

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**PREVALÊNCIA DE GENES RELACIONADOS COM A**  
**PATOGENICIDADE E PRODUÇÃO DE ENZIMAS**  
**EXTRACELULARES EM *Aeromonas sp.***

**RAQUEL FADANELLI**

Caxias do Sul  
2005

**RAQUEL FADANELLI**

**PREVALÊNCIA RELACIONADA COM A PATOGENICIDADE E PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS EXTRACELULARES EM *Aeromonas sp.***

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de Mestre em  
Biotecnologia**

**Orientador: Dr. Sérgio Echeverrigaray**

**Co-orientadores: Dra. Ana Paula L.  
Delamare**

**Dr Sérgio Olavo Pinto da Costa**

**Caxias do Sul**

**2005**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

F144p Fadanelli, Raquel

Prevalência relacionada com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em *Aeromonas sp.* / Raquel Fadanelli. – 2005. xii, 50 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2005.

Orientação: Sérgio Echeverrigaray.

Coorientação: Ana Paula Longaray Delamare, Sérgio Olavo Pinto da Costa.

1. Bactérias Gram-negativas. 2. Aeromonas - Patogenicidade. 3. Enzimas extracelulares. I. Echeverrigaray, Sergio, orient. II. Delamare, Ana Paula Longaray, coorient. III. Costa, Sérgio Olavo Pinto da, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 579.84

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Michele Fernanda Silveira da Silveira - CRB 10/2334

**RAQUEL FADANELLI**

PREVALÊNCIA DE GENES RELACIONADOS COM A PATOGENICIDADE E  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES EM *Aeromonas* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando à obtenção do título  
de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadores: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26 DE AGOSTO DE 2005

---

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

---

Co-orientadores: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare  
e Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

---

Prof. Dr. Afonso Luís Barth

---

Profa. Dra. Renata Ligia de Araújo Furlan

---

Profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray, orientador que admiro muito, pela confiança, ensinamentos, amizade e apoio constante.

À Prof. Dra. Ana Paula Longaray Delamare, pelo acompanhamento, sugestões e ensinamentos durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa, pelo acompanhamento, sugestões e ensinamentos durante o trabalho.

À Manoela Figueiró, pelo auxílio, apoio constante, amizade e companheirismo.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela colaboração e ótima convivência e amizade.

A todos os colegas da turma de mestrado, em especial à Karina Bracini e Rosane Carrer, pelo companheirismo e amizade.

À Prof. Dra. Neiva Monteiro de Barros, pelas sugestões e auxílio nas correções.

À Prof. Dra. Suelem Paesi, pelas sugestões e auxílio nas correções.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*À Milton, Marisa e Márcio,  
pelo apoio, dedicação e  
carinho.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Páginas</b>
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURASx	
RESUMOxi	
ABSTRACT xii	
1. INTRODUÇÃO1	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA3	
2.1 O gênero <i>Aeromonas</i> 3	
2.2 Taxonomia4	
2.3 Epidemiologia8	
2.4 Fatores de Virulência em <i>Aeromonas</i> 12	
3. MATERIAL E MÉTODOS18	
3.1. Descrição das linhagens de <i>Aeromonas</i> 18	
3.2. Avaliação fenotípica dos fatores da virulência20	
3.2.1. Atividade Proteolítica Qualitativa20	
3.2.2. Atividade Proteolítica Quantitativa20	
3.2.3. Atividade Lipolítica Qualitativa21	
3.2.4. Atividade Hemolítica Qualitativa21	
3.2.5. Atividade Hemolítica Quantitativa21	
3.3. Avaliação da presença de genes relacionados como fatores de virulência 22em <i>Aeromonas</i> sp.	
3.3.1. Primers utilizados22	
3.3.2. Amplificação dos genes de virulência22	

3.3.3. Separação e visualização dos segmentos amplificados23

3.4. Análise Estatística23

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO24

4.1. Presença de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em distintas espécies de *Aeromonas*24

4.2. Presença de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas*30

5. CONCLUSÕES40

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS CHAVES DOS BACILOS GRAM-NEGATIVOS OXIDASE POSITIVOS.	4
TABELA 2. PROVAS BIOQUÍMICAS DIFERENCIAIS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE <i>AEROMONAS</i> AO NÍVEL DE ESPÉCIE .	5
TABELA 3. GRUPOS DE HIBRIDIZAÇÃO, GENOESPÉCIES E GRUPOS FENOTÍPICOS DO GÊNERO <i>AEROMONAS</i> .	7
TABELA 4. DISTRIBUIÇÃO CLÍNICA DE <i>AEROMONAS SP.</i> ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES HUMANAS .	11
TABELA 5. DESCRIÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>AEROMONAS SP.</i> UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DOS GENES FATORES DA VIRULÊNCIA.	19
TABELA 6. SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM <i>AEROMONAS SP.</i>	22
TABELA 7. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>AERA</i> , <i>AHPA</i> , <i>AHYB</i> , <i>LIPA</i> E <i>SATA</i> EM DISTINTAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>AEROMONAS</i> .	25
TABELA 8. ATIVIDADES HEMOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA EM DISTINTAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>AEROMONAS</i> .	28
TABELA 9. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO (SPEARMAN) ENTRE AS ATIVIDADE ENZIMÁTICAS E A PRESENÇA DE GENES POTENCIALMENTE ASSOCIADOS COM A PATOGENICIDADE DE <i>AEROMONAS</i> .	29
TABELA 10. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>AERA</i> , <i>AHPA</i> , <i>AHYB</i> , <i>LIPA</i> E <i>SATA</i> EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE <i>AEROMONAS</i> DO GRUPO HYDROPHILA.	30
TABELA 11: ATIVIDADES HEMOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE <i>AEROMONAS</i> DO GRUPO HYDROPHILA.	33

TABELA 12. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO (SPEARMAN) ENTRE AS ATIVIDADE ENZIMÁTICAS E A PRESENÇA DE GENES POTENCIALMENTE ASSOCIADOS COM A PATOGENICIDADE EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *AEROMONAS* DO GRUPO HYDROPHILA.

37

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. PERCENTAGEM DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *AERA* (A), *AHPA* (B), *AHYB* (C), *LIPA* (D) E *SATA* (E) EM DISTINTAS ESPÉCIES DO GÊNERO *AEROMONAS*. POSITIVO ■ E NEGATIVO □ 26
- FIGURA 2. PERCENTAGEM DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *AERA* (A), *AHPA* (B), *AHYB* (C), *LIPA* (D) E *SATA* (E) EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *AEROMONAS* DO GRUPO *HYDROPHILA*. POSITIVO ■ E NEGATIVO □ 31
- FIGURA 3. VARIAÇÃO NA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS. 34
- FIGURA 4. VARIAÇÃO NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (AZOCASEÍNA) EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS. 35
- FIGURA 5. RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE HEMOLÍTICA E A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM ISOLADOS DE *AEROMONAS* 38

## RESUMO

As bactérias do gênero *Aeromonas* são consideradas como patógenos emergentes de animais e humanos, causando diarreia e infecções extra intestinais tais como, infecções de pele e septicemia. Várias enzimas extracelulares e toxinas tem sido apontadas como potenciais fatores de virulência em *Aeromonas*. Contudo, a importância de cada fator em particular ou sua interação durante os processos patogênicos não está bem definida. No presente trabalho, a distribuição e a atividade fenotípica dos genes que codificam aerolisina/hemolisina, serina protease, metaloprotease, lipase e glicerofosfolipideo-colesterol aciltransferase (GCAT) foram investigados em 15 linhagens tipos, representando 12 das 14 espécies do gênero, e 30 isolados clínicos e ambientais em *Aeromonas*. Os genes analisados estão altamente conservados entre os gêneros e os isolados. O gene *lipA* foi identificado em 93% das amostras, podendo ser usado como um gene alvo para a rápida identificação de *Aeromonas* em amostras clínicas, ambientais e de alimentos. Os genes que codificam aerolisina, elastase, lipase e GCAT estiveram presentes tanto nos isolados clínicos como nos ambientais. Contrariamente, o gene *ahpA* foi mais prevalente nos isolados clínicos, indicando papel direto ou indireto no mecanismo patogênese destes microrganismos. Variações em relação às enzimas extracelulares foram evidenciadas entre as espécies e os isolados de *Aeromonas*. Contudo, nenhuma relação foi encontrada entre as atividades enzimáticas e os isolados clínicos. A relação entre atividade hemolítica sobre o sangue humano e a presença do gene aerolisina/hemolisina (*aerA*) pode ser considerada um indicativo de que aerolisina seja particularmente ativa contra eritrócitos humanos.

