

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e β -
lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas*
hydrophila provenientes de ambientes aquáticos**

Livia Carminato Balsalobre

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

**Área de Concentração: Serviços de
Saúde Pública**

**Orientadora: Prof^ª Dra. Associada
Maria Helena Matté**

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e β -
lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas
hydrophila* provenientes de ambientes aquáticos**

Livia Carminato Balsalobre

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

**Área de Concentração: Serviços de
Saúde Pública**

**Orientadora: Prof^ª Dra. Associada
Maria Helena Matté**

São Paulo

2009

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

*Dedico este trabalho a Deus,
que faz tudo possível em minha vida
e aos meus pais por terem cultivado o melhor em mim.*

Agradecimentos Especiais

A Deus, por me fazer entender que nessa vida tudo tem seu tempo, por me dar forças para levantar quando caí e por me iluminar nos momentos mais difíceis.

*A meu pai,
por ser meu exemplo de
responsabilidade, confiança e humildade.*

*A minha mãe,
por ser meu exemplo de
perfeccionismo, comprometimento e atitude.*

*Ao Renato,
por me amar sem obrigações,
me aceitar sem restrições,
e me colocar à frente de seus desejos e ambições.*

Agradecimentos

Ao meu irmão, por saber usar o Corel Draw...

A toda minha família, que torceu, vibrou e rezou pelo meu sucesso...

...A minha prima-irmã Dani, que me acompanhou e acompanha até hoje nesta jornada. Que me ouviu por horas a fio, mesmo sem entender do que eu estava falando...

...Aos meus primos Fábía e Fábio, que amo como irmãos.

...Ao Alexandre, Fernanda e Bianca, novos na família, mas dentro do meu coração.

...A todos os meus primos e primas, por todas as ocasiões em que me fizeram rir e chorar de alegria.

...Ao meu avô, que se orgulha de cada passo que dou.

...A minha avó, que estaria muito orgulhosa em me ver chegar aonde cheguei.

...Aos meus amigos Paulo, Diana, Juliana, Rafael Gutierrez, Tati, Rafa, Dani Escudeiro e Dani Pelissari, por viverem comigo cada momento de alegria e de tristeza durante o mestrado.

...Ao professor Glavur, por estar nos bastidores, resolvendo os problemas burocráticos...

...Ao Nilton Lincopan e à Professora Elsa, por todas as observações, considerações e ajuda durante a realização deste trabalho.

...À Doutora Maria Inês e à CETESB, que sempre em parceria com o laboratório, contribuíram para a nossa pesquisa.

...Ao laboratório ALERTA da UNIFESP, em especial à Professora Ana Gales e ao Danilo.

...Ao CNPq pela bolsa concedida no início do mestrado.

...À FAPESP pelo financiamento concedido até o presente momento.

...A minha orientadora, Maria Helena, que confiou, apostou e sempre exigiu o melhor de mim, me transformando na profissional que sou hoje.

... A Martha, pelas risadas, amizade e companheirismo...por contribuir com meu amadurecimento pessoal e profissional...e por me dar esperança nos momentos mais difíceis...

...A RONALDA, pelos conselhos, sinceridade e confiança. Por me mostrar que eu sou capaz e por me fazer entender que nem tudo é do jeito que queremos...mas que com muito trabalho podemos ter tudo aquilo que desejamos...

...A Milena, por toda cumplicidade, por toda paciência...pelas risadas e pelas lágrimas...por me ouvir, me respeitar e me dar bronca...por me ajudar a crescer, profissionalmente e pessoalmente, por acreditar em mim, por me incentivar e me ajudar sempre...como uma irmã mais velha...

...Aos meus filhinhos...Nina e Birdie, meus companheiros, meu refúgio,

...À Pituca, que viveu muito mais do que esperado, mas muito menos do que queríamos...

Muito Obrigada!

O dia mais belo: *hoje*
A coisa mais fácil: *errar*
O maior obstáculo: *o medo*
O maior erro: *o abandono*
A raiz de todos os males: *o egoísmo*
A distração mais bela: *o trabalho*
A pior derrota: *o desânimo*
Os melhores professores: *as crianças*
A primeira necessidade: *comunicar-se*
O que traz felicidade: *ser útil aos demais*
O pior defeito: *o mau humor*
A pessoa mais perigosa: *a mentirosa*
O pior sentimento: *o rancor*
O presente mais belo: *o perdão*
o mais imprescindível: *o lar*
A rota mais rápida: *o caminho certo*
A sensação mais agradável: *a paz interior*
A maior proteção efetiva: *o sorriso*
O maior remédio: *o otimismo*
A maior satisfação: *o dever cumprido*
A força mais potente do mundo: *a fé*
As pessoas mais necessárias: *os pais*
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

Balsalobre LC. **Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e β -lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* provenientes de ambientes aquáticos** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

O gênero *Aeromonas* está amplamente distribuído em ambientes aquáticos, e estudos recentes incluem o gênero no grupo de patógenos emergentes, devido à sua freqüente associação com infecções locais e sistêmicas em humanos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de pesquisar por meio da PCR e confirmar por meio de seqüenciamento, a ocorrência dos genes de virulência *act*, *alt* e *ast*, e resistência *cphA*, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, verificando também o perfil de resistência a partir de antibiogramas, e a ocorrência de plasmídios nas cepas estudadas. A partir dos resultados observou-se que das 100 cepas selecionadas inicialmente, 87 pertenciam às espécies *A. jandaei* (46) e *A. hydrophila* (41). Dentre as quais pôde-se observar a ocorrência de *act*, *alt* e *ast*, respectivamente em 70,7% (29), 97,6% (40) e 26,8% (11) das cepas de *A. hydrophila*, e em 4,4% (2), 0% (0) e 32,6% (15) nas cepas de *A. jandaei*. Os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{SHV} não foram encontrados em nenhuma cepa. O gene *cphA* foi encontrado em 97,6% (40) e 100% (46) das cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, respectivamente e o gene *bla*_{TEM} foi encontrado em 97,6% (40) das cepas de *A. hydrophila* e em 85% (39) das cepas de *A. jandaei*. Foi verificada a presença de plasmídio em 10/41 (24,4%) das cepas de *A. hydrophila* e em 16/46 (34,9%) das cepas de *A. jandaei*.

Palavras-chave: Saúde Pública, *Aeromonas*, resistência, antibiograma, virulência, PCR, cepas ambientais, amostras de água.

ABSTRACT

Balsalobre LC. **Enterotoxins and β -lactamases encoding genes investigation in *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* from aquatic environments.** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

The genus *Aeromonas* is widely distributed in aquatic environments, and recent studies include the genus in the emergent pathogens group, due to its frequent association with local and systemic human infections. This work was carried out aiming the investigation and sequencing virulence (*act*, *alt* and *ast*) and resistance (*cphA*, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}) genes, also verifying the resistance profile of the strains using antibiograms and the occurrence of plasmids. From the 100 strains analyzed in this study, 87 belonged to *A. jandaei* (46) and *A. hydrophila* (41) species. Out of which it was observed the occurrence of *act*, *alt* and *ast*, respectively in 70.7% (29), 97.6% (40) and 26.8% (11) of *A. hydrophila* strains, and in 4.4% (2), 0% (0) e 32.6% (15) of *A. jandaei* strains. The genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} were not found. *CphA* gene was found in 97.6% (40) and 100% (46) of *A. hydrophila* and *A. jandaei* strains, respectively and *bla*_{TEM} gene was found in 97.6% (40) of *A. hydrophila* strains and in 85% (39) of *A. jandaei* strains. Presence of plasmid was found in 10/41 (24.4%) of *A. hydrophila* strains and in 16/46 (34,9%) of *A. jandaei* strains.

Key-words: Public Health, *Aeromonas*, resistance, antibiogram, virulence, PCR, environmental strains, water samples.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 16 |
| 1.2 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Aeromonas</i> | 18 |
| 1.3 TAXONOMIA | 18 |
| 1.4 OCORRÊNCIA..... | 20 |
| 1.5 IDENTIFICAÇÃO | 25 |
| 1.6 PATOGENICIDADE | 30 |
| 1.6.1 Virulência | 32 |
| 1.6.2.1 Toxinas | 32 |
| 1.6.2.2 Grupo <i>act/aer</i> /β-hemolisina | 33 |
| 1.6.2.3 Enterotoxinas citotônicas | 34 |
| 1.6.2.4 Ocorrência da virulência no Gênero <i>Aeromonas</i> | 35 |
| 1.7 RESISTÊNCIA..... | 38 |
| 1.7.1 Antibióticos β-lactâmicos..... | 39 |
| 1.7.2 β-lactamases..... | 40 |
| 1.7.2.1 β-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) | 42 |
| 1.7.2.2 Metalo-β-lactamases (MBLs)..... | 45 |
| 1.7.2.3 AmpC β-lactamases..... | 48 |
| 1.7.3 Detecção e identificação das ESBLs, MBLs e AmpCs | 50 |
| 1.7.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO GÊNERO <i>Aeromonas</i> .. | 51 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 58 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 60 |
| 3.1 Objetivos específicos | 60 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 61 |
| 4.1 SELEÇÃO DAS CEPAS..... | 61 |
| 4.1.1 Reisolamento | 61 |
| 4.1.2 Identificação das Colônias | 62 |
| 4.2 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO E ESPÉCIES | 62 |
| 4.2.1 Extração de DNA Genômico | 62 |
| 4.2.2 Confirmação do Gênero <i>Aeromonas</i> por meio da PCR | 63 |
| 4.2.3 Confirmação molecular das espécies | 64 |

| | |
|---|------------|
| 4.3 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NA PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA | 65 |
| 4.3.1 Extração de DNA Total | 65 |
| 4.3.2 Extração Plasmidial | 66 |
| 4.3.3 Técnica para desenho de primers | 66 |
| 4.3.4 Pesquisa dos Genes de Virulência <i>act/aerA/hlyA</i> , <i>alt</i> e <i>ast</i> | 67 |
| 4.3.5 Determinação da Produção de Enzimas β -lactamases | 68 |
| 4.3.5.1 Pesquisa Fenotípica para Produção de MBL..... | 68 |
| 4.3.5.2 Pesquisa Fenotípica para Produção de AmpC..... | 69 |
| 4.3.5.3 Pesquisa Fenotípica para Produção de ESBL..... | 69 |
| 4.3.5.4 Identificação Molecular dos Genes de Resistência | 70 |
| 4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE | 72 |
| 4.5 VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS | 72 |
| 5. RESULTADOS..... | 74 |
| 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS..... | 74 |
| 5.2 OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA..... | 76 |
| 5.3 PRODUÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES E OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS..... | 79 |
| 5.4 PRODUÇÃO DE ENZIMA AmpC E OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS..... | 83 |
| 5.5 PRODUÇÃO DE ESBLs E OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS..... | 89 |
| 5.6 OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS..... | 91 |
| 6. DISCUSSÃO | 92 |
| 6.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES | 92 |
| 6.2 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA | 95 |
| 6.3 PESQUISA DE METALO- β -LACTAMASES | 100 |
| 6.4 PESQUISA DE ENZIMAS DO TIPO AmpC..... | 103 |
| 6.5 PRODUÇÃO DE ESBLs | 106 |
| 6.6 OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS | 109 |
| 7. CONCLUSÕES | 111 |
| 8. RECOMENDAÇÕES..... | 112 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 113 |
| ANEXOS | |
| Anexo 1 – Artigos aceitos para publicação | 135 |
| Anexo 2 – Participação em eventos..... | 162 |

| | |
|--|------------|
| Anexo 3 – Produção Técnica..... | 163 |
| CURRÍCULO LATTES | |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|-----------|
| Quadro 1. Esquema de classificação das β -lactamases..... | 41 |
| Quadro 2. Descrição dos iniciadores utilizados para confirmação do gênero <i>Aeromonas</i> spp..... | 63 |
| Quadro 3. Iniciadores para amplificação do gene 16S rDNA..... | 64 |
| Quadro 4. Perfis de restrição gerados a partir das enzimas selecionadas, com base no gene 16S rDNA (1503pb)..... | 65 |
| Quadro 5. Relação dos iniciadores selecionados para pesquisa dos genes de virulência..... | 67 |
| Quadro 6. Lista de iniciadores (5'- 3') empregados para a pesquisa de genes relacionados à resistência a carbapenems..... | 70 |
| Quadro 7. Lista de iniciadores (5'- 3') empregados para a pesquisa de genes e integron relacionados à resistência a cefalosporinas de 3 ^a geração e aztreonam..... | 70 |
| Quadro 8. Lista de iniciadores (5'- 3') empregados para a pesquisa de genes relacionados à resistência a cefamicinas..... | 71 |
| Quadro 9. Controles positivos para os genes de resistência..... | 72 |
| Quadro 10. Dados das seqüências analisadas no dendrograma acima. Número de acesso, organismo, nome do gene e localização. Foi selecionado uma variante genética de cada grupo de genes AmpC, exceto pelos grupos mais próximos de <i>cepH</i> , os quais foram todos incluídos para construção do dendrograma..... | 88 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentagem das cepas identificadas ao nível de espécie do gênero *Aeromonas* utilizando a técnica RFLP.....74
- Figura 2.** Gel de agarose 3% para visualização de fragmentos provenientes da restrição do gene 16S rDNA identificando duas cepas pertencentes à amostragem estudada ao nível de espécie.....75
- Figura 3.** Distribuição da ocorrência de combinações de genes na mesma cepa. Porcentagem calculada de acordo com o número de cepas positivas para cada espécie.....77
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos genes de virulência. Canaletas 1, 3 e 5, complexo *act/aer/hlyA* (EU849096), *alt* (EU849094) e *ast* (EU84909), respectivamente, de *A. hydrophila*. Canaletas 2, 4 e 6, complexo *act/aer/hlyA* (EU849097), *alt* (EU84909) e *ast*, respectivamente, de *A. jandaei*. Canaletas 7-9, *Escherichia coli* usada como controle negativo para os genes. M representa o marcador molecular: Gene ruler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas).....78
- Figura 5.** Detecção fenotípica da produção de metalo-β-lactamase por meio da técnica de discos combinados. Discos contendo 10µg de Imipenem (IMP) e 10µg de Meropenem (MER) dispostos de 20 a 30mm dos discos contendo IMP+EDTA e MER+EDTA. Um aumento ≥7mm na área ao redor do disco contendo antibiótico+inibidor foi considerado positivo para produção de MBL. Placa A: *Aeromonas hydrophila*. Placa B: *Aeromonas jandaei*.....79
- Figura 6.** Gel de agarose dos produtos de PCR dos genes de resistência. Canaletas 1-3 (EU833973, EU833974 e EU833975) e 4-6 (EU833980, EU833981, EU833982) contêm produtos do gene *cphA* de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*, respectivamente. Canaletas 7-9 representam os controles negativos, *Vibrio cholera*, *Vibrio fluvialis* e *Escherichia coli*, respectivamente. Canaletas 10, 11, 13, 14,16,17 contêm cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* negativas para *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{SPM-1}*, respectivamente. Canaletas 12, 15, 18 controles positivos para *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{SPM-1}*, respectivamente. M é para marcador de peso molecular: Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).....81
- Figura 7:** Alinhamento manual das seqüências obtidas a partir da amplificação do gene *cphA*. Sublinhado encontram-se as seqüências dos iniciadores desenhados neste estudo.....82

Figura 8. Detecção fenotípica da produção de AmpC utilizando a técnica de discos combinados. Disco contendo 30µg de cefoxitina (FOX) disposto de 20 a 30mm dos discos contendo FOX+BA. Um aumento ≥ 5 mm na área ao redor do disco contendo antibiótico+inibidor foi considerado positivo para produção de AmpC.....**83**

Figura 9. Gel de agarose demonstrando os fragmentos amplificados para o gene *cepH*, canaletas 1, 2 e 3; e fragmentos amplificados com iniciadores MOXM descritos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002), canaletas 4, 5 e 6. Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).....**85**

Figura 10. Alinhamento de aminoácidos referente aos genes cromossômicos de *Aeromonas* spp.(*cepH* e *cepS*), grupos *bla*_{MOX} e *bla*_{FOX} e às duas seqüências obtidas neste estudo, MHM-237 amplificada com iniciadores descritos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002) e MHM-243 obtida a partir dos iniciadores desenhados neste estudo.....**86**

Figura 11. Dendrograma de cefalosporinases AmpC plasmidiais e cromossômicas. O dendrograma foi calculado com o programa *Mega* versão 4 (TAMURA et al., 2007) a partir do método Neighbor-Joining, utilizando Bootstrap de 1000. A distância dos traços corresponde às diferenças relativas de aminoácidos. Informações sobre as seqüências estão disponíveis no quadro a seguir.....**87**

Figura 12. Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para o gene *bla*_{TEM}. Canaletas 1, 2 e 3 representando cepas de *A. hydrophila* (FJ767900, FJ767901 e FJ767902) e canaletas 4, 5 e 6 cepas de *A. jandaei* (FJ767907, FJ767908 e FJ767909). Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).....**89**

Figura 13. De acordo com as seqüências de aminoácidos, o dendrograma foi calculado com o programa *Mega* versão 4 (TAMURA et al., 2007). utilizando-se a análise de Neighbor-Joining, com Bootstrap de 1000. A distância entre os traços mostra as diferenças entre as seqüências. As variantes de *bla*_{TEM} foram escolhidas baseadas na similaridade com *bla*_{TEM-116}, (JEONG et al., 2004).....**90**

Figura 14. Canaletas 1 a 6 representam plasmídios de cepas de *A. jandaei* e canaletas 7 a 12 plasmídios de *A. hydrophila*. Em destaque pode-se observar o DNA genômico aproximadamente na altura de 23000pb. M – Lambda/DNA *Hind*III Marker (Fermentas).....**91**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos fatores de virulência isolados e em associação, baseados nas cepas positivas para pelo menos um gene.....**76**
- Tabela 2.** Caracterização de metalo- β -lactamases em isolados ambientais de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*.....**80**
- Tabela 3.** Caracterização de enzimas AmpC em isolados ambientais de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*.....**82**

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A literatura sugere que o gênero *Aeromonas*, um dia considerado patógeno oportunista em humanos imunocomprometidos, seja agora implicado como um agente etiológico em inúmeros casos clínicos envolvendo indivíduos imunocompetentes de todas as idades (MERINO et al., 1995; CHOPRA e HOUSTON, 1999; KINGOMBE et al., 1999; SCOGLIO et al., 2001). Os organismos pertencentes a este gênero são de origem aquática e podem causar doenças diarréicas e gastrointestinais mais freqüentemente do que geralmente é observado (JOSEPH e CARNAHAN, 2000). Estudos incluem o gênero *Aeromonas* no grupo de patógenos emergentes pela sua relação cada vez mais freqüente com infecções locais e sistêmicas em hospedeiros imunologicamente competentes (DEODHAR et al., 1991; PALÚ et al., 2006; SESHADRI et al., 2006).

Doenças infecciosas emergentes ou re-emergentes podem representar uma ameaça significativa para a Saúde Pública: 1) quando caracterizadas como doenças pandêmicas que causam alta morbidade e mortalidade; 2) quando caracterizadas como doenças causadas por patógenos resistentes a drogas e por patógenos que tenham causado surtos locais, os quais ambos atingem altos índices de mortalidade ou quando estas doenças infecciosas não possuem regimes terapêuticos preventivos (SCHRAG e WIENER, 1995; CONWAY e ROPER, 2000; DASZAK et al., 2001).

As infecções virais e bacterianas continuam a ser a principal causa de mortalidade no mundo. Após a descoberta dos antibióticos, as infecções microbianas deixaram de ser prioridades na pesquisa, porém continuaram a causar sérios problemas nos países em desenvolvimento. Portanto, doenças que no passado podiam ser controladas por antimicrobianos e por medidas de Saúde Pública, estão atualmente re-emergindo como ameaças, tanto em

países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (SCHRAG e WIENER, 1995).

Estudos moleculares evolucionários contribuem para o entendimento da epidemiologia de patógenos emergentes, em geral constituídos por vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários. Estes estudos podem ajudar no controle destes microrganismos presentes no ambiente e em alimentos, sendo estes considerados as principais fontes de transmissão para a população (KINGOMBE et al., 1999; CONWAY e ROPER, 2000).

O seqüenciamento de DNA e a PCR (Polymerase Chain Reaction) trouxeram um grande progresso na detecção e identificação dos agentes etiológicos causadores de doenças, e com o desenvolvimento destas e outras técnicas moleculares, tornou-se possível identificar genes que codificam fatores de virulência responsáveis pela patogenia do microrganismo e genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos. Isto resultou na microbiologia molecular, onde o papel e a função de genes específicos e os fatores que eles codificam na virulência e resistência bacteriana é objeto de investigação (SCHRAG e WIENER, 1995; WASSENAAR, 2001).

A grande prevalência de *Aeromonas* no ambiente é uma importante ameaça para a Saúde Pública, já que as infecções causadas por este gênero geralmente são adquiridas pelo consumo de água e alimento contaminados (CHOPRA e HOUSTON, 1999; SEN e RODGERS, 2004; HUDDLESTON et al., 2006; PALÚ et al., 2006). Em 1998, *Aeromonas hydrophila* foi adicionada à Lista de Contaminantes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-Environmental Protection Agency), estabelecendo como prioridade sua pesquisa em água potável, incluindo a avaliação da ocorrência em água pública potável sob o regulamento da UCMR (Unregulated Contaminant Monitoring Regulation) (EPA, 2006).

Apesar de avanços significativos nas tecnologias de tratamento de água, as doenças de veiculação hídrica são as maiores ameaças à Saúde Pública. É estimado que 4% das mortes e 5,7% das doenças do mundo todo são de origem hídrica (PRÜSS et al, 2002).

1.2 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO AEROMONAS

O primeiro caso de infecção em humanos relacionado ao gênero *Aeromonas* foi observado em 1954, em uma mulher na Jamaica e desde 1961, quando uma cepa de *Aeromonas* spp. foi isolada de fezes humanas, estes microrganismos vêm sendo identificados como agentes causadores de diarreia (VON GRAEVENITZ, 2007).

O gênero *Aeromonas* foi proposto por KLUYVER e VanNIEL em 1936, e compreende bacilos Gram-negativos, com comprimento de 1 a 3,5µm, apresentando formas que variam de cocóide a bacilar, retos ou curvos, com extremidades arredondadas, podendo ser móveis através de um flagelo polar ou imóveis. São anaeróbios facultativos, oxidase positiva e fermentadores de glicose. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0 e 5°C, a máxima entre 38 e 41°C e a ótima entre 22 e 28°C. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0 (MARTINEZ-MURCIA et al., 1992; MATTÉ et al., 1997; CHOPRA e HOUSTON, 1999; DEMARTA et al., 1999; DELAMARE et al., 2002; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

1.3 TAXONOMIA

As espécies do gênero *Aeromonas* foram inicialmente incluídas na Família *Vibrionaceae*, porém com a evolução dos estudos taxonômicos favorecidos pelos avanços tecnológicos e principalmente com o emprego de métodos moleculares, em 1986 COLWELL et al. propuseram a criação da Família *Aeromonadaceae*.

Nas últimas duas décadas, o número de espécies reconhecidas aumentou muito rapidamente, tornando a taxonomia do gênero complexa e marcada por confusão e controvérsia (SAAVEDRA et al., 2006).

Muitas tentativas que têm sido aplicadas para caracterizar o gênero *Aeromonas* tentam obter um quadro definitivo de identificação e apesar destes esforços, a identificação de algumas espécies é ainda um sério

problema, pois os testes bioquímicos convencionais não são confiáveis. Ainda existem discrepâncias entre os grupos fenotípicos e genotípicos; e à medida que novas espécies são descritas, novos testes fenotípicos são propostos para a classificação destes organismos gerando uma variedade de tabelas que foram criadas para acomodar cada uma das novas espécies (JANDA et al., 1996; MATTÉ 1996; BORRELL et al., 1997; JOSEPH e CARNAHAN, 2000; ABBOTT et al., 2003; ESTEVE et al., 2003; HARF-MONTEIL et al., 2004; MATTÉ, 2004; MIÑANA-GALBIS et al., 2004; FIGUERAS et al., 2005a; SEN, 2005).

Este gênero pode ser dividido em dois grupos, um que inclui as formas imóveis, composto pela *A. salmonicida* com 4 subespécies (*salmonicida*, *achromogenes*, *mausocida* e *smithia*), responsáveis por doenças em peixes, e um segundo grupo, que é composto por formas móveis, que podem apresentar patogenicidade ao homem, no qual atualmente encontram-se 16 espécies: *Aeromonas hydrophila*, *A. media*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, *A. eucrenophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. veronii* bv sobria, *A. veronii* bv veronii, *A. schubertii*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. popoffii*, *A. culicicola*, *A. simiae* e *A. molluscorum* (CARNAHAN e JOSEPH, 1991; CARNAHAN et al., 1991; JANDA e ABBOTT, 1998; HUYS et al., 2003; HARF-MONTEIL et al., 2004; MIÑANA-GALBIS et al., 2004; ORMEN et al., 2005).

Além dessas espécies, existem outras em processo de validação. MATTÉ et al. (1999), descreveram outra espécie denominada *Aeromonas arequipensis*; recentemente SAHA e CHAKRABARTI (2006) descreveram uma nova espécie denominada *Aeromonas sharmana*, isolada de uma fonte termal na Índia; e MIÑANA-GALBIS et al. (2007) descreveram uma espécie isolada de moluscos bivalves, denominada *Aeromonas bivalvium*.

MARTÍNEZ-MURCIA et al. (2007) publicaram uma nota, afirmando que uma nova espécie isolada por SAHA e CHAKRABARTI (2006) e denominada *Aeromonas sharmana* não pertencia ao gênero *Aeromonas*. Os autores afirmaram que os testes utilizados para determinação do gênero e a classificação da nova espécie não foram suficientes para determinar seu

posicionamento taxonômico. Na nota publicada, os autores indicam a ausência da utilização da técnica de Hibridização DNA-DNA, a qual tem grande importância na classificação de gêneros e espécies. MARTÍNEZ-MURCIA et al. (2007) realizaram análises filogenéticas do gene 16S rRNA da cepa denominada *Aeromonas sharmans* e juntamente com os testes fenotípicos previamente descritos puderam concluir que a nova espécie isolada determinada por SAHA e CHAKRABARTI (2006) na verdade não pertence ao gênero *Aeromonas*. Assim pode-se concluir que os testes utilizados para classificação do gênero e espécies de *Aeromonas* geram controvérsias e tornam a taxonomia complexa e de difícil interpretação.

Em 2008, *Aeromonas aquariorum* (MARTINEZ-MURCIA et al., 2008) e *Aeromonas tecta* (DEMARTA et al., 2008) foram determinadas novas espécies pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Estes estudos mostram que a identificação das espécies do gênero gradativamente vai se tornando mais complexa, já que novas espécies são cada vez mais freqüentemente descobertas e incluídas nas chaves de identificação destes microrganismos.

O gênero *Aeromonas* está entre os muitos gêneros de relevância médica que se tornou um problema crescente para médicos e microbiologistas devido às mudanças nas relações filogenéticas, a recente evolução da taxonomia e o papel controverso do microrganismo na causa de doenças humanas. As freqüentes e turbulentas mudanças na taxonomia de *Aeromonas* spp. levaram muitos microbiologistas a desistirem de identificar o microrganismo (JANDA e ABBOTT, 1998).

Portanto, devido ao crescimento da importância do gênero *Aeromonas* em infecções clínicas e as limitações dos métodos existentes, há a necessidade da elaboração de um sistema que possa identificar inequivocadamente esses organismos (CHACÓN et al., 2002).

1.4 OCORRÊNCIA

As espécies do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídas em ambientes de água doce, salgada e salobra, compondo a microbiota de

peixes e anfíbios (JOSEPH e CARNAHAN, 2000; HUYS et al., 2003; NAYAK et al., 2004). Já foram isoladas de amostras clínicas, ambientais e de alimentos, e são organismos que têm sido relacionados com doenças em peixes e humanos e sua ampla distribuição deve-se à sua alta capacidade de multiplicação, independente de um hospedeiro (KIROV, 1993; KINGOMBE et al., 1999).

A investigação epidemiológica de *Aeromonas* spp. associada à diarreia na América do Norte, Europa e Sudeste da Ásia demonstra considerável variação geográfica quanto à frequência do isolamento e a intensidade da doença relacionada ao gênero (NOJIMOTO et al., 1997).

Diversos trabalhos relatam o isolamento do gênero *Aeromonas* em amostras de água, destinadas ao abastecimento público, com e sem tratamento prévio (RAZZOLINI, 1998; IVANOVA et al., 2001; IVANOVA et al., 2002; EMEKDAS et al., 2006). Alimentos também são considerados uma fonte de contaminação por bactérias do gênero *Aeromonas* por meio de água contaminada, irrigação ou contato direto com o ambiente de origem (CANSIAN et al., 2001; MCMAHON et al., 2001; PIANETTI et al., 2004; VALLY et al., 2004; SEN, 2005; SAAVEDRA et al., 2006).

PICARD e GOULLET (1987) relataram a presença de *Aeromonas* spp. em sistemas de fornecimento de água em hospitais; e BOMO et al. (2004) relataram a presença de *Aeromonas* spp. em biofilmes formados em água potável e reciclada que resistem à desinfecção. HIRANSUTHIKUL et al. (2005) na Tailândia determinaram que o gênero *Aeromonas* foi a maior causa de infecções de pele e mucosa entre os sobreviventes do tsunami em 2004

BRANDI et al. (1999) realizou um estudo na Itália, com o objetivo de verificar a sobrevivência de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* em água mineral, água do mar e água da torneira. De acordo com os resultados foi verificado que as três espécies têm maior tempo de sobrevivência em água mineral, seguido de água da torneira e do mar, respectivamente.

No período de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2001, em Barcelona (Espanha) VILA et al. (2003) determinaram a prevalência de *Aeromonas*

spp. associadas com a diarreia dos viajantes. Os resultados mostraram a presença de 18 (2%) isolados de *Aeromonas* spp. em 863 pacientes. Dentre as espécies isoladas estavam *A. veronii* bv sobria (9), *A. caviae* (7), *A. jandaei* (1) e *A. hydrophila* (1).

CLARK e CHENOWETH (2003), nos Estados Unidos, revisaram os registros de casos de um laboratório hospitalar com o objetivo de identificar pacientes com infecção no sistema hepatobiliar ou pancreático causado por *Aeromonas* spp. Os resultados indicaram a ocorrência de 41 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas* em 39 pacientes.

TOKAJIAN e HASHWA (2004), no Líbano, detectaram a presença de *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. jandaei* em um poço subterrâneo de uma rede de distribuição de água clorada.

No período de Junho de 1993 a Dezembro de 1994, na Venezuela, LONGA et al. (2005) estudaram amostras fecais de 397 pacientes com diarreia aguda e 121 pacientes sem diarreia. O gênero *Aeromonas* foi identificado em 11,83% dos pacientes com diarreia aguda e em 5,78% em pacientes sem diarreia.

Em Guadalajara (Espanha), TENA et al. (2007) revisaram de forma retrospectiva os históricos clínicos de pacientes admitidos no hospital durante o período de 1º de Janeiro de 1990 a 31 de Dezembro de 2005, dos quais foram isolados *Aeromonas* spp. de amostras de fezes. Durante o período de estudo os autores diagnosticaram 38 casos de infecções extraintestinais causadas por *Aeromonas* spp. sendo *A. hydrophila* a espécie mais isolada.

CABRERA et al. (2007) estudaram 95 cepas de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e oxidase positiva isolados de diversas amostras clínicas de diferentes laboratórios provenientes de diversos hospitais em Cuba, e que foram isolados entre Janeiro de 2002 e Dezembro de 2003. Das cepas estudadas 89,4% pertenciam ao gênero *Aeromonas*, 7,3% ao gênero *Vibrio* e 3,3% ao gênero *Plesiomonas*. As espécies de *Aeromonas* identificadas com maior frequência foram: *A. jandaei*, *A. veronii* bv sobria, *A. hydrophila* e *A. caviae*, respectivamente.

A relação da presença de espécies do gênero *Aeromonas* com a causa de doenças é pouco documentada no Brasil (NOJIMOTO et al., 1997), assim como (a) relatos sobre a ocorrência das espécies do gênero; (b) estudos moleculares para vigilância da presença de genes de virulência e resistência no gênero; (c) e esclarecimento do risco que esses microrganismos representam para a Saúde Pública.

Em um estudo realizado em São Paulo, 536 cepas de *Aeromonas* spp. foram isoladas de 64 amostras de água de superfície e 24 amostras de sedimento da Represa de Guarapiranga em São Paulo, das quais 10,3% foram determinadas *A. hydrophila*, 11% *A. caviae*, 11% *A. sobria*, 69,6% *A. jandaei* e 2,6% atípicas (MATTÉ, 1995).

NOJIMOTO et al. (1997), em Goiás, analisaram 163 amostras de fezes de crianças com idade abaixo de 5 anos, sendo 91 de fezes diarréicas e 72 de fezes não diarréicas. Dentre as fezes diarréicas foram isoladas 21,9% de *Aeromonas* spp., enquanto que das fezes não diarréicas nenhuma cepa do gênero *Aeromonas* foi isolada.

FALCÃO et al. (1998) pesquisou, dentre outros microrganismos, a incidência de *Aeromonas* spp. em água fresca de diversas origens em Araraquara. Hemolisina, citotoxina, enterotoxina termo-lábil e termo-estável foram avaliados em cultura de células Vero e presença de plasmídio. De 100 amostras de água coletadas foram isoladas: 3 *A. hydrophila*, 1 *A. sobria*, 1 *A. veronii* bv *sobria* e 1 *A. media*. Todas as espécies de *Aeromonas* foram positivas para o teste de β -hemólise, *A. media* e *A. veronii* bv *sobria* foram positivas para atividade citotóxica. Todas as cepas foram negativas para presença de plasmídio e enterotoxinas Ast e Alt.

GIBOTTI et al. (2000) determinaram a incidência de *Aeromonas* spp. e outros microrganismos em amostras de água do Rio Cambé, no Paraná. Doze *A. hydrophila*, 12 *A. caviae* e 8 *A. veronii* bv *sobria* foram isoladas das amostras. Todas as cepas apresentaram hemólise em Agar sangue. O teste em camundongos neonatos para a detecção de acúmulo e fluído foi positivo para 2 *A. hydrophila*, 1 *A. caviae* e 2 *A. veronii* bv *sobria*, no entanto o aquecimento a 56°C por 10 min. inibiu o efeito de acúmulo de fluído. A partir

dos resultados apresentados os autores puderam concluir que as cepas de *Aeromonas* spp. isoladas possuíam potencial patogênico.

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

BIZANI e BRANDELLI (2001), em Porto Alegre, determinaram a ocorrência do gênero *Aeromonas* em 21,4% de 70 amostras de água de abatedor bovino analisadas. Pelo fato da presença destes microrganismos em alimentos já ter sido descrita na literatura os autores puderam concluir que o sistema de abastecimento de água deste abatedouro possa ser uma fonte de contaminação a carcaças e alimentos derivados. Além destes resultados, todas as cepas apresentaram resistência a antibióticos β -lactâmicos.

PEREIRA et al. (2004) em Niterói (RJ) determinaram em 86 amostras (*in natura* e pré-cozidas) de mexilhões a presença de *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides*. Em 86% das 380 cepas isoladas de ambos os organismos. A determinação bioquímica de *Aeromonas* spp. possibilitou a identificação de 372 cepas pertencentes a nove espécies do gênero: *A. media*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv *veronii*, *A. jandaei*, *A. veronii* bv *sobria* e *Aeromonas* sp. Neste estudo os autores observaram que as cepas continuaram presentes nos mexilhões mesmo após o processo de pré-cozão. CABRAL (2005) isolou 273 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, em amostras de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, dentre as espécies encontradas 22 cepas foram classificadas em *A. hydrophila*.

HOFER et al. (2006) pesquisaram um surto de diarreia em São Bento da Una (Pernambuco), que envolveu 2170 casos. Foram realizadas 582 coproculturas das quais 145 (25%) revelaram a presença de somente um patógeno bacteriano, destacando os 114 (19,5%) casos com a participação

de *Aeromonas* spp. A faixa etária mais afetada situou-se entre 1 e 5 anos de idade e os autores observaram apenas um caso com a presença de mais de um patógeno, contrariando uma participação múltipla de agentes por indivíduo.

