. Olson; J. E. L. Arceneaux; L. W. Clem and B. R. Byers. 1989. Amonabactin, A Novel tryptophan- or Phenylalanine-Containing Phenolate Siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacter.* **171**:1811-1816.
9. Bernheimer, A. W. and G. Avigad. 1974. Partial Characterization of Aerolysin, a lytic exotoxin from *A. hydrophila*. *Infect. Immun.* **9**:1016-1021.
10. Birnboim, H. C. and J. Doly. 1989. A Rapid Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**:1513-1523
11. Black, R. E. 1990. Epidemiology of Travelers Diarrhea and Relative Importance of Various Pathogens. *Rev. Infect. Dis.* **12** (supplement 1):73-78
12. Boulanger, R.; R. Lallier and G. Cousineau. 1977. Isolation of Enterotoxigenic *Aeromonas* from Fish. *Can. J. Microbiol.* **23**:1161-1164.
13. Buchanan, R. L. and S. A. Palumbo. 1985. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a Review. *J. Food Safety.* **7**:15-29.

14. Burke, V.; J. Robinson; R. J. Berry and M. Gracey. 1981. Detection of Enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a Suckling-Mouse Test. *J. Med. Microbiol.* 114:401-408.
15. Burke, V.; J. Robinson, H. M. Atkinson and M. Gracey. 1982. Biochemical Characteristics of Enterotoxigenic *Aeromonas* sp. *J. Clin. Microbiol.* 15:48-52.
16. Burke, V.; M. Gracey; J. Robinson; D. Peck; J. Beaman and C. Bundell. 1983. The Microbiology of Childhood Gastroenteritis: *Aeromonas* Species and Other Infective Agents. *J. Infect. Dis.* 148:68-74.
17. Burke, V.; J. Robinson; J. Beaman; M. Gracey; M. Lesmana; R. Rockhill; P. Echeverria and M. Janda. 1983. Correlation of Enterotoxicity with Biotype in *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 18:1196-1200.
18. Burke, V.; J. Robinson; M. Cooper; J. Beaman; K. Partridge; D. Peterson and M. Gracey. 1984. Biotyping and Virulence Factors In Clinical and Environmental Isolates of *Aeromonas* Species. *J. Clin. Microbiol.* 47:1146-1149.
19. Burke, V.; J. Robinson and M. Gracey. 1987. Enterotoxins of *Aeromonas* Species. *Experientia.* 43:368-369.

20. Burrel, R. Immunomodulation by Bacterial Endotoxin. 1990.  
Crit. Rev. Microbiol. 17:189-208
21. Carnahan, A. M.; L. Hammontree; L. Burgeois and S. W. Joseph.  
1990. Pyrazinamidase Activity As A Phenotypic Marker for  
Several *Aeromonas* spp. Isolated from Clinical Specimens. J.  
Clin. Microbiol. 28:391-392.
22. Chakraborty, T.; M. A. Montenegro; S. C. Sanyal; R. Helmuth;  
E. Bulling and K. N. Timmis. 1984. Cloning of Enterotoxin  
Gene from *Aeromonas hydrophila* Provides Conclusive Evidence  
of Production of a Cytotoxic Enterotoxin. Infect. Immun.  
46:435-441.
23. Chakraborty, T.; B. Huhle; H. Hof; H. Bergbauer and W. Goebel.  
1987 Marker Exchange Mutagenesis of the Aerolysin Determinant  
in *Aeromonas hydrophila* Demonstrates the Role of Aerolysin in  
*A. hydrophila*-Associated Systemic Infections.  
Infect. Immun. 55:2274-2280.
24. Chang, B. J. and S. M. Bolton. 1987. Plasmids and Resistance  
to Antimicrobial Agents in *Aeromonas sobria* and  
*Aeromonas hydrophila* Clinical Isolates. Antimicrob. Ag.  
Chem. 31:1281-1282.
25. Champsaur, H; A. Andreumont; D. Mathieu; E. Rottman and P.  
Auzepy. 1982. Cholera-like Illness Due to

*Aeromonas sobria*. J. Infect. Dis. 145:248-254.