## ABSTRACT

*Aeromonas* are considered as emerging animal and human pathogens causing diarrhea and extraintestinal infections, such as wound infection and septicemia. Several extracellular enzymes and toxins have been pointed as potential virulence factors in *Aeromonas*. However, the importance of each particular factor or their interaction during the pathogenic processes is not well defined. In the present work, the distribution and phenotypic activity of the genes encoding the aerolysin/hemolysin, serine protease, metalloprotease, lipase and glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT) were investigated in 15 type strains, representing 12 of the 14 species of the genus, and 30 clinical and environmental isolates of *Aeromonas*. The former genes were found to be highly conserved among the genus and isolates. The *lipA* gene was identified in 93% of the samples and may be used as a target gene for the rapid identification of *Aeromonas* in clinical, food and environmental samples. Aerolysin, elastase, lipase and GCAT genes were present in both clinical and environmental isolates. Conversely, *ahpA* gene was more prevalent in clinical isolates, indicating their direct or indirect role in the mechanism of pathogenesis of these microorganisms. Variation on the extracellular enzymes was evidenced among the species and isolates of *Aeromonas*. However no relation was found between enzymatic activities and clinical isolates. The relation between hemolytic activity on human blood and the presence of aerolysin/hemolysin gene (*aerA*) can be seen as an indicative that aerolysin are particularly active against human erythrocytes.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas constituem a mais importante causa isolada de morbidez e mortalidade. A maior taxa de mortalidade por doenças diarreicas é observada em recém-nascidos e crianças, especialmente nos países em desenvolvimento. Cerca de um bilhão de episódios diarréicos e quase cinco milhões de mortes ocorrem, anualmente, em crianças com menos de cinco anos de idade. Além de vírus, existe uma gama de patógenos bacterianos que, isoladamente, ou em associação, provocam diarreias tais como: *Salmonella*, *Shigella*, *V. cholerae*, e outros, ditos emergentes, entre os quais se incluem diversas espécies do gênero *Aeromonas*.

As *Aeromonas* são bastonetes Gram-negativos que ocorrem de maneira amplamente difundida pela natureza, possuindo como habitat natural a água. Estas bactérias podem ser encontradas em águas utilizadas para diferentes fins, sendo consideradas como patógenos de peixes e animais de sangue frio. Porém, nos últimos anos, houve um crescente interesse por estes microrganismos devido aos aumentos dos registros de infecções em humanos, causadas por espécies de *Aeromonas*. Em humanos, membros deste gênero, são responsáveis, principalmente, por infecções intestinais transmitidas através da água e/ou alimentos contaminados e fezes de animais que albergam a bactéria. Estas espécies também podem provocar infecções extra intestinais, tais como: endocardites, meningites, abscessos intra-abdominais, peritonites, infecções do trato respiratório e urinário, septicemia, entre outras.

Apesar de não terem o seu papel completamente elucidado, vários fatores de virulência tem sido descritos para explicar o processo de patogenicidade em humanos por parte de *Aeromonas*. Tais fatores incluem a produção de enzimas e toxinas extracelulares, assim como a capacidade que estes patógenos possuem em aderir-se e multiplicar-se nos tecidos do hospedeiro. As toxinas produzidas por *Aeromonas* são classificadas como endotoxinas e exotoxinas (estas últimas também conhecidas como citotoxinas ou enterotoxinas). Dentre as principais

toxinas produzidas por estes microrganismos podemos citar a aerolisina e hemolisina. As principais enzimas extracelulares envolvidas na patogenicidade em humanos, descritas até o momento, são: lipases, proteases (metalo e serina proteases), glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferase (GCAT) e outras com funções ainda pouco estudadas. Além destas, a produção de biofilmes parece estar envolvida na implantação da população e na resistência ao tratamento com antibióticos, influenciando assim na capacidade patogênica destas bactérias. Diversos estudos mostram que a capacidade patogênica de *Aeromonas*, assim como ocorre em outros enteropatógenos, não está relacionada a um fator preponderante, mas à ação conjunta de diversos fatores que garantem a sobrevivência, implantação e proliferação do microrganismo no hospedeiro.

O envolvimento de vários genes que codificam estas substâncias tem sido descrito e a detecção destes é um passo importante para determinar o potencial patogênico de espécies de *Aeromonas*. Assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a presença de genes que codificam aerolisina/hemolisina, lipase, proteases (metalo e serina protease) e GCAT, bem como a expressão “*in vitro*” dos principais fatores de virulência em representantes das distintas espécies e em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas sp.*

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O gênero *Aeromonas*

As bactérias do gênero *Aeromonas* pertencem à família *Vibrionaceae*, são anaeróbicas facultativas, representadas por bacilos Gram-negativos (Gillespie, 1994; Janda et al., 1995). Possuem 0,3 – 1,0um de diâmetro e 1,0 – 3,5um de comprimento, são retos com extremidades arredondadas ou células que se aproximam a uma forma esférica. São bactérias monotríquias, embora flagelos peritriquios possam ser formados em culturas jovens em meio sólido (Popoff & Lallier, 1994; Altwegg, 1999).

As espécies são móveis (Bottarelli & Ossiprandi, 1999; Brooks et al., 2000) com exceção de *A. salmonicida* (Bottarelli & Ossiprandi, 1999). Podem ocorrer isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. São oxidase e catalase positivas, reduzem nitrato a nitrito e fermentam a D-glicose com formação de ácido e/ou gás. A grande maioria das espécies cresce a uma temperatura bastante variada, entre 0 – 45°C, embora sua faixa ótima de crescimento esteja entre 22 – 28°C, toleram pH de 4,5 – 9,0 e apresentam comprovada tolerância a salinidade (Popoff et al., 1981; Delamare et al., 2000). As *Aeromonas* são capazes de produzir uma série de exoenzimas (Popoff & Lallier, 1994; Janda et al., 1995; Altwegg, 1999) tais como: amilases DNAses, proteases, lipases, entre outras (Popoff & Lallier, 1994; Altwegg, 1999). Estes microrganismos também podem produzir B-lactamases, o que representa um grande problema na terapia com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Gillespie, 1994; Quiroga, et al., 2000).

## 2.2. Taxonomia

O grupo *Aeromonas* é distinguido da família *Enterobacteriaceae* pelo teste positivo da oxidase. Porém, como mostra a Tabela 1, existem limitações na identificação de *Aeromonas* dentro dos bacilos gram negativos oxidase positivos, entre os quais se encontram os gêneros *Aeromonas*, *Plesionomas*, *Vibrio* e *Pseudomonas* (Baron *et al.*, 1994).

**Tabela 1.** Características chaves dos bacilos Gram-negativos oxidase positivos (modificado de Baron *et al.*, 1994).

<b>Características</b>	<b><i>Aeromonas</i></b>	<b><i>Plesionomas</i></b>	<b><i>Víbro</i></b>	<b><i>Pseudomonas</i></b>
Fermentação Glicose	+	+	+	-
Ácido de Inositol	-	+	-	NA
Ácido de Manitol	+	-	+	NA
Liquefação da Gelatina	+	-	+	+/-
Crescimento TCBS*	-	-	+	-
Na+**	-	-	+	-

+: maioria das cepas positivas; -: maioria das cepas negativas; +/-: resultados variáveis; NA: não aplicável; \*: ágar Tiosulfato citrato-sais biliares-sacarose (TCBS); \*\*: requer ou é estimulado por NaCl 6,5%.

Tradicionalmente, as *Aeromonas* são classificadas ao nível de espécies através de uma série de testes bioquímicos de rotina, dentre os quais, os mais importantes são citados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Provas bioquímicas diferenciais para a classificação de *Aeromonas* ao nível de espécie (adaptada de Koneman *et al.*, 2001).