EVANGELISTA-BARRETO et al. (2006) pesquisaram a presença de *Aeromonas* spp. em 30 amostras de ostras do rio Cocó em Fortaleza (Ceará/Brasil) e determinaram a presença do gênero em 50% (15) das amostras, das quais *A. media* (37%) foi a espécie mais freqüentemente isolada.

RAZZOLINI et al. (2008) analisaram 200 amostras de água provenientes de reservatórios domésticos e públicos, e fontes potáveis, localizadas em São Paulo (Brasil). A presença do gênero *Aeromonas* foi detectada em 12 (6%) das amostras coletadas, sendo que as 96 cepas isoladas foram identificadas como *A. caviae* (41,7%), *A. hydrophila* (15,7%), *A. allosacharophila* (10,4%), *A. schubertii* (1%) e *Aeromonas* spp. (31,2%). Os resultados revelaram que 70% de *A. caviae*, 66,7% de *A. hydrophila*, 80% de *A. allosacharophila* e 46,6% de *Aeromonas* spp. apresentaram atividade hemolítica. Para a habilidade de produzir toxinas: 17,5% de *A. caviae*, 73,3% de *A. hydrophila*, 60% de *A. allosacharophila*, 100% de *A. schubertii* e 33,3% de *Aeromonas* spp, foram positivas. Os resultados mostraram o potencial patogênico do gênero, indicando que a presença destes patógenos em sistemas de água é uma preocupação para a Saúde Pública.

1.5 IDENTIFICAÇÃO

Uma das maiores dificuldades na identificação do gênero *Aeromonas* ao nível de espécie é o contínuo número de espécies novas reconhecidas e a falta de tabelas fenotípicas que distingam os grupos. Apesar dos testes fenotípicos usados serem os mesmos em estudos diferentes, as condições de crescimento, composição do meio, inoculação e incubação variam consideravelmente, afetando os resultados (ABBOTT et al., 2003) e a

identificação inadequada do gênero dificulta os estudos epidemiológicos e a determinação da virulência e resistência nas espécies do gênero (ORMEN et al., 2005)

Inicialmente a diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* era limitada à classificação entre psicrófilas não móveis e mesofílicas móveis (JANDA e ABBOTT, 1990). Posteriormente a nomenclatura foi ampliada para incluir a diferenciação entre as espécies mesofílicas *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* e as espécies psicrófilas *A. salmonicida*. Com relação às técnicas de biologia molecular como a Hibridização DNA-DNA, o gênero foi dividido em diferentes genomoespécies ou grupos de hibridização (FIGUERAS et al., 2000). Os testes bioquímicos convencionais nem sempre correspondem aos resultados adquiridos por métodos moleculares e isso é particularmente evidente em isolados ambientais (ABBOTT et al., 1992, SOLER et al., 2003; ORMEN et al., 2005).

Muitos estudos de Hibridização DNA-DNA contribuíram para a elucidação da relação entre as espécies de *Aeromonas*, no entanto discrepâncias foram relatadas entre diferentes grupos de dados utilizando as mesmas cepas, ou seja, a técnica não é reprodutível, dificultando a comparação de resultados entre laboratórios (ESTEVE et al., 1995, HUYS et al., 1996, MARTÍNEZ-MURCIA, 1999). Análises filogenéticas baseadas no seqüenciamento do gene 16S rRNA indicaram que as diferenças entre as espécies é muito pequena e apesar desta técnica se correlacionar bem com a técnica de Hibridização DNA-DNA, dificuldades foram encontradas na separação das espécies muito similares (MARTÍNEZ-MURCIA, 1999).

Sondas de DNA e a técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) baseadas no diagnóstico de regiões do gene 16S rRNA ajudaram a identificar o gênero *Aeromonas* ao nível de espécie, no entanto nenhum estudo mostra um quadro de identificação para todas as espécies do gênero (BORRELL et al., 1997, LEE et al., 2002, SOLER et al., 2002).

Recentemente análises de seqüenciamento baseadas no gene *gyrB* (que codifica a subunidade B da girase DNA, um tipo II de DNA topoisomerase) e no gene *rpoD* (que codifica um dos fatores sigma que

conferem especificidade ao promotor na iniciação da transcrição na RNA polimerase) vêm sendo estudadas e demonstraram ser eficientes na inferência da filogenia do gênero *Aeromonas* (SAAVEDRA et al., 2006).

O seqüenciamento do gene 16S rDNA é umas das técnicas mais precisas para determinação das relações filogenéticas entre bactérias. Em 1992, MARTINEZ-MURCIA et al., determinaram a seqüência do gene 16S rDNA em 20 cepas do gênero *Aeromonas* incluindo 10 espécies representadas pelas cepas tipo, com o objetivo de esclarecer as relações intergênicas entre as espécies. Com este estudo, os autores concluíram que esta é uma ferramenta precisa e confiável, que permite a comparação das seqüências, diferenciando as cepas ao nível de espécie.

BORRELL et al. (1997) desenvolveram uma metodologia baseada na restrição do gene 16S rDNA (RFLP) para identificação de espécies do gênero *Aeromonas*. Esta técnica foi aplicada em cepas-tipo de 11 espécies de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. veronii* bv. sobria, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* e *A. allosaccharophila*) e 76 isolados clínicos caracterizados como *Aeromonas* spp. Este estudo conduziu a diferenciação das cepas ao nível de espécie por meio de testes bioquímicos e posteriormente com a aplicação da técnica RFLP. Os resultados mostraram poucas discrepâncias entre os testes fenotípicos e o perfil de restrição, o qual demonstrou ser uma técnica precisa e rápida para a identificação das espécies estudadas.

Alguns estudos propõem a identificação de apenas algumas espécies do gênero, como é o caso da pesquisa realizada por KHAN e CERNIGLIA (1997), que descreveram iniciadores espécie-específicos para a amplificação de fragmentos de DNA das espécies *A. caviae* e *A. trota*. Com este estudo concluíram que esta técnica é mais rápida e precisa, quando comparada a outras técnicas moleculares como Hibridização DNA-DNA.

Em outro estudo foi possível a identificação de uma região específica dentro do gene 16S rDNA para a espécie *A. popoffii*, permitindo a diferenciação desta espécie das outras espécies do gênero. Esta técnica baseou-se no seqüenciamento do gene 16S rDNA das cepas envolvidas e

posterior comparação das seqüências das *Aeromonas* spp. e *A. popoffii* (DEMARTA et al., 1999).

FIGUERAS et al. (2000) propuseram uma chave de identificação baseada no perfil de restrição de enzimas, o qual possibilitou a identificação das espécies *A. popoffii* e *A. bestiarum*, as quais não foram inclusas no estudo de BORRELL et al. (1997). Mais uma vez, esta técnica apresentou sensibilidade, rapidez e precisão, sendo útil na identificação destas espécies. Apesar das vantagens apresentadas, o uso das enzimas propostas define em algumas espécies, um perfil de restrição de até 6 bandas de baixo peso molecular, o que pode dificultar a interpretação dos resultados.

Em um estudo KANNAN et al. (2001) propuseram a identificação do gênero *Aeromonas* por meio da amplificação do gene aerolisina em cepas isoladas de pacientes com diarreia. A identificação de espécies foi realizada a partir de testes bioquímicos descritos pelo grupo de testes denominado AEROKEY II. Das 602 amostras fecais, os autores observaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. pela presença do gene *Aer* detectado pela PCR em 68 das amostras, já os métodos fenotípicos identificaram o gênero *Aeromonas* em 64 amostras. Dentre as espécies encontradas 38 (59,3%) eram *A. hydrophila*, 12 (18,7%) *A. caviae*, 7 (10,9%) *A. veronii*, 3 (4,6%) *A. schubertii*, 2 (3,1%) *A. jandaei* e 2 (3,1%) *A. trota*. Os autores concluíram que a técnica de PCR é melhor para detecção direta, pois pôde identificar o gênero em amostras com cepas não-cultiváveis.

CHACÓN et al. (2002) desenvolveram uma sonda baseada no gene GCAT (glycine C-acetyltransferase) do gênero *Aeromonas*. A técnica propôs um ensaio de hibridização de colônia com a sonda GCAT, e os resultados mostraram que a sonda hibridizou com todas as espécies de *Aeromonas* testadas (total=16), e não ocorreu hibridização com as enterobactérias patogênicas avaliadas (total=20). Os autores concluíram que esta técnica pode identificar inequivocadamente o gênero *Aeromonas* em meio de isolamento com crescimento de 36h.

Em 2003, SOLER et al. realizaram um estudo comparando três métodos de tipagem para identificação de 26 cepas de *A. popoffii* isoladas de diferentes regiões. As técnicas RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) da região intergênica do 16S-23S, ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e REP (Repetitive Extragenic Palindromic) foram avaliadas. Quando os resultados foram interpretados separadamente mostraram que o método ERIC possui maior poder discriminatório e quando as técnicas foram interpretadas conjuntamente, a melhor combinação foi do método ERIC com REP, pois as cepas mostraram uma tendência a se separar em grupos de acordo com a origem geográfica.

SZCZUKA e KAZNOWSKI (2004) realizaram a tipagem de *Aeromonas* spp. por meio das técnicas RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Os autores concluíram que as técnicas RAPD e ERIC-PCR tem o mesmo poder discriminatório, enquanto que REP-PCR foi menos efetivo na diferenciação dos isolados de *Aeromonas* spp.

Em 2005, CHU e LU, descreveram uma técnica de PCR multiplex para detecção de *Aeromonas hydrophila* potencialmente patogênicas. Os iniciadores espécie-específicos utilizados na PCR foram desenvolvidos baseados em uma região específica do 16S rDNA de *A. hydrophila* e os outros iniciadores usados estavam associados com a virulência e foram denominados *aero*. A reação de PCR multiplex funcionou para amplificação apenas dos genes presentes em *A. hydrophila*, resultando em uma ferramenta útil, rápida e confiável, que permite a identificação de *A. hydrophila* e o gene da aerolisina.

ORMEN et al. (2005) compararam os resultados obtidos por meio de testes fenotípicos com o método molecular de identificação RFLP em 171 cepas de *Aeromonas* spp. provenientes de amostras clínicas e ambientais, e obtiveram um total de 96% de discrepância entre os dois métodos. Dentre as espécies isoladas encontravam-se *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. caviae* e *A.*

veronii em maior proporção nas amostras clínicas e *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. sobria*, *A. media*, and *A. encheleia* encontradas nas amostras ambientais. A grande discrepância entre resultados das técnicas fenotípica e molecular destaca o fato de que os testes bioquímicos não são efetivos para diferenciar as espécies do gênero *Aeromonas*.

SEN (2005) desenvolveu uma técnica de PCR para identificação de espécies do gênero *Aeromonas*, utilizando iniciadores de três genes de *Aeromonas* spp.: lipase, elastase e *gyrB*, combinados com iniciadores espécie-específicos de *A. veronii*, *A. popoffii*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e o gene hidrolipase específico para *A. hydrophila*. Os iniciadores foram combinados em uma única reação de PCR (multiplex) e permitiam a amplificação de um único padrão para cada espécie. Os resultados corroboraram com quase todos os testes fenotípicos previamente realizados para identificação das cepas, sendo que de 63 isolados, 59 apresentaram o padrão em concordância com a identificação fenotípica.

Em 2007, GHATAK et al. propuseram a identificação de espécies do gênero *Aeromonas* de importância médica por meio da restrição do gene 16S rDNA. Entre as 53 cepas isoladas de diferentes fontes, estavam as espécies *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. caviae*, *A. veronii* bv. *sobria* e *A. veronii* bv. *veronii*. As enzimas utilizadas para restrição foram *BstSNI*, *Mbol* e *PvuII*. Os resultados indicaram que a técnica de RFLP aplicada com as enzimas propostas é capaz de identificar as espécies médicas importantes, esses resultados ainda corroboraram com os testes fenotípicos realizados previamente para identificação das cepas.

1.6 PATOGENICIDADE

Apesar da descoberta do gênero *Aeromonas* ter sido feita há aproximadamente 100 anos, foi somente nas últimas 3 décadas que o seu papel na causa de doenças humanas foi provado (JANDA e ABBOTT, 1998).

As formas móveis do gênero *Aeromonas* estão relacionadas com diversos tipos de doenças no homem sendo a principal delas a diarreia

autolimitante, além de formas severas, similares à diarreia colérica. Em menor proporção aparecem meningites, síndrome urêmica hemolítica, doença no trato respiratório, septicemia, infecções de pele, ouvido e olhos, em indivíduos portadores de fatores predisponentes como cortes, perfurações, abrasões, cirurgias e distúrbios imunológicos e com prévia exposição a ambientes contaminados, principalmente água e alimentos (FRIELING et al., 1989; STECIW e COLODNY, 1994; MATTÉ, 1996; MARTINS et al., 2002; ABDULLAH et al., 2003; BORCHARDT et al., 2003; CHACÓN et al., 2003; MATTÉ, 2004; XIA et al., 2004; ORMEN et al., 2005; NAWAZ et al., 2006).

As espécies *A. veronii* bv. sobria, *A. caviae*, e *A. hydrophila* são as mais comumente relacionadas a infecções intestinais humanas, somando mais de 85% dos isolados clínicos do gênero, mas *A. jandaei*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. schubertii* e *A. trota* também foram isoladas de infecções humanas (JANDA e ABBOTT, 1998; SEN e RODGERS, 2004; AGUILERA-ARREOLA et al., 2005; ROBERTS et al., 2006; WU et al., 2006).

Baseado num estudo de patogenicidade de cepas tipo de 12 espécies do gênero *Aeromonas*, as espécies mais patogênicas (medidas pela dose letal de 50% em camundongos Swiss-Webster) foram determinadas *A. jandaei* ATCC 49568^T seguida de *A. hydrophila* ATCC 7966^T (JANDA e KOKKA, 1991).

A maioria dos laboratórios não preconiza a pesquisa por *Aeromonas* spp. em cultura de fezes rotineiramente, por isso a incidência de diarreia associada a *Aeromonas* spp. pode ser subestimada. As evidências que apóiam a associação de *Aeromonas* spp. como causa de diarreia incluem: 1. média maior de indivíduos carreadores sintomáticos do que assintomáticos; 2. a ausência de outros patógenos entéricos na maioria dos pacientes sintomáticos; 3. a identificação de enterotoxinas em cepas de *Aeromonas* spp.; 4. melhora no quadro de diarreia com o uso de antibióticos efetivos contra *Aeromonas* spp. e piora do quadro clínico com o uso de drogas não efetivas contra o organismo (KELLY et al., 1993).

1.6.1 Virulência

A virulência das espécies do gênero *Aeromonas* é multifatorial e não está completamente elucidada. Fatores de virulência como enterotoxinas, proteases, hemolisinas, lipases, adesinas, enzimas hidrolíticas, proteínas de membrana externa, S-layer, flagelo e pili foram descritos. Sendo que muitos destes fatores foram identificados em cepas isoladas de água (KÜHN et al., 1997; SCHUBERT, 2000; SOLER et al., 2002).

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

1.6.2.1 Toxinas

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

As enterotoxinas citotônicas Ast e Alt e a citotoxina codificada pelo gene *act* desempenham um papel importante na patogênese do gênero *Aeromonas*. Em estudos realizados com modelo animal, foi concluído que as enterotoxinas: citotóxica (produzida pelo gene *act*), citotônica termo-lábil (produzida pelo gene *alt*) e citotônica termo-estável (produzida pelo gene *ast*), contribuem para a gastroenterite causada por *A. hydrophila* (SHA et al., 2002; WANG et. al., 2003)

Entretanto, entre as diversas toxinas produzidas pelo gênero, o grupo aerolisina-hemolisina, o qual inclui a toxina Act, ainda continua a ser o principal e mais importante na patogenia desses microrganismos (CHOPRA

et. al., 1996; XU et. al., 1998; ALBERT et al., 2000; SHA et. al., 2002; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

1.6.2.2 Grupo *act/aer*/β-hemolisina

A classificação dos fatores de virulência Act, aerolisina e β-hemolisina é confusa e contraditória. Alguns autores determinam os três fatores como produtos de um mesmo gene outros afirmam que os genes são diferentes e os produtos a partir destes genes também não são os mesmos. Devido à falta de congruência na classificação, função e ação destes genes, neste trabalho eles serão classificados dentro de um grupo denominado grupo *act/aer*/β-hemolisina.

As hemolisinas mais importantes produzida por *Aeromonas* spp. são denominadas aerolisina e enterotoxina citotóxica (Act), também conhecida por toxina de Asao e enterotoxina citolítica que produz uma reação cruzada com a toxina colérica. O gene que codifica a aerolisina é denominada *aerA* o que codifica a enterotoxina citotóxica é chamado de *act* (EPA, 2006).

SINGH e SANYAL (1992) relataram que cepas de origem ambiental poderiam ser induzidas a produzir aerolisina por meio de passagens repetidas (de uma a 3 vezes) em alça ligada de coelho. Este resultado demonstra que cepas ambientais são potencialmente enterotoxigênicas quando passam de um hospedeiro a outro.

Aerolisina e a enterotoxina citotóxica são proteínas de 50 a 52 kDa, termo lábil, possuem atividades citotóxicas, enterotóxicas, hemolíticas e letalidade (demonstrada em camundongo) (ROSE et al.; 1989; XU et al., 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999). Pertencem a uma classe de citotoxinas formadoras de poro, que rompem a membrana celular, causando a lise da célula (CHOPRA et al., 1993; EPA 2006; VON GRAEVENITZ, 2007). Ambas as enterotoxinas são secretadas na forma de um precursor inativo denominado, o qual se torna ativo quando ocorre a clivagem do peptídeo C-terminal (PARKER et al., 1996; NELSON et al., 1997; ABRAMI et al., 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; SEN e RODGERS, 2005; EPA, 2006).

Estudos indicam que a atividade hemolítica de *A. hydrophila* está relacionada com os genes de β -hemolisina (*hlyA*), aerolisina e enterotoxina citotóxica (WANG et al., 2003).

Outras espécies de *Aeromonas* possuem atividade hemolítica pela presença de genes denominados *hlyA* e *aerA*, e é possível que a mesma cepa possua mais de um destes genes (HIRONO e AOKI, 1991; HEUZENROEDER et al., 1999; SEN e RODGERS, 2004).

A enterotoxina Act está relacionada à aerolisina que possui aproximadamente 90% de homologia com a aerolisina de *A. bestiarum* isolada de peixe, mas em contraste, quando Act é comparada com aerolisina de *A. trola* isolada de fezes, apresenta 75% de homologia. A enterotoxina citotóxica (Act) também é referida por alguns autores como β -hemolisina e/ou aerolisina (HOWARD e BUKCLEY, 1986; HOWARD et al., 1987; ALTWEGG e GEISS, 1989; CHOPRA et al., 1993, CHOPRA et al., 1999).

KINGOMBE et al. (1999) alinhou o gene *act* com outras hemolisinas de *A. hydrophila*, inclusive com aerolisinas de *Aeromonas* spp., e encontrou uma grande porcentagem de similaridade (73,1% a 96,9%). Os autores desenharam um par de iniciadores que permitiu a amplificação dos genes *act*, *hlyA* e *aerA*.

1.6.2.3 Enterotoxinas Citotônicas

Ambas enterotoxinas Alt e Ast consistem numa única cadeia polipeptídica. Alt tem 44 kDa de tamanho, termo-lábil a 56°C, causa elevação de AMP cíclico (cAMP) e prostaglandina em ovário de hamster Chinês (CHO) e células epiteliais intestinais, resultando numa resposta secretória de fluido em alça ligada de rato. Ast consiste numa enterotoxina de 44 kDa, termo-estável a 56°C, causa secreção de fluido em intestino de ratos pequenos (CHOPRA et al., 1994; CHOPRA et al. 1996; ALBERT et al., 2000; EPA, 2006)

1.6.2.4 Virulência no Gênero *Aeromonas*

GRANUM et al. (1998) analisaram 31 isolados de *Aeromonas* spp. de amostras de alimento e de água na Noruega. As cepas isoladas foram testadas para a presença de fatores de virulência como citotoxinas, por meio da PCR e cultura de tecidos; enterotoxinas, por meio da PCR e habilidade de invasão por meio de células Caco-2. Dentre os isolados cinco espécies foram identificadas: *A. caviae* (9), *A. hydrophila* (15), *A. schubertii* (3), *A. trota* (3) e *A. veronii* bv *veronii* (1). A produção de citotoxina secretada foi observada em 23 das cepas, indicando possível atividade enterotóxica. Quatorze das cepas apresentaram positividade na reação de PCR para o gene aerolisina. Quatro cepas foram negativas na PCR, mas são hemolíticas e citotóxicas, enquanto que duas cepas apresentaram características citotóxicas, mas não hemolíticas, e negativas na PCR do gene aerolisina.

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

ALBERT et al. (2000) estudaram a distribuição dos genes *alt*, *ast* e *act* em 115 cepas de *Aeromonas* spp, provenientes de crianças com diarreia, em 27 cepas de pacientes do grupo controle e em 120 cepas de *Aeromonas* spp. escolhidas ao acaso e provenientes da água de superfície de diferentes pontos em Bangladesh. A pesquisa dos genes foi realizada por meio da técnica de hibridização, utilizando sondas de DNA específicas para os alvos. A distribuição do gene *alt* foi similar nas três fontes de isolamento, o gene *ast* foi mais encontrado em amostras ambientais e a ocorrência de *alt* e *ast* simultaneamente foi maior nos isolados clínicos alertando para o fato de que a combinação destes genes pode estar relacionada à causa de diarreia em crianças.

ORMEN et al. (2001) examinou a presença de *Aeromonas* spp. em 77 amostras de água na Noruega, provenientes de 33 fontes diferentes. Setenta e três amostras foram positivas para a presença de *Aeromonas* spp., as quais totalizaram 445 isolados, que foram testados para a presença do gene

aerolisina por meio da PCR. Os resultados mostraram que 79% das cepas eram carreadoras do gene. Uma seleção de 142 cepas foram testadas em cultura de células Vero e 83% mostraram toxicidade.

SCOGLIO et al. (2001) estudaram a presença de fatores de virulência em frutos do mar, sendo que das 31 cepas isoladas, 7 foram identificadas como *A. hydrophila*, 11 como *A. caviae* e 13 como espécies de *Vibrio*. Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas cultura de células Vero, para teste de aderência células Hep2 e para presença de hemólise foi utilizado Ágar-sangue. Todas as cepas de *A. hydrophila* mostraram ser β -hemolíticas e produzir citotoxinas. Cepas de *A. caviae* mostraram padrões agregativo e de difusão.

Em 2002, GONZÁLEZ-SERRANO et al., pesquisaram genes de virulência em *A. hydrophila* (11) e *A. veronii* bv *veronii* (3) de amostras de água de peixe fresco e uma cepa de *A. hydrophila* proveniente de paciente com diarreia. Os genes hemolíticos *aerA* e *hlyA* foram pesquisados por meio da PCR. Os autores verificaram a presença dos genes *aerA* e *hlyA*, respectivamente, em 11 e 9 cepas de *A. hydrophila*. Na cepa clínica houve a ocorrência dos dois genes, enquanto que nas cepas de *A. veronii* bv *veronii* não houve a presença de nenhum dos genes.

ORMEN et al. (2003) verificou a distribuição de genes de virulência aerolisina/hemolisina em *Aeromonas* spp. isoladas de amostras ambientais e clínicas. Um total de 234 cepas foi estudado. As cepas foram identificadas pelo método de RFLP. Os genes foram pesquisados por meio da PCR e os resultados indicaram que 72,6% do total de cepas continham o gene aerolisina/hemolisina, sendo que a frequência foi maior em cepas clínicas dosque ambientais.

Em 2004, SEN e RODGERS isolaram 205 cepas de *Aeromonas* spp. provenientes de água tratada. Estas cepas foram pesquisadas para a presença dos genes de virulência elastase (*ahyB*), lipase (*pla/lip/lipH3/alp-1*), flagelo A e B (*flaA* e *flaB*), as enterotoxinas Act, Alt e Ast. Os genes de

virulência estavam presentes em 88% (*ahyB*), 88% (*lip*), 59% (*fla*), 43% (*alt*), 70% (*act*) e 30% (*ast*), indicando que o gênero *Aeromonas* encontrado em água potável podem carrear uma série de genes relacionados à virulência.

WU et al. (2006) isolaram 116 cepas de *Aeromonas* spp. de amostras clínicas, as quais foram submetidas às técnicas de PCR para pesquisa dos genes de virulência, AHCYTOEN – enterotoxina citotóxica, *aerA* – aerolisina, *hlyA* – hemolisina, *alt* – enterotoxina termo-lábil, *ast* – enterotoxina termo-estável. Os resultados mostraram a presença do gene AHCYTOEN em 63% das cepas, *aerA* em 31%, *hlyA* em 40%, *ast* em 13% e *alt* em 44%, sendo que os genes *hlyA* e *ast* estavam presentes apenas no complexo de *A. hydrophila*. Neste estudo foi concluído que as espécies de *Aeromonas* estavam relacionadas em 62% com as evidências clínicas de infecção.

AWAN et al. (2006) pesquisaram potenciais determinantes de virulência como produção de citotoxinas, toxina citotônica e hemolisina em 30 cepas de *Aeromonas* spp. ambientais e isoladas de alimento. Os testes para virulência foram realizados a partir da cultura de células Vero. De acordo com os resultados pôde-se observar que produziram citotoxina 6 de 7 cepas *A. hydrophila*, 6 de 13 cepas de *A. caviae* e 6 de 7 cepas de *A. veronii* bv sobria. Hemolisina foi produzida por todas as cepas de *A. hydrophila* e *A. veronii* bv sobria, e 50% das cepas de *A. caviae*. *A. schubertii*, *A. jandaei* e *A. trota* também produziram citotoxina e hemolisina.

Com base nos resultados de um estudo SEN e LYE (2007) concluíram que somente as cepas de *Aeromonas* spp. com a presença de algum dos genes codificadores do flagelo (*flaA*, *flaB*, *flaG* ou *lafA*) possuem a capacidade de causar danos a camundongos imunossuprimidos. O estudo foi realizado a partir da pesquisa dos genes por meio da PCR, seguida de inoculação em camundongos imunossuprimidos. As cepas eram provenientes de amostras de água, indicando que as mesmas possuem potencial patogênico em hospedeiros imunossuprimidos.

1.7 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A evolução da resistência bacteriana em humanos, em animais e no ambiente é o resultado da interação entre a exposição a antibióticos, a seleção de organismos carreadores de genes de resistência e a transmissão desses genes entre as bactérias (TALAVERA et al., 2006).

O extenso uso de antibióticos na medicina humana e veterinária, aquicultura e agricultura está contribuindo para a seleção e disseminação da resistência em microrganismos. Nas últimas décadas, a emergência da resistência entre bactérias patogênicas em ambientes clínicos se tornou um grande problema no mundo todo (FRENCH, 2005; HENRIQUES et al., 2006b).

As bactérias possuem um número considerável de mecanismos para resistência a antimicrobianos. Estes mecanismos podem ser mutações cromossômicas, expressão de resistência cromossômica latente, ou aquisição de novo material genético através da incorporação de DNA (transformação), por meio de bacteriófagos (transdução) e por conjugação plasmidial. A informação codificada neste material genético permite que a bactéria desenvolva resistência por meio de três mecanismos principais: produção de uma enzima que inativa ou destrói o antibiótico; alteração do sítio alvo do antibiótico impedindo a ação da droga; ou a prevenção do acesso do antibiótico ao sítio alvo (SHLAES et al., 1997).

A presença de antibióticos no ambiente e outros poluentes contribuem para a permanência e disseminação de genes relacionados à resistência bacteriana (KRUSE e SORUM, 1994; GOÑI-URRIZA et al., 2000; HUDDLESTON et al., 2006) e o fato de determinantes genéticos terem sido encontrados em organismos de comunidades de ambientes naturais, aumentam a preocupação sobre o risco que estes reservatórios de resistência podem constituir para a saúde humana e ecológica (CHEE-SANFORD et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003; HENRIQUES et al., 2006b).

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

Os integrons são caracterizados pela presença do gene *intl* que codifica uma integrase, um sítio de recombinação (*attI*) e um promotor forte. Muitos estudiosos acreditam que os integrons são os mecanismos mais importantes de disseminação da resistência em bactérias Gram-negativas (PLOY et al., 2000; WHITE et al., 2001; HENRIQUES et al., 2006b).

1.7.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os compostos β -lactâmicos são formados por um anel β -lactâmico central, o qual é responsável pela ação destes antibióticos na parede celular bacteriana, por meio de sua ligação às enzimas envolvidas na síntese da parede celular (DROPA, 2006). Transpeptidases bacterianas ou PBPs (penicilin-binding protein) são enzimas essenciais na formação da parede celular bacteriana. Os β -lactâmicos são muito similares à extremidade D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo ligado ao ácido *N*-acetilmurâmico que compõem a parede celular bacteriana, sendo assim as PBPs erroneamente utilizam a penicilina como substrato para a síntese da parede e a transpeptidase é acilada. A PBP acilada fica incapaz de hidrolizar o β -lactâmico e de formar a parede celular ocorrendo a autólise (BABIC 2006).

Os grupos de β -lactâmicos diferem uns dos outros pela presença de anéis adicionais (anel de tiazolidona para penicilinas, núcleo cefem para cefalosporinas, nenhum anel para monobactâmicos e um anel de dupla estrutura para os carbapenens) (SAMAHA-KFOURY e ARAJ, 2003). Os principais grupos de β -lactâmicos incluem as penicilinas, cefalosporinas,

monobactâmicos e carbapenens (SAMAHA-KFOURY e ARAJ, 2003; DROPA, 2006).

As bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, e apesar da produção de β -lactamases ser o mecanismo mais importante, existem outros como 1) alterações na permeabilidade da membrana em bacilos Gram-negativos, dificultando a penetração de substâncias hidrofílicas como os antibióticos β -lactâmicos; 2) modificações no sítio ativo implicam na perda de afinidade dos β -lactâmicos pelas PBPs, diminuindo sua atividade, este mecanismo existe principalmente em cocos Gram-positivos; 3) expressão de bombas de eliminação ativa que consiste num mecanismo de expulsão, a qual depende de bombas de efluxo, que bombeiam o antibiótico para o exterior da célula bacteriana (MARÍN e GUDIOL, 2003).

Os antibióticos β -lactâmicos são os agentes mais utilizados no tratamento das doenças infecciosas. As bactérias adquiriram diversos mecanismos de resistência a esses antibióticos e a produção de enzimas β -lactamases é o principal deles (KUROSAKI et al., 2002; DROPA, 2006; HENRIQUES et al., 2006b).

1.7.2 β -lactamases

As β -lactamases possuem um mecanismo de ação que cliva o anel β -lactâmico, hidrolisando o antibiótico e impedindo que o mesmo se ligue efetivamente às PBPs, permitindo assim a síntese da parede celular bacteriana (STÜRENBURG e MACK, 2003).

Essas enzimas são comumente classificadas de acordo com dois esquemas gerais: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (**Quadro 1**). O esquema de AMBLER et al. (1991) divide as β -lactamases em quatro classes A, B, C e D. Esta classificação é baseada na homologia das proteínas (similaridade de aminoácidos). As enzimas pertencentes às classes A, C e D possuem um resíduo serina no centro ativo, enquanto que as β -lactamases de classe B

requerem cátion de metais divalentes como zinco no centro ativo, e são chamadas de metalo- β -lactamases (KUROSAKI et al., 2002; BABIC et al., 2006). A classificação de BUSH et al. (1995) separa as β -lactamases de acordo com similaridades funcionais (perfil de substrato e inibidor).

Os genes que codificam as β -lactamases podem estar localizados no DNA cromossômico da bactéria, em plasmídios, em transposons, ou integrons. A localização de genes de β -lactamases (*bla*) indicam se os mesmos são produzidos de maneira indutiva ou constitutiva (WELDHAGEN, 2004; BABIC et al., 2006). Muitas bactérias Gram-negativas possuem naturalmente β -lactamases mediadas pelo cromossomo, e que provavelmente ajudam a bactéria quando há competição com outras bactérias naturalmente produtoras de β -lactâmicos (GHUYSEN, 1991; WALSH et al., 1997; KO et al., 1998; BRADFORD, 2001; TURNER, 2005).

Quadro 1. Esquema de classificação das β -lactamases.

| Classificação | Enzima | Gene |
|-----------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Ambler et al. (1995)</i> | | |
| Classe A | penicilinase | TEM, SHV, PC1, CTX-M, SME-1, KPC |
| Classe B | Metallo- β -lactamases (zinco) | IMP-1, VIM-1, Ccr A |
| Classe C | cefalosporinas | AmpC, CMY-2, ACT-1 |
| Classe D | oxacilinas | OXA-1 |
| Bush et al. (1991) | | |
| Grupo 1 | cefalosporinas | AmpC, CMY-2, ACT-1, MIR-1 |
| Grupo 2 | Resistentes ao clavulanato | |
| | Suscetíveis ao clavulanato | |
| 2a | Penicilinase | PC1 de <i>S. aureus</i> |
| 2b | Penicilinase de amplo espectro | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | ESBLs | SHV-2, TEM-10, CTX-M |
| 2br | Resistentes a inibidores | TEM, IRT TEM-30, TEM-31 |
| 2c | Hidrolisa a carbenecilina | PSE-1 |
| 2d | Hidrolisa a oxacilina | OXA-10, OXA-1 |
| 2e | Cefalosporinas inibidas por clavulanato | FEC-1 |
| 2f | Carbapenemases | KPC-1, SME-1 |
| | Metallo- β -lactamases | |
| Grupo 3 | Resistente a clavulanato | IMP-1, VIM-1, Ccr A |
| | Hidrolisa imipenem | |
| | Suscetível a EDTA | |
| Grupo 4 | diversos | |

Fonte: BABIC et al., 2006

Existem duas maneiras principais de impedir a ação hidrolítica das β -lactamases. A primeira estratégia é descobrir inibidores dessas enzimas. Atualmente existem três inibidores usados na clínica médica: ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, os quais possuem grande afinidade pelas β -lactamases, são pouco hidrolisados pelas enzimas e ocupam o sítio ativo por maior tempo (BABIC et al., 2006).

A outra maneira de impedir a ação das β -lactamases é achar um antibiótico β -lactâmico com maior afinidade pela proteína receptora de penicilina, o qual seja pouco, ou não seja hidrolisado pelas β -lactamases (BOSSO, 2005; BABIC et al., 2006).

A resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases são um problema crescente que ameaça a utilidade de drogas essenciais para os tratamentos clínicos. O surgimento de novas enzimas β -lactamases, especialmente entre bactérias Gram-negativas, é a preocupação mais importante atualmente. Mais de 340 enzimas β -lactamases foram detectadas até hoje, incluindo a classe A emergente derivada das SHVs e TEMs, que deu origem às ESBLs (Beta-lactamases de Espectro Estendido), a partir de mutações causadas pela pressão do uso e antibióticos (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003; SHAH et al., 2004).

Na América Latina as ESBLs são mais encontradas em membros da família *Enterobacteriaceae* (LINCOPAN et al., 2006).

1.7.2.1 β -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)

Não existe um consenso que define com precisão as ESBLs. O parâmetro comumente utilizado define as ESBLs como β -lactamases capazes de conferir às bactérias resistência a penicilina, primeira-, segunda- e terceira-geração de cefalosporinas e aztreonam (monobactâmico), mas não hidrolisam cefamicinas nem carbapenens (SHANMUGANATHAN et al., 2004; PATERSON e BONOMO, 2005; TURNER, 2005). Atualmente, os

carbapenems são as drogas utilizadas para o tratamento de infecções causadas por ESBL (SHAH et al., 2004).

As ESBLs geralmente são mediadas por plasmídios que podem ser transferidos de cepa para cepa ou ainda entre espécies diferentes, porém podem estar localizadas no cromossomo bacteriano. A maioria das ESBLs se desenvolveu a partir de mutações genéticas de β -lactamases nativas como TEM-1, TEM-2 e SHV-1. A detecção dessas enzimas em rotina laboratorial é difícil, os testes mais comumente utilizados são o “Double-disk method” (método do disco duplo), E-tests para ESBL, método dos discos combinados e os cartões VITEK (SHAH et al., 2004; SHANMUGANATHAN et al., 2004; PFALLER e SEGRETI, 2006).