26. Chopra, A. K.; C. W. Hoston and A. Kurosky. 1991. Genetic Variation In Related Cytolytic Toxins Produced by Different Species of *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Letters. 78:231-238.
27. Colwell, R. R.; M. T. MacDonell and J. de Ley. 1986. Proposal to Recognize The Family Aeromonadaceae fam. nov. Int. J. Syst. Bct 36:473-477.
28. Cumberbatch, N; M. J. Gurwith; C. Langston; R. B. Sack and J. L. Brunton. 1979. Cytotoxic Enterotoxin Produced by *Aeromonas hydrophila*: Relationship of Toxigenic Isolates To Diarrheal Disease. Infect. Immun. 23:829-837.
29. Daily, O. P.; S. W. Joseph; J. C. Coolbaugh; R. I. Walker; B. R. Merrell; D. M. Rollins; R. J. Seidler; R. R. Colwell and C. R. Lissner. 1981. Association of *Aeromonas sobria* with Human Infection. J. Clin. Microbiol. 13:769-777.
30. Davis, W. A.; J. G. Kane and V. F. Garagusi. 1978. Human *Aeromonas* Infections. A Review of the Literature and A Case Report of Endocarditis. Medicine. 57:267-276.
31. Denis, F. 1971. Contribution à l'étude des Bactéries hétérotrophes du milieu marin: Inventaire de 2700 Souches. Thèse de Sciences. Portier. France.

32. Deodhar, L.P.; K. Saraswathi and A. Varudkar. 1991. *Aeromonas* spp and Their Association with Human Diarrheal Disease. *J. Clin. Microbiol.* 29:853-856.
33. Dobrescu, L. 1978. Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a Case of Piglet Diarrhoea. *Vet. Med.* 25:713-718.
34. Dooley, J. S. G. and T. J. Trust. 1988. Surface Composition of *Aeromonas hydrophila* Strains Virulent for Fish: Identification of a Surface Array Protein. *J. Bacteriol.* 170:499-506.
35. Evans, D. J. Jr.; D. G. Evans and S. L. Gorbach. 1973. Production of Vascular Permeability Factor by Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Man. *Infect. Immun.* 8:725-730.
36. Evans, D. G.; D. J. Evans Jr. and W. Tjoa. 1977. Haemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect Immun.* 18:330-337.
37. Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th Edition. Elsevier Science Publishing Co.; Inc New York.

38. Figura, N.; L. Marri; S. Verdiani; C. Ceccherini and A. Barberi. 1986. Prevalence, Species Differentiation, and Toxicity of *Aeromonas* Strains in Cases of Childhood Gastroenteritis and in Controls. *J. Clin. Microbiol.* **23**:595-599.
39. Finegold, S. M. and E. J. Baron. 1986. *Diagnostic Microbiology*. 7a. Edição. p.874. The C. V. Mosby Company. St. Louis, Missouri USA.
40. Freer, J. H. 1990. Membrane Damage Caused by Bacterial Toxins: Recent Advances and New Challenges. *Natural Toxins*. pp.189-211. Oxford Publishers. London U. K.
41. Freij, B. J. 1987. Extraintestinal *Aeromonas* and *Plesiomonas* Infections of Humans. *Experientia*. **43**:359-360.
42. Gracey, M; V. Burke and J. Robinson. 1982. *Aeromonas* Associated Gastroenteritis. *The Lancet*. **2**:1304-1306.
43. Guinee, P. A. M.; J. Veltkamp and W. H. Jansen. 1977. Improved Minca Medium for the Detection of K99 antigen in Calf Enterotoxigenic Strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **15**:676-678.
44. Hill, K. R.; Caselitz, F. H. and Moody, L. M. 1954. A case of

acute, metastatic myositis caused by a new organism of the family *Pseudomonadaceae*. *West Ind. Med. J.* 3:9.