Microorganismo	oxidase	motilidade	DNase	Indol	Voges Proskauer	Lisina Descarboxilase	Ornitina Descarboxilase	Arginina Descarboxilase	Esculina	Gás (glicose)	Arabinose	Sacarose	Manitol	Inisitol
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. caviae</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>A. media</i>	+	-	+	v	-	-	-	+	+	-	+	-	na	na
<i>A. eucrenophila</i>	+	+	+	na	-	-	-	+	+	+	v	v	+	-
<i>A. sobria</i>	+++	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>A. veronii v. sóbria</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	v	-	+	+	-
<i>A. veronii v. veronii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>A. jandaei</i>	+	+	na	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>A. schubertii</i>	+	+	+	-	v	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. trota</i>	+	+	na	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+

na: não avaliada; v: variável; +++: reação intensa; +: positiva; -: negativa

Embora úteis para a identificação de algumas espécies, em particular aquelas presentes em amostras humanas, os testes bioquímicos apresentam limitações quanto a sua aplicação na identificação de muitas espécies isoladas do ambiente ou de alimentos (Millership, 1996). Diante disto, nas últimas décadas, a classificação de *Aeromonas* tem sofrido grandes mudanças já que, alguns autores consideram que os testes bioquímicos, usados para a identificação de *Aeromonas* spp. são inseguros, uma vez que, são incapazes de identificar precisamente as espécies, desde as mais comuns até algumas recentemente descritas (Borrel *et al.*, 1997; Chacón, *et al.*, 2003). Um sistema bastante aceito de classificação das espécies de *Aeromonas*, é a hibridização DNA-DNA. Este sistema apresenta alta sensibilidade e segurança quanto à caracterização de isolados, sendo capaz de identificar como mesma espécie aqueles isolados que diferem unicamente em poucos caracteres fenotípicos e que, certamente, pelos métodos convencionais, seriam considerados como espécies distintas. Portanto, a partir desse método, as *Aeromonas* podem ser separadas por grupos de hibridização (HGs), isto é, grupos de genoespécies, os quais, como mostra a Tabela 3, não tem mostrado, obrigatoriamente, correlação com os grupos fenotípicos (Popoff *et al.*, 1981).

**Tabela 3.** Grupos de hibridização, genoespécies e grupos fenotípicos do gênero *Aeromonas* (Carnahan & Altwegg, 1996 modificado).

Grupo de Hibridização	Genoespécie	Fenoespécie
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
2	Não definida	<i>A. hydrophila</i>
3	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
3	Não definida	<i>A. hydrophila</i>
4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> ( <i>A. Punctata</i> )
5 A	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
5 B	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
8 X	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biotipo <i>sobria</i>
8 Y	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biotipo <i>sobria</i>
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
10	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biotipo <i>veroni</i>
11	Não definida	Não definida
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
13	Não definida	<i>Aeromonas</i> grupo 501
14	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>
15	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
16	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>

Apesar de eficiente, a hibridização DNA-DNA não solucionou todas as controvérsias relativas à taxonomia de *Aeromonas* (Carnahan & Altwegg, 1996; Borrel *et al.* 1997). Assim sendo, novos métodos tem sido utilizados para tentar desvendar as relações filogenéticas do gênero. De acordo com Borrel *et al.* (1997), a análise da sequência do gene 16S rRNA, através da técnica de RFLP-PCR, mostrou ser um bom método para acessar a identidade de *Aeromonas* sp. Isto se deve ao fato de que a sequência deste gene, apesar de apresentar uma elevada similaridade entre as espécies, mostrou ter estruturas primárias únicas permitindo assim, a identificação de algumas espécies (Borrel *et al.*, 1997).

Desta forma, Borrel *et al.* (1997), estabeleceram um protocolo, baseado nos padrões de RFLP-PCR do gene 16S rRNA, usando duas endonucleases simultaneamente, AluI e MboI o qual, permitiu a identificação de algumas espécies do gênero *Aeromonas*. Os autores avaliaram a sequência do gene 16S rRNA em 76 isolados, caracterizados através de provas bioquímicas e constataram que uma linhagem identificada bioquimicamente como *A. veronii* mostrou ter o padrão RFLP para a espécie genômica *A. hydrophila*. Os mesmos também constataram que duas espécies, inicialmente classificadas como *A. hydrophilla* e *A. veronii* foram, posteriormente, identificadas geneticamente como *A. caviae*. Neste sentido, a técnica proposta por Borrel *et al.* (1997), permite identificar muitas espécies, tais como: *A. hydrophila*, *A. veronii* biotipo *sobria* e *A. caviae*, consideradas por Janda *et al.* (1995) como as mais frequentes espécies isoladas em laboratórios, bem como as mais patogênicas para humanos. Dessa forma, a determinação das espécies em *Aeromonas* através da avaliação do 16S rRNA pode ser realizada em um curto período de tempo, por um custo razoável, e para um grande número de isolados, possuindo assim um potencial inestimável para as investigações de epidemiologias e implicações patogênicas em humanos por *Aeromonas* sp. (Borrel *et al.*, 1997).

### 2.3. Epidemiologia

*Aeromonas* sp. São habitantes do ambiente aquático (Krovacek *et al.*, 1994; Handfield *et al.*, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Chacón *et al.*, 2003), sendo reconhecido como patógenos ocasionais de peixes e outros animais de sangue frio (Krovacek *et al.*, 1994; Janda *et al.*, Borrel *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, estas bactérias têm sido reconhecidas como patógenos humanos (Santos *et al.*, 1999), sendo associadas, principalmente à gastroenterites (Palumbo *et al.*, 1985; Krovacek *et al.*, 1994; Janda *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1999).

As gastroenterites associadas a estes microrganismos acometem principalmente crianças menos de cinco anos de idade, porém, casos de adultos associados a estas infecções são relativamente comuns (Janda *et al.*, 1995). De acordo com os autores, a maior incidência de diarreias, provocadas por *Aeromonas*, nos Estados Unidos, ocorre, principalmente, durante os meses de verão, e alguns

estudos indicam que estas bactérias estão entre as principais causas de gastroenterites durante estes meses. Um estudo realizado por (Guerra *et al.*, 2005), no Brasil, demonstrou que mais de 50% das diarreias bacterianas, que acometem principalmente em crianças, são provocadas por estas bactérias. O paciente com gastroenterite por *Aeromonas* apresenta diarreia líquida, febre, vômitos, dor abdominal e, em casos mais graves, diarreia mucosanguinolenta (Gracey *et al.*, 1982; Goodwin *et al.*, 1983; Buchanan & Palumbo, 1985; Wilcox *et al.*, 1992; Gosling, 1996; Koneman, 1997; Teka *et al.*, 1999). Em geral, a diarreia ocasionada por *Aeromonas* não requer tratamento, mesmo na presença de fezes mucosanguinolenta, no entanto, na sua persistência prolongada, a antibioticoterapia deve ser considerada (Gillian *et al.*, 1992). Neste caso, a presença de  $\beta$ -lactamases (Quiroga *et al.*, 2000) e a resistência múltipla à antibióticos (Zanella, 2002), representam um problema potencial na terapia antimicrobiana.

Outras infecções menos comuns podem ser causadas por *Aeromonas* spp., tais como: endocardites, meningites, abscessos intra-abdominais, peritonites, infecções do trato respiratório e urinário, septicemia, entre outras (Morena *et al.*, 1993; Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000).

Muitos estudos referentes à etiologia das gastroenterites determinadas por *Aeromonas* tem estabelecido a água como principal veículo de transmissão destes patógenos (Neves *et al.*, 1990; Hanninen & Siitonen, 1995; Botarelli e Ossiprandi, 1999), já que a água pode favorecer a disseminação destas bactérias através de práticas como irrigação e lavagem de alimentos (Chopra e Houston, 1999).

Bactérias deste gênero podem ser encontradas em rios, lagos, água do mar, reservatórios, locais de tratamento de água potável e de esgoto, assim como em peixes, frutos do mar, fezes humanos e de animais (Austin *et al.*, 1998; Holmes, 1996). Fuzihara *et al.* (1995) isolaram espécies de *Aeromonas* de águas cloradas e não cloradas, sendo *A. hydrophila* a espécie mais comum encontrada em água limpa.