- Tipos de ESBLs

A maioria das ESBLs derivam das enzimas TEM, SHV e CTX-M. Atualmente existem aproximadamente 161 tipos da enzima TEM, 105 tipos da enzima SHV, e 69 tipos da enzima CTX-M, e aparentemente novas enzimas são descritas toda semana (TURNER, 2005; BUSH e JACOBY, 2008). Durante os últimos 20 anos, muitos antibióticos β -lactâmicos foram desenvolvidos para serem resistentes à ação hidrolítica das β -lactamases, no entanto isto resultou na associação desses agentes com a emergência de cepas produtoras de enzimas SHV-2 e TEM-2, que surgiram a partir de mutações e conferiram as bactérias resistência aos β -lactâmicos, posteriormente dando origem às ESBLs (CAO et al. 2002; SHAH et al., 2004; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2004; DROPA, 2006).

Outros tipos de ESBL, tão importantes quanto as SHV e TEM, são OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO, GES e BES (STÜRENBURG e MACK, 2003; SHAH et al., 2004; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2004; DROPA, 2006; PHILIPPON e ARLET, 2006).

- β -lactamases do tipo TEM

A primeira β -lactamase mediada por plasmídeo foi descrita no começo de 1960, e denominada TEM-1. Esta enzima foi originalmente encontrada em uma única cepa de *E. coli* e em poucos anos, esta e outras β -lactamases se disseminaram pelo mundo todo (BRADFORD, 2001).

A enzima TEM-1 é a mais comum encontrada em bactérias Gram-negativas e acima de 90% de cepas de *E. coli* são resistentes à ampicilina devido à presença dessa enzima, que também confere resistência à penicilina em outras espécies bacterianas (BRADFORD, 2001; SHAH et al., 2004). As ESBLs do tipo TEM também foram descritas em bactérias Gram-negativas não pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Esta enzima está localizada no transposon Tn3, que é pouco seletivo, permitindo uma série de transposições e rearranjos envolvendo seu gene codificador *bla*_{TEM-1} (STÜRENBURG e MACK, 2003; DROPA, 2006).

A enzima TEM-3 originalmente descrita em 1989, foi o primeiro tipo de enzima TEM a apresentar o fenótipo ESBL (SOUGAKOFF et al., 1988). As β -lactamases mais comuns mediadas por plasmídios são as TEM-1, descritas em aproximadamente 75-80% das cepas resistentes (SHAH et al., 2004).

- β -lactamases do tipo SHV

As β -lactamases do tipo SHV são mais comumente encontradas em *K. pneumoniae*, sendo responsáveis por até 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídeo nesta espécie, podendo também ser encontrada no cromossomo onde o gene *bla*_{SHV-1} e seus derivados estão integrados. (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG e MACK, 2003; SHAH et al., 2004; PFALLER e SEGRETI, 2006).

A primeira ESBL do tipo SHV foi descrita em 1985 em *K. pneumoniae*, e foi designada SHV-2. Atualmente a maioria dos tipos de SHV possui o fenótipo ESBL (BRADFORD, 2001; TURNER, 2005).

- β -lactamases do tipo CTX-M

Conforme os estudos descreviam a disseminação da ESBLs pelo mundo, outras ESBLs que não pertenciam aos tipos TEM e SHV também começaram a ser descritas (TURNER, 2005).

Um novo grupo de ESBL mediada por plasmídio surgiu, e foi denominada CTX-M, destacando sua grande atividade contra cefotaxima e em menor grau ceftazidima. Atualmente existem aproximadamente 69 tipos de CTX-M, que foram detectadas em cepas bacterianas isoladas de muitas partes do mundo, incluindo Europa, América do Sul e Japão. As enzimas CTX-M não são geneticamente muito parecidas com as enzimas TEM e SHV, apresentando apenas 40% de identidade com as mesmas (BRADFORD, 2001; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2004; SHAH et al., 2004; TURNER, 2005).

1.7.2.2 Metallo- β -lactamases (MBLs)

A ocorrência de carbapenemases em bactérias vem aumentando consideravelmente. Este grupo diverso de β -lactamases são ativas não somente contra as oximino-cefalosporinas e cefamicinas, mas também contra os carbapenens (NORDMANN e POIREL, 2002; TURNER, 2005).

As metallo- β -lactamases são caracterizadas por ocorrer naturalmente em diversas bactérias Gram-negativas como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella gormanii* e outras (NORDMANN e POIREL, 2002). Sendo assim, os determinantes genéticos das MBLs são geralmente carregados por cassetes móveis de genes inseridos em plasmídios ou integrons de ocorrência intrínseca em cromossomos (YAN et al., 2001).

Existem quatro grupos principais de enzimas metalo- β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenens, sendo eles IMP, VIM, SPM, GIM, SIM (LEE et al., 2005) e AIM (GUPTA, 2008). Outros grupos incluem algumas variações do grupo OXA e poucas enzimas mediadas por plasmídios e pertencentes à classe A designadas KPC (carbapenamase de *K. pneumoniae*) também têm a propriedade de hidrolisar carbapenens. Essas enzimas são resistentes ao ácido clavulânico e suscetíveis à inibição por quelantes divalentes como o EDTA (NORDMANN e POIREL, 2002).

As MBLs diferem das outras β -lactamases por utilizarem o zinco ao invés da serina em seu sítio ativo, possibilitando assim a capacidade de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenens, como imipenem e meropenem, excluindo-se apenas os monobactâmicos (KUROSAKI et al., 2003; HORSFALL et al., 2007).

Existem três subclasses de MBLs, B1, B2 e B3, as quais diferem em sua dependência de zinco. A subclasse B1 inclui enzimas como VIM-2, IMP-1 e VIM-4, que podem agregar um ou dois íons de zinco em seu sítio ativo para obtenção de atividade total. A subclasse B2, inclui enzimas como CphA de *Aeromonas hydrophila*, a qual é ativa com um íon de zinco, e a subclasse B3 inclui enzimas como FEZ-1 e L1, que contêm dois íons de zinco (ZERVOSEN et al., 2001; HORSFALL et al., 2007).

- Metalo- β -lactamases dos tipos IMP e VIM

A primeira MBL do tipo IMP foi descrita no Japão em 1988. Desde então variações desta enzima têm sido relatadas. Atualmente MBLs do tipo IMP vêm sendo detectadas em todo o mundo, Europa, América do Sul, Austrália, Canadá e recentemente nos EUA. No entanto, a frequência com que essa enzima é detectada pode estar subestimada, pois diversos isolados clínicos carregam o gene *bla*_{IMP} "críptico" que demonstra baixo nível de resistência a carbapenens em teste de suscetibilidade como o MIC (PITOUT et al., 2005; NEUWIRTH et al., 2007). Atualmente existem 23

variações da enzima IMP e 18 da enzima VIM descritas em todo o mundo (KOUUDA et al., 2007; BUSH e JACOBY, 2008).

O gene *bla*_{IMP} é codificado principalmente por plasmídios, mas pode estar localizado no cromossomo, enquanto que o gene *bla*_{VIM} até o ano de 2000 foi identificado no cromossomo e já em 2001 o gene *bla*_{VIM-2} foi detectado em integron inserido em plasmídio de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Ambos os genes são codificados pela região variável de integrons classe 1, permitindo sua rápida disseminação (CORNAGLIA et al., 2000; POIREL et al., 2000; PALLECCHI et al., 2001; YAMAGUCHI et al., 2005).

Ambas as enzimas IMP e VIM são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, oxacefamicinas e carbapenens, mas não hidrolisam monobactâmicos, sendo que sua atividade é dependente de zinco e inibida por EDTA (LIVERMORE, 1997; POIREL et al., 2000).

- Metallo- β -lactamases do tipo SPM

Em 2002, TOLEMAN et al. descreveram uma nova metallo- β -lactamase detectada em *Pseudomonas aeruginosa* no Brasil, denominada SPM-1, a qual também depende da presença de zinco em seu sítio ativo e mostrou ter mais identidade com a enzima IMP-1, embora seja significativamente distinta de ambos os tipos de enzimas VIM e IMP. Os estudos também mostraram que apesar de não ter sido encontrado nenhum tipo de elemento transmissível adjacente ao gene *spm-1*, o mesmo aparenta ser móvel. Também foi observado que a enzima SPM-1 tem a capacidade de hidrolisar todas as classes de antibióticos β -lactâmicos.

Após seu primeiro relato diversos trabalhos relataram a presença do gene *bla*_{SPM-1} em *P. aeruginosa*, em diferentes regiões do Brasil, demonstrando a disseminação epidêmica do gene. Esta disseminação não foi apenas relatada no Brasil, mas em outros países, particularmente na América Latina (GALES et al., 2003; ZAVASCKI et al., 2005; MARTINS et al., 2007).

- Metallo- β -lactamases do tipo CphA

A MBL CphA pertence à subclasse B2 e possui um limitado perfil de substrato, hidrolisando quase que exclusivamente carbapenems, mostrando pouca atividade contra penicilinas e cefalosporinas, tornando-se uma das carbapenemases mais ativas conhecidas. A CphA é produzida por diversas espécies do gênero *Aeromonas* e é ativada somente pela forma monozinco. Em contraste com as β -lactamases com sítio ativo serina, as metallo- β -lactamases não possuem um inibidor clínico disponível (ROSSOLINI et al., 1995; GARAU et al., 2005). Em um estudo realizado na Itália, foi observado que a produção de carbapenemases é restrita a algumas espécies do gênero *Aeromonas* e em todos os testes realizados a atividade da enzima foi inibida por EDTA (ROSSOLINI et al., 1995). Similar a outras β -lactamases, a produção de metallo- β -lactamases é normalmente regulada nas cepas do gênero *Aeromonas*, assim a enzima é produzida em quantidades muito pequenas na ausência de indutores convenientes, enquanto que a produção aumenta consideravelmente na presença de indutores β -lactâmicos como a penicilina e o imipenem (TALAVERA et al., 2006).

Em 1997 RASMUSSEN e BUSH seqüenciaram um segundo gene de *A. hydrophila*, denominado de *cphA2*, o qual apresentou grande homologia com o gene *cphA*. Estudos de hibridização mostraram que genes homólogos ao *cphA* de *A. hydrophila* foram detectados em *A. veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei* e em outras cepas de *A. hydrophila*, demonstrando a disseminação deste gene em *Aeromonas* spp. (ROSSOLINI et al., 1995).

1.7.2.3 AmpC β -lactamases

A classe C de enzimas de Ambler (Grupo 1 de Bush) inclui o tipo de β -lactamase AmpC, que ocorre principalmente no cromossomo de certas bactérias como *Aeromonas*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* e *Morganella morganii* (RUPPÉ et al., 2006). Bactérias que possuem este tipo de enzima são clinicamente importantes, pois são resistentes a cefoxitina, cefotetan,

cefalotina, cefazolina, cefalexina, 3ª geração de cefalosporinas, penicilinas, inibidores de β -lactamases, e as cefalosporinas de amplo-espectro (carbenilina, piperacilina, piperacilina+tazobactam, ticarcilina, ticarcilina+tazobactam) e aztreonam (COUDRON et al., 2000). Cefepime, cefpiroma e carbapenems são normalmente mais ativos contra as bactérias que possuem AmpC (RASMUSSEN e BUSH, 1997; PÉREZ-PÉREZ e HANSON, 2002; BABIC et al., 2006).

AmpC mediadas por plasmídios já constituem um problema emergente no tratamento terapêutico. A maioria dessas enzimas conferem uma resistência similar à super-produção de AmpC codificadas cromossomicamente. Evidências baseadas na comparação de nucleotídeos das seqüências sugerem que as enzimas codificadas por plasmídios derivam de genes *ampC* cromossômicos de diversas enterobactérias e que os mesmos se integraram em elementos genéticos transferíveis facilitando a disseminação dos genes para microrganismos diferentes (MIRELIS et al., 2006).

Aparentemente a resistência conferida pela presença de AmpC plasmidial não é induzida, diferenciando-se assim da resistência conferida pela presença de genes *ampC* no cromossomo, a qual é tipicamente induzida, exceto em *E. coli* e *Shigella* spp. Ocasionalmente cepas de *E. coli* podem produzir grandes quantidades de enzima AmpC possuindo um fenótipo semelhante ao de mutantes desreprimidos, nestes casos a análise genética mostrou que o gene *ampC* era precedido por um forte promotor, o qual resultou num aumento da transcrição (COUDRON et al., 2000)

Dentre os bacilos Gram-negativos produtores de AmpC e clinicamente importante, a produção da enzima é normalmente reprimida. A repressão e a ativação estão muito ligadas ao processo de síntese de parede e situações de stress para a bactéria. Existem diferenças nos termos “indução” da produção de β -lactamase e “seleção de mutantes desreprimidos”. Certos β -lactâmicos, como a cefoxitina e combinações de ácido clavulânico, quando em contato com *Enterobacter* spp. e *Morganella* spp. Induzem a produção de β -lactamases. Apesar de o imipenem ser um

indutor, o mesmo continua estável na presença da super-produção de AmpC. Os mutantes desreprimidos possuem alterações no gene *ampD*, o qual não mais reprime a expressão do gene *ampR*, resultando num alto nível de produção de AmpC. Este mecanismo descrito se aplica a bactérias como *Enterobacter* spp. e *P. aeruginosa*, no entanto nem todos os mecanismos de expressão funcionam assim (BABIC et al., 2006).

Em *Aeromonas*, uma penicilinase, uma cefalosporinase e uma MBL, são coordenadamente reguladas possuindo um fator comum na indução do mecanismo. Estudos recentes indicam que este mecanismo de indução envolve um sistema de dois componentes regulatórios dependentes da fosforilação, o qual determina um novo mecanismo para expressão de β -lactamases (WALSH et al., 1997; AVISON et al., 2004; BABIC et al., 2006).

Os genes responsáveis pela produção de enzimas que conferem resistência a *Aeromonas* *A. veronii* bv. sobria e *A. jandaei*, são cromossomicamente codificados e denominados *cepS*, *ampS* e *cphA* (*imiS*). AmpS é uma penicilinase da classe 2d, CepS (AmpC-like) é uma cefalosporinase de classe 1 e CphA, como já visto anteriormente pertence à classe 3, de metalo- β -lactamase (AVISON et al., 2000, NIUMSUP et al., 2003). Os genes *ampH*, *cepH* e *imiH* foram encontrados em *Aeromonas hydrophila* e possuem as mesmas características dos genes acima descritos em *A. veronii* bv. sobria e *A. jandaei*,

1.7.3 Detecção e Identificação das ESBLs, MBLs e AmpCs

A detecção das ESBLs, MBLs e AmpCs é feita por meio de métodos fenotípicos de triagem e confirmação da ausência ou presença das enzimas. A identificação dos grupos TEM, SHV, SPM, CphA, IMP, VIM, genes AmpC e de integrons, é feita por meio de métodos moleculares, como a PCR, a hibridização e o seqüenciamento (ROSSOLINI et al., 1995; KO et al., 1996; QU et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005; PITOUT et al., 2005; DROPA,

2006; HENRIQUES et al., 2006b; TALAVERA et al., 2006; KOKSAL et al., 2007; NEUWIRTH et al., 2007).

1.7.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO GÊNERO *Aeromonas*

Aeromonas spp. são quase que invariavelmente resistentes à ampicilina, e na maioria das vezes esta resistência é mediada por β -lactamases (IACONIS e SANDERS, 1990; MASSIDDA et al., 1991; SEGATORE et al., 1993, SAYEED et al., 1996).

AOKI et al. (1971) sugeriram que a resistência à ampicilina era uma propriedade inata, já que essa característica não podia ser transferida para *E. coli*. SAWAI et al. (1976) demonstrou que a resistência à ampicilina não era perdida mesmo que a cepa fosse submetida a situações estressantes. Aparentemente as β -lactamases são geralmente codificadas pelo cromossomo, esta afirmação é corroborada por um estudo feito por WALSH et al. (1995b), o qual identificou uma β -lactamase cromossômica em *A. veronii* bv. *sobria*.

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

No entanto, em 1996, SAYEED et al. relataram a transferência induzida do gene *bla*_{TEM-like} por conjugação de *A. caviae* para *E. coli*. O gene estava localizado em um plasmídeo de 55,5 kb e não era expresso em *A. caviae*, porém quando transferido para *E. coli* apresentou expressão. A falta de expressão do gene presente em *A. caviae* parece estar relacionada com o fato de existir pouca pressão seletiva, não sendo suficiente para acarretar as mudanças na expressão.

Em um estudo KO et al. (1996) isolaram de amostras clínicas de um hospital em Taiwan, 234 *Aeromonas* spp., das quais 90% eram suscetíveis a moxalactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, amicacina e fluoroquinolonas, sendo resistentes à tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, algumas cefalosporinas de amplo espectro e aminoglicosídeos, por meio da técnica de MIC (Minimum inhibitory concentration).

OVERMAN et al. (1999) realizaram antibiogramas para determinação do padrão de suscetibilidade de *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* e *A. veronii* biotype veronii. Neste estudo os autores concluíram que dentre as espécies estudadas, *A. jandaei* foi a mais resistente.

DOI et al. (2002) relataram a primeira ocorrência do gene CMY-9 em uma cepa de *E. coli*. Com o seqüenciamento do gene os autores observaram uma similaridade de 78 e 74% com CepH e CepS, respectivamente. Esses genes são cefalosporinases cromossômicas encontradas em algumas espécies do gênero *Aeromonas*. Os autores verificaram que a cepa estudada era resistente a certos antibióticos, entre eles amoxicilina-clavulanato, cefotaxima, ceftazidima e cefoxitina.

FOSSE et al. (2003) com o objetivo de caracterizar a cefalosporinase produzida pela *A. caviae* CIP 74.32 resistente a amoxicilina, ticarcilina e cefalotina, e sensível a cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, aztreonam e imipenem; clonaram o gene denominado *cav-1*, o qual passou a expressar resistência a cefoxitina na cepa de *E. coli* receptora. Com os resultados obtidos no estudo, os autores concluíram que CAV-1 pode ser um possível

ancestral da família FOX (classe C), disseminada entre as enterobactérias por meio de plasmídeo.

SINHA et al. (2004) realizaram um estudo com cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de pacientes com diarreia aguda na Índia, em um período de 2 anos (2000 e 2001). Estas cepas foram submetidas ao teste de suscetibilidade de medida do halo de inibição recomendado pelo NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards)/CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Os resultados mostraram uma considerável variação entre os anos estudados. Cento e sessenta e quatro cepas foram analisadas, os resultados apresentam a primeira porcentagem referente ao ano de 2000 e a segunda referente ao ano de 2001, das quais 94,1% e 91,2% foram resistentes a ampicilina, 22,4% e 12,3% resistentes a ciprofloxacina, 62,8% e 54,4% resistentes a ácido nalidíxico, 19% e 14% resistentes a norfloxacina, 73,8% e 7% resistentes a furazolidona e, 44,9% e 71,9% resistentes a estreptomicina.

FOSSE et al. (2004) relataram a possível transferência do gene *bla*_{TEM-24} de *Enterobacter aerogenes* para *Aeromonas hydrophila*, em um paciente hospitalizado. Neste estudo também foi observada a ocorrência de uma cepa de *A. hydrophila* selvagem produzindo simultaneamente β -lactamases das classes A, B, C e D.

RODRIGUEZ et al. (2005) em Caracas, descreveram um caso de septicemia devido à presença de *A. hydrophila* produtora de ESBL. Um paciente pediátrico exposto à água recreacional com quadro de diarreia e pneumonia, progredindo para septicemia, teve amostras de sangue analisadas, das quais foi isolada *A. hydrophila*. Inicialmente o paciente havia sido tratado com cefotaxima, oxacilina, vancomicina, claritromicina e ampicilina-sulbactam, mas seu quadro clínico piorou, evoluindo para septicemia. Diversas análises de culturas foram realizadas, fluido pleural, sangue, urina e fezes. *A. hydrophila* foi detectada nas amostras de sangue e nenhum outro patógeno foi isolado de nenhuma das culturas. O isolado foi inicialmente testado por meio de testes de suscetibilidade com a técnica de difusão de discos e em seguida pela determinação de MICs, de acordo com

os padrões descritos pelo NCCLS/CLSI. Os resultados determinaram que a cepa era suscetível a imipenem e cefoperazona-sulbactam, mas resistente a amicacina, gentamicina, oxacilina, piperacilina, ampicilina-sulbactam, cefotaxima, levofloxacina e ciprofloxacina, sendo determinada produtora de ESBL.

QU et al. (2005) na China, analisaram quatro cepas multiresistentes de *Aeromonas* spp. isoladas de pacientes com cirrose. O gene de resistência *bla*_{TEM} foi pesquisado por meio da PCR e em três cepas foi observada a presença deste gene. O seqüenciamento identificou o gene como *bla*_{TEM-1}. Todas as cepas eram resistentes a ampicilina, cefazolina e cefmetazol.

Na Índia, oitenta cepas ambientais de *Aeromonas* spp. isoladas entre 1999 e 2002 foram analisados por meio de testes de suscetibilidade através da técnica de MIC. Os resultados mostraram que 100% dos isolados foram resistentes à ampicilina, mais de 66% resistentes a clorotetraciclina, 53% e 57% resistentes a oxitetraciclina e canamicina, respectivamente (VASEEHARAN et al., 2005).

A prevalência e os padrões de suscetibilidade entre bactérias patogênicas causadoras de gastroenterites isoladas na Europa e América Latina e relatadas pelo Programa SENTRY foram estudados por STREIT et al. (2006). Dentre as 1479 amostras coletadas de infecções gastrointestinais, 72 (5%) pertenciam ao gênero *Aeromonas*, que apresentaram 16% e 9,1% de resistência a tetraciclina, em cepas da Europa e América Latina, respectivamente. Todas as cepas de *Aeromonas* foram suscetíveis a fluoroquinolonas e 95% foram suscetíveis à ceftriaxona.

TALAVERA et al. (2006) no Brasil, verificaram a presença de metalo- β -lactamases em seis das sete cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de carcaças de frango, no entanto só verificaram a presença do gene *cphA* em duas das cepas.

Em 2006b, HENRIQUES et al. pesquisaram em 164 isolados a ocorrência de genes codificadores β -lactamases e integrons entre bactérias resistentes a ampicilina e provenientes do Rio de Aveiro, Portugal, por meio de métodos moleculares como a PCR. Dentre os isolados de *Aeromonas* spp. 10,5% apresentaram os genes de β -lactamases, sendo que duas cepas

apresentaram o gene *bla*_{TEM}, uma cepa o gene *bla*_{SHV}, duas cepas o gene *bla*_{OXA-B}, duas cepas o gene *bla*_{CphA/IMIS} e nenhuma cepa apresentou o gene *bla*_{CARB}.

Cento e quatro cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de pequenos lagos e rios, do Texas e Novo México, respectivamente, foram analisadas a partir de testes de suscetibilidade utilizando o método de MIC. O resultado mostrou que as cepas apresentaram no mínimo 90% de suscetibilidade à cefuroxima, canamicina, ácido nalidíxico, ofloxacina, tetraciclina e sulfametoxazol. No entanto, 26% das cepas apresentaram resistência a trimetoprim (HUDDLESTON et al., 2006).

PALU et al. (2006), no Brasil, analisaram o perfil de suscetibilidade e a ocorrência de plasmídios em 83 cepas de *Aeromonas* spp., sendo 35 do complexo *A. hydrophila* e 48 do complexo *A. caviae*. Do total de cepas, 28 eram isolados clínicos e 55 isolados de alface fresca. Os testes de suscetibilidades mostraram que as cepas de alface foram resistentes a ampicilina-sulbactam, cefoxitina e tetraciclina, enquanto que as cepas clínicas apresentaram resistência a ampicilina-sulbactam, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol e tetraciclina. Os testes foram conduzidos por meio da técnica de difusão com discos preconizada pelo NCCLS/CLSI, com exceção de cloranfenicol, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol que foram analisados pela técnica de diluição de ágar. Duas *A. hydrophila* e uma *A. caviae* apresentaram DNA extracromossomal, com 3 e 15kb de tamanho, respectivamente.

BALASSIANO et al. (2007) analisaram o envolvimento dos genes de resistência a tetraciclina, denominados *tetA* e *tetE*, em 16 cepas de *Aeromonas* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento. A PCR revelou que 37,5% das cepas foram positivas para o gene *tetA* e 37,5% para o gene *tetE*, sendo que apenas um isolado apresentou os dois genes concomitantemente. Apenas um isolado, referente a uma *A. caviae* possuía a resistência associada à presença de plasmídio. Com os resultados deste estudo os autores concluíram uma possível disseminação desses genes entre as cepas de *Aeromonas* spp. no Brasil, sendo a presença de plasmídio um fator que contribui para essa disseminação.

KOKSAL et al. (2007), na Turquia, analisaram 1680 amostras de água (840 de água de torneira e 840 de água de tanque doméstico), um total de 147 cepas de *Aeromonas* foram isoladas. O *screening* de ESBL foi realizado por meio da técnica de disco-duplo preconizada pela CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Dentre as cepas isoladas 46% eram *A. hydrophila*, 34% *A. sobria*, 8% *A. caviae*, 6% *A. salmonicida*, 3% *A. veronii* e 3% *A. jandaei*. Aproximadamente 55% das cepas foram resistentes à ampicilina, 48% à eritromicina, 41% à amoxicilina-clavulanato, 28% à ceftazidima, 27% à cefoxitina, 26% à ceftriaxona e cefotaxima, 22% à piperacilina, 14% a trimetoprim-sulfametoxazol, 12% à tetraciclina, 11% a aztreonam, 8% a meropenem, 6% a imipenem, 2% ao ácido nalidíxico e 1% à ciprofloxacina. Nenhuma cepa apresentou perfil de ESBL.

NEUWIRTH et al. (2007), na França, descreveram o primeiro isolado de *A. caviae* com a presença do gene *bla_{IMP}* adquirido. A cepa foi isolada de fezes de uma paciente pediátrico com diarreia, e que recebeu tratamento antibiótico por seis meses. A produção de MBL foi detectada pela técnica de difusão com discos baseada no critério do NCCLS/CLSI, sendo caracterizada por ser resistente à maioria dos β -lactâmicos, exceto aztreonam e imipenem. Houve confirmação da presença do gene pela PCR com o uso de iniciadores para o gene *bla_{IMP}*.

SCOARIS et al. (2007), no Brasil, realizaram teste de suscetibilidade em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de água de torneira, água mineral e água de poço artesiano e os resultados mostraram que todas as 5 *A. jandaei* isoladas, 9 das 12 *Aeromonas* spp. e 4 de 5 *A. hydrophila* eram multiresistentes, sendo a ciprofloxacina o antibiótico mais ativo contra as cepas e o menos ativo foi a ampicilina.

Embora existam poucos estudos que realizem a pesquisa de genes de resistência em organismos do gênero *Aeromonas*, com base nos estudos acima descritos é possível sugerir, que este gênero tem potencial de expressar resistência a antibióticos de diversas classes incluindo β -lactâmicos, tornando-se assim uma preocupação para a Saúde Pública, uma vez que os organismos do gênero *Aeromonas* podem ser adquiridos por meio de contato com água e alimentos.

Alguns estudos de relevância clínica demonstram dificuldade no tratamento de pacientes com infecções por espécies de *Aeromonas*. KO et al. (1998) analisaram três cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas. Uma das cepas era resistente a ampicilina e cefamicinas, enquanto que duas cepas foram resistentes a cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima e piperacilina. CHIM e SONG (2007) estudaram quatro cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas, dentre outros antibióticos testados, todas as cepas foram resistentes a imipenem, aztreonam, ceftriaxona e cefepime. Em estudo realizado por STANO et al. (2009) uma cepas de *Aeromonas hydrophila* foi isolada da cultura de sangue de um paciente com HIV, esta cepa apresentou resistência a β -lactâmicos, imipenem e meropenem. A ocorrência de ESBLs não foi detectada pelo E-teste.

2. JUSTIFICATIVA

É estimado que espécies de *Aeromonas* possam causar cerca de 13% dos casos de gastroenterite nos Estados Unidos (KINGOMBE et al., 1999). A grande prevalência desses patógenos no ambiente deve ser considerada como uma importante ameaça para a saúde pública, já que as infecções causadas por *Aeromonas* geralmente são adquiridas pelo consumo de água e alimento contaminados (CHOPRA et al., 1999; SEN, 2004; PALÚ et al., 2006; HUDDLESTON et al., 2006).

A distribuição das espécies do gênero *Aeromonas* em ambientes aquáticos, seu papel como um contaminante de sistemas de água potável e seu potencial patogênico são de grande importância para a Saúde Pública (GAVRIEL et al., 1998; DUMONTET et al., 2000; JOSEPH e CARNAHAN, 2000), sendo necessário o monitoramento desses organismos a fim de entender sua epidemiologia e patogenia, planejando programas de vigilância à saúde da população.

Outros fatores, como a complicada e controversa taxonomia, a presença de genes de virulência em *Aeromonas* spp. e o surgimento crescente de estudos que mostram genes de resistência presentes em cepas de *Aeromonas*, contribuem para a importância em pesquisar este gênero.

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é controversa devido à falta de congruência entre as características fenotípicas e genotípicas das espécies, e porque os testes bioquímicos não proporcionam resultados precisos (JANDA e ABBOTT, 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; FIGUERAS et al., 2005a; SEN, 2005; EPA, 2006).

Dentre as espécies associadas com a causa de doenças em humanos *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* foram determinadas as espécies mais patogênicas, sendo necessária a priorização da pesquisa destas espécies, bem como sua distribuição e ocorrência de determinantes genéticos responsáveis pela virulência e resistência.

Os métodos moleculares também vêm sendo aplicados na pesquisa de genes de virulência, já que o mecanismo de patogenia é complexo e ainda não está completamente esclarecido, assim pode-se determinar se o microorganismo isolado tem potencial para ser patogênico. Uma estratégia adequada para a pesquisa dos genes de virulência é a técnica da PCR, já utilizada por diversos autores para pesquisa de um ou mais genes (KINGOMBE et al., 1999; GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2002; SEN e RODGERS, 2004).

Alguns autores demonstraram a resistência de *Aeromonas* a antimicrobianos (HENRIQUES et al. 2006b; NAWAZ et al. 2006; PALÚ et al. 2006); no entanto, estudos moleculares para pesquisa de genes de resistência em *Aeromonas* ainda são escassos. Embora a relevância de estudos de resistência bacteriana seja de grande preocupação, os isolados clínicos são o objeto de estudo mais destacado, no entanto sabe-se sem dúvida que a resistência a antibióticos também está presente em comunidades microbianas ambientais, as quais podem esconder uma diversidade molecular muito grande. Todos esses motivos apresentados são suficientes para estimular mais estudos em relação aos determinantes genéticos de resistência presentes em ambientes naturais (HENRIQUES et al., 2006a).

No Brasil ainda são poucos os grupos de pesquisas que mostram interesse pela pesquisa do gênero *Aeromonas*, sendo assim ainda são escassos os estudos que tem como principal agente etiológico de pesquisa os organismos deste gênero, por isso a ocorrência destes microrganismos pode estar subestimada no Brasil, bem como a sua capacidade de causar doenças em humanos.

É fundamental que mais estudos sejam realizados, para elucidar o posicionamento taxonômico, a ocorrência e prevalência dos genes relacionados à virulência e resistência, de bactérias do gênero *Aeromonas*, provenientes de amostras ambientais, para que seja possível a elucidação do papel desses organismos nas doenças diarreicas e sistêmicas.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar genótipos de virulência e resistência em *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* isoladas de ambientes aquáticos.

3.1 Objetivos Específicos

1. Confirmar o posicionamento taxonômico de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*, previamente identificadas por meio de série bioquímica e pertencentes à Coleção de Cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública/FSP/USP; por meio da PCR, utilizando primers gênero-específicos, seguido da digestão do gene 16Sr DNA com enzimas de restrição;
2. Pesquisar por meio da PCR, os genes de virulência *act*, *ast* e *alt*, e de resistência *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}*, *cphA*, *cepH* e *bla_{MOX}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*. Em cepas com a presença dos genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, realizar a pesquisa de Integron de classe I;
3. Pesquisar a ocorrência de plasmídios nas cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*;
4. Discutir o significado dos resultados para a Saúde Pública considerando a presença de genes de resistência e virulência e a ocorrência de cepas do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS CEPAS

As cepas selecionadas pertencem à Coleção de Cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública e a maioria é proveniente da pesquisa realizada nas teses:

1. “Pesquisa de *Aeromonas* spp. potencialmente patogênicas em alguns pontos da Represa de Guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público” – Professora Maria Helena Matté (mestrado/1995);
2. “Ribotipagem de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sóbria* e *Aeromonas jandaei*, potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga, São Paulo” – Professora Maria Helena Matté (doutorado/1996);
3. “Diversidade e perfil plasmidial de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo” – Andréa Cabral (mestrado/2005);

Algumas cepas, não pertencentes a nenhuma tese realizada no laboratório também foram selecionadas, pelo fato de serem cepas provenientes de ambiente aquático e/ou provenientes de coleta em pontos de captação de água e recreação no Estado de São Paulo.

4.1.1 Reisolamento

As cepas encontravam-se armazenadas em Ágar Lúria 0,5% (temperatura ambiente), ou em Freezer -70°C em Glicerol 60%, ou em meio sólido.

Uma alçada retirada do meio de armazenamento foi semeada em Caldo Lúria 1% NaCl para ativação e crescimento das cepas, prosseguindo

com incubação por 18-24h a 35°C. Após este período, uma alçada do caldo crescido foi semeada em Ágar Amido.

4.1.2 Identificação das Colônias

Colônias que apresentaram características típicas do gênero *Aeromonas*, tais como, colônias lisas e brilhantes, de bordas bem definidas, com dois a três milímetros de diâmetro, brancas ou acastanhadas e envoltas por halo transparente, foram submetidas ao teste de oxidase. Após o reisolamento as cepas foram armazenadas em Ágar Lúria 0,5% NaCl e em Freezer -70°C.

4.2 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO E ESPÉCIES

4.2.1 Extração de DNA Genômico

A extração de DNA genômico foi realizada por meio do protocolo CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) de acordo com o preconizado por MURRAY e THOMPSON (1980), e descrito por AUSUBEL et al. (1995). Esta extração permite a obtenção de um DNA mais purificado e concentrado, necessário para amplificação do gene 16S rDNA.

As cepas reisoladas e armazenadas em Soft Ágar Lúria 0,5% foram semeadas em 10 mL de Caldo Lúria 1% NaCl e incubadas a 35°C por 18-24h. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 5000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspense com 1 mL de mQ[®] estéril e transferido para microtubo tipo eppendorf[®]. Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense com 567µL de TEI estéril, 30µL de SDS 10% e 3µL de Proteinase K, em seguida levados ao banho-maria 37°C por 1h. Após esse período, foram adicionados aos microtubos 80µL de

CTAB e 100µL de NaCl 5M, os quais foram incubados em banho-maria 65°C por 20 minutos. Em seguida, aproximadamente 500µL de clorofórmio e álcool-isoamílico na proporção 24:1 foi adicionado e agitado fortemente, seguido de centrifugação a 10000rpm por 25 minutos a 24°C, em seguida a parte superior, separada pelo CTAB, foi transferida para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 1µL de RNase e em seguida transferidos para banho-maria 37°C por 1h. Após esse período, aproximadamente 500µL de clorofórmio puro foram adicionados, os microtubos foram agitados fortemente e centrifugados a 10000rpm por 15 minutos a 24°C, novamente a parte superior foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 1mL de isopropanol gelado, em seguida os tubos foram centrifugados a 10000rpm por 5 minutos a 24°C. Após o sobrenadante ser descartado, 1mL de etanol 70% foi adicionado e novamente centrifugado a 10000rpm por 5 minutos a 24°C, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar sob vácuo. Após a secagem, foi realizada a ressuspensão com 50µL de TEII.

4.2.2 Confirmação do Gênero *Aeromonas* por meio da PCR

Para confirmação do gênero *Aeromonas* foi utilizado um par de primers gênero-específico, de acordo com UEHARA (2008) (**Quadro 2**).