45. Hokama, A.; Y. Honma and N. Nakasone. 1990. Pili of *Aeromonas hydrophila* Strains as a Possible Colonization Factor. *Microbiol. Immunol.* 34:901-913.
46. Honma, Y. and N. Nakasone. 1990. Pili of *Aeromonas hydrophila*: Purification, Characterization and Biological Role. *Microbiol. Immunol.* 34:83-98
47. Janda, J. M.; R. Brenden and E. J. Bottone. 1984. Differential Susceptibility to Human Serum by *Aeromonas* spp. *Curr. Microbiol.* 11:325-328.
48. Janda, J. M. 1985. Biochemical and Exoenzymatic Properties of *Aeromonas* Species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 3:223-232
49. Janda, J. M.; L. S. Oshiro; S. L. Abott and P. S. Duffey. 1987. Virulence Markers of Mesophilic *Aeromonads*: Association of the Autoagglutination Phenomenon with Mouse Pathogenicity and the Presence of a Peripheral Cell-Associated Layer. *Infect. Immun.* 55:3070-3077.
50. Janda, J. M. and P. S. Duffey. 1988. Mesophilic *Aeromonads* in Human Disease: Current Taxonomy, Laboratory Identification and Infectious Disease Spectrum. *Rev. Infect. Dis.* 10:980-

987.

51. Jones, G. W. 1977. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In: Reissig, J. L. (ed.), Microbial Interactions, receptors and recognition, series B, vol. 3, pp 139-176. Chapman and Hall. London, U.K.
52. Kaper, J. B.; H. Lockman and R. R. Colwell. 1981. *Aeromonas hydrophila*: Ecology and Toxigenicity of Isolates from an Estuary. J. Appl. Bacteriol. 50:359-377.
53. Kandolo, K. and G. Wauters. 1985. Pyrazinamidase Activity in *Yersinia enterocolitica* and Related Organisms. J. Clin. Microbiol. 21:980-982.
54. Kay, B. A.; C. E. Guerrero and R. B. Sack. 1985. Media for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. J. Clin. Microbiol. 22:888-890.
55. Ketover, B. P.; L. S. Young and D. Armstrong. 1973. Septicemia Due to *Aeromonas hydrophila*: Clinical and Immunological Aspects J. Infect. Dis. 127:284-290.
56. Keusch, G. T. and S. T. Donta. 1975. Classification of Enterotoxins on the Base of Activity in Cell Culture. J. Infect Dis. 131:58-63.

57. Kokka, R. P.; N. A. Vedros and J. M. Janda. 1990. Electrophoretic Analysis of the Surface Components of Autoagglutinating Surface Array Protein-Positive and Surface Array Protein-Negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *J. Clin. Microbiol.* 28:2240-2247.
58. Kozaki, S.; K. Kato; A. Kurokawa; Y. Kamata; T. Asao and G. Sakaguchi. 1988. Production of Monoclonal Antibody Against *Aeromonas hydrophila* Haemolysin. *J. Med. Microbiol.* 25:187-190.
59. Kuijper, E; A. G. Steigerwalt; B. S. C. I. M. Schoenmakers; M. F. Peeters; H. C. Zanen and D. J. Brenner. 1989. Phenotypic Characterization and DNA Relatedness in Human Fecal Isolates of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 27:132-138.
60. Leclere, H. and R. Buttiaux. 1962. Fréquence des *Aeromonas* dans les eaux d'Alimentation. *Ann. Inst. Pasteur.* 103:97-100.
61. Lee, K. K. and A. E. Ellis. 1990. Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase Complexed with Lipopolysaccharide (LPS) is a Major Lethal Exotoxin and Cytolysin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and Enhances Toxicity of the Enzyme. *J. Bacteriol.*:172:5382-5393.