Muitas espécies de *Aeromonas* podem ser encontradas em alimentos frescos de origem animal (carnes de gado e porco, leite e peixes) e vegetal, bem como em alimentos processados (Buchanan & Palumbo, 1985; Callister & Agger 1987; Barnhart *et al.*, 1989; Saad *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000). A alta frequência destas bactérias em alimentos pode estar associada a

sua capacidade de crescimento a baixas temperaturas (>4°C) (Krovacek *et al.*, 1994) bem como em altas concentrações salinas (Delamare *et al.*, 2000). A possibilidade de que a gastroenterite por *Aeromonas* seja consequência da ingestão de toxinas pré-formadas presentes nos alimentos (Majeed *et al.*, 1990) é reforçada pela constatação de que *A. hydrophila* é capaz de produzir enterotoxinas e hemolisinas mesmo à temperatura de 4°C (Palumbo, 1996). Sendo assim, algumas técnicas de conservação de alimentos parecem ineficazes em inibir a replicação, principalmente de *A. hydrophila*, que pode se multiplicar, embora a uma taxa menor, em produtos refrigerados ou embalados a vácuo. A presença de *Aeromonas* foi constatada em 43% dos vegetais analisados, comercializados na CEASA de São Paulo, com números que variam entre 10<sup>2</sup> a 2x10<sup>6</sup> UFC/g. Dentre os isolados, 96,5% foram classificados como *A. caviae*, 2,8% como *A. hydrophila* e 0,7% como *Aeromonas sp.* (Saad *et al.*, 1995).

Estudos indicam a ocorrência preferencial de alguns grupos de *Aeromonas* em isolados clínicos. Neste sentido, como resumido na Tabela 4, as espécies predominantes em casos clínicos são: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biotipo *sobria*, pertencentes aos grupos de hibridização HG1, HG4, HG8, respectivamente (Janda *et al.*, 1995).

**Tabela 4.** Distribuição clínica de *Aeromonas* sp. envolvidas em infecções humanas (Janda *et al.*, 1995)

Genoespécie	Grupo de hibridização	Dados clínicos		Frequência de isolamento <sup>a</sup>			
		Frequência <sup>b</sup>	Significância <sup>c</sup>	Fezes	Feridas	Sangue	Outros
<i>A. hydrophila</i>	1	+++	1	+++	+++	+++	+++
<i>A. salmonicida</i>	3	+	3	+	-	-	-
<i>A. caviae</i>	4	+++	1	+++	+	+++	+++
<i>A. media</i>	5	+	3	+	-	-	-
<i>A. veronii</i> biotipo <i>sobria</i>	8	+++	1	+++	+	+++	+++
<i>A. veronii</i> biotipo <i>veronii</i>	10	+	3	+	+	-	+
<i>A. jandaei</i>	9	+	2	+	+	+	-
<i>A. schubertii</i>	12	-	2	-	+	+	-
<i>A. trota</i>	13	+	3	+	-	-	+

a: +++, isolados mais comuns; +, raramente isolados; -, não isolados.

b: +++, freqüentemente isolados em laboratório; ++, ocasionalmente isolados em laboratórios; +, raramente isolados em laboratório.

c: 1, espécie mais patogênica para humanos; 2, causa provada de doenças em casos raros; 3, ocasionalmente isolados de humanos (fezes) mas de significância desconhecida.

Em um estudo realizado na região de Planalto, Rio Grande do Sul, Zanela (2002), demonstrou a ocorrência de *Aeromonas* em amostras de fezes de trabalhadores de aviários. Os resultados das análises microbiológicas mostram que, do total dos 81 trabalhadores de aviários examinados, 12 (14,81%) foram positivos para a presença de *Aeromonas*. Considerando que estes trabalhadores não apresentavam gastroenterites no momento da coleta, a frequência de portadores de *Aeromonas* observada é bastante elevada, uma vez que a frequência normal destas espécies em indivíduos assintomáticos varia de 0 a 5%. A autora considera que a frequência obtida em seus estudos é elevada mesmo considerando indivíduos com gastroenterite, já que a frequência destes microrganismos, relatada em indivíduos diarreicos no Rio Grande do Sul é da ordem de 13%. A espécie de *Aeromonas* mais frequente em trabalhadores de aviários é *A. hydrophila*, considerada como uma das espécies patogênicas para humanos.

De acordo com Guerra (2001), as bactérias do gênero *Aeromonas* representam um importante grupo de bactérias enteropatógenicas presentes em 57,4% das diarreias bacterianas avaliadas em pacientes do Hospital Geral de Caxias

do Sul. Conforme a autora, a incidência destes microrganismos foi maior em crianças do que em adultos, sendo particularmente elevada em crianças menores de 2 anos de idade. As espécies de maior prevalência foram *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*.

#### **2.4. Fatores de virulência em *Aeromonas***

Vários fatores de virulência têm sido descritos para explicar os processos de patogenicidade de *Aeromonas*. Dentre os principais podemos citar a produção de biofilme, enterotoxinas hemolíticas, proteases, nucleases, lipases e outras com papel patogênico ainda pouco definido (Botarelli e Ossiprandi, 1999). Muitos autores relacionam a virulência em *Aeromonas* com a produção de enzimas proteolíticas extracelulares (Cascón *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Albert *et al.*, 2000; Chacón *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004).

A formação de biofilme tem sido descrita para varias espécies de *Aeromonas*. Segundo Lynch *et al.* (2002), a formação de biofilme é dependente do numero de bactérias e do acumulo de acetil homoserina lactonas (AHL), fenômeno conhecido como “quórum sensing”. De acordo com os resultados obtidos por Kirov *et al.* (2002), a formação de biofilme está relacionada com a presença de flagelos laterais, e a sua influência na patogenicidade de *Aeromonas* em humanos não é perfeitamente conhecida, mas sabe-se que esta característica está envolvida na capacidade bacteriana em aderir-se às células epiteliais (Gavin *et al.*, 2002).

As enterotoxinas produzidas por *Aeromonas* são substâncias extracelulares, que podem agir sobre o epitélio intestinal produzindo inflamação (Sakai, 1985). Neste sentido, Albert *et al.* (2000), avaliaram a presença de genes, que codificam algumas enterotoxinas, em isolados de fezes de crianças com diarreia provocada por *Aeromonas* sp. Três genes distintos foram identificados: *act*, que codifica uma enterotoxina citotóxica (Act), e os genes *alt* e *ast*, responsáveis por duas enterotoxinas citotônicas (Alt e Ast). Act é uma toxina que possui atividades hemolítica, citotóxica e enterotóxica. Por outro lado, Alt e Ast apresentam atividade enterotóxica, causando elevação dos níveis de AMP cíclico e prostaglandinas em modelos animais (Albert *et al.*, 2000).

A atividade hemolítica em isolados de *A. hydrophila* foi identificada na década de 60. Wretling *et al.* (1971), identificam duas hemolisinas, por focalização isoelétrica,

as quais foram consideradas como duas formas da mesma enzima (isoenzimas). Dessa forma, *A. hydrophila* secreta, pelos menos, dois tipos de hemolisinas, uma delas denominada aerolisina (Aer A), e a segunda conhecida como hemolisina (Hly A), esta última bastante semelhante com aquela produzida pela bactéria *Vibrio cholerae* (Zhang *et al.*, 2000).

Dados sugerem que a aerolisina de *A. hydrophila* é produzida na forma de um precursor dimérico inativo, denominado de proaerolisina. Este precursor é ativado por clivagem proteolítica no C- terminal do peptídeo. Isto possibilita o próximo passo que é a geração de um oligômero heptamérico. Sendo anfipático o heptâmero pode ser inserir na membrana produzindo canais. No caso dos eritrócitos, a formação destes canais leva à lise celular. Contudo, dependendo da concentração da toxina, as células podem passar por várias mudanças como, por exemplo, a perda de pequenas moléculas e íons, antes que a sua morte ocorra. Estudos sugerem que a proaerolisina possa ser processada por proteases produzidas pelo próprio microrganismo patogênico, por enzimas digestivas, como a tripsina e quimiotripsina, por proteínas convertases (PC), tais como PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/ 6, PC7/LPC e por furina (Abrami *et al.*, 1998).