Quadro 2. Descrição dos iniciadores utilizados para confirmação do gênero *Aeromonas* spp.

| Primer | Seqüência (5' - 3') | Localização | Produto (pb) |
|---------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| Aero16F | TGTGACGTTACTCGCAGAAGA | 472-491 | 797 |
| Aero16R | AGCTTGCAGCCCTCTGTACG | 1238-1257 | |

A partir do DNA obtido da extração por CTAB, a reação foi realizada em um termociclador (Martercycler gradient, Eppendorf®), sendo iniciada com uma denaturação a 95°C por 7 min., seguida de 25 ciclos, com

denaturação a 95°C por 1 min., anelamento a 65°C por 1 min., e extensão a 72°C por 1 min., por fim uma extensão final de 5 min. a 72°C (UEHARA, 2008), e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

4.2.3 Confirmação molecular das espécies

- Amplificação do gene 16S rDNA

Para a amplificação do gene 16S rDNA foram usados iniciadores universais descritos por THOMPSON et al. (2001) (**Quadro 3**).

Quadro 3. Iniciadores para amplificação do gene 16S rDNA.

| <i>Primer</i> | <i>Seqüência (5´ - 3´)</i> | <i>Localização</i> | <i>Produto (pb)</i> |
|---------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| MH1 | AGTTTGATCCTGGCTCAG | 1-18 | 1503 |
| MH2 | TACCTTGTTACGACTTCACCCCA | 1481-1503 | |

A partir do DNA obtido da extração por CTAB, a reação foi realizada em um termociclador (Martercyler gradient, Eppendorf®), sendo iniciada com uma denaturação a 95°C por 7 min., seguida de 35 ciclos, com denaturação a 95°C por 2 min., anelamento a 56°C por 3 min., e extensão a 72°C por 2 min. e uma extensão final de 10 min. A 72°C, e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

- RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A partir dos produtos de PCR obtidos da amplificação do gene 16S rDNA, a restrição com enzimas foi realizada com base nos estudos realizados por UEHARA (2008).

Para *Aeromonas hydrophila* foram utilizadas as enzimas de restrição: *Pst*I, *Xho*II e *Sna*BI e para *Aeromonas jandaei*: *Pst*I, *Pvu*II, *Nru*I e *Xho*II; nos tampões e condições de temperaturas sugeridas pelos respectivos fabricantes para as diferentes enzimas (**Quadro 4**).

Quadro 4. Perfis de restrição gerados a partir das enzimas selecionadas, com base no gene 16S rDNA (1503pb).

| <i>Aeromonas hydrophila</i> | | | | <i>Aeromonas jandaei</i> | | | | |
|-----------------------------|--------------|---------------|---------------|--------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | <i>Pst</i> I | <i>Xho</i> II | <i>Sna</i> BI | | <i>Pst</i> I | <i>Xho</i> II | <i>Nru</i> I | <i>Pvu</i> II |
| Sítio de clivagem | 1006 | 698 | 462 | Sítio de clivagem | 1006 | 215e700 | X | X |
| Fragmento (pb) | 497,1006 | 698,805 | 462,1041 | Fragmento (pb) | 497,1006 | 215,485,803 | - | - |

4.3 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NA PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

4.3.1 Extração de DNA total

A extração do DNA total foi realizada por meio de choque térmico segundo CHAPMAN et al. (2001). Esta extração permite a obtenção do material genético cromossômico e plasmidial.

As cepas reisoladas e armazenadas em Ágar Lúria 0,5% NaCl foram semeadas em 10 mL de Caldo Lúria 1% NaCl e incubadas a 35°C por 18-24h. Os tubos foram centrifugados a 5000rpm, a 24°C por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento (*pellet*) foi ressuspensão em 1mL de água mQ[®] estéril, homogeneizado e transferido para microtubo tipo eppendorf[®]. Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 3min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 200µL de água mQ[®] estéril. A suspensão foi então colocada em banho-maria a 95°C, por 10 minutos, e em seguida colocada em freezer -20°C, por 30 minutos. Os microtubos foram retirados do freezer e mantidos em repouso em temperatura ambiente até o descongelamento. Os microtubos foram

centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 10min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf®. Os tubos contendo o DNA foram armazenados em freezer a -20°C.

4.3.2 Extração Plasmidial

Para a verificação da ocorrência de plasmídios nas cepas estudadas, foram realizadas extrações utilizando-se o kit Wizard Plus SV Mlnipreps (Promega-USA) segundo as orientações do fabricante. Os plasmídios foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.3.3 Técnica para Desenho dos *Primers*

Os *primers* desenhados neste estudo foram baseados em regiões conservadas dos genes-alvo de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* disponíveis no GenBank. As seqüências escolhidas de cada gene foram alinhadas manualmente no software BioEdit (HALL, 1999) e pesquisas foram realizadas para todos os primers a fim de testar a especificidade teórica usando BLAST. Depois da seleção dos *primers*, os mesmos foram sintetizados pela Bionner Oligo Synthesis Report (KOREA).

Para desenho dos *primers* de virulência algumas dificuldades foram encontrados em relação à escolha das seqüências do GenBank para os genes *act* (enterotoxina citotóxica), *aer* (aerolisina) e *hlyB* (β -hemolisina) já que a nomenclatura dos mesmos é confusa e controversa, portanto decidiu-se utilizar o mesmo par de *primers* para detecção dos três genes, sendo denominados complexo *act/aer/hlyB*.

Para o desenho dos *primers* do gene *alt* algumas dificuldades também foram encontradas, já que o gene possui grande similaridade com o gene da lipase. Portanto para o desenho dos *primers altF* e *altR* foram levadas em consideração duas seqüências principais disponíveis no GenBank e que possuem a publicação de artigos relacionados a essas seqüências. Para o

gene *alt* a seqüência de número de acesso L77573 (CHOPRA et al. 1996) e para o gene da lipase a seqüência de número de acesso AF092033 (MERINO et al. 1999). Para verificar a localização dos genes dentro do genoma de *Aeromonas* foi utilizada a seqüência com número de acesso CP000462 (SESHADRI et al. 2006) que corresponde ao seqüenciamento total do genoma de *A. hydrophila* ATCC 7966. Os *primers* desenhados foram denominados *altF* e *altR*.

4.3.4 Pesquisa dos Genes de Virulência *act/aerA/hlyA*, *alt* e *ast*

Para a identificação dos genes de virulência por meio da PCR o DNA utilizado foi obtido a partir da extração por CTAB, previamente descrita, utilizando-se os iniciadores descritos no **Quadro 5**.

Quadro 5. Relação dos iniciadores selecionados para pesquisa dos genes de virulência.

| Gene | Iniciadores (5' - 3') | Produto | Referência |
|------------------------|------------------------------|----------------|----------------------|
| <i>act/aerA/hlyA</i> F | AGAAGGTGACYACCAAGAACA | 400pb | Este estudo |
| <i>act/aerA/hlyA</i> R | CCACTTCACTTCACCCGGGA | | |
| <i>alt</i> F | ATCGGGGTGACCCTCACCTC | 764bp | Este estudo |
| <i>alt</i> R | GGCAGGAACTCGTTGACGAAGC | | |
| <i>ast</i> F | TCTCCATGCTTCCCTTCCA | 331pb | SEN e RODGERS (2004) |
| <i>ast</i> R | GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG | | |

A partir do DNA obtido da extração por CTAB, a reação foi realizada em um termociclador (Martercycler gradient, Eppendorf®), sendo empregada uma denaturação a 94°C por 5', seguida de 30 ciclos, com denaturação a 94°C por 45", anelamento a 50°C por 1', e extensão a 72°C por 1' e uma extensão final de 5' a 72°C, e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. As amplificações foram realizadas separadamente.

Os controles positivos utilizados nas reações foram obtidos no decorrer do estudo, seqüenciados e depositados no GenBank, sob os

números EU849093 (*ast*), EU849094 e EU849095 (*alt*), EU849096 e EU849097 (*act/aer/hlyA*).

4.3.5 Determinação da Produção de Enzimas β -lactamases

Diversos autores relatam que as espécies do gênero *Aeromonas* só demonstram a produção de enzimas β -lactamases quando induzidas com antibióticos apropriados (ROSSOLINI et al., 1995; TALAVERA et al., 2006). Sendo assim, para a pesquisa de MBL, AmpC e ESBL todas as cepas foram repicadas duas vezes em placa de Müeller Hinton contendo o respectivo disco de antibiótico referente à produção da enzima. Quando verificada uma diminuição de halo no segundo repique deu-se continuidade à indução até que a cepa se tornasse resistente e então foi feito o teste com os inibidores.

4.3.5.1 Pesquisa Fenotípica para Produção de MBL

Para detecção de cepas produtoras de MBL a metodologia utilizada foi de combinação de discos. Em placa de Petri contendo Agar Mueller-Hinton foram dispostos de 20 a 30mm discos de Imipenem (10 μ g) (IMP) e Meropenem (10 μ g) (MER) (OXOID – UK), imipenem/meropenem (10 μ g) associado ao EDTA 0,5M (930 μ g ou 5 μ L) (PITOUT et al., 2005) e associados ao Ácido mercaptoacético (3 μ L – utilizados diretamente) (ARAKAWA et al., 2000). Também foram testados discos somente com EDTA 0,5M e Ácido mercaptoacético para verificar se os inibidores possuíam ação tóxica sobre as cepas. Para EDTA 0,5M um aumento maior ou igual a 7mm na zona de inibição do disco associado ao inibidor de metalo- β -lactamase indica produção de MBL (PITOUT et al., 2005) e para o Ácido mercaptoacético um aumento de 5mm indica produção da enzima (ARAKAWA et al, 2000).

4.3.5.2 Pesquisa Fenotípica para Produção de AmpC

Para detecção de cepas produtoras de enzimas AmpC a metodologia utilizada foi a de combinação de discos. Em placa de Petri contendo Agar Mueller-Hinton discos de cefoxitina (30µg) (FOX) e cefotetan (30µg) (CTT) (OXOID – UK) foram dispostos a uma distância de 20 a 30mm um do outro e a uma distância de aproximadamente 30mm foram dispostos discos de cefoxitina e cefotetan ambos contendo 20µL de Ácido fenilborônico (BA) (Preparo: 120mg de BA em 3mL de dimetil-sufóxido e 3mL de água destilada estéril. Usar após 1 hora). Um aumento maior ou igual a 5mm na zona de inibição de um dos discos de antibióticos associados ao inibidor BA indica produção de AmpC (COUDRON, 2005). Todas as cepas também foram testadas para suscetibilidade a discos de cefotaxima (CTX) (30µg), ceftazidima (CAZ) (30µg) e cefpodoxima (CPD) (10µg) (OXOID – UK).

4.3.5.3 Pesquisa Fenotípica para Produção de ESBL

A detecção de cepas produtoras de ESBL foi feita por meio do método de sinergismo. Em cepas produtoras de AmpC foram colocados 200µg/mL de cloxacilina no meio Müller Hinton (WELDHAGEN et al., 2003), em seguida o teste foi realizado utilizando-se discos de ceftazidima (CAZ) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), cefpodoxima (CPD) (10µg) e cefepima (CPM) (30µg) (OXOID – UK) dispostos em uma placa de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton+cloxacilina, e no centro um disco de amoxicilina + ácido clavulânico (20/10mg). Um aumento na zona de inibição de qualquer um dos antibióticos utilizados sozinhos indica produção de ESBL (BRADFORD, 2001). Nas cepas não-produtoras de AmpC o teste foi realizado sem o uso da cloxacilina no meio.

4.3.5.4 Identificação Molecular dos Genes de Resistência

Quadro 6. Lista de iniciadores (5'- 3') empregados para a pesquisa de genes relacionados à resistência a carbapenems.

| Gene | Iniciadores (5' – 3') | Produto | Referência | |
|-------------------------------|------------------------------|----------------|-------------------|------------------------|
| <i>bla</i> _{IMP} F | GGAATAGRRTGGCTTAAAYT | 232pb | Este estudo | |
| <i>bla</i> _{IMP} R | GGTTTAAYAAARCAMCCACC | | | |
| <i>bla</i> _{VIM} F | GTTTGGTTCGCATATCGCAAC | 590pb | | |
| <i>bla</i> _{VIM} R | GAGCAAKTCYAGACCGCCC | | | |
| <i>bla</i> _{CphA} F | TCTATTTTCGGGGCCAAGGG | 230pb | | |
| <i>bla</i> _{CphA} R | TCTCGGCCCCAGTCGCTCTTCA | | | |
| <i>bla</i> _{SPM-1} F | CCTACAATCTAACGGCGACC | 648pb | | ZAVASCKI et al. (2005) |
| <i>bla</i> _{SPM-1} R | TCGCCGTGTCCAGGTATAAC | | | |

Para amplificação dos genes de resistência descritos no **Quadro 6** foi empregada uma denaturação a 95°C por 10', seguida de 30 ciclos, com denaturação a 95°C por 1', anelamento a 55°C por 1', e extensão a 72°C por 1', uma extensão final de 5' a 72°C, e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. Para a amplificação do gene *bla*_{IMP} a temperatura de anelamento utilizada foi de 40°C.

Quadro 7. Lista de iniciadores (5'- 3') empregados para a pesquisa de genes e integron relacionados à resistência a cefalosporinas de 3ª geração e aztreonam.

| Gene | Iniciadores (5' – 3') | Produto | Referência | |
|-------------------------------|--|----------------|-------------------|------------------------|
| <i>bla</i> _{TEM} F | TCGGGGAAATGTGCGCG | 972pb | CAO et al. (2002) | |
| <i>bla</i> _{TEM} R | TGCTTAATCAGTGAGGCACC | | | |
| <i>bla</i> _{SHV} F | TTATCTCCCTGTTAGGCACC | 795pb | | |
| <i>bla</i> _{SHV} R | GATTTGCTGATTTTCGCTCGG | | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M} F | SCSATGTGCAGYACCAGTAA | 543pb | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M} R | CCGCRATATGRTTGGTGGTG | | | |
| Integron classe 1 | GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA | variável | | LÉVESQUE et al. (1995) |

Para amplificação dos genes de resistência descritos no **Quadro 7** foi empregada uma denaturação de 94°C por 2', seguida de 30 ciclos, com

denaturação a 94°C por 45", anelamento a 52°C por 1', e extensão a 72°C por 1' e uma extensão final de 10' a 72°C, e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. A cepa que apresentou a amplificação de algum dos genes descritos acima foi submetida à PCR utilizando-se o iniciador direto do Integron de classe 1 com o iniciador reverso do gene de resistência, e vice-versa; sendo utilizada na reação uma extensão a 72°C por 2'.

Quadro 8. Lista de iniciadores (5' - 3') empregados para a pesquisa de genes relacionados à resistência a cefamicinas.

| Gene | Iniciadores (5' – 3') | Produto | Gene alvo | Referência |
|-------------|------------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| cepHF | ATGAAACAGACCAGAKCCCT | 1140pb | AmpC cromossômica | Este estudo |
| cepHR | AGCTGGCTCAAATGGCATG | | | |
| MOXMF | GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT | 520pb | MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11 | Pérez-Pérez e Hanson (2002) |
| MOXMR | CACATTGACATAGGTGTGGTGC | | | |
| FOXMF | AACATGGGGTATCAGGGAGATG | 190pb | FOX-1 a FOX-5 | Pérez-Pérez e Hanson (2002) |
| FOXMR | CAAAGCGCGTAACCGGATTGG | | | |
| CITMF | TGGCCAGAACTGACAGGCAA | 462pb | LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1 | Pérez-Pérez e Hanson (2002) |
| CITMR | TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | | | |
| DHAMF | AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT | 405 | DHA-1, DHA-2 | Pérez-Pérez e Hanson (2002) |
| DHAMR | CCGTACGCATACTGGCTTTGC | | | |
| ACCMF | AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA | 346 | ACC | Pérez-Pérez e Hanson (2002) |
| ACCMR | TTGCCCGCAATCATCCCTAGC | | | |
| EBCMF | TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG | 302 | MIR-1T, ACT-1 | |
| EBCMR | CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT | | | |

Para amplificação dos genes de resistência descritos no **Quadro 8** foi empregada uma denaturação de 95°C por 10', seguida de 30 ciclos, com denaturação a 95°C por 1', anelamento a 60°C por 1', e extensão a 72°C por 1' e uma extensão final de 10' a 72°C, e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. Exceto para o gene *cepH* onde foram empregados anelamento de 56°C por 1' e extensão a 72°C por 1' e 20"

Os controles positivos para os genes de resistência foram gentilmente cedidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP) e estão descritos a seguir no **Quadro 9**.

Quadro 9. Controles positivos para os genes de resistência.

| Gene | Organismo |
|------------------------------|-------------------------------|
| <i>bla</i> _{SMP-1} | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>bla</i> _{VIM-1} | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>bla</i> _{IMP-1} | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>bla</i> _{CTX-M} | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>bla</i> _{TEM-3} | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>bla</i> _{SHV-18} | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>bla</i> _{CMY-2} | <i>Escherichia coli</i> |

Para a padronização da reação de PCR para pesquisa dos genes propostos por PÉREZ-PÉREZ e HANSON (2002), foi utilizado apenas o controle positivo para o gene *bla*_{CMY-2}, uma vez que o controle foi amplificado, a reação foi considerada padronizada para o resto dos genes.

Para a pesquisa de *cepH* e *cphA* os controles positivos foram obtidos no decorrer do estudo e seqüenciados. O gene *cepH* ainda não se encontra disponível no GenBank e o gene *cphA* se encontra sob os números EU833973 a EU833982.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Todas as reações de PCR foram realizadas da seguinte maneira: cada microtubo de reação continha um volume total de 25µL, nos quais havia os seguintes reagentes nas respectivas concentrações 5µL de DNA, tampão com MgCl₂ 1,5mM, DNTp 200µM, iniciadores 0,2µM cada, GoTaq® (Promega – USA) DNA polimerase 1,25U e água MilliQ® suficiente para completar o volume de 25 µL.

4.5 VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

- Eletroforese em gel de agarose

O perfil de bandas obtido da RFLP foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3%, enquanto que os produtos obtidos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8% e os plasmídios foram verificados em gel de agarose 1%. Ao final da corrida o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e submetido a uma fonte de luz ultravioleta para a visualização das bandas. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP). A medida dos fragmentos foi determinada pelo software Gelworks 1D Advanced 4.01(UVP).

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

Das 100 cepas selecionadas, *Aeromonas hydrophila* (50) e *Aeromonas jandaei* (50), todas foram positivas para o PCR do gênero *Aeromonas* e em um total de 13% (13) os testes fenotípicos falharam na identificação correta das espécies, como pôde ser observado com a aplicação do método de RFLP.

Pela observação da Figura 1 pode-se verificar que 18% (9) das de *A. hydrophila* foram identificadas pela RFLP como outras espécies, sendo que 1,5% (3) foram determinadas *A. caviae*, 2% (4) *A. media*, 0,5% (1) *A. jandaei* (não incluída nos resultados posteriores) e 0,5% (1) pertencente ao Grupo RC50, portanto 82% (41) das cepas estavam corretamente identificadas com o uso de métodos fenotípicos.

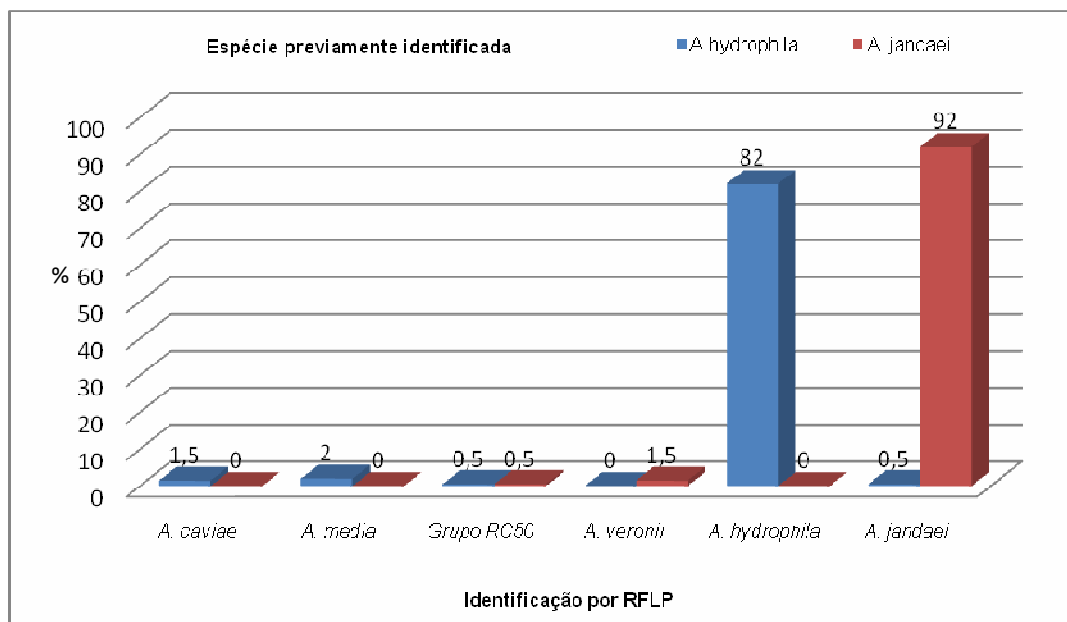


Figura 1. Porcentagem das cepas identificadas ao nível de espécie do gênero *Aeromonas* utilizando a técnica RFLP.

Na Figura 1 também pode-se verificar que das cepas de *A. jandaei*, 8% (4) foram identificadas como outras espécies, sendo 1,5% (3) *A. veronii* e 0,5% (1) pertencente ao Grupo RC50, somando assim um total de 92% (46) cepas identificadas corretamente pelos métodos fenotípicos.

Com base nestes resultados, um total de 87 cepas foi identificado como as espécies de interesse deste trabalho, portanto os resultados posteriores foram calculados utilizando-se um total de 87 cepas.

As enzimas utilizadas para restrição do gene 16S rDNA das cepas em estudo promoveram os cortes previstos (**Figura 2**) previamente descritos no Quadro 4 na seção Material e Métodos.

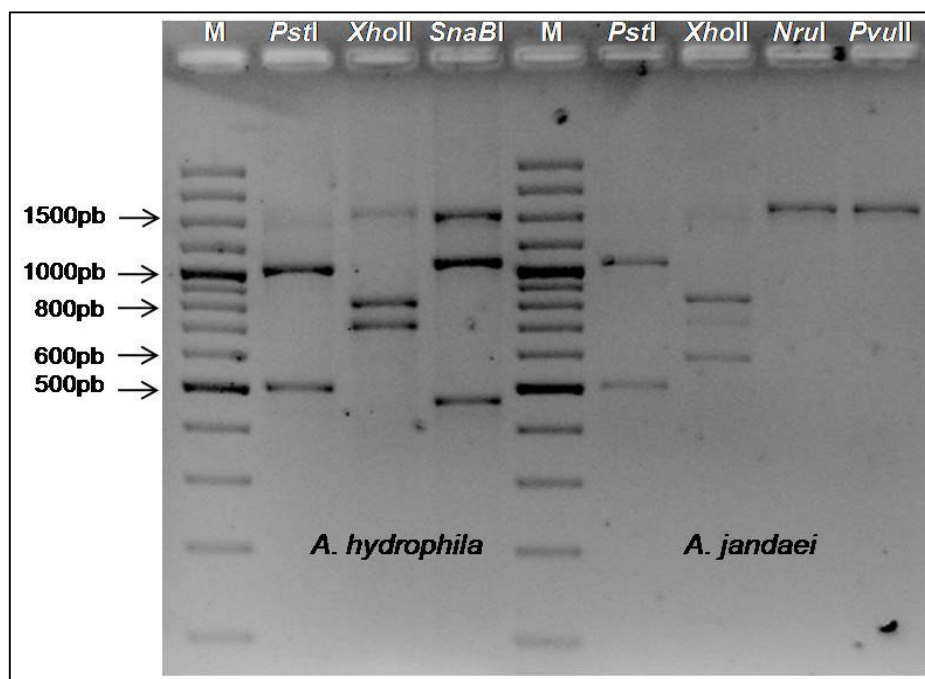


Figura 2. Gel de agarose 3% para visualização de fragmentos provenientes da restrição do gene 16S rDNA identificando duas cepas pertencentes à amostragem estudada ao nível de espécie.

5.2 OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Do total de cepas (87) analisadas 64,4% (56) apresentaram a ocorrência de pelo um dos genes pesquisados, sendo que 35,6% (31), 29,9% (26) e 46% (40) apresentaram, respectivamente, o complexo *act/aer/hlyA* e os genes *ast* e *alt*. Em relação às espécies estudadas, todas as cepas de *Aeromonas hydrophila* tiveram a presença de pelo menos um dos genes, sendo que 70,7% (29), 97,6% (40) e 26,8% (11) possuíam o complexo *act/aer/hlyA* e os genes *ast* e *alt*, respectivamente. Em relação à *Aeromonas jandaei*, 37% (17) das cepas possuíam pelo menos um dos genes, sendo que 4,4% (2), 0% (0) e 32,6% (15) foram positivas para o complexo *act/aer/hlyA* e os genes *ast* e *alt*, respectivamente (**Tabela 1**).

Tabela 1. Distribuição dos fatores de virulência isolados e em associação, baseados nas cepas positivas para pelo menos um gene.

| | Espécie (no. de cepas) | Localização | <i>act</i> [¥] | <i>ast</i> | <i>alt</i> | % |
|-----------------------------|--|---|-------------------------|------------|------------|------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 6, 7 [§] ; 12-16, 19*; 17, 20, 39-41, 43, 44 ^α ; 21 ^λ ; 23,24, 26, 29, 31 ^o (21) | ETE [§] , Caverna Santana*, Represa da Guarapiranga ^α , Caverna Água suja ^λ , Rio Tietê ^o | + | + | - | 51.2 |
| | 3 [§] (1) | ETE [§] | + | - | + | 2.4 |
| | 5 [§] ; 18*; 22, 27, 28 33 [§] ; 45-47 ^α (9) | ETE [§] , Caverna Santana*, Represa da Guarapiranga ^α , Rio Tietê ^o | - | + | - | 22.0 |
| | 38, 42, 50 (3) | Represa da Guarapiranga ^α | - | + | + | 7.3 |
| | 8 [§] ; 25, 30, 32 ^o ; 37, 48, 49 ^α (7) | ETE [§] , Caverna Santana*, Represa da Guarapiranga ^α , Rio Tietê ^o | + | + | + | 17.1 |
| <i>Aeromonas jandaei</i> | 96 ^α (1) | Represa da Guarapiranga ^α | + | - | - | 6.2 |
| | 94 ^α (1) | Represa da Guarapiranga ^α | + | - | + | 6.2 |
| | 52 ^ω ; 58, 71, 73, 75, 76,79, 84, 87, 90, 93, 95, 101, 103, 104 ^α (15) | Lago recreacional ^ω ; Represa da Guarapiranga ^α | - | - | + | 88.2 |

ETE[§]: Estação de Tratamento de Esgoto
 ¥ complexo *act/hlyB/aer*

Calculada a partir da quantidade de cepas positivas para pelo menos um dos genes, a ocorrência de mais de um gene na mesma cepa foi observada em 78,0% (32) das cepas de *A. hydrophila* e em 5,9% (1) das cepas de *A. jandaei*. Para *A. hydrophila* a combinação mais freqüente foi observada entre os genes *act* e *ast*, seguido do gene *ast* isolado e das combinações *act*, *ast* e *alt*; *act* e *alt*, para *A. jandaei* a única combinação encontrada foi dos genes *act* e *alt*, como pode ser observado na **Figura 3**.

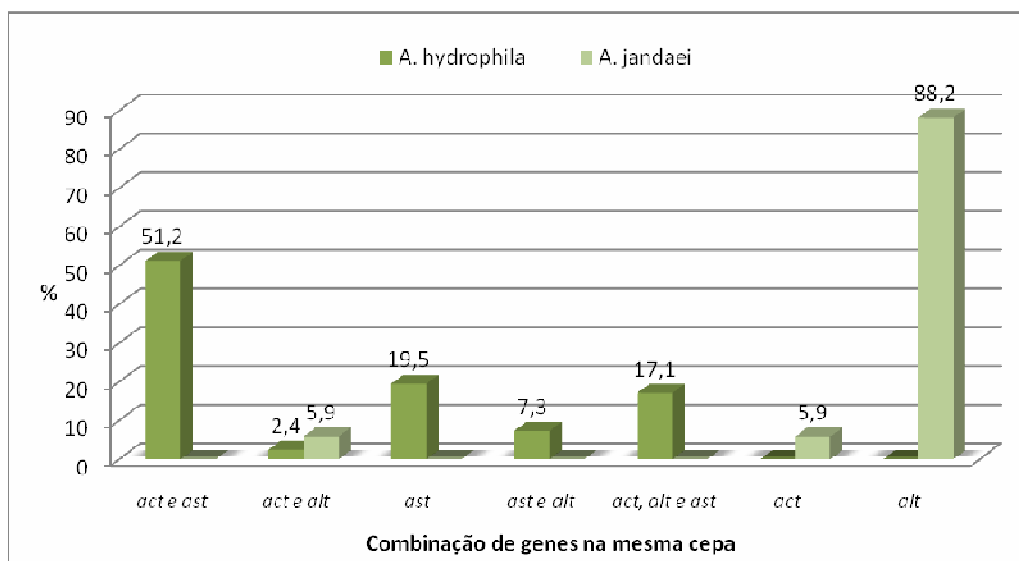


Figura 3. Distribuição da ocorrência de combinações de genes na mesma cepa. Porcentagem calculada de acordo com o número de cepas positivas para cada espécie.

O Programa BLAST permitiu a confirmação dos produtos amplificados seqüenciados quando feita a comparação com o banco de dados GenBank, mostrando a especificidade dos primers desenhados neste estudo, bem como do primer escolhido para detecção do gene *ast*. As seqüências encontradas neste trabalho estão disponíveis no GenBank através dos números de acesso EU849093 (*ast*), EU849094 e EU849095 (*alt*), EU849096 e EU849097 (*act/aer/hlyA*) **Figura 4**.

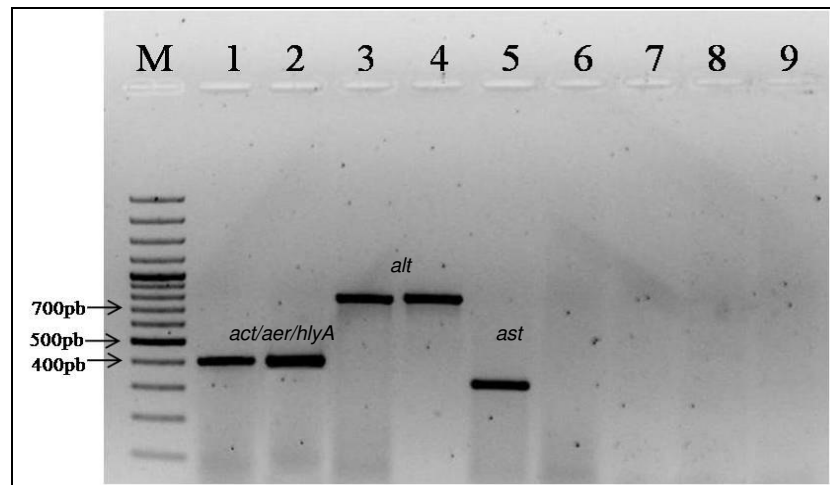


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos genes de virulência. Canaletas 1, 3 e 5, complexo *act/aer/hlyA* (EU849096), *alt* (EU849094) e *ast* (EU84909), respectivamente, de *A. hydrophila*. Canaletas 2, 4 e 6, complexo *act/aer/hlyA* (EU849097), *alt* (EU84909) e *ast*, respectivamente, de *A. jandaei*. Canaletas 7-9, *Escherichia coli* usada como controle negativo para os genes. M representa o marcador molecular: Gene ruler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

5.3 PRODUÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES E OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS

De acordo com os testes fenotípicos para detecção da produção de MBL foram determinados resistentes a IMP 36/41 (87,8%) e 5/46 (10,8%) dos isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, respectivamente. Resistência e produção de MBL somente para IMP foram verificadas em 5/41 (12,1%) e 1/46 (2,2%) dos isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, respectivamente (Figura 5).

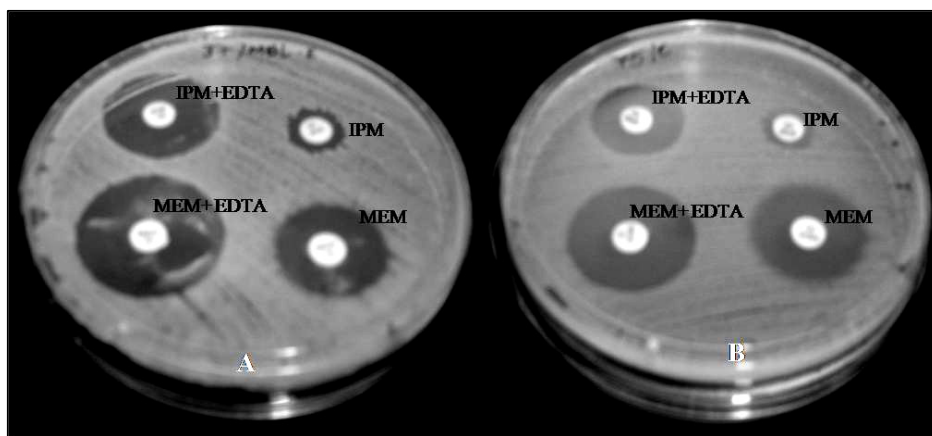


Figura 5. Detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase por meio da técnica de discos combinados. Discos contendo 10 μ g de Imipenem (IMP) e 10 μ g de Meropenem (MER) dispostos de 20 a 30mm dos discos contendo IMP+EDTA e MER+EDTA. Um aumento \geq 7mm na área ao redor do disco contendo antibiótico+inibidor foi considerado positivo para produção de MBL. Placa A: *Aeromonas hydrophila*. Placa B: *Aeromonas jandaei*.

Nenhuma das cepas apresentou resistência somente a MER, sendo que 75,6% e 8,7% das cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* respectivamente, apresentaram resistência aos dois antibióticos testados (Tabela 2). Em relação à utilização dos inibidores escolhidos, foi verificado que o TGA não é um inibidor apropriado para detecção da resistência em espécies do gênero *Aeromonas*, uma vez que o mesmo mostrou-se tóxico às cepas em estudo, impedindo que um resultado verdadeiro pudesse ser interpretado frente aos

antibiogramas. O EDTA 0,5M não demonstrou toxicidade frente às cepas testadas, portanto foi verificado ser um reagente apropriado para a detecção de cepas produtoras de metalo- β -lactamases. Sendo assim, os resultados acima apresentados referem-se somente a testes com a utilização de EDTA 0,5M.

Tabela 2. Caracterização de metalo- β -lactamases em isolados ambientais de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*

| Cepas | Resistência a carbapenems (%) | | | MBL screening (% isolados positivos) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------------|------|---------|--|-------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | | Ensaio de discos combinados ^a 0.5 mol l ⁻¹ EDTA | | PCR | | | |
| | IMP | MER | IMP/MER | + IPM | + MER | <i>cphA</i> | <i>bla</i> _{IMP} | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{SPM} |
| <i>A. hydrophila</i> (41) | 87.8 | 75.6 | 75.6 | 87.8 | 75.6 | 97.6 | - | - | - |
| <i>A. jandaei</i> (46) | 10.9 | 8.7 | 8.7 | 10.9 | 8.7 | 100 | - | - | - |

^a IMP, imipenem; MER, meropenem; EDTA, ethylenediamin tetraacetic acid; um aumento de ≥ 7 mm no diâmetro da zona de inibição na presença de EDTA, em comparação com o diâmetro do disco de imipenem e meropenem sozinhos, foi interpretado como resultado positivo.

Com relação à pesquisa dos genes de resistência nas cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, foi verificada a presença do gene *cphA* em 40/41 (97,5%) e 46/46 (100%), respectivamente. Sendo assim, para *A. hydrophila* 36 cepas expressaram a resistência e possuíam o gene *cphA*, 1 cepa não possuía o gene e não apresentou resistência aos antibióticos e 4 cepas apresentaram o gene porém não demonstraram resistência frente aos testes fenotípicos. Com relação a *A. jandaei* apenas 5 cepas das 46 que possuíam o gene, foram capazes de expressar resistência a carbapenems nos testes fenotípicos.

Nenhum dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM-1} foi encontrado (**Figura 6**). As seqüências referentes ao gene *cphA* encontram-se depositadas no GenBank sob os números de acesso: EU833973 a EU833982.