62. Lehmann, W. 1989. Zum Vorkommen von Adhärenzfaktoren bei **Enterobacteriaceae** aus der bakteriologischen Fleischuntersuchung und aus lebensmittelhygienischem Untersuchungsmaterial Arch. Exp. Vet. Med. 43:821-834.
63. Ljungh, A. and T. Kronevi. 1982. **Aeromonas hydrophila** Toxins. Intestinal Fluid Accumulation and Mucosal Injury in Animal Models. Toxicol. 20:397-407.
64. Ljungh, A.; P. Eneroth and T. Wadstrom. 1982. Cytotoxic Enterotoxin from **Aeromonas hydrophila**. Toxicol. 20:787-794.
65. Ljungh, A. and T. Wadstrom. 1982. **Aeromonas** Toxins. Pharmac. Ther. 15:339-334.
66. Ljungh, A. 1987. **Aeromonas** - Toxins and Other virulence Factors. Experientia. 43:367-368.
67. Lopes, J. F.; J. Quesada and A. Saied. 1968. Bacteremia and Osteomyelitis due to **Aeromonas hydrophila**: A Complication during the Treatment of Acute Leukemia. Am. J. Clin. Pathol. 50:587.
68. Massad, G.; J. E. L. Arceneaux and B. R. Byers. 1991. Acquisition of Iron from Host Sources by Mesophilic **Aeromonas** Species. J. Gen. Microbiol. 137:237-241

69. Martinez, J. L.; A. Delgado-Iribarren and F. Baquero, 1990. Mechanisms of Iron Acquisition and Bacterial Virulence. FEMS Microbiol. Rev. 75:45-56.
70. Namdari, H. and E. J. Bottone. 1988. Correlation of Suicide Phenomenon in *Aeromonas* Species with Virulence and Enteropathogenicity. J. Clin. Microbiol. 26:2615-2619.
71. Namdari, H. and E. J. Bottone. 1989. Suicide Phenomenon in Mesophilic Aeromonads as a Basis for Species Identification J. Clin. Microbiol. 27:788-789.
72. Namdari, H. and V. J. Cabelli. 1989. The Suicide Phenomenon in Motile Aeromonads. Appl. Env. Microbiol. 55:543-547.
73. Namdari, H. and E. J. Bottone. 1990. Microbiological and Clinical Evidence Supporting the Role of *Aeromonas caviae* as Enteric Pathogen. J. Clin. Microbiol. 28:837-840.
74. Namdari, H. and E. J. Bottone. 1990. Cytotoxin and Enterotoxin Production as Factors Delineating Enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. J. Clin. Microbiol. 28:1796-1798.
75. Namdari, H. and V. J. Cabelli. 1990. Glucose-Mediated Catabolite Repression of Tricarboxylic Acid Cycle as a Explanation for Increased Acetic Acid Production in Suicidal *Aeromonas* Strains. J. Bacteriol. 172:4721-4724.

76. Ong, K. R.; E. Sordillo and E. Frankel. 1991. Unusual Case of *Aeromonas hydrophila* Endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1056-1057.
77. Payne, S. M. 1988. Iron and Virulence in the Family *Enterobacteriaceae*. *Crit. Rev. Microbiol.* **16**:81-111.
78. Pazzaglia, G.; J. R. Escalante; R. B. Sack; C. Rocca and V. Benavides. 1990. Transient Intestinal Colonization by Multiple Phenotypes of *Aeromonas* species During the First Week of Life. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1842-1846.
79. Pazzaglia, G.; R. B. Sack; E. Salazar; A. Yi; E. Chea; R. Leon Barua; C. E. Guerrero and J. Palomino. 1991. High Frequency of Coinfecting Enteropathogens in *Aeromonas*-Associated Diarrhea of Hospitalized Peruvian Infants. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1151-1156
80. Pitarangsi, C.; P. Echeverria; R. Whitmire; C. Tirapat; S. Formai; G. Dammin and M. Tingtalapong. 1982. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: Prevalence Among Individuals With and Without Diarrhea in Thailand. *Infect. Imm.* **35**:666-673.
81. Popoff, M. and R. Lallier. 1984. Biochemical and Sorological

Characteristics of *Aeromonas*. Methods in Microbiology, vol. 16. pp 127-145. Academic Press. London U.K.