Estudos de mutagênese indicaram que a atividade hemolítica de *A. hydrophila* está relacionada com ambos os genes *aerA* e *hlyA* uma vez que a hemólise, em placas contendo ágar sangue, só foi eliminada com mutações nos dois genes. A comparação da sequência de nucleotídeos das duas hemolisinas detectou uma homologia de apenas 23,8%. Este dado sugere que a origem evolucionária dos genes que codificam estas hemolisinas possa ser diferente (Wang *et al.*, 2003).

Artigos relatam que aerolisina e hemolisina contribuem para a virulência de *A. hydrophila*, estando bem difundidas dentro do gênero (Santos *et al.*, 1999); Zhang *et al.*, 2000). Analisando a distribuição de alguns genes de virulência em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonassp.* Chacón *et al.* (2003), detectaram que 72,6% do total de linhagens analisadas eram positivas para o gene aerolisina/hemolisina sendo que a sua presença foi mais frequente em isolados clínicos do que em ambientais. Da mesma forma, Serrano *et al.* (2002), analisaram onze linhagens de *A. hydrophila*, três de *A. veronii* biotipo *sobria* (todas isoladas de peixes de água doce)

e uma linhagem de *A. hydrophila* (isolada de fezes de indivíduos com diarreia humana). Os resultados mostraram que, dez isolados de *A. hydrophila* foram *aerA<sup>+</sup>hlyA<sup>+</sup>* e dois foram *aerA<sup>+</sup>hlyA<sup>-</sup>*. Os três isolados de *A. veronii* biotipo sobria apresentaram resultados negativos para ambos os genes. Por outro lado, Shibata *et al.* (1996), constataram que apenas 23,4% das linhagens de *A. sobria* estudadas foram positivas para o gene *aerA*.

A avaliação da atividade fenotípica dos genes responsáveis por toxinas hemolíticas pode variar de acordo com o tipo de sangue utilizado. Chacón *et al.* (2003), concluíram que, um número mais alto de espécies hemolíticas de *Aeromonas* foi encontrado entre os isolados clínicos quando testados com sangue de carneiro, mas não com sangue humano. Neste estudo, os autores constataram que as espécies menos hemolíticas foram: *A. popoffi*, *A. encheleia* e *A. allosaccharophila*.

Estudando a patogenicidade de isolados de *Aeromonas* a partir de peixes de água doce, Wakabayashi *et al.* (1981) determinaram a virulência destas bactérias injetando suspensões bacterianas em bagres japoneses de água doce. As linhagens ditas virulentas, produziram inchaço e necrose no local da injeção. A maioria das linhagens virulentas eram *A. hydrophila* e, estas, também produziram hemorragia na cavidade abdominal após a aplicação por via intra-peritoneal. Os exames de *A. hydrophila* estatisticamente apresentaram maior atividade proteolítica do que outras linhagens analisadas. Em outro trabalho Kanai e Wakabayashi (1984), apresentaram novas evidências sobre a capacidade letal das proteases. Após isolar uma linhagem de *A. hydrophila* do intestino de enguias doentes, uma protease foi purificada e mostrou-se não somente letal, como também dermonecróticas, quando injetada na pele de porcos-da-índia.

Para explicar o processo de patogenicidade de *Aeromonas*, alguns autores atribuem que, o papel das proteases está relacionada com a capacidade que estas enzimas possuem em clivar a imunoglobulina A (IgA) permitindo aos patógenos inativar o anticorpo encontrado sobre a superfície das mucosas, eliminando assim a proteção primária do hospedeiro (Bier, 1978). Além disso, as proteases podem contribuir com a patogenicidade, causando danos diretos nos tecidos ou

umentando a capacidade de invasão e estabelecimento de *Aeromonassp.* (Sakai, 1985).

Basicamente as proteases podem ser classificadas como endopeptidases e exopeptidases. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas aos grupamentos amino ou carboxi terminais do substrato, enquanto que as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes do término do substrato. Baseado no grupofuncional presente no local ativo, as proteases também são classificadas como serina proteases e metaloproteases. As primeiras são caracterizadas pela presença de um grupo serina no seu local ativo, são numerosas e bem distribuídas entre vírus, bactérias e eucariotos. São enzimas geralmente ativas em pH neutro e alcalino, possuindo uma ampla especificidade com substratos. As segundas possuem como principal característica a necessidade de um metal divalente como cofator. Aproximadamente 30 famílias de metaloproteases já foram reconhecidas (Rao *et al.*, 1998).

Três proteases têm sido descritas em *A. hydrophila*: uma metaloprotease termoestável de 38-kDa, denominada de elastase (Cáscon *et al.*, 2000), uma serina protease termolábil de 68-kDa (Rivero *et al.*, 1991), uma zinco-protease de 19-kDa (Loewy *et al.*, 1993). Porém, outra serina protease termoestável, de 22-kDa, já foi encontrada no meio de cultura da linhagem B32 de *A. hydrophila* (Cáscon *et al.*, 2000).

Cáscon *et al.* (2000), demonstraram que, uma linhagem de *A. hydrophila*, foi capaz de degradar a elastina, presente no meio de cultura, quando plaqueada em ágar nutriente. O gene *ahyB* (o qual codifica a elastase), mostrou ser responsável pela atividade elastolítica de *A. hydrophila*. Desta forma, um mutante isogênico foi construído para provar que o produto do gene *ahyB* contribui com a virulência de *A. hydrophila* (Cáscon *et al.*, 2000).

Através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), Sem e Rodgers (2004), determinaram a presença de seis genes responsáveis por fatores de virulência em *Aeromonassp.* isoladas de água potável. Um dos genes analisados foi o *ahyB*, o qual esteve presente em 88% dos isolados estudados.

Outros estudos também têm permitido a caracterização de uma exoprotease produzida por *A. veronii* biotipo *sobria*. Foi demonstrado que, a atividade desta protease de 34-kDa, foi significativamente afetada por inibidores de metaloproteases, característica não observada com inibidores de serina protease, sugerindo a presença de uma metaloprotease. De acordo com alguns autores, mutantes deficientes para esta enzima, mostraram fraca atividade proteolítica, citotóxica e hemolítica quando comparados com as linhagens selvagens. Além disto, nos mutantes, a proaerolisina foi parcialmente ativada em aeolisina, demonstrando que a metaloprotease de 34-kDa, possa estar envolvida na conversão deste precursor inativo (Song *et al.*, 2004).

Chacón *et al.* (2003), investigaram a frequência de genes para a serina protease em 234 isolados de *Aeromonas* sp. identificadas pela técnica 16SrRNA-RFLP. Os autores verificaram que os genes estiveram presentes em 78 dos 108 isolados clínicos. Dentre os 126 isolados ambientais, 97 foram positivos. Relatos sugerem que as serina-proteases, produzidas por *Aeromonas* sp. estão associadas com a ativação, *in vitro*, da aerolisina (Abrami *et al.*, 1998). Esta hipótese é corroborada por Chacón *et al.* (2003), os quais verificaram uma associação estatística entre linhagens hemolíticas e a presença de genes para serina protease.

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos livres e glicerol. O interesse por estas enzimas tem aumentado devido ao seu papel como importante fator de virulência (Snellman *et al.*, 2002), já que estas enzimas são capazes de interagir com os leucócitos humanos e afetar várias funções do sistema imune através da liberação de ácidos graxos (Chuang *et al.*, 1997).

A principal lipase extracelular de *A. hydrophila* (Lip) apresenta 80kDa e possui atividade máxima para hidrólise de ésteres C10 e C12, e para triacilgliceróis C8 e C10. Verificou-se que esta lipase apresentou elevada atividade no início da fase estacionária do crescimento celular com uma faixa de pH ótimo entre 7,5 – 8,0.

A atividade máxima da enzima foi obtida a uma temperatura de 37°C, sendo que, após 30 minutos de incubação a 55°C, apenas 20% da atividade enzimática permaneceu (Chuang *et al.*, 1997).

Além da proteína Lip, as *Aeromonas* são capazes de produzir uma outra lipase extracelular, codificada pelo gene *lipH3*. Esta é capaz de degradar derivados do p-nitrofenil que possuem de 4 até 10 átomos de carbono em sua cadeia, bem como triacilgliceróis de 4 a 8 átomos de carbono (Chuang *et al.*, 1997). Outras duas enzimas com atividade fosfolipídica, foram caracterizadas em *Aeromonas*: a fosfolipase C (codificada pelo gene *apl-1*) e a fosfolipase A1 (codificada pelo gene *pla*) (Watanabe *et al.*, 2004).