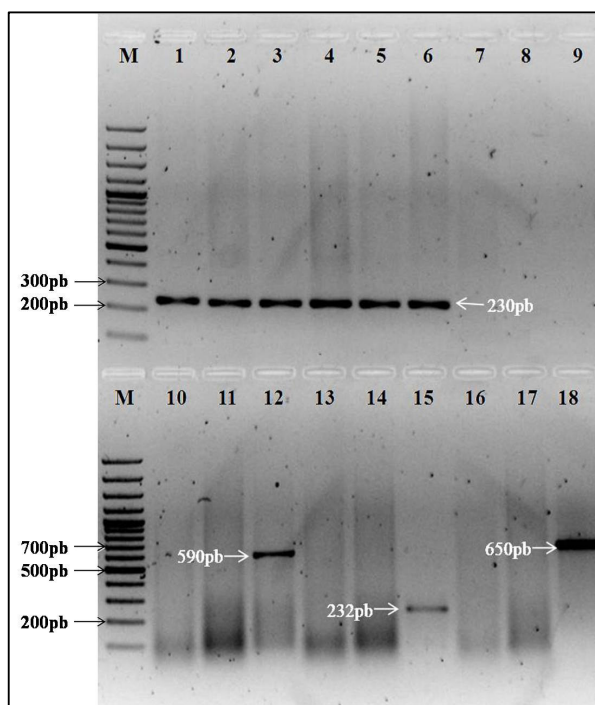


Figura 6. Gel de agarose dos produtos de PCR dos genes de resistência. Canaletas 1-3 (EU833973, EU833974 e EU833975) e 4-6 (EU833980, EU833981, EU833982) contêm produtos do gene *cphA* de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*, respectivamente. Canaletas 7-9 representam os controles negativos, *Vibrio cholera*, *Vibrio fluvialis* e *Escherichia coli*, respectivamente. Canaletas 10, 11, 13, 14, 16, 17 contêm cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* negativas para *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM-1}, respectivamente. Canaletas 12, 15, 18 controles positivos para *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM-1}, respectivamente. M é para marcador de peso molecular: Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).

Dez fragmentos referentes ao gene *cphA* (5 *A. hydrophila* e 5 *A. jandaei*), foram seqüenciados e confirmados pelo banco de dados GenBank utilizando o programa BLAST, determinando a compatibilidade dos fragmentos com proteínas e seqüências de nucleotídeos relacionadas com a metalo-β-lactamase CphA (**Figura 7**) e certificando a especificidade dos iniciadores desenvolvidos neste estudo para o gene *cphA*. Apesar de o alinhamento ter demonstrado algumas variações de nucleotídeos, quando as seqüências foram transformadas em proteína, essas mudanças foram irrelevantes.

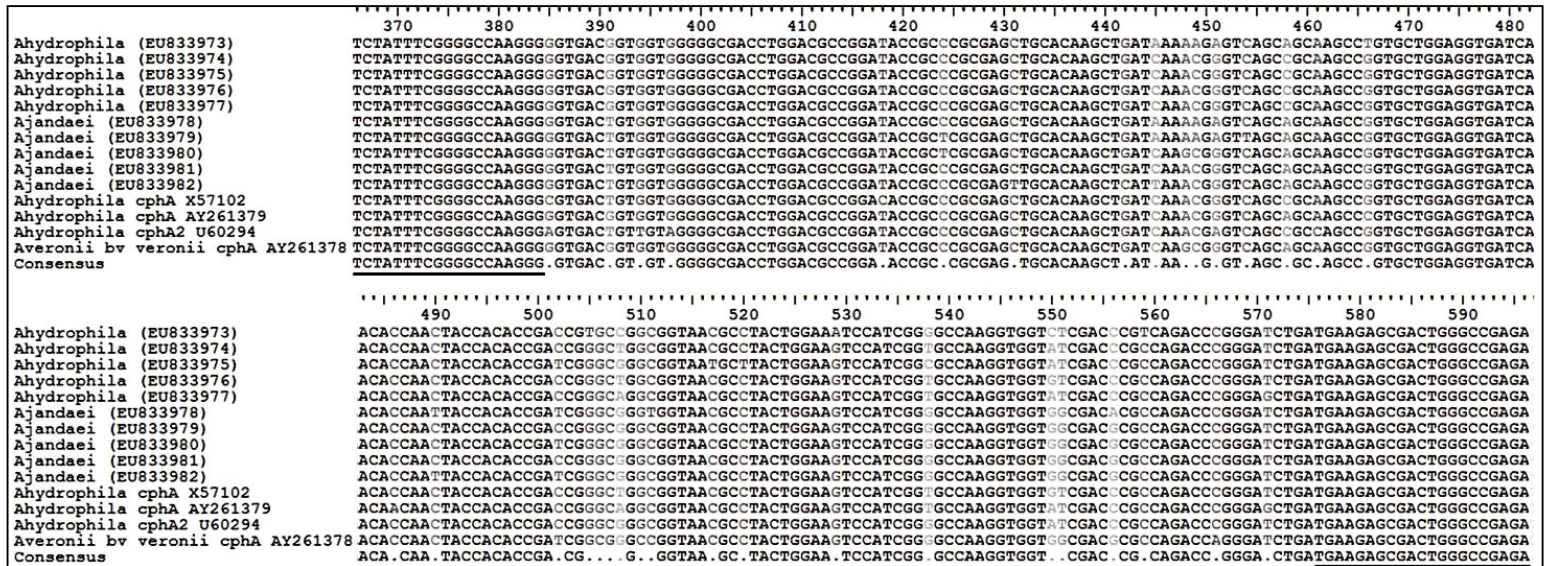


Figura 7: Alinhamento manual das seqüências obtidas a partir da amplificação do gene *cphA*. Sublinhado encontram-se as seqüências dos iniciadores desenhados neste estudo.

5.4 PRODUÇÃO DE ENZIMA AmpC E OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS

. Com base nos testes fenotípicos (**Figura 8**) foi observado que em relação às cepas de *A. hydrophila* 39/41 (95,1%) foram resistentes a FOX (Cefoxitina) e CTT (Cefotetan) e positivas para o teste de produção de enzima, com exceção de uma cepa que não apresentou tais resultados para FOX. Com relação à *Aeromonas jandaei* um total de 6/46 (13%) mostraram-se resistentes e positivas para a produção de enzima para ambos antibióticos testados. Observando a **Tabela 3** pode-se verificar a suscetibilidade das cepas aos antibióticos CTX, CAZ e CPD.

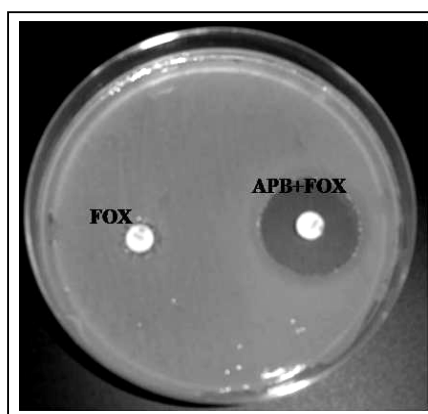


Figura 8. Detecção fenotípica da produção de AmpC utilizando a técnica de discos combinados. Discos contendo 30µg de cefoxitina (FOX) disposto de 20 a 30mm do disco contendo FOX+BA (APB: phenilboronic acid). Um aumento ≥ 5 mm na área ao redor do disco contendo antibiótico+inibidor foi considerado positivo para produção de AmpC.

Tabela 3. Caracterização de enzimas AmpC em isolados ambientais de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*

| Cepas | Resistência a | | | | | | AmpC screening (% isolados positivos) | | | |
|---------------------------|------------------------------|------|---------|---------------------------------|------|-----|---------------------------------------|-------|-------------|--------------------------|
| | cefamicinas ^a (%) | | | cefalosporinas ^c (%) | | | Ensaio de discos combinados | | PCR | |
| | CTT | FOX | CTT/FOX | CPD | CTX | CAZ | BA ^d | | <i>cepH</i> | <i>bla_{MOX}</i> |
| | | | | | | | + CTT | + FOX | | |
| <i>A. hydrophila</i> (41) | 95,1 | 92,6 | 95,1 | 80,5 | 83 | 54 | 95,1 | 92,6 | 73,1 | 39 |
| <i>A. jandaei</i> (46) | 13 | 13 | 13 | 10,9 | 10,9 | 6,5 | 13 | 13 | 0 | 0 |

^aCTT, cefotetan; FOX, cefoxitina; ^bcepas resistentes e intermediárias; ^cCPD, cefpodoxima; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; ^dBA, Ácido fenilborônico; um aumento de ≥ 5 mm no diâmetro da zona de inibição na presença de

BA, em comparação com o diâmetro do disco de CTT e FOX sozinhos, foi interpretado como resultado positivo.

Com relação à *A. hydrophila*, cepas resistentes 29/41 (70,7%) e intermediárias 4/41 (9,7%) a CTX apresentaram resistência a CTT e FOX, e das 8/41 (19,5%) cepas sensíveis a CTX, duas foram sensíveis às cefamicinas. Em relação à CAZ, as cepas resistentes 21/41 (51,2%) e intermediárias 1/41 (2,4%) apresentaram resistência a CTT e FOX, sendo que das cepas sensíveis a CAZ 19/41 (46,3%), duas eram sensíveis às cefamicinas. Para CPD todas as cepas resistentes 33/41 (80,5%) eram também resistentes a CTT e FOX, e para as cepas sensíveis a CPD 8/41 (19,5%) foi observado que duas eram sensíveis a CTT e FOX. A ocorrência da resistência a CTX, CAZ e CPD concomitantemente, foi observada em 19/41 (46,3%) das cepas. Para *A. jandaei*, as 5/46 (10,9%) resistentes à CTX eram também resistentes às cefamicinas testadas, enquanto que das 41/46 (89,1%) sensíveis a CTX apenas uma era resistente a CTT e FOX. Em relação à resistência a CAZ 3/46 (6,5%) também foram resistentes a CTT e FOX, sendo que das 43/46 (93,5%) sensíveis a CAZ, 3 foram resistentes às cefamicinas testadas. Para resistência a cefpodoxima 5/46 (10,9%) cepas também apresentaram resistência a CTT e FOX e das 41/46 (89,1%) cepas sensíveis a CPD apenas uma era resistente às cefamicinas.

Para as cepas de *A. hydrophila* a pesquisa pelos genes de resistência revelou que 30/41 (73,1%) dos isolados possuíam o gene *cepH* quando utilizados os iniciadores desenhados neste estudo, no entanto destes 30 isolados 16/41 (39%) também foram positivos quando amplificados com os iniciadores MOXM propostos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002); exceto por um isolado que foi positivo para MOXM e negativo para *cepH* (**Figura 9**).

Os genes do grupo *bla_{FOX}* não foram encontrados em nenhuma cepa de ambas as espécies. Também foi verificado que os iniciadores utilizados neste estudo não permitiram a amplificação dos genes em isolados de *A. jandaei*.

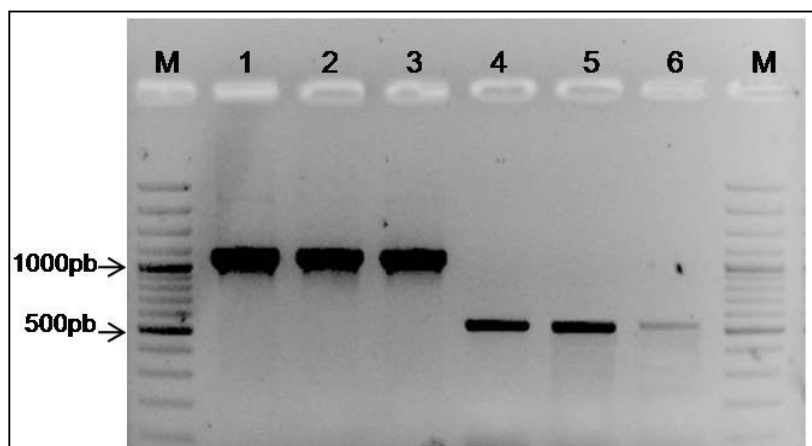


Figura 9. Gel de agarose demonstrando os fragmentos amplificados para o gene *cepH*, canaletas 1, 2 e 3; e fragmentos amplificados com iniciadores MOXM descritos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002), canaletas 4, 5 e 6. Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).

Com relação à produção de enzima e a ocorrência dos genes, foi verificado que das 39 cepas de *A. hydrophila* com resultado positivo no teste fenotípico, seis não apresentaram a ocorrência de nenhum dos genes primariamente pesquisados, *cepH*, MOXM e FOXM, portanto para essas cepas foi realizada a pesquisa para outros genes relacionados com a produção de AmpC e previamente descritos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002). Estas cepas não apresentaram resultado positivo para nenhum dos genes adicionais testados.

Ambos os fragmentos amplificados, MHM-237 (iniciadores MOXM - PÉREZ-PÉREZ et al., 2002) e MHM-243 (iniciadores propostos neste estudo) correspondem a variações do gene *cepH*, diferindo em quatro aminoácidos, quando comparados com a sequência do gene *cepH* de *A. hydrophila* (AJ276030) na **Figura 10**. Com base nas análises feitas a partir do dendrograma composto por seqüências de genes disponíveis no GenBank (**Quadro 10**) que conferem a produção de AmpC, pôde-se verificar que a seqüência MHM-243, está mais relacionada com o gene *cepH* quando comparada com outros genes (**Figura 11**).

| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
|-----------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CepH | GGQAHYFNYGLADMAAGKKVSEQT | LFEIGSVSKTYTATLGAYAVV | KGGIGLDDKVSRRHAPWLKGS | AFDGV | TMAELATYSAGGLELQFP | DEVESVEQMCQSYRQWTPAY | QPGSHRQYSNPSIGLFGHLAAS | SSLQCPFAQLMEQTLPLGLHHT | | | | | | | | |
| CepS |V.T.A..N..... |FK...Q..G..... |I..... |D.SDT.RA...H...P..A.TQ..... |ST.....A...E.. | | | | | | | | | | | |
| MHM-243 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MHM-237 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| blaMOX-1 | D.K.....V.NRES.AS..... | L.....AMQ...A..... | V..SI..G..... | E..D.S.K.RA...A.V.S..... | K.....M..... | | | | | | | | | | | |
| blaMOX-2 | D.K.....V..RERAVG..... | PL.....AMQ...A..... | SI..G..... | E..D.L.K..A.....S..... | MK..... | | | | | | | | | | | |
| blaMOX-2A | D.K.....V..RERAVG..... | PL.....AMQ...A..... | SI..G..... | E..D.L.K..A.....S..... | MK..X..C.LPERMRSASRR | | | | | | | | | | | |
| blaMOX-3 | D.K.....V..RERAVG..... | PL.....AMQ...A..... | SI..G..... | E..D.L.K..A.....S..... | K..... | | | | | | | | | | | |
| blaCAV-1 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...Q..... | H.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-1 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...Q..... | D.NDK.RT...H.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-2 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...H..... | D.NDK..T...S.S.V.PA.T..... | N..G...EK.S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-3 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FV...Q..... | L.....K.D.NDK..T...S.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-4 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...Q..... | D.NDK..T...S.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-5 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...Q..... | L.....D.NDK.RT...S.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-5b | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...C..... | L.....D.NDK.RT...S.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |
| blaFOX-7 | D.K.....V.NRES.QR..... | L.....A...FE...Q..... | D.NDK.RT...H.S.V.PA.T..... | N..G...E...S...K..... | | | | | | | | | | | | |

Figura 10. Alinhamento de aminoácidos referente aos genes cromossômicos de *Aeromonas* spp.(*cepH* e *cepS*), grupos *bla_{MOX}* e *bla_{FOX}* e às duas seqüências obtidas neste estudo, MHM-237 amplificada com iniciadores descritos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002) e MHM-243 obtida a partir dos iniciadores desenhados neste estudo.

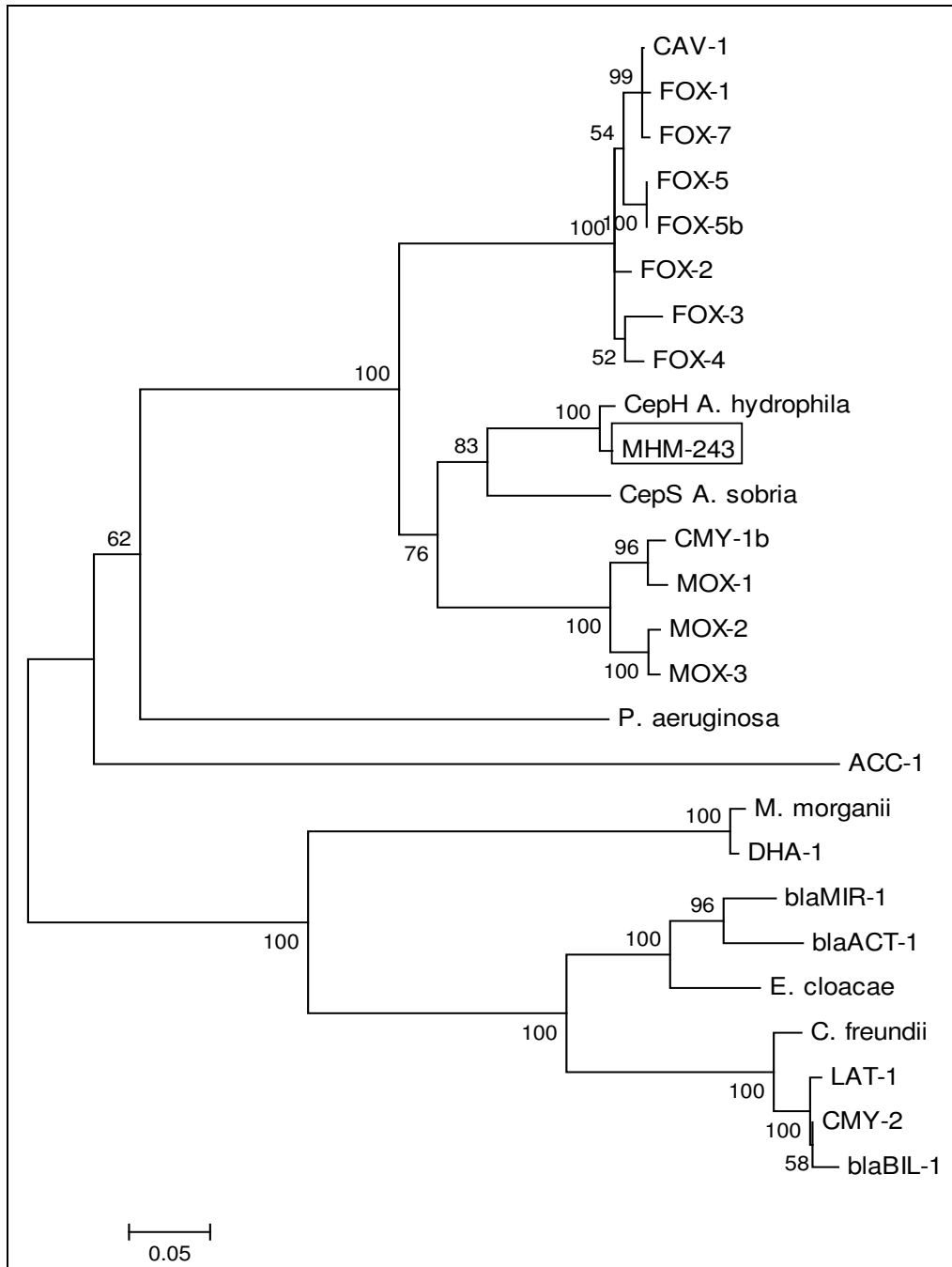


Figura 11. Dendrograma de cefalosporinas AmpC plasmidiais e cromossômicas. O dendrograma foi calculado com o programa *Mega* versão 4 (TAMURA et al., 2007) a partir do método Neighbor-Joining, utilizando Bootstrap de 1000. A distância dos traços corresponde às diferenças relativas de aminoácidos. Informações sobre as seqüências estão disponíveis no quadro a seguir.

Quadro 10. Dados das seqüências analisadas no dendrograma acima. Número de acesso, organismo, nome do gene e localização. Foi selecionado uma variante genética de cada grupo de genes AmpC, exceto pelos grupos mais próximos de *cepH*, os quais foram todos incluídos para construção do dendrograma.

| Número de acesso | Espécie | Gene | Localização |
|------------------|----------------------|------------------------------|-------------|
| AF373218 | <i>E. coli</i> | <i>bla</i> _{CMY-1b} | Plasmídio |
| DQ355981 | <i>E. coli</i> | <i>bla</i> _{CMY-2} | Plasmídio |
| X78117 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{LAT-1} | Plasmídio |
| M37839 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{MIR-1} | Plasmídio |
| X74512 | <i>E. coli</i> | <i>bla</i> _{BIL-1} | Plasmídio |
| U58495 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{ACT-1} | Plasmídio |
| EF406115 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{DHA-1} | Plasmídio |
| AJ133121 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{ACC-1} | Plasmídio |
| D13304 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{MOX-1} | Plasmídio |
| AJ276453 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{MOX-2} | Plasmídio |
| EU515248 | <i>Aeromonas</i> sp. | <i>bla</i> _{MOX-3} | * |
| X77455 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{FOX-1} | Plasmídio |
| Y10282 | <i>E. coli</i> | <i>bla</i> _{FOX-2} | Plasmídio |
| Y11068 | <i>K. oxytoca</i> | <i>bla</i> _{FOX-3} | Plasmídio |
| AJ277535 | <i>E. coli</i> | <i>bla</i> _{FOX-4} | Plasmídio |
| AY007369 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{FOX-5} | Plasmídio |
| AY034848 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{FOX-5b} | Plasmídio |
| AJ703796 | <i>E. cloacae</i> | <i>bla</i> _{FOX-7} | * |
| AF462690 | <i>A. caviae</i> | <i>bla</i> _{CAV-1} | Plasmídio |
| AJ276030 | <i>A. hydrophila</i> | <i>CepH</i> | Cromossomo |
| X80277 | <i>A. sobria</i> | <i>CepS</i> | Cromossomo |
| AF349570 | <i>C. freundii</i> | - | Cromossomo |
| AY125471 | <i>E. cloacae</i> | - | Cromossomo |
| AJ620362 | <i>M. morgani</i> | - | Cromossomo |
| AB198756 | <i>P. aeruginosa</i> | - | Cromossomo |

* Seqüências disponíveis no GenBank, porém os artigos referentes à estas seqüências ainda não foram publicados.

5.5 PRODUÇÃO DE ESBLs E OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS

A detecção de cepas produtoras de ESBLs foi realizada após a detecção da produção de enzimas AmpC, pois para cepas produtoras de AmpC foi realizada uma metodologia diferente, uma vez que este tipo de enzima pode impedir a detecção de ESBLs em testes fenotípicos.

Com base nos resultados encontrados foi possível observar que nenhuma cepa de *Aeromonas* apresentou resultado positivo para produção de ESBLs com os antibióticos testados, o que permite associar a resistência a cefotaxima, ceftazidima e cefpodoxima com a produção de enzima AmpC cromossômica.

Com relação à pesquisa por genes relacionados à produção de ESBLs, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, pôde-se verificar que os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} não ocorreram em nenhuma cepa, no entanto, foi observada a ocorrência do gene *bla*_{TEM} em 40/41 (97,6%) das cepas de *A. hydrophila* e em 39/46 (85%) das cepas de *A. jandaei* (**Figura 12**).

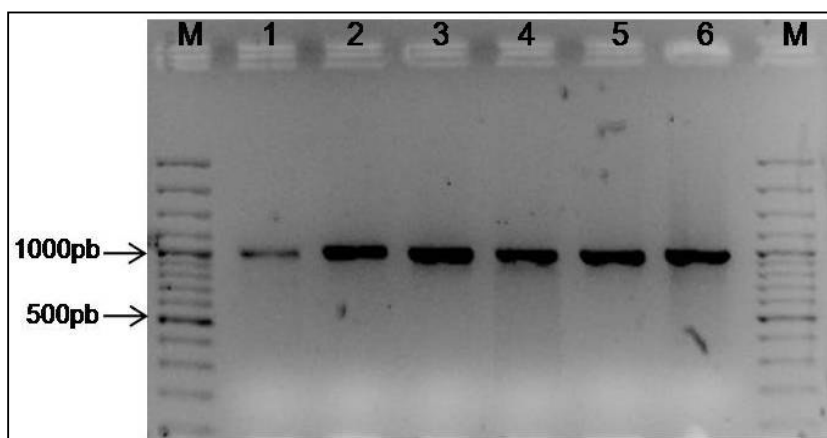


Figura 12. Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para o gene *bla*_{TEM}. Canaletas 1, 2 e 3 representando cepas de *A. hydrophila* (FJ767900, FJ767901 e FJ767902) e canaletas 4, 5 e 6 cepas de *A. jandaei* (FJ767907, FJ767908 e FJ767909). Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).

Para confirmação do gene *bla*_{TEM}, dez (5 *A. hydrophila* e 5 *A. jandaei*) produtos amplificados foram enviados ao seqüenciamento. Para escolha dos produtos a serem amplificados foi levado em consideração o local de

isolamento das cepas, diminuindo a probabilidade de ocorrência de cepas clonais. O seqüenciamento mostrou que os produtos de PCR correspondiam ao gene $bla_{TEM-116}$ (Genbank nº de acesso: FJ767900 a FJ767909), sendo observada 100% de similaridade com a seqüência de número de acesso AY903309 disponível no GenBank (**Figura 13**).

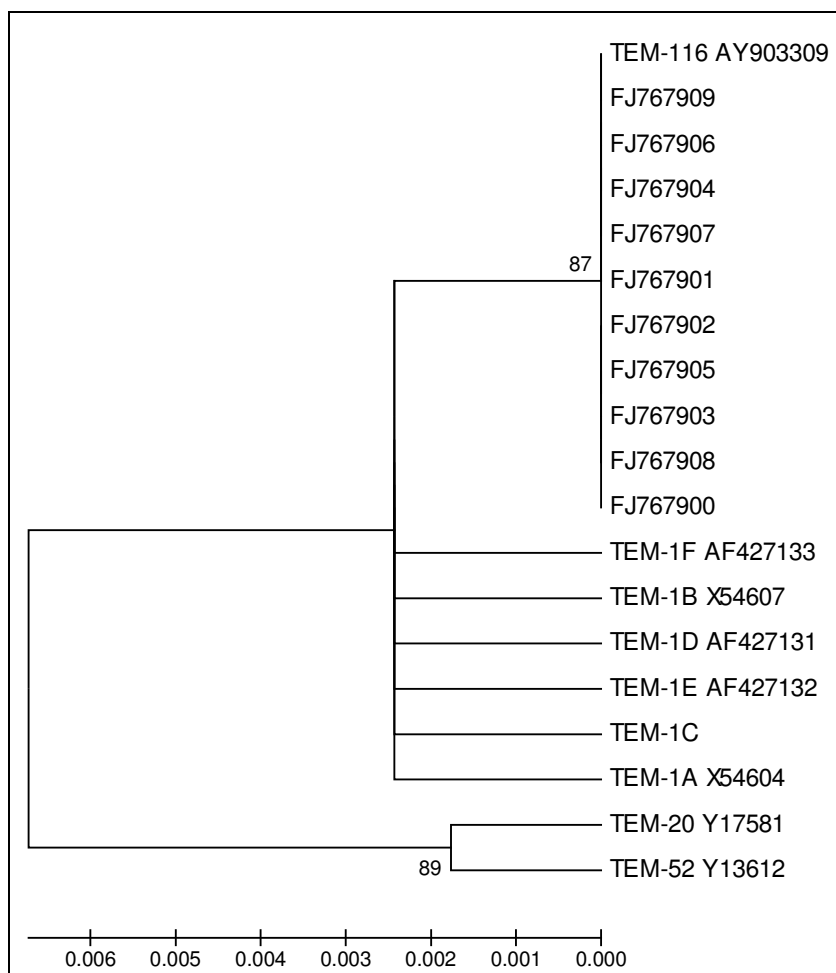


Figura 13. De acordo com as seqüências de aminoácidos, o dendrograma foi calculado com o programa *Mega* versão 4 (TAMURA et al., 2007) utilizando a análise de Neighbor-Joining, com Bootstrap de 1000. A distância entre os traços mostra as diferenças entre as seqüências. As variantes de bla_{TEM} foram escolhidas baseadas na similaridade com $bla_{TEM-116}$, (JEONG et al., 2004).

As cepas de *Aeromonas* positivas para o gene bla_{TEM} foram negativas para a presença de integron classe 1. Os testes fenotípicos de sinergismo indicaram que nenhuma cepa possui perfil ESBL.

5.6 OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS

As cepas de *Aeromonas* das espécies selecionadas foram submetidas à extração de plasmídio com uso de kit comercial. A partir dos resultados foi verificada a presença de plasmídio em 10/41 (24,4%) das cepas de *A. hydrophila* e em 16/46 (34,9%) das cepas de *A. jandaei*. O peso molecular dos plasmídios variou de 2,5kb a maiores que 23kb.

Também pôde ser observado que o kit utilizado não só extraiu DNA plasmidial, mas também DNA genômico (**Figura 14**), observando-se bandas na altura do 23000pb, tamanho que caracteriza o DNA genômico bacteriano.

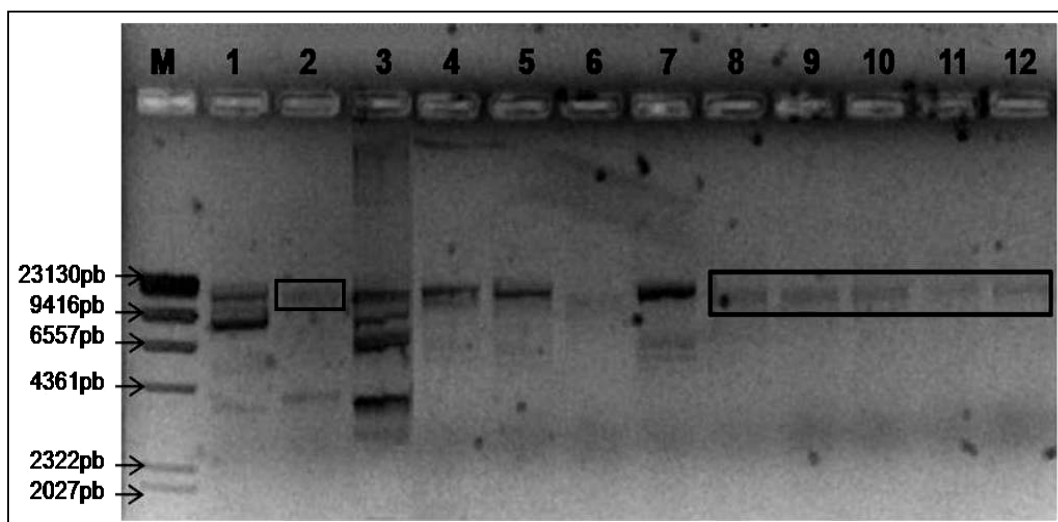


Figura 14. Canaletas 1 a 6 representam plasmídios de cepas de *A. jandaei* e canaletas 7 a 12 plasmídios de *A. hydrophila*. Em destaque pode-se observar o DNA genômico aproximadamente na altura de 23000pb. M – Lambda/DNA *Hind*III Marker (Fermentas).

6. DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Em 1986 COLWELL et al. propuseram a criação da Família *Aeromonadaceae*, pois até então as espécies do gênero faziam parte da Família *Vibrionaceae*, a qual possui muitas semelhanças fenotípicas com os membros do gênero *Aeromonas*, sendo freqüente a identificação de espécies de *Aeromonas* como membros do gênero *Vibrio* (ABBOTT et al., 2003; PARK et al., 2003).

Portanto, pela urgente necessidade em se detectar o gênero *Aeromonas* e suas espécies, estudos moleculares começaram a ser aplicados com o propósito de chegar a uma chave definitiva de identificação. Técnicas como DNA-DNA hibridização, RFLP, PCR e seqüenciamento passaram a fazer parte essencial na identificação do gênero, embora até agora nenhuma técnica tenha sido suficiente para diferenciar todas as espécies (ABBOTT et al., 1992, SOLER et al., 2003; ORMEN et al., 2005).

No presente trabalho foi utilizada a técnica desenvolvida por UEHARA (2008), a qual primeiramente tem como objetivo a identificação do gênero *Aeromonas* utilizando-se primers gênero-específicos e em seguida a identificação das espécies através da restrição da região conservada 16SrRNA.

O método de RFLP utilizado mostrou ser rápido, eficaz e prático, permitindo a identificação das espécies em estudo, bem como das que não se enquadraram nos objetivos propostos, sendo possível identificar 100% das cepas ao nível de gênero e espécie, sendo que nenhuma cepa foi negativa para o PCR do gênero e apenas 13% (13) das cepas foram identificadas como outras espécies, divergindo dos resultados obtidos a partir dos testes fenotípicos, assim como descrito por outros estudos previamente realizados (ABBOTT et al., 1992; FIGUERAS et al. 2000; ORMEN et al., 2005; SEN, 2005; GHATAK et al., 2007). É importante ainda

ressaltar que a metodologia utilizada neste estudo mostrou-se rápida, precisa e fácil de ser aplicada a uma grande quantidade de cepas.

Em estudo realizado por MARTÍNEZ-MURCIA (1999) foi observado que havia dificuldades na diferenciação de espécies muito similares quando utilizada a técnica de DNA-DNA hibridização, já que o gene 16S rRNA possuía poucas diferenças entre as espécies. Porém de acordo com o presente estudo, apesar das espécies do gênero apresentarem grande similaridade na região do 16S rRNA, a técnica de RFLP utilizada mostrou identificar as espécies baseando-se nas regiões de corte das enzimas, obtendo resultados confiáveis e precisos, assim como foi observado em outros estudos que também realizaram a identificação das espécies por meio da técnica de RFLP (FIGUERAS et al., 2000; ORMEN et al., 2005; GHATAK et al., 2007).

Um fato importante a ser destacado é que diferentemente do estudo realizado por BORRELL et al. (1997), no qual os autores concluíram que apesar da técnica de RFLP ser precisa, as enzimas utilizadas poderiam dificultar a interpretação dos resultados, uma vez que poderiam mostrar um perfil de até 6 bandas, o presente estudo obteve no máximo um perfil de 3 bandas, permitindo facilmente a discriminação das espécies.

As discrepâncias encontradas neste estudo, entre os testes bioquímicos e a RFLP podem ser explicadas pela ocorrência de cepas atípicas, ou seja, que apresentem características bioquímicas não comuns à espécie, conseqüentemente sendo erroneamente identificadas, é também por essa razão que testes moleculares devem ser indispensáveis na caracterização de espécies do gênero *Aeromonas* (ABBOTT et al., 2003; ESTEVE et al., 2003). Foi também observado em estudos prévios que os testes bioquímicos convencionais nem sempre correspondem aos resultados adquiridos por métodos moleculares e isso é particularmente evidente em isolados ambientais (ABBOTT et al., 1992, SOLER et al., 2003; ORMEN et al., 2005).

Estudos realizados por BORRELL et al. (1997), ABBOTT et al. (2003), ORMEN et al. (2005) corroboram com os resultados encontrados neste

trabalho, os quais demonstraram que cepas de *A. hydrophila* foram identificadas como outras espécies pela RFLP, entre elas *A. caviae*, *A. media*, *A. jandaei* e *Aeromonas* sp. RC50-nº de acesso AF037271, e entre as cepas de *A. jandaei* foram determinadas *A. veronii* e *Aeromonas* sp. RC50-nº de acesso AF037271. Estes resultados demonstram que os testes bioquímicos permitem uma classificação equivocada das cepas de *Aeromonas*, enfatizando a necessidade do uso de métodos moleculares na sua identificação.

6.2 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA

As evidências que tentam esclarecer o papel do gênero *Aeromonas* na causa de doenças, ainda são controversas. Desde 1961, quando a primeira cepa foi isolada de fezes humanas (LAUTROP 1961), o gênero vem sendo associado com a causa de diarreia e outras doenças, como infecções de ferida, doenças hepatobiliares e uma variedade de infecções extraintestinais (SEN e RODGERS, 2004; TENA et al., 2007).

Baixos níveis de cloro, alta quantidade de matéria orgânica ou a presença de biofilmes aumentam o número de *Aeromonas* spp. em água potável (FIGUERAS, 2005b), se tornando-se importante verificar a distribuição deste patógeno em ambientes aquáticos, bem como determinar o seu potencial patogênico.