82. Popoff, M. Genus III. *Aeromonas*. Kluvier and van Niel 1936; in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1; Krieg, N. R. and Holt, J. G.; Eds. Williams & Wilkins, Baltimore; 1984, 545.
83. Price, N. C.; R. M. Banks; C. M. Campbell; D. Duncan and L. Stevens. 1990. The Specificity of the Major (70 Kda) Protease Secreted by *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 13:49-58.
- 84 Rizzo, E.; H. N. Tuchyia e C. H. Martines. 1983. Técnicas Básicas de Cultura Celular (Apostila). Instituto Butantã e Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, Brasil.
85. Roffley, P. E. and J. M. Pemberton. 1990. Cloning and Expression of an *Aeromonas hydrophila* Chitinase Gene in *Escherichia coli*. Curr. Microbiol. 21:329-337.
86. Sant'Anna, O; S. Massa; D. Monton; Y. Bouthillier; Jean-Claud Menel; O. M. Ibanez; R. Vassao; M. de franco; R. Bellinati; M. Siqueira and G. Biozzi. 1989. *Salmonella typhimurium* Infection in High and Low antibody Responder Mice: Inverse Correlation Between Antibody Responsiveness and Resistance to Infection. FEMS Microbiol. Immunol. 47:465-472.

94. Snower, D. P.; C. Ruef; A. P. Kuritza and S. C. Edberg. 1989. *Aeromonas hydrophila* Infection Associated With the Use of Medicinal Leeches. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1421-1422.
95. Stelma Jr., G. N.; C. H. Johnson and P. Spaulding. 1986. Evidence for Direct Involvement of Beta-hemolysin in *Aeromonas hydrophila* Enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.* **14**:71-77.
96. Toledo, M. R. F.; C. F. Fontes & L. R. Trabulsi. 1982. EPM - Modificação do Meio de Rugai & Araujo para a Realização do Teste de Produção de Gás a partir de Glicose, H<sub>2</sub>S, Urease e Triptofano-Desaminase. *Rev. Microbiol. (São Paulo, Brasil)*, **13**:309-315.
97. Toledo, M. R. F.; C. F. Fontes & L. R. Trabulsi. 1982. MILI - Um Meio para a Realização dos Testes de Motilidade, Indol e Lisina Descarboxilase. *Rev. Microbiol. (São Paulo, Brasil)*, **13**:309-315.
98. Van der Kooij, D.; A. Visser and W. A. M. Hijnen. 1980. Growth of *Aeromonas hydrophila* at low concentrations of substrates added to tap water. *Appl. Env. Microbiol.* **39**: 1198.

99. Von Graevenitz, A. 1987. Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Experientia*, 43:348-349.
100. Wadstrom, T.; A. Ljungh and B. Wretlind. 1976. Enterotoxin, Haemolysin and Cytotoxic Protein in *Aeromonas hydrophila* from Human Infections. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 84:112-114.
101. Wadstrom, T. 1987. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, Enteric Infection and Fecal Carriage. *Experientia*, 43:362-363
102. Wohlgenuth, K.; R. L. Pierce and C. A. Kenkude. 1972. Bovine Abortion Associated with *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160:1001-1002.
103. Wretlind, B.; R. Mollby and T. Wadstrom. 1971. Separation of Two Haemolysins from *A. hydrophila* by Isoelectric Focusing. *Infect. Immun.* 4:503-505.