Embora as propriedades físicas destas enzimas, como, peso molécula, estabilidade térmica e especificidade com substratos diferem uma da outra, a proteína, Lip mostrou forte similaridade com a Lipase H3 (67%) e Apl-1 (65%) (Watanabe *et al.*, 2004).

Devido à importância da lipase na nutrição bacteriana e como fator que afeta as funções do sistema imunológico pela geração de ácidos graxos livres, Cascón *et al.* (1996), têm proposto a identificação do gene *lip*, através de PCR, para a avaliação da patogenicidade de isolados em *Aeromonas*. Chacón *et al.* (2003), também relataram em seus estudos uma elevada prevalência de genes para lipases, já que dos 234 isolados em *Aeromonas* analisados, 221 apresentaram resultados positivos através da técnica de PCR. Em outro estudo, Cascón *et al.* (1996), constataram que 100% dos isolados de *Aeromonas sp.* analisados, apresentaram atividade lipolítica quando plaqueados em meio ágar LB suplementado com 0,5% de tributirim.

A glicerofosfolípido-colesterol aciltransferase (GCAT) pertence a uma nova família de lipases, sendo encontrada na membrana externa de *A. salmonicida* e *A. hydrophila* (Shaw & Squires, 1984) e sintetizada como uma pré-enzima de 37,4 kDa. Para explicar o seu mecanismo de ação, alguns autores, entre os quais Vipond *et al.*, (1998), evidenciaram que a GCAT atua através da hidrólise dos fosfolípidos de membrana, lisando os eritrócitos de peixes. Por sua vez, Lee e Ellis (1990), mostraram que a GCAT pode estar agregada a um lipopolissacarídeo (LPS) formando um complexo GCAT/LPS. A presença do LPS, segundo os autores, contribui com um aumento da estabilidade, uma vez que a GCAT livre é mais susceptível à inativação pelo calor.

A GCAT já foi detectada em culturas bacterianas do gênero *Vibrio* e também em *A. salmonicida* e *A. hydrophila*. Foi constatado que a enzima está relacionada com o desenvolvimento de uma doença que acomete algumas espécies de peixes, conhecida como “furunculose”. A doença recebe este nome devido às lesões características (ou furúnculos) formadas na superfície dos peixes, como resultado de uma infecção crônica causada por *A. salmonicida* (Vipond *et al.*, 1998).

Um estudo com peixes saudáveis demonstrou que, injeções contendo preparações brutas da enzima reproduziram sintomas típicos da doença, incluindo escurecimento da pele, hemorragia na base das nadadeiras, lesões necróticas e até mesmo liquefação dos tecidos internos. Esses dados ressaltam a importância desta enzima como fator de patogenicidade em *A. salmonicida* (Vipond *et al.*, 1998)

Vipond *et al.* (1998), sugeriram que a serina protease é necessária para a ativação *in vitro* da GCAT. Contudo, Chacón *et al.* (2003), não encontraram nenhuma associação estatística entre GCAT e serina protease.

A GCAT tem sido investigada por PCR apenas como marcador potencial em linhagens atípicas de *A. salmonicida*, não sendo investigadas em outras espécies (Chacón *et al.*, 2003). Porém, há relatos de que a presença desta enzima foi muito comum entre isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas sp.* Assim sendo, Chacón *et al.* (2003) demonstraram que 106 dos 108 isolados clínicos foram positivos para GCAT, e apenas 3 dos 126 isolados ambientais eram desprovidos da enzima.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Descrição das linhagens de *Aeromonas***

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens de *Aeromonas* descritas na Tabela 5, as quais fazem parte da coleção do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

**Tabela 5.** Descrição das linhagens de *Aeromonassp.* utilizadas na avaliação dos genes fatores da virulência.

Coleção do Laboratório	Espécie	Origem
ATCC 7966	<i>A. hydrophila</i>	Isolado de leite
ATCC 43979	<i>A. sobria</i>	Isolado de peixe
ATCC 49904	<i>A. ichthiosmia</i>	Isolado de água
ATCC 33907	<i>A. media</i>	Isolado de peixe
ATCC 33658	<i>A. salmonicida</i>	Isolado de peixe
ATCC 14486	<i>A. hydrophila punctata</i>	Isolado de água
NCIB 9233	<i>A. hydrophila</i>	Sem determinação de origem
ATCC 15468	<i>A. caviae</i>	Isolado de porco da índia
ATCC 49657	<i>A. trola</i>	Isolado de fezes
CECT 839	<i>A. hydrophila</i>	Isolado de leite
CECT 191	<i>A. hydrophila</i>	Sem determinação de origem
CECT 4341	<i>A. encheleia</i>	Isolado de peixe
ATCC 35624	<i>A. veronii</i>	Sem determinação de origem
ATCC 23309	<i>A. eichrenophila</i>	Sem determinação de origem
ATCC 51208	<i>A. allosaccariophila</i>	Sem determinação de origem
IB Aer 009	<i>A. caviae</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 010	<i>A. sobria</i>	Fezes diarreicas humanas

IB Aer 101	<i>A. caviae</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 102	<i>A. caviae</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 103	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 104	<i>A. caviae</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 105	<i>A. caviae</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 106	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 107	<i>A. caviae</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 109	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 110	<i>A. sobria</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 111	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 112	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 113	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 114	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 115	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 116	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 117	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 118	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 119	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 120	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 121	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 126	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 127	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 128	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 129	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 130	<i>A. hydrophila</i>	Fezes humanas
IB Aer 131	<i>A. hydrophila</i>	Isolado de jacaré
IB Aer 132	<i>A. hydrophila</i>	Fezes diarreicas humanas
IB Aer 133	<i>A. hydrophila</i>	Isolado de fezes humanas

ATCC- American Type Culture Collection; NCIB- National Collection of Industrial Bacteria;  
 CECT- Colección Española de Cultivos Tipo; IB Aer- Instituto de Biotecnologia, UCS

## **3.2.Avaliação fenotípica dos fatores de virulência**

### **3.2.1.Atividade Proteolítica Qualitativa**

A atividade proteolítica qualitativa foi avaliada através do sistema proposto por Chacón *et al.* (2003), com algumas modificações. Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA (tryptone soya agar) 4% modificado (gelatina 0,75% ou caseína 0,75%), e incubadas a 37°C por um período de 18-20 horas. A atividade proteolítica foi observada ao adicionar-se uma solução saturada de sulfato de amônio cobrindo toda a superfície do ágar, ocorrendo, dessa forma, a precipitação da proteína do meio. As colônias envolvidas por um halo transparente, após esta precipitação, evidenciaram a atividade enzimática sobre as proteínas do meio. Estas colônias foram consideradas proteases positivas. Aquelas que não apresentaram halo, foram consideradas proteases negativas. Segundo o diâmetro dos halos, os isolados foram classificados como: (+) halo pequeno (<9mm), (++) halo médio (9 a 13 mm) e (+++) halo grande (>13mm).

### **3.2.12. Atividade Proteolítica Quantitativa**

A verificação da atividade proteolítica quantitativa foi realizada segundo o método descrito por Cascón *et al.*, (2000). As amostras foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) por um período de 18-20 horas. Após este período procedeu-se à centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm. Às alíquotas de 200µl do sobrenadante foram acrescentados 400µl de uma solução contendo azocaseína 1%, Tris HCl 25 Mm pH 8,0 e MgCl<sub>2</sub> 5mM, e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após a incubação adicionou-se 600ul de ácido tri-cloroacético (TCA) 10% para inativar a reação, esta mistura foi incubada a 0°C por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e colocado em novos tubos com 200µl de NaOH 2M. A solução foi mantida por 30 minutos em temperatura ambiente e a leitura efetuou-se em espectrofotômetro Ultrospec 100 (Pharmacia Biotech) a 420nm. Como controle negativo à solução de azocaseína foi adicionada de meio LB e tratada da mesma forma que as amostras de cultivo bacteriano. Uma unidade de atividade proteolítica foi calculada como o aumento de absorbância a 420nm por mililitro de sobrenadante por hora, de acordo com Vipond *et al.* (1998).