Estudos descreveram a associação de *Aeromonas* spp. com doenças diarreicas levando em consideração a presença destes microrganismos em culturas puras ou como patógeno predominante em amostras fecais e a melhora do quadro clínico do indivíduo quando *Aeromonas* spp. deixaram de estar presentes nas fezes (KELLY et al., 1993; ABBOTT & JANDA, 1998; ALBERT et al., 2000; HOFER et al., 2006; WU et al., 2006).

A aplicação de métodos moleculares na identificação do gênero *Aeromonas* trouxe significantes avanços para a área. Estudos moleculares evolucionários contribuíram para esclarecer a emergência de patógenos bacterianos, assistindo no controle destes organismos encontrados no ambiente e alimentos, os quais estão associados com a transmissão de doenças, como é o caso do gênero *Aeromonas* (KINGOMBE et al., 1999; CONWAY e ROPER, 2000). Os métodos moleculares, como a PCR e o seqüenciamento tornaram possível a identificação de genes que codificam determinantes de virulência, os quais são responsáveis pelo potencial patogênico dos microrganismos (SCHRAG e WIENER, 1995; WASSENAAR, 2001).

Na literatura, um considerável número de estudos relacionados a fatores de virulência de *Aeromonas* spp. são caracterizados por realizar

metodologias clássicas, como a avaliação da enterotoxigenicidade em camundongos neonatos, detecção de citotoxicidade em células Vero e a detecção de β -hemólise em placas de Agar sangue (SINGH e SANYAL, 1997; FALCÃO et al. 1998; ALAVANDI & ANANTHAN, 2003; AWAN et al., 2006; OBI et al., 2007; RAZZOLINI et al., 2008). Apesar da grande quantidade de estudos que utilizam estas metodologias clássicas, o número de pesquisas que vêm aplicando métodos moleculares está aumentando consideravelmente e todas procuram alcançar um método rápido e específico, capaz de detectar determinantes genéticos de virulência. Infelizmente, a confusa nomenclatura da virulência em *Aeromonas* spp. vem se tornando um problema, já que cada estudo utiliza sua própria nomenclatura ou não enfatiza esta problemática na publicação.

KANNAN et al. (2001) verificaram a presença do gene aerolisina em cepas clínicas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei* e *A. trota* e encontraram o gene em todas as cepas estudadas. Comparando os *primers* utilizados pelos autores com as seqüências alinhadas no presente estudo, foi observado que esses *primers* não estavam presentes nas seqüências do gene aerolisina quando comparadas com o banco de dados GenBank utilizando-se o programa BLAST. Na verdade os *primers* usados por KANNAN et al. (2001) mostraram homologia com o gene de enterotoxina citotônica (*alt*), indicando que os produtos amplificados eram referentes ao gene *alt*. No presente trabalho o complexo *act/hlyB/aer* de *Aeromonas hydrophila* pode detectar os três fatores de virulência previamente descritos neste estudo.

Durante a execução do alinhamento das seqüências dos genes do complexo pode-se observar que as seqüências eram muito similares, portanto baseado nesta informação e na informação adquirida da literatura pode-se concluir que os três genes são responsáveis pela codificação do mesmo produto, sendo que ao longo dos anos os trabalhos científicos deram nomenclaturas diferentes para o mesmo gene. Sendo assim, a detecção dos genes para enterotoxina citotóxica, aerolisina e β -hemolisina foi confirmada utilizando-se o um único par de *primers*.

Pela análise das seqüências L77573 (CHOPRA et al. 1996), (MERINO et al. 1999) e CP000462 (SESHADRI et al. 2006), foi possível determinar que o gene *alt* descrito na seqüência L77573 é parte do gene da lipase AF092033. Devido às diferentes nomenclaturas e análises descritos na literatura foram considerados genes diferentes.

Para o presente estudo, 64,4% (56) das 87 cepas analisadas tiveram a ocorrência de pelo menos um dos genes de virulência e o complexo *act/aer/hlyA* foi encontrado em 35,6% dos isolados, sendo mais freqüente em cepas de *A. hydrophila* (70,7%). Estudos anteriores realizados também verificaram a presença dos genes *act*, *aerA* e *hlyA* em cepas de *A. hydrophila* provenientes tanto de amostras clínicas como ambientais (GRANUM et al., 1998; GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2002; ORMEN e OSTENSVIK, 2001; SEN e RODGERS, 2004; SINHA et al., 2004; WU et al., 2006). Estudos ainda demonstraram que a atividade hemolítica dos microrganismos do gênero *Aeromonas* está relacionada com a presença dos genes *hlyA* e *aerA* (HIRONO e AOKI, 1991; HEUZENROEDER et al., 1999; WANG et al., 2003; SEN e RODGERS, 2004).

O presente estudo revelou 97,6% de positividade para o *ast* em cepas de *A. hydrophila*, enquanto que todas as cepas de *A. jandaei* foram negativas, corroborando com o estudo de SEN e RODGERS (2004). Para o gene *alt* foi observado uma maior taxa de positividade entre as cepas de *A. jandaei* (29,9%), enquanto que SINHA et al. (2004) verificaram a presença de *alt* na única cepa de *A. jandaei* isolada no estudo. Em *A. hydrophila* verificou-se 26,8% de positividade para o gene *alt*, os quais se encontravam em associação com outro gene, dados que também foram encontrados nos estudos de SEN e RODGERS, 2004; SINHA et al., 2004 e WU et al., 2006.

De acordo com a literatura pesquisada este é o primeiro estudo que detecta a ocorrência do complexo *act/hlyB/aer* em um alto número de cepas positivas para *alt* em *A. jandaei*. Poucas pesquisas incluíram a espécie na pesquisa para marcadores genéticos de virulência e sua participação na causa de doenças em humanos ainda é controversa. Ainda assim alguns autores enfatizarem sua importância para a saúde pública e sua capacidade

de produzir fatores de virulência (HSU et al., 1981; SINGH e SANYAL, 1997; ESTEVE et al., 2003; LONGA et al., 2005).

No presente estudo foi observado que o gene *ast* não ocorreu em nenhuma das cepas de *A. jandaei*, isto pode ser explicado pelo fato de não existirem muitos estudos de virulência com esta espécie e, portanto pouco se sabe sobre as características genotípicas de seus fatores de virulência, sendo possível que o primer utilizado não seja capaz de amplificar o gene *ast* de *A. jandaei*. No entanto, apesar do uso de seqüências dos genes de *Aeromonas hydrophila* para o desenho dos iniciadores do complexo *act/hlyB/aer*, duas cepas de *A. jandaei* apresentaram o produto de amplificação esperado. Com base nesta informação, pode-se inferir que estes iniciadores também podem ser usados para o complexo em outras espécies.

As cepas analisadas no presente estudo são provenientes de ambientes aquáticos e a porcentagem de cepas positivas para os genes de virulência encontrados aumenta a preocupação sobre a ocorrência destas espécies no ambiente, uma vez que diversos estudos relatam o potencial patogênico de cepas ambientais (SINGH e SANYAL, 1992; GRANUM et al., 1998; GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2002; SEN e RODGERS, 2004; AWAN et al., 2006; SEN e LYE, 2007).

A combinação desses determinantes genéticos podem demonstrar o potencial patogênico das espécies do gênero *Aeromonas*, como encontrado por ALBERT et al. (2000), cepas com a presença de *ast* e *alt* estavam associadas com fezes aquosas, já que essa combinação foi mais freqüente em amostras clínicas do que em ambientais, já o gene *act* foi relacionado com a ocorrência de diarreia sanguinolenta, os autores também observaram que o gene sempre foi encontrado em associação com *alt* ou *ast*, assim como foi observado no presente estudo, com exceção de uma cepa de *A. jandaei*.

Ao longo dos anos diversos estudos vêm associando o gênero *Aeromonas* com a causa de doenças em humanos (SINGH e SANYAL, 1992; KELLY et al., 1993; CHOPRA et al., 1994; ALBERT et al., 2000;

WANG et. al., 2003; HOFER et al.,2006; RAZZOLLINI et al., 2008) e pela ampla distribuição desses microrganismos torna-se essencial o monitoramento destes patógenos em amostras ambientais, atentando também para a pesquisa de genes de virulência, os quais podem determinar o potencial patogênico do gênero. Para a realização deste monitoramento é necessário a utilização de uma metodologia rápida e específica, capaz de detectar uma variedade de determinantes genéticos num só procedimento, como a proposta feita no presente estudo. Também é possível propor a utilização desta metodologia para aplicação em cepas clínicas de *Aeromonas* uma vez que os genes encontrados nas cepas ambientais deste estudo são os mesmo encontrados em cepas clínicas como descrito nos estudos realizados por ALBERT et al., 2000, SINHA et al., 2004 e WU et al., 2006.

6.3 PESQUISA DE METALO-B-LACTAMASES

Antibióticos β -lactâmicos são drogas que ainda obtêm sucesso no tratamento terapêutico de infecções bacterianas, porém a produção de metalo- β -lactamases está entre os diversos mecanismos que as bactérias possuem para escapar da ação dos antimicrobianos. Estas enzimas foram encontradas em diversas espécies patogênicas responsáveis por infecções em humanos e são codificadas por genes localizados no cromossomo ou por transferência horizontal entre as bactérias. As primeiras metalo- β -lactamases detectadas e estudadas foram aquelas codificadas cromossomicamente em bactérias como *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia* (QUEENAN e BUSH, 2007; ABRIATA et al., 2008; NAUTON et al., 2008).

A ocorrência de metalo- β -lactamases no gênero *Aeromonas* é pouco documentada na literatura e os estudos que caracterizam a suscetibilidade do gênero falham ao usar uma metodologia que não demonstra a real resistência destes microrganismos (OVERMAN e JANDA 1999; PALÚ et al., 2006; CEYLAN et al., 2008), uma vez que para verificação da mesma é necessária a ativação do mecanismo de resistência por meio da indução com o uso de antibióticos, revelando assim o verdadeiro padrão de suscetibilidade das cepas avaliadas.

No presente trabalho, a análise de diversos estudos já descritos permitiu a seleção de uma metodologia capaz de detectar fenotípica e genotipicamente a presença de resistência a carbapenems em cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*.

O gênero *Aeromonas* possui um gene codificador de uma metalo- β -lactamase localizado no cromossomo, denominada CphA, a qual sob pressão seletiva de certos antibióticos pode ser expressa em cepas mutantes de certas espécies do gênero (IACONIS e SANDERS, 1990; KO et al., 1998). No entanto, o mecanismo responsável pela ativação da produção desta MBL, codificada pelo gene *cphA*, ainda não foi totalmente elucidado (AVISON et al., 2004).

Os métodos de *screening* convencionais não conseguem detectar a resistência nos organismos do gênero *Aeromonas*. De fato, inclusive o Etest, um dos métodos mais recentemente desenvolvidos e visto como um dos mais práticos e conclusivos falhou em detectar a presença de MBLs em cepas de *Aeromonas* spp. mesmo após a confirmação da produção da enzima por meio de testes *in vitro* e testes genotípicos (WALSH et al., 2002). Sendo assim, de acordo com metodologias previamente testadas, o uso de EDTA como inibidor e/ou o PCR são as estratégias mais recomendadas para detecção cromossômica da produção de MBLs em *Aeromonas* spp (ROSSOLINI et al., 1995; WALSH et al., 1996).

ROSSOLINI et al. (1995) descreveram a pesquisa do genes *cphA* por meio de sondas de hibridização. O gene foi encontrado na maioria das cepas produtoras de MBL, e não houve detecção do mesmo nas cepas não-produtoras. No entanto, outros estudos relatam a ocorrência do gene mesmo em cepas não-produtoras de MBL (MASSIDA et al., 1991; ROSSOLINI et al., 1995; WALSH et al., 1998). Estes resultados corroboram com o presente estudo, indicando a presença de um sistema regulador responsável pela expressão do gene *cphA*. Sendo assim, pode-se inferir que o gene pode ser encontrado em cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, no entanto nem todas são capazes de expressar a resistência.

Estudos também demonstraram a descoberta de outros genes relacionados com o *cphA*, como é o caso do *cphA2*, o qual foi encontrado em *A. hydrophila*. Genes homólogos também foram encontrados em *A. veronii*, *A. caviae* e *A. jandaei*, sugerindo a ocorrência de genes homólogos dentre as espécies do gênero (MASSIDA et al., 1991; ROSSOLINI et al., 1995; RASMUSSEN e BUSH, 1997).

A ocorrência de seqüências homólogas ao gene *cphA* pode dificultar sua detecção molecular, portanto é importante o desenvolvimento de uma técnica capaz de detectar todas as variantes do gene. No presente estudo o seqüenciamento de um fragmento de aproximadamente 230pb foi suficiente para determinar a similaridade das seqüências amplificadas com os genes alinhados manualmente.

Alguns estudos pesquisaram a presença do gene *cphA* em cepas de *Aeromonas*, mas o gene não foi encontrado na maioria das cepas (HENRIQUES et al., 2006b; TALAVERA et al., 2006), sugerindo a ocorrência de variantes do gene *cphA* ainda desconhecidas. Com o uso de iniciadores criados a partir de seqüências das variações do gene *cphA* disponíveis no GenBank, o presente estudo detectou uma maior quantidade de cepas positivas para o gene.

Apesar da atividade enzimática contra os carbapenems ser restrita a cepas carreadoras de genes *cphA* e suas variantes, os genes *bla*_{IMP-19} e *bla*_{VIM-4}, associados à integrons e que conferem resistência a carbapenems foram recentemente identificados em *A. caviae* e *A. hydrophila*, respectivamente (NEUWIRTH et al., 2007; LIBISCH et al., 2008). No presente estudo os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM-1}, também associados à produção de MBL não foram encontrados em nenhuma das cepas analisadas. HENRIQUES et al. (2006b) pesquisaram diversos genes associados à produção de β -lactamases em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de ambiente, dentre os quais também não foram encontrados os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. Até o presente momento, não se conhece outros estudos que tenham pesquisado *bla*_{SPM-1} em cepas de *Aeromonas*.

Sendo assim, os resultados aqui apresentados indicam que o gene *cphA* aparenta ser intrínseco em cepas ambientais de *A. hydrophila* e *A. jandaei* no Brasil, apesar de nem todas as cepas serem capazes de expressar atividade enzimática contra carbapenems. Baseado nos achados deste estudo pode-se sugerir a aplicação da metodologia utilizada para identificar a presença do gene *cphA* e a produção de MBL, colaborando assim para a vigilância destes genes já definidos como um risco para a saúde humana.

6.4 PESQUISA DE ENZIMAS DO TIPO AmpC

A classe C de β -lactamases era inicialmente estrita a cromossomos de certas bactérias Gram-negativas, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas* spp. (LINDBERG e NORMARK, 1986; GALLENi et al., 1988; LODGE et al., 1990; WALSH et al., 1995a; BARNAUD et al., 1997), mas desde o final dos anos 80 a disseminação de plasmídios, carreando genes relacionados à produção de enzimas AmpC, vêm espalhando mundialmente este tipo de resistência (DOI e PATERSON, 2007).

A presença destas enzimas confere à bactéria resistência à maioria dos β -lactâmicos e seus inibidores, incluindo cefamicinas. Apesar de geneticamente diversa, a produção de β -lactamases cromossômica ou plasmidial pode ser inferida em testes de suscetibilidade. Cepas resistentes a cefamicinas e β -lactâmicos de 3ª geração, como a ceftazidima, são normalmente um indicativo de produção de AmpC (LIVERMORE et al., 2001; DOI e PATERSON, 2007). Sendo assim os resultados encontrados indicam a presença de AmpC já que grande porcentagem das cepas analisadas também apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos de 3ª geração testados, cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e cefpodoxima (CPD).

No presente estudo algumas cepas foram resistentes a cefamicinas e sensíveis β -lactâmicos de 3ª geração, DOI e PATERSON (2007) afirmam que a detecção destas cepas pode ocorrer quando *breakpoints* convencionais do CLSI são usados e LIVERMORE et al. (2001) explicam que esta característica ocorre quando as cepas possuem enzima AmpC induzida.

Estudos que analisaram isolados clínicos mostraram que a quase 100% das cepas de *Aeromonas* eram suscetíveis a ceftazidima ou cefotaxima (KO et al., 1996; OVERMAN et al., 1999). Somente em estudo realizado por PALÚ et al., (2006) foram encontradas cepas clínicas de *Aeromonas* apresentando resistência a cefotaxima e ceftazidima, já as cepas provenientes de alface fresca analisadas no estudo foram sensíveis a estes antibióticos. O estudo realizado por KOKSAL et al. (2007),

encontraram, assim como no presente estudo, cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras de água, resistentes a ceftazidima e cefotaxima, utilizando a técnica de disco-duplo.

No presente trabalho a detecção de enzimas AmpC por meio da técnica de discos combinados, utilizando como inibidor o Ácido Fenilborônico, mostrou ser eficiente, detectando a presença de AmpC em todas as cepas que continham genes relacionados e em 6 cepas negativas na PCR para presença dos genes estudados. Outros estudos também descrevem a eficácia de ácidos borônicos na detecção de AmpC (COUDRON et al., 2005; SONG et al., 2007; TAN et al., 2007; JEONG et al., 2008).

Com relação aos resultados obtidos, a ocorrência de 95,1% e 13% de cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, produtoras de enzima AmpC, respectivamente, confirmam os estudos realizados anteriormente, os quais descrevem algumas espécies do gênero *Aeromonas* como portadoras cromossômicas de genes codificadores não só de enzimas AmpC, mas também de metalo- β -lactamases (BAKKEN et al., 1988; IACONIS et al., 1990; KO et al., 1998; WALSH et al., 1995a).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, pôde-se notar que a maioria dos trabalhos que envolvem estudos de resistência no gênero *Aeromonas*, visam esclarecer o mecanismo de funcionamento desta resistência (WALSH et al., 1995a; AVISON et al., 2000; NIUMSUP et al., 2003), portanto torna-se escassa a ocorrência de trabalhos sobre a distribuição de genes relacionados à resistência do gênero ou mesmo a padronização de técnica para detecção fenotípica em isolados de *Aeromonas*.

Sendo assim, com relação à pesquisa de genes relacionados com a produção de AmpC, pode-se observar que existem poucos estudos que direcionam esta pesquisa a microrganismos do gênero *Aeromonas*. No presente trabalho pôde-se observar que os iniciadores desenvolvidos neste estudo foram capazes de amplificar o gene *cepH* em 24 das 39 cepas positivas para o teste fenotípico, sendo que destas observou-se também em 16 cepas a amplificação do gene com os iniciadores MOXM descritos por

PÉREZ-PÉREZ et al. (2002). Este resultado confirma a conclusão dos autores, os quais afirmaram que os iniciadores MOXM podem amplificar genes de AmpC em organismos que os carregam cromossomicamente.

O fato de uma única cepa apresentar amplificação somente com iniciadores descritos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002) permite levantar a questão de que existem variações nas seqüências do gene *cepH* nas espécies de *Aeromonas*. Este fato pode explicar o porquê nenhuma cepa de *A. jandaei* e 6 cepas de *A. hydrophila* não apresentarem resultado positivo para amplificação do gene, mesmo constando positividade no teste fenotípico, dados que também foram obtidos por WALSH et al. (1997) a partir de estudos com hibridização.

O seqüenciamento de um fragmento de aproximadamente 480pb (MHM-237) amplificado com iniciadores usados por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002) permitiu observar grande similaridade do fragmento com o gene *cepH* (**Figura 13**). Também se observou que o fragmento MHM-243 obtido com os iniciadores propostos no presente estudo refere-se ao gene *cepH* de acordo com a **Figura 14** apresentada em Resultados.

FOSSE et al. (2003) descreveram o gene CAV-1 em *Aeromonas caviae*, e de acordo com a análise da seqüências de aminoácidos do grupo FOX e do gene encontrado, os autores puderam inferir que CAV-1 seria um possível ancestral para o grupo de genes FOX da classe C de cefalosporinases, fato que também foi verificado na análise do dendrograma proposto no presente estudo. Dendrograma este, que se assemelha em sua disposição com aquele proposto em estudo realizado por DOI et al. (2002), ao encontrarem uma nova cefalosporinase (CMY-9) em *Escherichia coli*.

O gênero *Aeromonas* ainda é pouco estudado no meio clínico, porém os resultados indicam que cepas ambientais podem ser induzidas à produção de enzima AmpC *in vitro* o que pode significar uma preocupação no tratamento de infecções causadas por espécies do gênero, principalmente pela fato de que *A. hydrophila*, a espécie mais relacionada com casos clínicos, apresentou maior número de cepas resistentes aos antibióticos testados.

6.5 PESQUISA DE ESBLs

A ocorrência de cepas de *Aeromonas* produtoras de ESBLs é raramente relatada na literatura (RODRÍGEZ et al., 2005), sendo poucos os estudos que visam determinar a presença dessas enzimas no gênero, bem como detectar os genes associados a este tipo de resistência. No presente estudo foi verificada a ausência da produção de beta-lactamases de espectro estendido nas cepas de *Aeromonas* estudadas. A ausência dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} foi verificada em todas as cepas. Pôde-se detectar o gene *bla*_{TEM-like} na maioria das cepas estudadas e a variante *bla*_{TEM-116} nos fragmentos seqüenciados de 10 cepas, envolvendo ambas as espécies.

Apesar das ESBLs serem mais freqüentemente relatadas em *K. pneumoniae* e *E. coli*, estas enzimas também foram encontradas em outras espécies bacterianas, como *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas* spp., entre outras (RADICE et al., 2002; PFALLER e SEGRETI, 2006; KOLAR et al., 2006).

Em estudo realizado por HENRIQUES et al. (2006b), os autores determinaram a distribuição dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} em cepas ambientais de *Aeromonas*, encontrando apenas 1 cepa positiva para *bla*_{SHV} e nenhuma para *bla*_{CTX-M}, informação que relata a pouca ocorrência desses genes dentro do gênero *Aeromonas*, fato que suporta os dados encontrados no presente trabalho. Neste mesmo estudo os autores detectaram a presença do gene *bla*_{TEM-1} em duas cepas de *Aeromonas*. Outro estudo realizado recentemente por PICÃO et al. (2008) verificou a presença do gene *bla*_{PER-1} em uma cepa de *Aeromonas media* isolada de amostra de água e caracterizada por apresentar produção de ESBL.

Nos estudos realizados por MARCHANDIN et al. (2003) e FOSSE et al. (2004), puderam observar a transferência *in vivo* do gene *bla*_{TEM-24} de *Enterobacter aerogenes* para *Aeromonas hydrophila*, na qual foi constatada a produção de ESBL pela cepa de *Aeromonas*, demonstrando a potencial disseminação de genes *bla*_{TEM} em cepas de *Aeromonas*. Em estudo prévio SAYEED et al. (2006) descreveram uma cepa de *A. caviae* carreadora de

plasmídeo com a presença do gene *bla*_{TEM-12}, no entanto a ESBL só passou a ser expressa após a transferência deste plasmídeo para *Escherichia coli* K12, o que mostra a possibilidade do gene estar presente em cepas de *Aeromonas*, porém não expressar ESBL, como é o caso das cepas estudadas no presente trabalho. Essa expressão pode estar relacionada com o tipo de promotor que antecede a seqüência do gene *bla*_{TEM} e regula a intensidade da expressão (LARTIGUE et al., 2002; TRISTRAM et al., 2005; ENNE et al., 2006).

Em estudo realizado por JEONG et al. (2004), os autores verificaram que a variante *bla*_{TEM-116} possui duas substituições de aminoácidos quando comparada à *bla*_{TEM-1}. Neste mesmo estudo os autores puderam verificar que *bla*_{TEM-116} conferiu a produção de ESBL às cepas estudadas. Este resultado demonstra mais uma indicação de que possivelmente a produção das β-lactamases esteja relacionada à presença de um promotor que possibilite a expressão do gene.

Estudos mostram que genes *bla*_{TEM} podem estar localizados no cromossomo bacteriano desde que inseridos em transposons. DUBOIS et al. (2002) relataram a ocorrência de *bla*_{TEM-21} em transposon localizado cromossomicamente em *Pseudomonas aeruginosa*. NAAS et al. (2003) demonstraram a ocorrência do gene *bla*_{TEM-67} em um transposon de *Proteus mirabilis*, posteriormente os autores verificaram a integração deste transposon em cromossomo de *Escherichia coli* e recentemente, CHOUCANI et al. (2007) descreveram a ocorrência do gene *bla*_{TEM-15} em transposon localizado no cromossomo de uma cepa de *Escherichia coli* isolada amostra clínica.

A presença de integrons de classe 1 relacionados ao gene *bla*_{TEM} não foi detectada no presente estudo. No entanto, estudos já demonstraram a ocorrência de integrons associados a outros genes em cepas de *Aeromonas* (SCHMIDT et al., 2001; BARLOW et al., 2004; POOLE et al., 2006; JACOBS et al., 2007; LEE et al., 2008).

Segundo LIVERMORE (2008) é provável que todas as β-lactamases tenham origem cromossômica, no entanto os organismos que deram origem

para a maioria dos tipos de β -lactamases ainda são desconhecidos. Diversos estudos já demonstraram a associação evolutiva do gene cromossômico *cepH* de *Aeromonas* com genes AmpC disseminados por plasmídios (DOI et al., 2002; FOSSE et al., 2003). De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, pode-se inferir que os microrganismos do gênero *Aeromonas* sejam reservatório de genes *bla*_{TEM}, no entanto para esclarecimento do mecanismo de expressão destes genes em *Aeromonas* são necessários estudos mais aprofundados, assim como se faz necessária a pesquisa por elementos móveis, como transposons, responsáveis pela disseminação desses genes.

6.6 OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS

Os plasmídios podem carrear uma variedade de genes, tanto relacionados a fatores de virulência quanto a fatores de resistência (MECSAS e STRAUSS, 1996; LEVIN e BERGSTROM, 2000), no entanto para organismos do gênero *Aeromonas* estudos determinaram que a ocorrência de fatores como enterotoxinas e hemolisinas não estão associados com plasmídios (CUMBERBATCH et al., 1976; FALCÃO et al., 1998; ALAVANDI et al., 2003), como pôde ser observado no presente trabalho.

Estudos demonstraram a ocorrência de genes de resistência associados com plasmídios em espécies do gênero *Aeromonas*. Para a classe de enzimas metalo- β -lactamases os genes *bla*_{IMP-19} e *bla*_{VIM-4}, associados à integrons e plasmídios foram recentemente identificados em *A. caviae* e *A. hydrophila*, respectivamente (NEUWIRTH et al., 2007; LIBISCH et al., 2008), no entanto no presente trabalho, dos genes pesquisados para metalo- β -lactamases foi encontrado apenas o gene *cphA*, o qual ocorre de maneira constitutiva no gênero *Aeromonas* (MASSIDA et al., 1991; ROSSOLINI et al., 1995; WALSH et al., 1998).

Com relação à ocorrência de genes relacionados com a produção de enzimas AmpC, apenas um estudo relata a ocorrência plasmidial de um gene denominado CAV-1 em *Aeromonas caviae*, o qual possui considerável similaridade genética com genes do grupo FOX (FOSSE et al., 2003). A maioria dos estudos demonstra a ocorrência do gene *cepH*, responsável pela produção de enzimas AmpC em *Aeromonas* spp. e que assim como o gene *cphA* ocorre de maneira constitutiva (WALSH et al., 1995a; AVISON et al., 2000; NIUMSUP et al., 2003).

Genes plasmidiais relacionados com a produção de ESBLs em *Aeromonas* foram descritos por MARCHANDIN et al. (2003) e FOSSE et al. (2004) na descoberta de *bla*_{TEM-24}, SAYEED et al. (2006) com a descoberta de *bla*_{TEM-12} em *A. caviae*, e recentemente PICÃO et al. (2008)

descreveram a presença de *bla*_{PER-1} em plasmídio de *A. media* isolada de amostra de água.

Diferentemente dos estudos apresentados, o presente trabalho analisou uma grande quantidade de cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras aquáticas ambientais e apesar do indício de que estes genes estejam localizados no cromossomo, seria necessária a utilização de outros métodos para comprovar esta afirmação, uma vez que a extração plasmidial realizada por meio de kit comercial, também permite a extração de DNA cromossômico, além de dificultar a extração de plasmídios de alto peso molecular.

É de grande importância o monitoramento de plasmídios no gênero *Aeromonas*, uma vez que existem diversos trabalhos relatando a ocorrência de elementos móveis e a disseminação de genes plasmidiais no gênero (SCHMIDT et al., 2001; JACOBS e CHENIA, 2007; CATTOIR et al., 2008; PICÃO et al., 2008; LEE et al., 2008).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados pode-se concluir que:

- As metodologias de classificação do gênero e das espécies, mostraram ser rápidas, precisas e de fácil aplicação;
- Cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* são potenciais carreadoras dos genes de virulência *act*, *ast* e *alt* e de resistência *cphA*, *cepH* e *bla_{TEM}* constituindo um risco potencial à saúde da população humana;
- *A. hydrophila* apresentou maior número de cepas positivas para os genes de virulência e resistência, sendo também a espécie que teve mais cepas positivas para o teste fenotípico de produção de enzimas sendo a espécie de maior preocupação para a Saúde Pública;
- Os genes *cphA* e *cepH* parecem ser intrínsecos em isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei* no Brasil, independente de sua expressão;
- O gênero *Aeromonas* pode ser reservatório dos genes *bla_{TEM}*, os quais foram encontrados na maioria dos isolados;
- Ambientes aquáticos não monitorados para a presença de *Aeromonas* spp. representam uma preocupação para a Saúde Pública uma vez que podem ser uma fonte de bactérias carreadoras de genes de virulência e resistência, potencialmente patogênicas para seres humanos;

8. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se

- A utilização das técnicas de identificação utilizadas neste trabalho, para identificar corretamente organismos do gênero *Aeromonas*, tanto em amostras clínicas como ambientais;
- A pesquisa do gênero *Aeromonas* em ambientes aquáticos, atentando para a ocorrência de genes de virulência e resistência nas cepas isoladas, podendo assim obter mais informações a respeito da distribuição destes organismos;
- Estudos adicionais são necessários para o esclarecimento dos mecanismos de ação dos genes de virulência e resistência, bem como da disseminação destes genes em cepas de *Aeromonas*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott SL, Cheung WK, Kroske-Bystrom S, Malekzadeh T, Janda JM. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1262–6.
- Abbott SL, Wendy KWC, Janda JM. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2348-57.
- Abdullah AI, Hart CA, Winstanley C. Molecular characterization and distribution of virulence-associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *J Appl Microbiol*. 2003;95:1001-7.
- Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Parton RG, van der Goot FG. A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1998;140(3):525-40.
- Abriata LA, González LJ, Llarrull LI, Tomatis PE, Myers WK, Costello AL, Tierney DL, Vila AJ. Engineered mononuclear variants in *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamase BcII are inactive. *Biochemistry*. 2008;19;47(33):8590-9.
- Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;242(2):231-40.
- Alavandi SV, Ananthan S. Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of aeromonas species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian J Med Microbiol*. 2003;21(4):233-8.
- Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M, Faruque AS, Islam MS, Sack RB, Mollby R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct;38(10):3785-90
- Altwegg M, Geiss HK. *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit Rev Microbiol*. 1989;16:253–86.
- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *J Biochem*. 1991;276:269–270.
- Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe T. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl Microbiol*. 1971;22(4):716-7.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H and Goto M. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38, 40-43.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in Molecular Biology 1995. John Wiley & Sons, USA.

Avison MB, Niumsup P, Walsh TR, Bennett PM. *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH beta-lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking creB. J Antimicrob Chemother. 2000;46(5):695-702.

Avison MB, Niumsup P, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM. Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. J Antimicrob Chemother. 2004;53(2):197-202.

Awan MB, Ahmed MM, Bari A, Krovacek K. Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. Isolated from food and environment in Abu Dhabi United Arab Emirates. J Food Prot. 2006;69:1713-1716.

Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat. 2006;9(3):142-56.

Bakken JS, Sanders CC, Clark RB, Hori M. Beta-lactam resistance in *Aeromonas* spp. caused by inducible beta-lactamases active against penicillins, cephalosporins, and carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 1988 Sep;32(9):1314-9.

Balassiano IT, Bastos MD, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. In press 2007.

Barnaud G, Arlet G, Danglot C, Philippon A. Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC beta-lactamase of *Morganella morganii*. FEMS Microbiol Lett. 1997;1;148(1):15-20.

Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(3):838-42.

Bizani MA, Brandelli A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. Isolated from water of a bovine abattoir. Braz J Microbiol. 2001; 32:334-39.

Bomo, AM, Stevik TK, Hovi I, Hanssen JF. Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters. J Environ Qual. 2004; 33(3):1041-1047.

Borchardt MA, Stemper ME, Standridge JH. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed field gel electrophoresis. Emerg Infect Dis. 2003;9(2):224-28.

Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martinez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. J Clin Microbiol. 1997;35(7):1671-4.

Bosso JA. The antimicrobial armamentarium: evaluating current and future treatment options. Pharmacotherapy 2005;25:55S-62S.

- Brandi G, Sisti M, Giardini F, Schiavano GF, Albano A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp. in different types of water. *Lett Appl Microbiol.* 1999;29:211–215
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):933-51, table of contents.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211–33.
- Bush K, Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet]; c2003 [atualizado em 07 de janeiro de 2008; acesso em 21 de janeiro de 2008]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/>.
- Cabral A. Diversidade e perfil plasmidial de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.
- Cabrera LER, Castro GE, Ramírez MMA, Liop AH, Linaes RC, Castañeda NE, Fernández AA, Bravo LF. Aislamiento e identificación de espécies pertenecientes a los gêneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales em Cuba. *Rev Chil Infect.* 2007;24(3):204-208.
- Cansian RL, Floriani STR, Valduga E. Microbiological analysis of critical points in the chicken industry. *Braz Arch Biol technol.* 2005; 48:403-6.
- Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, Courvalin P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemoter* 2002;46: 3739-3743.
- Carnahan AM, Joseph SW. *Aeromonas* update: new species and global distribution. *Experientia* 1991;47:402-3.
- Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II. A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol.* 1991;29(12): 2843-9.
- Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Hernanz C, Luengo JM, Naharro G. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* 2000;68(6):3233-41.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):231-7.
- Ceylan E, Berktaş M, Ağaoğlu Z. The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock. *Trop Anim Health Prod.* 2008 May 15. [Epub ahead of print].

Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44(3):221-5.

Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 84(4): 269-278.

Chapman, P. A., Ellin, M., Ashton, R., Shafique, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001;68, 11-20.

Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microb*. 2001;67:1494–02.

Chim H, Song C. *Aeromonas* infection in critically ill burn patients. *Burns*. 2007;33(6):756-9.

Chopra AK, Houston CW, Peterson JW, Jin GF. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can J Microbiol*. 1993;39:513–23.

Chopra AK, Pham R, Houston CW. Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 1994;139:87–91.

Chopra AK, Peterson JW, Xu X-J, Coppenhaver DH, Houston CW. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog*. 1996;21:357–377.

Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect*. 1999;1(13):1129-1137.

Chouchani C, Ben-Achour N, M'charek A, Belhadj O. Cefotaxime and ceftazidime-resistant *Escherichia coli* isolate producing TEM-15 beta-lactamase from a Tunisian hospital. *C R Biol*. 2007;330(8):565-70.

Chu WH, Lu CP. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Dis*. 2005;28(7):437-41.

Clark NM, Chenoweth CE. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2003;37(4):506-13.

Colwell RR, MacDonell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1986;36:473-477.

Conway DJ, Roper C. Micro-evolution and emergence of pathogens. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1423-1430.

Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis.* 2000;31(5):1119-25.

Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1791-6.

Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4163-7.

Cumberbatch N, Gurwith MJ, Langston C, Sack RB, Brunton JL. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect Immun* 1979;23: 829-837.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 2001;78(2):103-116.

Delamare APL, Artico LO, Grazziotin FG, Echeverrigaray S, Costa SOP. Total protein electrophoresis and rapd fingerprinting analysis for the identification of *Aeromonas* at species level. *Braz J Microbiol.* 2002;33: 358-362.

Demarta A, Tonolla M, Caminada AP, Ruggeri N, Peduzzi R. Signature region within the 16S rRNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;172(2):239-46.

Demarta A, K pfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonolla M, Peduzzi R, Monera A, José Saavedra M, Martínez-Murcia A. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol.* 2008; 31(4):278-86.

Deodhar LP, Saraswathi M, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. *J Clin Microbiol.* 1991;29(5): 853-856.