### **3.2.3. Atividade Lipolítica Qualitativa**

A atividade lipolítica foi avaliada segundo o método proposto por Chacón *et al.* (2003). A atividade lipolítica qualitativa foi determinada inoculando os isolados sobre placas com meio contendo: 1% de peptona 0,5% NaCl, 0,01% CaCl<sub>2</sub> 2% de ágar, adicionando-se 1ml de Tween 20 após esterilização. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, e a atividade da lipase foi determinada através da leitura dos halos de precipitação do Tween ao redor das estrias. Segundo o diâmetro dos halos, os isolados foram classificados como: (+) halo pequeno (<9mm), (++) halo médio (9 a 13 mm) e (+++) halo grande (>13mm).

### **3.2.4. Atividade Hemolítica Qualitativa**

A avaliação da atividade hemolítica foi avaliada sobre sangue de coelho e humano, segundo o método proposto por Chacón *et al.* (2003). As amostras foram inoculadas em placas de Petri com meio TSA acrescido com sangue de coelho ou humano 5% (adicionado após autoclavagem do meio). Após 48h de incubação a 37°C foi avaliada a atividade de hemólise através da leitura dos halos. Segundo o diâmetro dos halos os isolados foram classificados como: (+) halo pequeno (<9mm), (++) halo médio (9 a 13 mm) e (+++) halo grande (>13mm).

### **3.2.5. Atividade Hemolítica Quantitativa**

A verificação quantitativa da atividade hemolítica foi realizada sobre sangue de coelho, segundo o método descrito por Handfield *et al.* (1996).

As amostras foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 5ml de meio LB líquido, incubadas a 35°C durante 18 horas e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. À alíquota de 500µl do sobrenadante foi acrescentado 1ml da suspensão de hemácias (1% em tampão fosfato) e incubada a 37°C por 30 e 60 minutos. Após este período foi realizada a centrifugação e a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Como controle negativo foi utilizada uma suspensão de eritrócitos em meio LB líquido, e como controle positivo (100% de hemólise) uma suspensão de eritrócitos em meio LB líquido e SDS (Dodecilsulfato de sódio).

### 3.3. Avaliação da presença de genes relacionados com os fatores de virulência de *Aeromonassp.*

No presente trabalho, para a identificação da presença de genes relacionados com a virulência de *Aeromonas*, foram utilizadas as sequencias de primers descritas no item 3.3.1 (Tabela 6). Os primers foram desenhados com base nos trabalhos de Chacón *et al.* (2003) e Cascón *et al.* (2000) e confirmados através da comparação com sequencias depositadas no GenBank.

#### 3.3.1. Primes Utilizados

**Tabela 6.** Sequências dos primers utilizados para a detecção de genes de virulência em *Aeromonassp.*

Gene	Sequência do Primer	Tamanho do Segmento amplificado	Referência
aerolisina/hemolisina ( <i>aerA</i> )	F: 5'-CTATGGCCTGAGCGAGAAG-3' R: 5'-CCAGTTCAGTCCCACCACT-3'	431 pb	Chacón <i>et al.</i> (2003)
serina protease ( <i>ahpA</i> )	F: 5'-CACCGAAGTATTGGGTCAGG-3' R: 5'-GGCTCATGCGTAACTCTGGT-3'	350 pb	Chacon <i>et al.</i> (2003)
GCAT ( <i>satA</i> )	F: 5'-CTCCTGGAATCCCAGTATCAG-3' R: 5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3'	237 pb	Chacon <i>et al.</i> (2003)
Lipase ( <i>lipA</i> )	F: 5'-CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG-3' R: 5'-GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA-3'	247pb	Chacon <i>et al.</i> (2003)
Elastase ( <i>ahvB</i> )	F: 5'-GGCAACGTCAAGACTGGCAAGT-3' R: 5'-CGATCAGGGAGCCTGCGGCT-3'	450pb	Cascón <i>et al.</i> (2000)

#### 3.3.2. Amplificação de genes de virulência

A amplificação dos segmentos correspondentes aos genes associados à virulência de *Aeromonassp.* foi realizada de acordo com o procedimento descrito a seguir.

As bactérias foram crescidas em 1ml de meio LB liquido, por 24 horas a 37°C. Após este período ressuspendeu-se o precipitado de células até a obtenção de uma solução homogênea. Adicionou-se 10µl do crescimento homogeneizado em 200µl de água destilada autoclavada. Utilizou-se 2µl desta suspensão bacteriana para realização das amplificações. As reações de amplificações foram realizadas em

volume de 25µl contendo 10mM de Tris HCl (pH 8,3), 50mM de KCl, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25% de Triton-X-100, 1.25mM de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,25µl de cada primer, 0,12µl (5U/µl) de enzima taq polimerase e 2µl de suspensão bacteriana de cada um dos isolados, obtidas de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC100, programado para 10 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de um minuto a 94°C para a desnaturação das fitas do DNA, um minuto a temperaturas que variaram de 56 a 64°C para anelamento de cada um dos pares de primer ao DNA, e dois minutos a 72°C para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 35 ciclos foi feita uma extensão suplementar por 10 minutos a 72°C (Grundmann et al., 1997).

### **3.3.3.Separação e visualização dos segmentos amplificados**

Os produtos de amplificação, acrescidos de 5µl de tampão de amostra (250mg de Azul de Bromofenol e 15g de Ficoll em 100ml de água destilada), foram submetidos à eletroforese (3V/cm), em géis horizontais de agarose 1,5% em tampão TBE (89mM Trisma, 89mM de Ácido Bórico e 8mM de EDTA), e acrescidos de solução de Brometo de Etídio (10mg/ml). Como tampão de corrida utilizou-se também o TBE. Os géis de agarose foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

### **3.4.Análise Estatística**

As análises dos dados foram utilizadas com os testes de Correlação de Spearman, Kruskal-Wallis e Qui-Quadrado com o auxílio do programa computacional SPSS for Windows versão 10.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies de *Aeromonas* são patógenos oportunistas de uma variedade de animais aquáticos e terrestres, incluindo humanos. As manifestações clínicas das infecções causadas por estes microrganismos variam desde gastroenterites até septicemia e meningites. A capacidade patogênica destes microrganismos tem sido associada com a presença de diversos fatores entre os quais se destacam a formação de biofilmes, produção de enterotoxinas e invasinas. Entretanto, o papel destes fatores de virulência não está completamente elucidado, atuando possivelmente em conjunto (Merino *et al.*, 1999). Desta forma, no presente trabalho foi avaliada a presença de genes relacionados com fatores de patogenicidade, assim como a atividade proteolítica, lipolítica e hemolítica em distintas espécies e isolados de *Aeromonas*.

### 4.1. Presença de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em distintas espécies de *Aeromonas*

Como pode ser observado na Tabela 7, a amplificação do fragmento de 431pb correspondente ao gene *aerA* que codifica a aerolisina/hemolisina, considerado um dos principais fatores de virulência em *Aeromonas* (Santos *et al.*, 1999 Wang *et al.*, 2003), foi evidenciada em 12/15 (80%) linhagens avaliadas (Figura 1), estando ausente unicamente nos representantes de *A. sobria*, *A. media* e *A. caviae*. A alta frequência do gene *aerA* observada está de acordo com os dados observados por Chacón *et al.* (2003).

A ausência de amplificação do gene da *aerA* em linhagens tipo *A. caviae* e *A. media* tem sido previamente evidenciado por Kingombe *et al.* (1999) e Chacón *et al.* (2003). Entretanto, tal ausência não pode ser considerada como característica das espécies, já que isolados clínicos destas espécies apresentaram o gene (Chacón *et al.*, 2003). Por outro lado, o gene *aerA* foi amplificado na linhagem tipo *A. allosaccharophila* ATCC 51208, discordando dos dados obtidos por Chacón *et al.* (2003). Cabe ressaltar que as sequências iniciadoras (primers), utilizadas para amplificação deste como dos outros genes testados foram desenhadas com base num número limitado de sequências de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* (Chacón *et*

*al.*, 2000; Chacón *et al.*, 2003) de tal forma que a ausência de amplificação pode estar associada à ausência do gene, como também a alterações que levam ao não anelamento de um dos primers.

**Tabela 7.** Amplificação dos genes *aerA*, *ahpA*, *ahyB*, *lipA* e *satA* em distintas espécies do gênero *Aeromonas*.