Doi Y, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Kurokawa H, Yokoyama K, Yagi T, Arakawa Y. Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2427-34.

Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis.* 2007;11(3):191-7.

Dropa M. Estudo de espécies da Família Enterobacteriaceae produtoras de ESBL causadoras de infec o hospitalar, através de métodos moleculares

[dissertação de mestrado]. São Paulo:Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3624-6.

Dumontet S, Krovacek K, Svenson SB, Pasquale V, Baloda SB, Figliuolo G. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2000;23(1):53-72.

Emekdas G, Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Yildiz C, Ozturhan H, Durmaz R. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *Int J Food Microbiol.* 2006;107(3):310-314.

Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3003-10.

Environmental Protection Agency (EPA). *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington; 2006.

Esteve C, Valera L, Gutiérrez C, Ventosa A. Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *A. jandaei* Carnahan *et al.* 1992. *Int J Syst Evolut Microbiol.* 2003;53:1411-9.

Evangelista-Barreto NS, Vieira RH, Carvalho FC, Torres RC, Sant'Anna ES, Rodrigues DP, Reis CM. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2006;48(3):129-33.

Falcão DP, Lustri WR, Bauab TM. Incidence of non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. *Curr Microbiol.* 1998;37(1):28-31.

Figueiras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:2069-73.

Figueras MJ, Suarez-Franquet A, Chacón MR, Soler L, Navarro M, Alejandro C, Grasa B, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol.* 2005a;71(1): 538-541.

Figueras MJ. Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol.* 2005b;16, 145–153.

Fosse T, Giraud-Morin C, Madinier I, Labia R. Sequence analysis and biochemical characterisation of chromosomal CAV-1 (*Aeromonas caviae*),

- the parental cephalosporinase of plasmid-mediated AmpC 'FOX' cluster. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 16;222(1):93-8.
- Fosse T, Giraud-Morin C, Madinier I, Mantoux F, Lacour JP, Ortonne JP. *Aeromonas hydrophila* with plasmid-borne class A extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and three chromosomal class B, C, and D beta-lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(6):2342-3.
- French GL. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57:1514-27.
- Frieling JS, Rosenberg R, Edelstein M, Colby SD, Kopelowitz NN. Endogenous *Aeromonas hydrophila* endophthalmitis. Ann Ophthalmol. 1989;21:117-8.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 2003;52(4):699-702.
- Galleni M, Lindberg F, Normark S, Cole S, Honore N, Joris B, Frere JM. Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae* ampC beta-lactamase genes and their products. Biochem J. 1988; 15;250(3):753-60.
- Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère JM, Dideberg O. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. J Mol Biol. 2005;345(4):785-95.
- Gavín R, Rabaan AA, Merino S, Tomás JM, Gryllos I, Shaw JG. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. Mol Microbiol. 2002;43(2):383-97.
- Gavriel AA, Landre JP, Lamb AJ. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. J Appl Microbiol. 1998;84(3):383-392.
- Ghatak S, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. Lett Appl Microbiol. 2007;44(5):550-4.
- Ghuysen JM. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. Annu Rev Microbiol. 1991;45:37-67.
- Gibotti A, Saridakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). J Appl Microbiol. 2000;89(1):70-5.
- Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine

Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol. 2005;66:125–32.

González-Serrano CJ, Santos JA, Garcia-Lopez ML, Otero A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar sobria isolates from freshwater fish and from a diarrhea case. J Appl Microbiol. 2002;93(3):414-19.

Granum PE, O'Sullivan K, Tomas JM, Ormen O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. From food and water. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998;21(2):131-37.

Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Expert Opin Investig Drugs. 2008;17(2):131-43.

Harf-Monteil C, Flèche AL, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Inter J Syst Evol Microbiol. 2004;54:481-485.

Hall, TA. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98 [Available on line].

Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. FEMS Microbiol Ecol. 2006a;56(3):418-29.

Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res Microbiol. 2006b;157:938-47.

Heuzenroeder MW, Wong CY, Flower RL. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. FEMS Microbiol Lett. 1999;174:131–6.

Hiransuthikul N, Tantisiriwat W, Lertutsahakul, K, Vibhagool A, Boonma P. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand.. Clin Infect Dis. 2005;41:93–6.

Hirono I, Aoki T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila*. Microb Pathog. 1991;11:189–97.

Hofer E, Reis CM, Theophilo GN, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques MdeF. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(2): 217-20.

Horsfall LE, Garau G, Liénard BM, Dideberg O, Schofield CJ, Frère JM, Galleni M. Competitive inhibitors of the CphA metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):2136-42.

Howard SP, Buckley JT. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. Mol Gen Genet. 1986;204:289–295.

- Howard SP, Garland WJ, Green MJ, Buckley JT. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. J Bacteriol. 1987;169:2869–2871.
- Hsu TC, Waltman WD, Shotts EB. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. Dev Biol Stand. 1981;49, 101–111.
- Huddleston JR, Zak JC, Jeter RM. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from environmental sources. Appl Environ Microbiol. 2006;72:7036-7042.
- Huys G, Altwegg M, Hänninen ML. Genotypic and chemotaxonomic description of two subgroups in the species *Aeromonas eucrenophila* and their affiliation to *A. encheleia* and *Aeromonas* DNA hybridization group 11. Syst Appl Microbiol. 1996;19:616–23.
- Huys G, Pearson M, Kämpfer P, Denys R, Cnockaert M, Inglis V, Swings J. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. Int J Syst Evolut Microbiol. 2003; 53:885-891.
- Iaconis JP, Sanders CC. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(1):44-51.
- Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matté GR, Lysenko AM, Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Sawabe T, Vysotskii MV, Frolova GM, Mikhailov V, Christen R, Colwell RR. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51:1071-8.
- Ivanova EP, Matté GR, Matté MH, Coyene T, Huq A, Colwell RR. Characterization of *Pseudoalteromonas citrea* and *P. nigrifaciens* isolated from different ecological habitats based on REP-PCR genomic fingerprints. System Appl Microbiol. 2002;25: 275-83.
- Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentation and unanswered questions. Clin infect Dis. 1990;27:332–44
- Janda, JM, Kokka RP. The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identification. FEMS Microbiol Lett. 1991;69:29–33.
- Janda JM, Abbott SL, Khasheshkellogg GH, Shimada T. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the Genus *Aeromonas*. J Clin Microbiol. 1996;34(8):1930-33.
- Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species. Disease presentations, and unanswered questions. Clin Infect Dis. 1998;27:332-44.

- Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol.* 2007;114(3):295-306.
- Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):2902-6.
- Jeong SH, Song W, Park MJ, Kim JS, Kim HS, Bae IK, Lee KM. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(5):467-71.
- Joseph SW, Carnahan AM. Update on the Genus *Aeromonas*. *ASM News.* 2000;66(4) 218-21.
- Kannan S, Suresh Kanna P, Karkuzhali K, Chattopadhyay UK, Pal D. Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2001;5(3):91-4.
- Kelly KA, Koehler JM, Ashdown LR. Spectrum of extraintestinal disease due to *Aeromonas* species in tropical Queensland, Australia. *Clin Infect Dis.* 1993;16(4):574-9.
- Khan AA, Cerniglia CE. Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* 1997;24(4):233-9.
- Kingombe CIB, Huys G, Tonolla M, Albert MJ, Swings J, Peduzzi R, Temmi T. Pcr detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(12):5293-5302.
- Kirov SM. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int J Food Microbiol.* 1993;20(4):179-98
- Ko WC, Yu KW, Liu CY, Huang CT, Leu HS, Chuang YC. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(5):1260-2.
- Ko WC, Wu HM, Chang TC, Yan JJ, Wu JJ. Inducible beta-lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3188-92.
- Koksal F, Oguzkurt N, Samasti M, Altas K. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* strains isolated from drinking water samples in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2007;53(1):30-5.
- Kolar M, Latal T, Cermak P, Bartonikova N, Chmelarova E, Sauer P, Kesselova M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28(1):49-53.

- Kouda S, Kuwahara R, Ohara M, Shigeta M, Fujiwara T, Komatsuzawa H, Usui T, Sugai M. First isolation of blaIMP-7 in a *Pseudomonas aeruginosa* in Japan. *J Infect Chemother*. 2007;13(4):276-7.
- Kruse H, Sørum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:4015–21.
- Kühn I, Huys G, Coopman R, Kersters K, Janssen P. A 4-year study of the diversity and persistence of coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well. *Can J Microbiol*. 1997;43(1):9-16.
- Kurosaki H, Yasuzawa H, Yamaguchi Y, Jin W, Arakawa Y, Goto M. Detection of a metallo-beta-lactamase (IMP-1) by fluorescent probes having dansyl and thiol groups. *Org Biomol Chem*. 2003;1(1):17-20.
- Lartigue MF, Leflon-Guibout V, Poirol L, Nordmann P, Nicolas-Chanoine MH. Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from bla(TEM) genes and their relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):4035-7.
- Lautrop H. *Aeromonas hydrophila* isolated from human feces and its possible pathological significance. *APMIS* 1961;144, 299–301.
- Lee C, Cho J-C, Lee S-H, Lee D-G, Kim SJ. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J Appl Microbiol*. 2002;93:976–85.
- Lee MF, Peng CF, Lin YH, Lin SR, Chen YH. Molecular diversity of class 1 integrons in human isolates of *Aeromonas* spp. from southern Taiwan. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61(5):343-9.
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 49(11):4485-91.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(1): 185-191.
- Levin BR, Bergstrom CT. Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):6981-5.
- Libisch B, Giske CG, Kovács B, Tóth TG, Füzi M. Identification of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol* 2008;46, 1878-1880.
- Lindberg F, Normark S. Sequence of the *Citrobacter freundii* OS60 chromosomal ampC beta-lactamase gene. *Eur J Biochem*. 1986; 2;156(3):441-5.

- Lincopan N, Leis R, Vianello MA, de Araújo MR, Ruiz AS, Mamizuka EM. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Med Microbiol.* 2006;55(11):1611-3.
- Livermore DM. Acquired carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(6):673-6.
- Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:3-10.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:87-102.
- Lodge JM, Minchin SD, Piddock LJ, Busby JW. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. *Biochem J.* 1990;15;272(3):627-31.
- Longa A, Vizcaya L, Nieves B, Bravo L, Morier L, Pérez-Schael I, Enrique Cabrera L. Factors of virulence associated with enteropathogenicity in strains of *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea in Mérida, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57(2):85-91.
- Marchandin H, Godreuil S, Darbas H, Jean-Pierre H, Jumas-Bilak E, Chanal C, Bonnet R. Extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3994-5.
- Marín M, Gudiol F. Beta-Lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(1):42-55.
- Martin-Carnahan A, Joseph, SW. 2005. *Aeromonadaceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 2005. v.2.
- Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization group 11 and *Aeromonas* group 501. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Oct;49 Pt 4:1403-8
- Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16s ribosomal DNA sequencing lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42(3):412-21.
- Martínez-Murcia AJ, Figueras MJ, Saavedra MJ, Stackebrandt E. The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol.* 2007;10(1):61-4.

- Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58:1169-75.
- Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection*. 2007;35(6):457-60.
- Martins LM, Marquez RF, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;32: 237-42.
- Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J Bacteriol*. 1991;173(15):4611-7.
- Matté MH. Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da represa de Guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público [dissertação de mestrado]. São Paulo:Faculdade de Saúde Pública da USP; 1995.
- Matté MH. Ribotipagem de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas jandaei*, potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga, São Paulo. [tese de doutorado]. São Paulo:Faculdade de Saúde Pública da USP; 1996.
- Matté MH, Matté GR, Gil AI, Lanata CF, Huq A, Colwell RR. Molecular epidemiology of *Aeromonas arequipensis* isolated from diarrhea, in Arequipa, Peru. 6th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Chicago; 1999.
- Matté MH. Aplicação de Métodos Moleculares no Estudo de Organismos do Gênero *Aeromonas* [tese de livre docência]. São Paulo:Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.
- Matté MH, Nitrini SMO, Matté GR. *Aeromonas* relacionadas com infecções no homem: Aspectos epidemiológicos, ecológicos, laboratoriais, de virulência e relativos à Saúde Pública. *Laes & Haes* 1997;104: 62-74.
- McMahon MAS, Wilson IG. The occurrence of enteric pathogens in *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol*. 2001;70:155-62.
- Mecenas JJ, Strauss EJ. Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg Infect Dis*. 1996;2(4):270-88.
- Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomás, JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol*. 1995; 28(2):157-68.
- Merino S, Aguilar A, Noguerras MM, Regue M, Swift S, Tomas JM. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun*. 1999; 67 (8), 4008-4013.

- Miñana-Galbis D, Farfan M, Fuste MC, Loren JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(6):2073-78.
- Miñana-Galbis D, Farfan M, Fuste MC, Loren JG. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:582-587.
- Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2006; 24(6):370-2.
- Murray MG e Thompson WF. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 4321-5.
- Naas T, Zerbib M, Girlich D, Nordmann P. Integration of a transposon Tn1-encoded inhibitor-resistant beta-lactamase gene, bla(TEM-67) from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):19-26.
- Nayak AK, Das BK, Kohli MPS, Mukherjee SC. Immunossuppressive effect of a-permethrin on Indian major carp, rohu (*Labeo rohita* Ham.). *Fish Shelfish Immu.* 2004;16:41-50.
- Namdari H, Bottone EJ. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1796-98.
- Nauton L, Kahn R, Garau G, Hernandez JF, Dideberg O. Structural insights into the design of inhibitors for the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Mol Biol.* 2008 Jan 4;375(1):257-69.
- Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan AA, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolated from Catfish. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:6461-66.
- Nelson KL, Raja SM, Buckley JT. The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem.* 1997;272(18):12170-74.
- Neuwirth C, Siebor E, Robin F, Bonnet R. First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(12):4486-8.
- Niumsop P, Simm AM, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM, Avison MB. Genetic linkage of the penicillinase gene, amp, and blrAB, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(6):1351-8.
- Nojimoto IT, Bezana CS, do Carmo C, Valadão LM, Carrijo Kde M. The prevalence of *Aeromonas* spp. in the diarrheal feces of children under the age of 5 years in the city of Goiânia, Goiás in the 1995-1996 biennium] *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(5):385-8.

- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(6):321-31.
- Ormen O, Ostensvik O. The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas* spp. and their cytotoxicity in Norwegian water sources. *J Appl Microbiol.* 2001;90(5):797-802.
- Ormen O, Regue MQ, Tomás JM, Granum PE. Studies of aerolysin promoters from different *Aeromonas* spp. *Microb Pathog.* 2003;35(5):189-96.
- Ormen O, Granum PE, Lassen J, Figueiras MJ. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS.* 2005;113:203-7.
- Overman TL, Janda JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):706-8.
- Pallecchi L, Riccio ML, Docquier JD, Fontana R, Rossolini GM. Molecular heterogeneity of bla(VIM-2)-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;195(2):145-50.
- Palú AP, Gomes LM, Miguel MAL, Balassiano IT, Queiroz MLP, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiol.* 2006;23: 504-9.
- Park TS, Oh SH, Lee EY, Lee TK, Park KH, Figueras MJ, Chang CL. Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37(4):349-53.
- Parker MW, Van Der Goot FG, Buckley JT. Aerolysin-the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol.* 1996;19(2):205-12.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-86.
- Pereira CS, Possas CA. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Cienc Tecnol Aliment.* 2004;24(4):562-66.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-62.
- Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 2006;42 Suppl 4:S153-63.
- Philippon A, Arlet G. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! *Ann Biol Clin (Paris).* 2006;64(1):37-51.
- Pianetti A, Sabatini L, Bruscolini F, Chiaverini F, Cecchetti G. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. *Epidemiol Infect.* 2004;132:231-8.

- Picard B, Goulet P. Seasonal prevalence of nosocomial *Aeromonas hydrophila* infection related to aeromonas in hospital water. *J Hosp Infect* 1987;10:152-5.
- Picão RC, Poirel L, Demarta A, Petrini O, Corvaglia AR, Nordmann P. Expanded-spectrum beta-lactamase PER-1 in an environmental *Aeromonas media* isolate from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(9):3461-2.
- Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129-35.
- Ploy MC, Lambert T, Couty JT, Denis F, Integrons: An antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38:483–87.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(4):891-7.
- Poole TL, Callaway TR, Bischoff KM, Warnes CE, Nisbet DJ. Macrolide inactivation gene cluster mphA-mrx-mphR adjacent to a class 1 integron in *Aeromonas hydrophila* isolated from a diarrhoeic pig in Oklahoma. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1):31-8.
- Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. *Environ Health Perspect.* 2002;110(5):537–42.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58
- Qu F, Bao CM, Cui EB, Shi JB, Guo TS, Mao YL. Detection of multiresistance *Aeromonas* with TEM type resistant genes in patients with cirrhosis. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2005;19(1):43-5.
- Rabaan AA, Gryllos I, Tomás JM, Shaw JG. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun.* 2001;69(7):4257-67.
- Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):602-4.
- Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(2):223-32.
- Razzolini MTP. Pesquisa de *Aeromonas* e suas toxinas em águas de consumo humano provenientes de caixa d' água e bebedouros. São Paulo – SP. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade Mackenzie; 1998.

- Razzolini MT, Bari MD, Zanolli Sato MI, Sanchez PS. *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *J Water Health*. 2008;6(1):117-123
- Roberts MT, Enoch DA, Harris KA, Karas JA. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. *J Med Microbiol*. 2006;55(2):241-3.
- Rodríguez CN, Campos R, Pastran B, Jimenez I, Garcia A, Meijomil P, Rodríguez-Morales AJ. Sepsis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Aeromonas hydrophila* in a pediatric patient with diarrhea and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2005;41(3):421-2.
- Rose JM, Houston CW, Kurosky A. Bioactivity and immunological characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*. 1989;57:1170-76.
- Rossolini GM, Zanchi A, Chiesurin A, Amicosante G, Satta G, Guglielmetti P. Distribution of *cphA* or related carbapenemase-encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus *Aeromonas*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(2):346-9.
- Ruppé E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler class C 1 AmpC beta-lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test. *J Clin Microbiol*. 2006;44(11):4204-7.
- Saavedra MJ, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:2481-87.
- Saha P, Chakrabarti T. *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56: 1905-9.
- Sawai T, Morioka K, Ogawa M, Yamagishi S. Inducible oxacillin-hydrolyzing penicillinase in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;10(2):191-5.
- Sayeed S, Saunders JR, Edwards C, Corkill JE, Hart CA. Expression of *Aeromonas caviae* *bla* genes in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(3):435-41.
- Schmidt AS, Bruun MS, Larsen JL, Dalsgaard I. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47(6):735-43.
- Schrag SJ, Wiener P. Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends Ecol Evol*. 1995;8:319-24.
- Schubert RH. Intestinal cell adhesion and maximum growth temperature of psychrotrophic aeromonads from surface water. *Int J Hyg Environ Health*. 2000;203(1):83-5.
- Schwartz T, Kohnen W, Janses B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;43:325-35.

- Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*. 2003;;327(7425):1209-13.
- Scoaris O de, Colacite J, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, de Abreu Filho BA, Dias Filho BP. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008;93(1-2):111-22.
- Scoglio ME, DiPietro A, Picerno I, Délia S, Mauro A, Lagaña P. Virulence factors in vibrios and aeromonads isolated from seafood. *Microbiologica*. 2001;24(3):273-280.
- Segatore B, Massidda O, Satta G, Setacci D, Amicosante G. High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Jun;37(6):1324-8.
- Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J Appl Microbiol*. 2004;97(5):1077-86.
- Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can J Microbiol*. 2005;51:957-66.
- Sen K, Lye D. Importance of flagella and enterotoxins for *Aeromonas* virulence in a mouse model. *Can J Microbiol*. 2007;53(2):261-9.
- Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q, Rosovitz MJ, Madupu R, Tallon L, Kim M, Jin S, Vuong H, Stine OC, Ali A, Horneman AJ, Heidelberg JF. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T: jack of all trades. *J Bacteriol*. 2006;188(23):8272-82
- Sha, J., E. V. Kozlova, and A. K. Chopra. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*. 2002;70:1924–35.
- Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol*. 2004;155(6):409-21.
- Shanmuganathan C, Ananthakrishnan A, Jayakeerthi SR, Kanungo R, Kumar A, Bhattacharya S, Badrinath S. Learning from an outbreak: ESBL-the essential points. *Indian J Med Microbiol*. 2004;22(4):255-7.
- Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan JE Jr, Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin Infect Dis*. 1997;25(3):584-99.

Singh DV, Sanyal SC. Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. J Med Microbiol. 1992;36(4):269-72.

Sinha S, Shimada T, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrheal cases in Kolkata, India. J Med Microbiol 2004; 53: 527-534.

Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;32:243–247.

Soler L, Marco F, Vila J, Chacon MR, Guarro J, Figueras MJ. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. J Clin Microbiol. 2003;41:5732–4.

Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2007;45(4):1180-4.

Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev Infect Dis. 1988;10(4):879-84.

Souza JA, Silva-Souza AT. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. Braz arch biol technol. 2001;44(4)373-81.

Stano F, Brindicci G, Monno R, Rizzo C, Ghezzani F, Carbonara S, Guaglianone E, Donelli G, Monno L. *Aeromonas sobria* sepsis complicated by rhabdomyolysis in an HIV-positive patient: case report and evaluation of traits associated with bacterial virulence. Int J Infect Dis. 2009;13(3):e113-8.

Steciw A, Colodny SM. Empyema due to *Aeromonas hydrophila*. Clin Infect Dis. 1994;18:474–5.

Streit JM, Jones RN, Toleman MA, Stratchounski LS, Fritsche TR. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). Int J Antimicrob Agents. 2006;27(5):367-75.

Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect. 2003;47(4):273-95.

Szczuka E, Kaznowski A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):220-8.

Talavera BMM, Benassi FO, von Specht MH, Quiroga MI, García MA, Pucciarelli AB, Zubreski E, Laczeski ME, Gutkind G. Susceptibilities to carbapenems and presence of *cphA* gene on food-borne *Aeromonas*. *Braz arch biol technol*. 2006; 49(4): 677-82.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596-1599.

Tan TY, Ng SY, Teo L, Koh Y, Teok CH. Detection of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *J Clin Pathol*. 2008;61(5):642-4.

Tena D, González-Praetorius A, Gumeno C, Pérez-Pomata MT, Bisquert J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(4):235-41.

Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *System Appl Microbiol*. 2001;24:520-538.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemotherapy*. 2002;50(5):673-9.

Tokajian S, Hashwa F. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* spp. isolated from a chlorinated intermittent water distribution system in Lebanon. *J Water Health*. 2004;2(2):115-22.

Tristram SG, Hawes R, Souprounov J. Variation in selected regions of blaTEM genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(3):481-4.

Turner PJ. Use of a program-specific website to disseminate surveillance data obtained from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;53(4):273-9.

Ueraha F. Concordância entre perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*. [dissertação de mestrado]. São Paulo:Faculdade de Saúde Pública da USP; 2008.

Vally H, Whittle A, Cameron S, Dowse GK, Watson T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Wound Infections Associated with Mud Football. *Clin Infect Dis*. 2004;38(8):1084-9.

- Vaseeharan B, Ramasamy P, Murugan T, Chen JC. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26(4):285-91.
- Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, Gascon J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(5):552-5.
- von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*. 2007;35(2):59-64.
- Xia C, Ma ZH, Rahman MH, Wu ZG. PCR cloning and identification of the β -haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquacultura* 2004;229:45-53.
- Xu XJ, Ferguson MR, Popov VL, Houston CW, Peterson JW, Chopra AK. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infect Immun*. 1998;66:3501-9.
- Walsh TR, Payne DJ, MacGowan AP, Bennett PM. A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemotherapy*. 1995a;35(2):271-9.
- Walsh TR, Gamblin S, Emery DC, MacGowan AP, Bennett PM. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo- β -lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:423-431.
- Walsh TR, Hall L, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible beta-lactamases from *Aeromonas sobria*, strain 163a, one a class D penicillinase, the other an AmpC cephalosporinase. *J Antimicrob Chemother*. 1995b Jul;36(1):41-52.
- Walsh TR, Neville WA, Haran MH, Tolson D, Payne DJ, Bateson JH et al. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo- β -lactamase. Imis, from *Aeromonas veronii* bv *sobria*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:436-439.
- Walsh, T.R., Bolmstrom ,A., Qvarnstrom, A. and Gales, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2755-9.
- Walsh TR, Stunt RA, Nabi JA, MacGowan AP, Bennett PM. Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40(2):171-8.
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol*. 2004;50(3):137-65.
- Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TM, Caldeira R, Woodward DL, Rodgers FG. Detection and characterization of the hemolysin

- genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2003;41(3):1048-54.
- Wassenaar TM, Gaastra W. Bacterial virulence: can we draw the line? FEMS Microbiol Lett. 2001;201(1):1-7.
- Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases? a novel perspective on resistance. Int J Antimicrob Agents. 2004;23:556–62.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Aug;47(8):2385-92
- White PA, Maclver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2658–61.
- Wu CJ, Wu JJ, Yan JJ, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Hsin-I Shih, Wu HM, Wang LR, Ko WC. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. J Infect. 2006;(xx):1-8.
- Yamaguchi Y, Kuroki T, Yasuzawa H, Higashi T, Jin W, Kawanami A, Yamagata Y, Arakawa Y, Goto M, Kurosaki H. Probing the role of Asp-120(81) of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and X-ray crystallography. J Biol Chem. 2005;280(21):20824-32.
- Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC et al. Metallo-b-lactamases in clinical isolates in Taiwan and identification of VIM-3 a novel variant of VIM-2 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2224–8.
- Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother 2005;56(6):1148-1151.
- Zervosen A, Valladares MH, Devreese B, Prosperi-Meys C, Adolph HW, Mercuri PS, Vanhove M, Amicosante G, van Beeumen J, Frère JM, Galleni M. Inactivation of *Aeromonas hydrophila* metallo-beta-lactamase by cephamycins and moxalactam. Eur J Biochem. 2001;268(13):3840-50.

ANEXOS

ANEXO 1

➤ Artigos aceitos para publicação

Artigo 1

1. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., LINCOPAN, N., MAMIZUKA, E. M., MATTÉ, G. R., MATTÉ, M. H. Detection of metallo-beta-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Letters in Applied Microbiology, 2009.

Palavras-chave: metallo-beta-lactamase, aeromonas, resistance

Áreas do conhecimento: Microbiologia Aplicada, Resistência antimicrobiana, Biologia Molecular

NOTE TO THE EDITOR

Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*

L.C. Balsalobre¹, M. Dropa¹, N. Lincopan^{2,3}, E.M. Mamizuka², G.R. Matté¹ and M.H. Matté¹

¹ Public Health Laboratory, School of Public Health, University of São Paulo, CEP 01246-904, São Paulo, SP, Brazil

² School of Pharmacy, University of São Paulo, CP 66083, São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

Correspondence to Livia C. Balsalobre, Public Health Laboratory, School of Public Health, Av. Doutor Arnaldo, 715, Cerqueira César, Universidade de São Paulo, CEP 01246-904, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: liviabalsalobre@usp.br

Abstract

Aims: To determine the prevalence and expression of metallo- β -lactamases (MBL)-encoding genes in *Aeromonas* species recovered from natural water reservoirs in southeastern Brazil.

Methods and Results: Eighty-seven *Aeromonas* isolates belonging to *A. hydrophila* (n= 41) and *A. jandaei* (n= 46) species were tested for MBL production by the combined disk test using imipenem and meropenem disks as substrates and EDTA or thioglycolic acid as inhibitors. The presence of MBL genes was investigated by PCR and sequencing using new consensus primer pairs designed in this study. The *cphA* gene was found in 97.6% and 100% of *A. hydrophila* and *A. jandaei* isolates, respectively, whereas the acquired MBL genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{SPM-1} were not detected. On the other hand, production of MBL activity was detectable in 87.8% and 10.9% of the *cphA*-positive *A. hydrophila* and *A. jandaei* isolates, respectively.

Conclusions: Our results indicate that *cphA* seems to be intrinsic in the environmental isolates of *A. hydrophila* and *A. jandaei* in southeastern Brazil, although, based on the combined disk test, not all of them are apparently able to express the enzymatic activity.

Significance and Impact of the Study: These data confirm the presence of MBL-producing *Aeromonas* species in natural water reservoirs. Risk of waterborne diseases owing to domestic and industrial uses of freshwater should be re-examined from the increase of bacterial resistance point of view.

Keywords: *Aeromonas* spp., waterborne isolates, *cphA* gene, imipenem-resistant, Brazil.

Members of the genus *Aeromonas* have been associated with a wide range of illnesses in humans, including gastrointestinal disorders and systemic infections in both immunocompromised and healthy hosts. In Brazil, *Aeromonas* species have been reported as an important cause of acute diarrhea, particularly in children (Guerra *et al.* 2007). In this regard, several studies have showed the presence of *Aeromonas* spp. in food and drinking water samples, suggesting that these sources may act as dissemination vehicles of the human pathogen, with implications in the public health (Couto *et al.* 2007; Blasco *et al.* 2008; Razzolini *et al.* 2008). In addition to the virulence factors that are involved in adhesion and cytotoxicity, high rates of resistance to beta-lactam antibiotics have been detected in *Aeromonas* spp. isolated from water sources in Brazil (Scoaris *et al.* 2008). In fact, *Aeromonas* spp. are among the few microorganisms harboring different chromosomal β -lactamase genes, including *cphA* (also named *imiH*), *cepH* and *ampH*, encoding class B, C and D β -lactamases, respectively (Avison *et al.* 2004). Curiously, in contrast to class B metallo-beta-lactamases (MBLs), the subclass B2 CphA enzyme from *A. hydrophila* is a Zn(II) containing enzyme that hydrolyses specifically carbapenems (Bebrone *et al.* 2008). Although carbapenemase activity has been restricted to isolates carrying *cphA*-related sequences, integron-associated *bla*_{IMP-19} and *bla*_{VIM-4} MBL genes have been recently identified in *A. caviae* and *A. hydrophila*, respectively (Rossolini *et al.* 1995; Neuwirth *et al.* 2007; Libisch *et al.* 2008). Thus, there is currently an increasing public health interest in screening MBL-producing *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources, but, on the other hand, there are no standard phenotypic tests for MBL screening. In this work, we evaluated the prevalence of MBLs in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* collected from different environmental water sources in São Paulo, southeastern Brazil, by using a designed PCR assay with new consensus primer pairs, and the combined disk (CD) method.

Eighty-seven isolates of *Aeromonas* belonging to *A. hydrophila* (n= 41) and *A. jandaei* (n= 46) species recovered from different environmental water sources in the city of São Paulo, southeastern Brazil, which include sewage treatment effluent, Gurapiranga Dam, Tietê River, two caves, and a university recreational lake, from

1992 to 2004, were studied. The isolates, belonging to the culture collection of the Laboratory of Public Health at University of São Paulo, were previously identified on the basis of biochemical and molecular techniques, including enzymatic digestion of the conserved gene 16S rDNA using *Pst*I, *Xho*II, *Sna*BI, *Pvu*I and *Nru*I enzymes for identification of *Aeromonas* species (Uehara *et al.* 2008). MBL production was tested, from cultures induced with imipenem, by a combined disk assay (CD) using imipenem (10 µg) and meropenem (10 µg)-containing disks as substrates and 0.5 mol l⁻¹ EDTA or thioglycolic acid (undiluted solution) as inhibitors, as previously described (Arakawa *et al.* 2000; Pitout *et al.* 2005). The inhibition zone diameters were interpreted according to the CLSI breakpoints established for *Enterobacteriaceae* (CLSI 2008). A ≥ 7mm and a ≥ 5mm increase in the diameter of the zone of inhibition in the presence of EDTA or TGA, respectively, in comparison with the diameter of an imipenem (IMP) or meropenem (MEM) disk alone was interpreted as a positive result.

Conserved regions of all available GenBank-deposited (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *cphA*, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} alleles were identified in clustal multiple alignments using BioEdit sequence alignment editor (Hall 1999). Three primer pairs, specific for each family of MBLs, were designed to amplify fragments of 230 bp (IMP), 232 bp (VIM) and 590 bp (CphA). The consensus oligonucleotide primers were: CphA family, Cpha-F 5'-TCT ATT TCG GGG CCA AGG G-3'/Cpha-R 5'-TCT CGG CCC AGT CGC TCT TCA-3'; IMP family, Imp-F 5'-GGA ATA GRR TGG CTT AAY T-3'/Imp-R 5'-GGT TTA AYA AAR CAM CCA CC-3'; and VIM family, Vim-F 5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3'/Vim-R 5'-GAG CAA KTC YAG ACC GCC C-3', where R (A/G), Y (C/T), K (G/T) and M (A/C), represent degenerated hybrid oligonucleotides. The presence of the *bla*_{SPM-1} gene was investigated as previously described (Gales *et al.* 2003). For each MBL family, screening of genes was performed by PCR using 25 µl reaction mixtures containing 5 µl total DNA, 1X Reaction buffer, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 200 µmol l⁻¹ dNTPs (deoxynucleoside triphosphates), 0.2 µmol l⁻¹ of each primer and 1.25 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), in a Mastercycler® gradient 5331 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The cycling conditions were:

initial DNA release and denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 5 min. Positive controls are listed in Table 1. PCR products were purified with illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) and directly sequenced using the 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems-US). Both strands of the amplification products were sequenced by the standard Sanger dideoxynucleotide method (Sanger *et al.* 1977).

The results from the phenotypic and genotypic assays, performed to determine the presence and expression of MBL genes in environmental isolates of *Aeromonas*, are summarized in Table 1. Firstly, 36/41 (87.8%) and 5/46 (10.9%) isolates of *A. hydrophila* and *A. jandaei*, respectively, were resistant to IMP; co-resistance to IPM and MEM was confirmed in 31/41 (75.6 %) isolates of *A. hydrophila* and 4/46 (8.7%) isolates of *A. jandaei*; resistance to IPM and susceptibility to MEM was observed in 5/41 (12.2%) and 1/46 (2.2%) isolates of *A. hydrophila* and *A. jandaei*, respectively, whereas all meropenem-resistant isolates were resistant to IMP. Secondly, it was observed that use of TGA failed to detect MBL producers among *Aeromonas* species, whereas the CD test with imipenem associated with 0.5 mol l⁻¹ EDTA (5 µl/disk) was the most accurate combination for detecting MBL production among imipenem-resistant isolates. Thirdly, the *cphA* gene was identified and confirmed by sequencing in 40/41 (97.6%) and 46/46 (100%) *A. hydrophila* and *A. jandaei* isolates, respectively (GenBank accession numbers EU833973 to EU833982), whereas no *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{SPM-1} genes were found. Finally, production of MBL activity was detectable in 87.8% and 10.9% of the *cphA*-positive *A. hydrophila* and *A. jandaei* isolates, respectively.

Although *Aeromonas* spp. possess a chromosomal beta-lactamase (named CphA) that hydrolyzes the carbapenems, wild-type isolates are usually categorized under standardized *in vitro* testing conditions as carbapenem susceptible (Rossolini *et al.* 1996). Under selective pressure of certain antibiotics, the emergence of β-lactamase-overexpressing carbapenem-resistant *Aeromonas* species mutant isolates has been observed (Iaconis and Sanders 1990; Ko *et al.* 1998), however, the mechanism controlling MBL expression encoded by *cphA* gene has not been fully elucidated (Avison *et al.* 2004). As a result, occurrence of metallo-β-lactamases in

Aeromonas spp. is poorly documented by conventional MBL screening protocols. In fact, the MBL Etest does not detect the presence of the chromosomal MBLs in wild-type isolates (Walsh *et al.* 2002) and it has failed to detect acquired MBL in *A. hydrophila* (i.e., the VIM enzyme) (Libisch *et al.* 2008). Thus, screening by the use of EDTA-disk synergy tests or by PCR has been a recommended strategy for the detection of chromosomal and acquired MBLs in *Aeromonas* spp.

Absence of expression of MBLs is a well known and widely discussed phenomenon in gram-negative bacteria, and it has been currently pointed as the main challenge to clinical laboratories, regarding the unfavorable outcome of patients infected with isolates carrying MBL-encoding genes (Walsh *et al.* 2005).

Regarding PCR screening, absence of *cphA* gene has been reported in non-producing MBL *Aeromonas* isolates (Rossolini *et al.* 1995). On the other hand, several studies have described the occurrence of *cphA* gene in isolates without any MBL activity (Massida *et al.* 1991; Rossolini *et al.* 1995). Other studies have demonstrated the discovery of *cphA* variants (i.e., *cphA2*). In fact, homologous *cphA* genes have been found in *A. veronii*, *A. caviae* and *A. jandaei*, suggesting a species-related *cphA* distribution among members of the genus *Aeromonas* (Massida *et al.* 1991; Rossolini *et al.* 1995; Rasmussen and Bush 1997).

In conclusion, our results indicate that *cphA* seems to be intrinsic in environmental isolates of *A. hydrophila* and *A. jandaei* in southeastern Brazil, although, based on the combined disk test, not all of them are apparently able to express the enzymatic activity. Finally, use of EDTA as MBL inhibitor is recommended for initial MBL screening based on a double-disk synergy or a disk potentiation test.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP-2007/02266-7 and 2007/02238-3 (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and FINEP-520287/2007-0 (Financiadora de Estudos e Projetos).

References

- Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H. and Goto, M. (2000) Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* **38**, 40-43.
- Avison, M.B., Niumsup, P., Nurmahomed, K., Walsh, T.R. and Bennett, P.M. (2004) Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* β -lactamase regulator, BlrA. *J Antimicrob Chemother* **53**, 197-202.
- Bebrone, C., Anne, C., Kerff, F., Garau, G., De Vriendt, K., Lantin, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., Dideberg, O., Frère, J.M. and Galleni, M. (2008) Mutational analysis of the zinc- and substrate-binding sites in the CphA metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *Biochem J* **414**, 151-159.
- Blasco, M.D., Esteve, C. and Alcaide, E. (2008) Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *J Appl Microbiol* **105**, 469-475.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Seventeenth informational supplement. Document M100-S17. Wayne PA: CLSI.
- Couto, C.R., Oliveira, S.S., Queiroz, M.L. and Freitas-Almeida, A.C. (2007) Interactions of clinical and environmental *Aeromonas* isolates with Caco-2 and HT29 intestinal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* **45**, 405-410.
- Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S. and Sader, H.S. (2003) Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **52**, 699-702.
- Guerra, I.M.F., Fadanelli, R., Figueiró, M., Schreiner, F., Delamare, A.P.L., Wollheim, C., Costa, S.O.P. and Echeverrigaray, S. (2007) *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Braz J Microbiol* **38**, 638-643.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid. Symp Ser* **41**, 95-98.

- Iaconis, J.P. and Sanders, C.C. (1990) Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 44-51.
- Ko, W.C., Wu, H.M., Chang, T.C., Yan, J.J. and Wu, J.J. (1998) Inducible β -lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. *J Clin Microbiol* **36**, 3188-3192.
- Libisch, B., Giske, C.G., Kovács, B., Tóth, T.G. and Füzi, M. (2008) Identification of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol* **46**, 1878-1880.
- Massidda, O., Rossolini, G.M. and Satta, G. (1991) The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J Bacteriol* **173**, 4611-4617.
- Neuwirth, C., Siebor, E., Robin, F. and Bonnet, R. (2007) First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4486-4488.
- Pitout, J.D., Gregson, D.B., Poirel, L., McClure, J.A., Le, P. and Church, D.L. (2005) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* **43**, 3129-3135.
- Rasmussen, B.A. and Bush, K. (1997) Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 223-232.
- Razzolini, M.T., Di Bari, M., Sanchez, P.S. and Sato, M.I. (2008) *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *J Water Health* **6**, 117-123.
- Rossolini, G.M., Zanchi, A., Chiesurin, A., Amicosante, G., Satta, G. and Guglielmetti, P. (1995) Distribution of *cphA* or related carbapenemase-encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus *Aeromonas*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 346-349.
- Rossolini, G.M., Walsh, T. and Amicosante, G. (1996) The *Aeromonas* metallo- β -lactamases: genetics, enzymology, and contribution to drug resistance. *Microb Drug Resist* **2**, 245-252.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.

- Scoaris, O., Colacite, J., Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Abreu, B.A.F. and Dias B.P.F. (2008) Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**, 111-122.
- Uehara, F.I., Balsalobre, L.C., Dropa, M., Rojas, M.V.R., Moura, E.M., Mayer, C.C.S., Matté, G.R. and Matté, M.H. (2008) A novel genus-specific primer for detection of *Aeromonas* and identification of atypical strains by PCR-RFLP approach. In: 9th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*, Vila Real - Portugal. 9th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*, 2008. p. 106.
- Walsh, T.R., Bolmstrom ,A., Qwarnstrom, A. and Gales, A. (2002) Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* **40**, 2755-2759.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L. and Nordmann, P. (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **18**, 306–325.

Table 1. Characterization of metallo- β -lactamases in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*

| Strain | Carbapenem resistance (%) | | | MBL screening (% positive isolates) | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|------|---------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | | Combined disk assay ^a | | | | PCR | | | |
| | IPM | MEM | IMP/MEM | 0.5 mol l ⁻¹ EDTA | | TGA | | <i>cphA</i> | <i>bla</i> _{IMP} | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{SPM} |
| | | | | + IPM | + MEM | + IPM | + MEM | | | | |
| <i>A. hydrophila</i> (n=41) | 87.8 | 75.6 | 75.6 | 87.8 | 75.6 | 0 | 0 | 97.6 | - | - | - |
| <i>A. jandaei</i> (n=46) | 10.9 | 8.7 | 8.7 | 10.9 | 8.7 | 0 | 0 | 100 | - | - | - |
| Positive control strains | | | | | | | | | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> IMP-1 | R | R | R/R | + | + | + | + | - | + | - | - |
| <i>E. cloacae</i> VIM-1 | R | R | R/R | + | + | + | + | - | - | + | - |
| <i>P. aeruginosa</i> SPM-1 | R | R | R/R | + | + | + | + | - | - | - | + |

^a IPM, imipenem; MEM, meropenem; EDTA, ethylenediamin tetraacetic acid; TGA, thioglycolic acid; a ≥ 7 mm increase in the diameter of the zone of inhibition in the presence of EDTA, in comparison with the diameter of an imipenem or meropenem disk alone was interpreted as a positive result.

Artigo 2

1. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H. Molecular detection of enterotoxins in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Journal of water and health, 2009.

Molecular detection of enterotoxins in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*.

Balsalobre LC^{1*}, Dropa M¹, Matté GR¹, Matté MH¹.

¹School of Public Health, University of São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo 715, Zip code: 01246-904, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author. Tel: 55 11 81456348; Fax: 55 11 30833501; E-mail: liviabalsalobre@usp.br

Short title for printed page headings: Livia C. Balsalobre *et al.* *Aeromonas* virulence.

Abstract. *Aeromonas* species are widely distributed in aquatic environments and recent studies include the genus in the emergent pathogens group due to its frequent association with local and systemic infections in immunocompetent humans. Aiming search for virulence genes in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* we designed specific primers to detect *act* and *alt* genes. Primers described elsewhere were used to detect *ast*. Eighty-seven strains previously identified using phenotypic and genotypic tests as *A. hydrophila* (41) and *A. jandaei* (46) were analyzed for the presence of the virulence genes using PCR. DNA fragments of expected size were purified and directly sequenced. Among the 41 strains of *A. hydrophila* 70.7% (29), 97.6% (40) and 26.8% (11) possessed *act*, *ast* and *alt* genes, respectively. Among the 46 strains of *A. jandaei*, 4.4% (2), 0% (0) and 32.6% (15) were positive for *act*, *ast* and *alt* genes, respectively. Sequencing allowed for the confirmation of amplified products using BLAST. The present work proposes a specific and rapid diagnostic method to detect the main virulence determinants of *Aeromonas*, a genus potentially pathogenic to humans.

Keywords: *act*, *Aeromonas*, *alt*, *ast*, PCR, virulence.

INTRODUCTION

Aeromonas species are aquatic organisms that cause a series of clinical manifestations, including septicemia, skin ulcers and diarrhea (Chopra *et al.* 1999). Although the genus was discovered more than 100 years ago, only during the past four decades its role in a variety of human diseases has been proved and *Aeromonas* species were formerly considered opportunistic organisms of immunocompromised hosts, now implicated as etiologic agents in numerous clinical cases involving competent and immunocompetent hosts (Janda & Abbott 1998; Sechi *et al.* 2002; Awan *et al.* 2006) as it was observed in the Thailand Tsunami, where the genus was the main cause of skin ulcers among the survivors (Hiransuthikul *et al.* 2005). The World Health Organization (WHO) considers the health significance of *Aeromonas* moderate and the evidences that infer the relation of genus *Aeromonas* in the cause of disease in humans include: the absence of others pathogens in symptomatic individuals, an average of symptomatic individuals higher than asymptomatic ones, identification of enterotoxins in *Aeromonas* strains, and improvement of patients' diarrhea when effective *Aeromonas* spp. antibiotic therapy is used (Kelly *et al.* 1993). The detection of these organisms is thought to be underestimated, as diarrhea symptoms may subside spontaneously. Recent studies have included the genus *Aeromonas* within the emergent pathogens group, due to the increase of its frequent association with local and systemic infections in humans (Di Bari *et al.* 2008).

The genus *Aeromonas* is widely distributed in water, food and soil, and it has been isolated from treated and untreated water samples, including a hospital water supply and chlorinated water (Bomo *et al.* 2004; Wu *et al.* 2006). Also its high prevalence in the environment is considered a threat to public health, as infections caused by these organisms usually result from the ingestion of contaminated water or food (Sen & Rodgers 2004). *Aeromonas* has been isolated from clinical samples as the sole pathogen, where it was inferred to be the cause of diarrhea in the studied patients (Hofer *et al.* 2006). Previous studies have shown that *Aeromonas* strains can carry virulence determinants responsible for infection in humans (Kingombe *et al.* 1999; Sen & Rodgers 2004; Razzolini *et al.* 2008). Due to the increasing reports about the

genus occurrence, in 1998 the Environmental Protection Agency (EPA) included *Aeromonas hydrophila* in the Contaminant Candidate List of potential waterborne pathogens (EPA 2006).

Among the recognized *Aeromonas* species, *Aeromonas veronii* bv. *sobria*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas hydrophila* are more frequently associated with diarrhea in humans, representing 85% of clinical isolates. A smaller proportion of *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas veronii* bv. *veronii*, *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas trota* have also been isolated from clinical samples (Ormen *et al.* 2003). Despite the literature data, the most pathogenic species were determined to be *Aeromonas jandaei* ATCC 49568^T followed by *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T (Janda & Kokka 1991) according to a pathogenicity study of 12 *Aeromonas* type strains.

Aeromonas can produce a variety of biologically active extracellular substances similar to virulence factors found in other enteropathogens, especially toxins responsible for gastrointestinal infections. *Aeromonas* virulence is multifactorial and not completely understood, but it is known that the cytotoxic enterotoxins Ast and Alt, the toxin group aerolysin-hemolysin and the cytotoxic enterotoxin encoded by *act* gene play an important role in the genus pathogenesis and are directly associated with the cause of gastroenteritis in humans (Chopra *et al.* 1996; Sha *et al.* 2002). These virulence factors are chromosomally encoded and cause fluid secretion in rabbit ileal loops (Brown *et al.* 1997).

Given the importance of *Aeromonas* to public health, it is crucial to detect the potential pathogenic strains in the environment. The present work developed a rapid and specific molecular diagnostic method that can determine the main virulence factors of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* strains.

METHODS

Bacterial strains

Eighty-seven *Aeromonas* isolates were selected from the Culture Collection of Public Health Laboratory located at School of Public Health-SP-Brazil. The strains were isolated from different environmental water sources and have been previously identified as *Aeromonas hydrophila* (41) and *Aeromonas jandaei* (46) using molecular and biochemical techniques.

Preparation of DNA

Total chromosomal DNA from *Aeromonas* strains was extracted using heat-shock method according to Chapman *et al.* (2001) with modifications. In brief, the strains were grown overnight in 2mL of LB (Luria Broth) 1% NaCl and centrifuged for 5 min. at 10,000 xg. The pellet was resuspended in 1mL sterile MilliQ® water and centrifuged for 3 min. at 10,000 xg. The pellet was resuspended in 200µL of sterile MilliQ® water and the 1.5mL microtubes were boiled for 10 min. at 95°C and then immediately frozen for 30 min. at -20°C. After that, tubes were centrifuged for 10 min. and the supernatant was transferred to a new 1.5mL microtube. Total DNA was storage at -20°C.

Design of primers

Primers were designed based on conserved regions of the genes and were 18 to 22bp in length (**Table 1**). We experienced difficulties in choosing the GenBank sequences for hemolysin, aerolysin and *act* because of controversial nomenclature of these genes; hence, we used the genes for cytotoxic/citolytic enterotoxin (*act*), β-hemolysin (*hlyB*) and aerolysin (*aer*) as a group, denominated *act/hlyB/aer* complex. For *ast*, Sen & Rodgers' (2004) primers were used. For the *act/hlyB/aer* complex, genes named as citolytic or cytotoxic enterotoxin, aerolysin and hemolysins (except α-hemolysin) were chosen. When designing the *alt* gene primers set we noticed that this gene presented a high similarity with the lipase gene and by studying the complete genome of *A. hydrophila* ATCC (**CP000462**) and *alt* (**L77573**) and lipase (**AF092033**) genes sequences, we observed that the *alt* gene sequence is located inside the lipase gene, when compared with the *A. hydrophila* ATCC complete genome, so the primers herein designed to amplify the *alt* gene, are also able to amplify the lipase gene. Based on the information above, different nomenclatures

have been given to the same gene. Unique primers were designed for the amplification of virulence encoding genes *alt* and *act/hlyB/aer* complex. All available gene sequences for a given factor were manually aligned using BioEdit (BioEdit version 5. 0. 6; Tom Hall, North Carolina State University, NC, USA) and searches were performed for all primers to test the overall theoretic specificity by using the basic local alignment search tool (BLAST). All primers were synthesized by Bioneer Oligo Synthesis Report (Korea).

PCR (Polymerase Chain Reaction) Analysis

Cycling conditions were determined for the three genes separately as: 95°C for 5 min. followed by 30 cycles of 95°C for 1min, 55°C for 1 min., 72°C for 1 min., and a final extension at 72°C for 5min.. The expected product sizes for *ast*, *alt* and *act/hlyB/aer* complex were 328bp, 764bp and 400bp, respectively. Negative controls of *Vibrio fluvialis*, *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* were included.

The amplified products were visualized on 1.8% agarose gels stained with ethidium bromide. Bands were purified with illustra™ GFX™ PCR DNA (GE – UK) and Gel Band Purification Kit and sequenced directly.

RESULTS

All the strains of *A. hydrophila* presented at least one gene: 70.7% (29), 97.6% (40) and 26.8% (11) possessed *act/hlyB/aer* complex, *ast* and *alt* genes, respectively. Almost forty percent (17) of *Aeromonas jandaei* strains presented at least one gene: 4.4% (2), 0% (0) and 32.6% (15) were positive for *act/hlyB/aer* complex, *ast* and *alt* genes, respectively. The occurrence of more than one gene in the same strain was observed in 78.0% (32) of *Aeromonas hydrophila* and 6.2% (1) of *Aeromonas jandaei* strains. The distribution of the virulence factors alone and in combination was calculated based on the positive strains for the occurrence of at least one gene and is described in **Table 2**. Sequencing allowed the confirmation of the amplified products using BLAST, showing specificity of the *act/hem/aer* complex and *alt* primers, emphasizing the capability of detecting *aerolysin*, β -*hemolysin* and *cytotoxic enterotoxin* genes using the same pair of primers (**Figures 1, 2**). The sequences are

available with GenBank accession nos. **EU849093**, **EU849094**, **EU849095**, **EU849096** and **EU849097**.

DISCUSSION

The application of molecular methods in the identification of *Aeromonas* species has brought advances in the area. Molecular evolutionary studies and methods have elucidated the emergence of epidemiological pathogenic bacteria associated with the transmission of disease to humans (Kingombe *et al.*, 1999; Conway & Roper 2000), helping in the detection, identification, differentiation and distribution of virulence determinants responsible for the pathogenicity of microorganisms (Schrag & Wiener 1995; Wassenaar 2001).

A considerable number of studies on *Aeromonas* spp. virulence factors are characterized by utilizing classic methods, including enterotoxigenicity in suckling mice, detection of cytotoxicity in Vero cell and detection of β -hemolysis in blood agar plates (Singh & Sanyal 1997; Falcão *et al.* 1998; Alavandi & Ananthan 2003; Awan *et al.* 2006; Obi *et al.* 2007; Razzolini *et al.* 2008). Despite this, there has been an increase in research using molecular methods to reach a definitive, rapid and specific diagnosis of genetic virulence determinants. Unfortunately the confusing virulence nomenclature is becoming a problem, as each publication uses its own nomenclature or does not emphasize this problem. For example, Kannan *et al.* (2001) verified the presence of the aerolysin gene in clinical strains of *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*. However, we did BLAST searches with their primers and found they showed homology to the cytotoxic enterotoxin Alt, indicating that the products yielded in that study were from the *alt* gene and not aerolysin gene. In the present work, the *act/hlyB/aer* complex of *A. hydrophila* can detect the three previously described virulence factors.

Previous studies have addressed the molecular detection of virulence factors in *Aeromonas* spp. by using oligonucleotides probes or PCR detection. Comparing the results obtained in this work with those present in the literature, we have found a higher number of *Aeromonas hydrophila* strains positive for the genes. Sen & Rodgers (2004) rarely found the *act* gene in *Aeromonas hydrophila* when compared

with other species in the study, *ast* gene was found only in *A. hydrophila* and *alt* gene had a variable distribution among the species. Albert *et al.* (2000) found only one *A. hydrophila* strain among clinical isolates, which did not demonstrate the presence of *alt*, *ast* and *act* genes. Pollard *et al.* (1990) analyzed 33 strains from different *Aeromonas* species using classical methods of hemolysis detection and PCR for aerolysin gene and found only one *Aeromonas sobria* strain positive for hemolysis production and only one *A. hydrophila* strain positive for the aerolysin gene. All the other strains were negative for both assays.

To our knowledge this is the first study that detects the *act/hlyB/aer* complex and a high number of positive strains for *alt* in *Aeromonas jandaei*. Few studies have included this species when searching for virulence factors and its importance to public health is still controversial, although some authors have emphasized its association with disease in humans and its capability to producing virulence factors. (Hsu *et al.* 1981; Singh & Sanyal 1997; Longa *et al.* 2005; Esteve *et al.* 2003). Despite the use of *Aeromonas hydrophila* sequences to design *act/hlyB/aer* complex primers, two strains of *Aeromonas jandaei* yielded the expected product. Based on this, one can infer that this primer set can also be used to detect *act/hlyB/aer* complex in *Aeromonas jandaei*. *Ast* gene was not found in *A. jandaei* strains, corroborating reports that except for one *A. encheleia* strain, *ast* was only found in *A. hydrophila* (Sen & Rodgers 2004). It is important to note that the strains used in this study are environmental. Thus, both the percentage of positive strains found herein and the combination of the virulence factors are of concern vis-a-vis the potential virulence of *Aeromonas*. According to Albert *et al.* (2000), strains possessing *ast* and *alt* were associated with watery stools, as they were more frequent in clinical than in environmental samples. The opposite occurred with *ast* alone. *Act* was found to be associated with bloody diarrhea and the gene was never found alone, as in the present work, except for one *Aeromonas jandaei* strain.

Virulence in *Aeromonas* has been associated with disease in humans. The wide distribution of the species highlights the importance of environmental samples surveys for virulence genes to determine potential pathogenic strains, which

represent a risk to human health. Such surveillance requires a rapid and specific method, as the method proposed herein. This methodology may be useful to detect virulence genes in clinical *Aeromonas* strains, becoming an important instrument in the understanding of their epidemiology, distribution and association with disease.

CONCLUSIONS

This study describes a molecular method that can characterize the principal genetic virulence determinants of environmental and clinical strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. The distribution of these two species was also observed in various environmental sources and using the diagnostic method described herein we were able to show the presence and correlation of the virulence factors within the studied strains. Based on this, one can conclude that potential pathogenic strains are present in the environment, based on the detection of virulence factors in these strains, that may pose a risk to human health.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2007/02266-7 and 2007/02238-3) for supporting this work. We are indebted to Martha Rojas, Elisabeth Moura and Helena Muranaka for technical support and Pedro Pedro for reviewing this article.

REFERENCES

Alavandi, S. V. & Ananthan, S. 2003 Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian J. Med. Microbiol.* **21**(4), 233-8.

Albert, M. J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K. A., Chopra, A. K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A. S., Islam, M. S., Sack, R. B., Mollby, R. 2000 Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.* **38**(10), 3785-90.

Awan, M. B., Ahmed, M. M., Bari, A., Krovacek, K. 2006 Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. isolated from food and environment in Abu Dhabi United Arab Emirates. *J. Food Prot.* **69**, 1713-1716.

Bomo, A. M., Stevik, T. K., Hovi, I., Hanssen, J. F. 2004 Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters. *J. Environ. Qual.* **33**(3), 1041-1047.

Brown, R. L., Sanderson, K., Kirov, S. M. 1997 Plasmids and *Aeromonas* virulence. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **17**, 217-223.

Chapman, P. A., Ellin, M., Ashton, R., Shafique, W. 2001 Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **68**, 11-20.

Chopra, A. K., Peterson, J. W., Xu, X-J., Coppenhaver, D. H., Houston, C. W. 1996 Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **21**, 357-377.

Chopra, A. K., Houston, C. W. 1999 Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect.* **1**(13), 1129-1137.

Conway, D. J. & Roper, C. Micro-evolution and emergence of pathogens. 2000 *Int. J. Parasitol.* **30**(12-13), 1423-1430.

Di Bari, M., Hachich, E. M., Melo, A. M. J., Sato, M. I. Z. 2008 *Aeromonas* spp. and microbial indicators in raw drinking water sources. *Braz. J. Microbiol.* **38**, 516-521.

Esteve, C., Valera, L., Gutiérrez, C., Ventosa, A. 2003 Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *A. jandaei* Carnahan et al. 1992. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(Pt 5), 1411-9.

Environmental Protection Agency (EPA). 2006 *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington, pp 184.

Falcão, D. P., Lustri, W. R., Bauab, T. M. 1998 Incidence of non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. *Curr. Microbiol.* **37**(1), 28-31.

Hall, TA. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98 [Available on line].

Hiransuthikul, N., Tantisiriwat, W., Lertutsahakul, K., Vibhagool, A., Boonma, P. 2005 Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 93–6.

Hofer, E., Reis, C. M., Theophilo, G. N., Cavalcanti, V. O., Lima, N. V., Henriques, M. F. 2006 Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**(2), 217-20.

Hsu, T. C., Waltman, W. D., Shotts, E. B. 1981 Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Dev. Biol. Stand.* **49**, 101–111.

Janda, J. M. & Kokka, R. P. 1991 The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identification. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**(1), 29–33.

Janda, J. M. & Abbott, S. L. 1998 Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species. Disease presentations and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 332-44.

Kannan, S., Suresh, K. P., Karkuzhali, K., Chattopadhyay, U. K., Pal, D. 2001 Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain

reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **5**(3), 91-4.

Kelly, K. A., Koehler, J. M., Ashdown, L. R. 1993 Spectrum of extraintestinal disease due to *Aeromonas* species in tropical Queensland, Australia. *Clin. Infect. Dis.* **16**(4), 574-9.

Kingombe, C. I. B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M. J., Swings, J., Peduzzi, R., Temmi, T. 1999 Pcr detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12), 5293-5302.

Longa, A., Vizcaya, L., Nieves, B., Bravo, L., Morier, L., Pérez-Schael, I., Enrique, C. L. 2005 Factors of virulence associated with enteropathogenicity in strains of *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea in Mérida, Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.* **57**(2), 85-91.

Obi, C. L., Ramalivhana, J., Samie, A., Igumbor, E. O. 2007 Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolates from stool samples of patients in the Venda region of South Africa. *J. Health. Popul. Nutr.* **5**(4), 428-35.

Ormen, O., Regue, M. Q., Tomás, J. M., Granum, P. E. 2003 Studies of aerolysin promoters from different *Aeromonas* spp. *Microb Pathog.* **35**(5), 189-96.

Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D., Rozee, K. R. 1990 Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**(11), 2477-81.

Razzolini, M. T., Bari, M. D., Zanolli, S. M. I., Sanchez, P. S. 2008 *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *J. Water Health.* **6**(1), 117-123

Schrag, S. J. & Wiener, P. 1995 Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends Ecol. Evol.* **8**, 319-24.

Sechi, L. A., Deriu, A., Falchi, M. P., Fadda, G., Zanetti, S. 2002 Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *J. Appl. Microbiol.* **92**(2), 221-7.

Sen, K. & Rodgers, M. 2004 Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J. Appl. Microbiol.* **97**(5), 1077-86.

Sha, J., Kozlova, E. V., Chopra, A. K. 2002 Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect. Immun.* **70**(4), 1924-35.

Singh, D. V. & Sanyal, S. C. 1992 Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.* **36**(4), 269-72.

Wassenaar, T. M., Gaastra, W. 2001 Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* **201**(1), 1-7.

World Health Organization. 2006 Guidelines for drinking-water quality [http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf]: incorporating first addendum. **Vol. 1**, Recommendations, 3rd edn.

Wu, C. J., Wu, J. J., Yan, J. J., Lee, H. C., Lee, N. Y., Chang, C. M., Hsin-I, S., Wu, H. M., Wang, L. R., Ko, W. C. 2006 Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *J. Infect.* **54**(2), 151-8.

Figure captions

Table 1. Primers Selected for the detection of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*.

| Primer (5' – 3') | Target gene (toxin) | Position* | Product |
|--|---|-----------|---------|
| <i>act/hlyB/aer</i> complex ^λ | | | |
| F AGAAGGTGACYACCAAGAACA | <i>act</i> : cytotoxic enterotoxin, | 1661-2061 | 400pb |
| R CCACTTCACTTCACCCGGGA | <i>hlyB</i> : beta-hemolysin, <i>aer</i> : aerolysin | | |
| <i>ast</i> ^α | | | |
| F TCTCCATGCTTCCCTTCCACT | <i>ast</i> : cytotoxic enterotoxin | 2349-2677 | 328pb |
| R GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG | | | |
| <i>alt</i> ^λ | | | |
| F ATCGGGGTGACCCTCACCTC | <i>alt</i> : cytotoxic enterotoxin | 181-944 | 764pb |
| R GGCAGGAACCTCGTTGACGAAGC | | | |

*Position based on the alignment of the genes for this study.

^αPrimers designed by Sen & Rodgers (2004).

^λPrimers designed in this work.

Table 2. The distribution of the virulence factors alone and in association, based on the positive strains for the occurrence of at least one gene.

| | <i>Specie (no. of strains)</i> | <i>Location</i> | <i>act[¥]</i> | <i>ast</i> | <i>alt</i> | <i>%</i> |
|-----------------------------|--|--|------------------------|------------|------------|----------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 6, 7 [§] ; 12-16, 19*; 17, 20, 39-41, 43, 44 ^α ; 21 ^λ ; 23,24, 26, 29, 31 ^δ (21) | STE [§] , Santana Cave* Guarapiranga Dam ^α , Dirty Water Cave ^λ Tietê River ^δ | + | + | - | 51.2 |
| | 3 [§] (1) | STE [§] | + | - | + | 2.4 |
| | 5 [§] ; 18*; 22, 27, 28 33 ^δ ;45-47 ^α (9) | STE [§] , Santana Cave* Guarapiranga Dam ^α , Tietê River ^δ | - | + | - | 22.0 |
| | 38, 42, 50 (3) | Guarapiranga Dam | - | + | + | 7.3 |
| | 8 [§] ; 25, 30, 32 ^δ ; 37, 48, 49 ^α (7) | STE [§] , Guarapiranga Dam ^α , Tietê River ^δ | + | + | + | 17.1 |
| <i>Aeromonas jandaei</i> | 96 ^α (1) | Guarapiranga Dam ^α | + | - | - | 6.2 |
| | 94 ^α (1) | Guarapiranga Dam ^α | + | - | + | 6.2 |
| | 52 ^ω ; 58, 71, 73, 75, 76,79, 84, 87, 90, 93, 95, 101, 103, 104 ^α (15) | Pool ^ω ; Guarapiranga Dam ^α | - | - | + | 88.2 |

STE[§]: Sewage Treatment Effluent
[¥]act/hlyB/aer complex

Figure 1. Alignment of GenBank sequences and sequences found in this study of the *act/hlyB/aer* complex and *alt*. Underlined sequences were regions chosen for primers design.

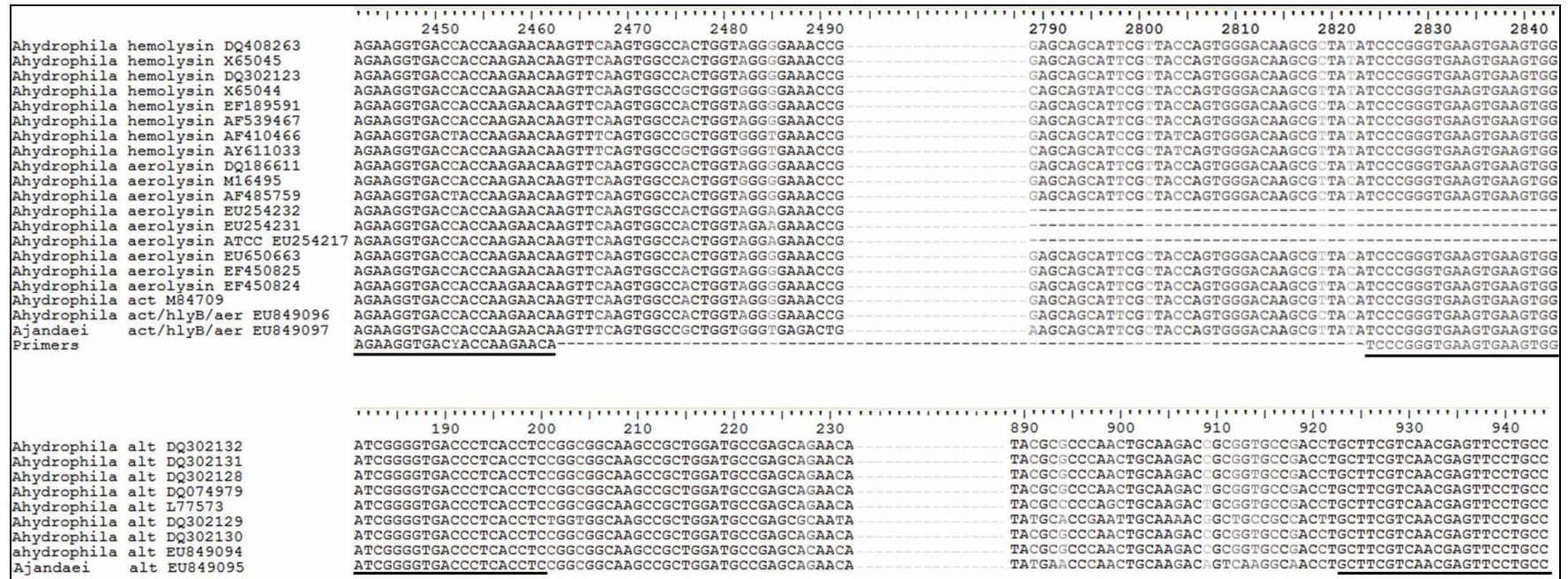
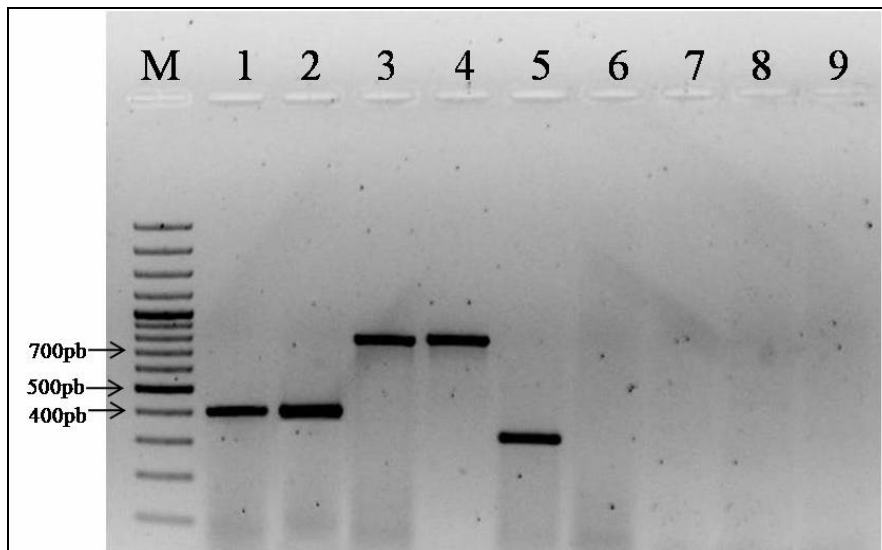


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* virulence genes. Lanes 1, 3 and 5, *act/hlyB/aer* complex, *alt* and *ast*, respectively, from *Aeromonas hydrophila*. Lanes 2, 4 and 6, *act/hlyB/aer* complex, *alt* and *ast*, respectively, from *Aeromonas jandaei*. Lanes 7-9, *Escherichia coli* negative for the three genes. M stands for the molecular weight standard: Gene ruler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).



ANEXO 2

➤ Participação em eventos

1. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Rojas, M. V. R., Araújo, RS, Moura EMM, Muranaka, H., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.

Detection of AmpC and Metallo-beta-lactamases production in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from aquatic environments In: 9th International Symposium on Aeromonas and Plesiomonas, 2008, Vila Real - Portugal.

9th International Symposium on Aeromonas and Plesiomonas. Vila Real - Portugal: Setembro, 2008. v.1. p.60 – 60..

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Muranaka, H., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.

Presença de genes de virulência em cepas ambientais de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* In: 6º Congresso Paulista de Infectologia, 2008, Atibaia-SP.

Anais do 6º Congresso Paulista de Infectologia. Agosto, 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. BALSALOBRE, L. C., Rojas, M. V. R., DROPA, M., Araújo, RS, FERNANDES, L. N., Moura EMM, Matté, G. R., MATTÉ, M. H.

Characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from a clinical sample at Itapevi, SP In: 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2008, Gramado/RS.

Anais do 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. Gramado/RS: Outubro, 2008. v.1. p.1 - 1

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

4. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Lincopan, N., Moura EMM, Muranaka, H., Rojas, M. V. R., FERNANDES, L. N., Araújo, RS, Matté, G. R., MATTÉ, M. H.

Phenotypic and molecular detection of metallo-b-lactamases in environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* In: 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2008, Gramado/RS.

Anais do 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. Gramado/RS: Outubro, 2008. v.1. p.1 - 1

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

ANEXO 4

➤ Produção Técnica

Produtos tecnológicos sem registro ou patente

1. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP183/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas hydrophila, partial cds (FJ767900), 2009
2. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP195/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas hydrophila, partial cds (FJ767903), 2009
3. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP201/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas hydrophila, partial cds (FJ767904), 2009
4. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP221/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas hydrophila, partial cds (FJ767901), 2009
5. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP223/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas hydrophila, partial cds (FJ767902), 2009
6. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP229/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas jandaei, partial cds (FJ767907), 2009
7. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP233/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas jandaei, partial cds (FJ767908), 2009
8. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP239/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas jandaei, partial cds (FJ767905), 2009
9. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP263/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas jandaei, partial cds (FJ767909), 2009
10. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
FSP269/08 - bla_{TEM-116} Aeromonas jandaei, partial cds (FJ767906), 2009
11. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila act/hlyB/aer complex, partial cds (EU849096), 2008
12. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833973), 2008
13. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833974), 2008
14. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833975),
15. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833976), 2008
16. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833977), 2008
17. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila enterotoxina citotônica (alt), partial cds (EU849094), 2008

18. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas hydrophila enterotoxina citotônica (ast), partial cds (EU849093), 2008
19. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei act/hlyB/aer complex, partial cds (EU849097), 2008
20. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833978), 2008
21. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833979), 2008
22. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833980), 2008
23. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833981), 2008
24. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei cphA metallo-beta-lactamase gene, partial cds (EU833982), 2008
25. BALSALOBRE, L. C., DROPA, M., Matté, G. R., MATTÉ, M. H.
Aeromonas jandaei enterotoxina citotônica (alt), partial cds (EU849095), 2008

Seqüências disponíveis online no site
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nuccore&itool=toolbar>, através
do número de acesso entre parênteses.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)