Espécie e linhagem	<i>aerA</i>	<i>ahpA</i>	<i>ahyB</i>	<i>lipA</i>	<i>satA</i>
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	+	+	-	+	-
<i>A. sobria</i> ATCC 43979	-	-	+	+	+
<i>A. ichtiosmia</i> ATCC 49904	+	+	-	+	+
<i>A. media</i> ATCC 33907	-	-	-	+	+
<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	+	+	-	+	-
<i>A. hydrophila punctata</i> ATCC 14498	+	+	-	+	-
<i>A. hydrophila</i> NCIB 9233	+	+	-	+	-
<i>A. caviae</i> ATCC 15468	-	-	+	+	+
<i>A. trota</i> ATCC 49657	+	-	+	+	-
<i>A. hydrophila</i> CECT 839	+	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i> CECT 191	+	-	+	+	+
<i>A. encheleia</i> CECT 4341	+	+	+	+	+
<i>A. veronii</i> ATCC 35624	+	+	-	+	-
<i>A. euchrenophila</i> CECT 4224	+	+	-	+	-
<i>A. allosacharophila</i> ATCC 51208	+	-	+	+	+

(+) presença de segmento amplificado, (-) ausência de segmento amplificado.

A sequência correspondente ao gene da serina protease (*ahpA*) foi amplificada nas linhagens padrões de *A. hydrophila*, *A. ichtiosmia*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila punctata*, *A. encheleia*, *A. veronii*, e *A. eucherenophila*, mas não nas representantes de *A. sobria*, *A. media*, *A. caviae*, *A. trota*, e *A. allosacharophila* (Tabela 7). Das 15 linhagens avaliadas 8 apresentaram amplificação do gene *ahpA*, correspondendo a uma frequência de 53,3%, percentagem esta inferior à observada por Chacón *et al.* (2003). A presença ou ausência do gene da serina protease não pode ser considerada como característica da espécie, já que das quatro linhagens

tipo de *A. hydrophila* avaliadas ATCC 7966 e NCIB 9233 foram positivas, enquanto, CECT 839 e CECT 191 foram negativas.

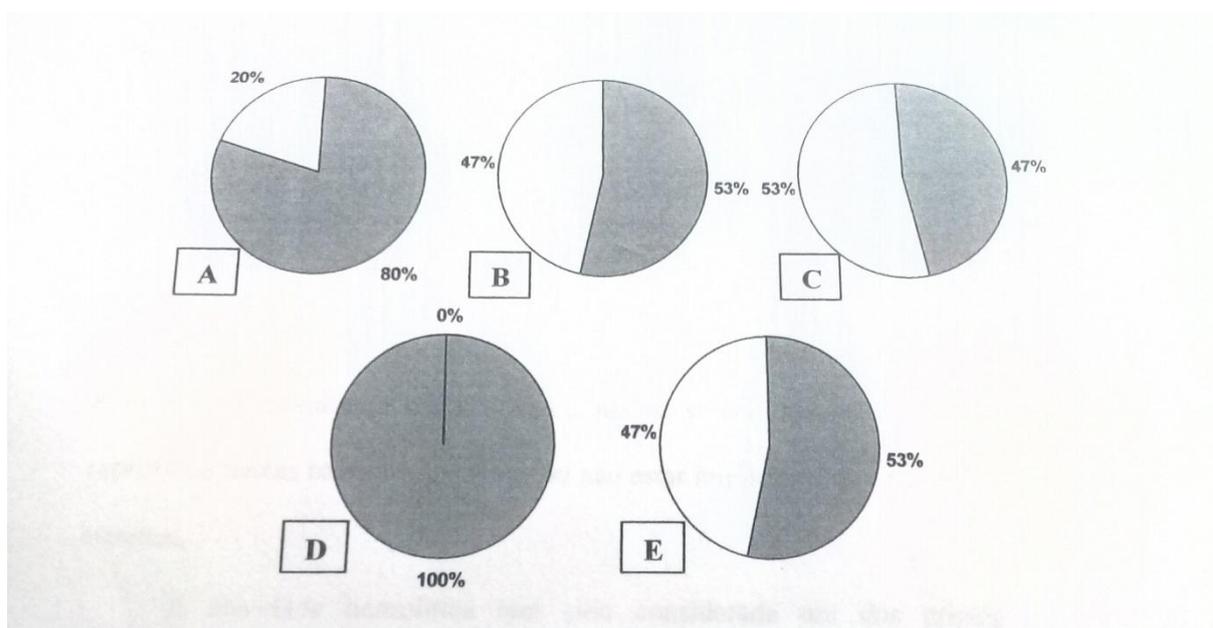


Figura 1. Percentagem de amplificação dos genes *aerA* (A), *ahpA* (B), *ahyB* (C), *lipA* (D) e *satA* (E) em distintas espécies do gênero *Aeromonas*. Positivo ■ e □ negativo.

Conforme pode ser observado na Tabela 7 e Figura 1, o gene da elastase (*ahyB*) foi amplificado em 7/15 linhagens avaliadas (46,7%). Esta frequência é significativamente inferior à observada por Sen e Rodgers (2004), os quais constataram a presença do gene *ahyB* em 88% dos isolados de *Aeromonas* obtidos de água potável. Esta diferença pode estar associada a grande diversidade de espécies avaliadas no presente trabalho.

Como previamente observado por Chacón *et al.* (2003), o segmento correspondente ao gene *lipA* foi amplificado em todas as espécies e linhagens de *Aeromonas* avaliadas (Tabela 7 e Figura 1). A presença do gene *lipA*, em todas as espécies, é indicativo de que este gene pode ser utilizado como um marcador para identificação do gênero, apresentando grande potencial na constatação rápida destas bactérias em espécimes clínicos, alimentos e água. O gene *satA* que codifica a enzima glicerofosfolípido colesterol aciltransferase (GCAT) foi amplificado em 53,3% das linhagens tipo avaliadas (Tabela 7 e Figura 1), estando ausente nas linhas ATCC 7966 e NCIB 9233 de *A. hydrophila*, e nos representantes de *A.*

*salmonicida*, *A. hydrophila punctata*, *A. trota*, *A. veronii* e *A. euchrenophila*. A frequência de amplificação do gene *satA* é inferior à observada por Chacón *et al.* (2003) em estudo envolvendo um grupo de espécies de *Aeromonas*.

Considerados em conjunto, os resultados obtidos mostram a presença de genes potencialmente associados com a patogenicidade em todas as espécies de *Aeromonas* avaliadas, mesmo naquelas não consideradas como potenciais patógenos de animais ou do homem. Tal constatação é indicativa de que estes genes tem um papel importante na vida saprofítica destas bactérias, podendo ou não estar implicados na capacidade patogênica das mesmas.

A atividade hemolítica tem sido considerada um dos principais fatores de patogenicidade de *Aeromonas* (Singh e Sanyal, 1992; Khan *et al.*, 1998). Tal atividade está relacionada aos genes *hlyA* e *aerA* os quais codificam uma hemolisina e a aerolisina/hemolisina com atividade citotóxica, respectivamente (Wong *et al.*, 1998).

Como pode ser evidenciado na Tabela 8, as espécies avaliadas, com exceção de *A. euchrenophila* e *A. encheleia*, apresentaram atividade hemolítica sobre sangue humano, de coelho ou ambos. A maior parte das linhagens apresentaram atividade sobre sangue humano e de coelho, entretanto, as linhagens representantes de *A. salmonicida* e *A. veronii* apresentaram atividade unicamente sobre o sangue humano, e *A. media*, *A. hydrophila punctata*, e *A. hydrophila* NCIB 9233 unicamente sobre sangue de coelho. Diferentemente das observações de Handfield *et al.* (1996), no presente trabalho, não foi observada diferença significativa no número de linhagens que exibiram atividade hemolítica sobre o sangue humano e de coelho.

A avaliação quantitativa da atividade hemolítica sobre sangue de coelho mostra grande variação entre as linhagens avaliadas, ressaltando a alta atividade das linhagens *A. hydrophila* NCIB 9233 e CECT 839, *A. hydrophila punctata* ATCC 14498, e *A. trota* ATCC 49657.

**Tabela 8.** Atividades hemolítica, proteolítica e lipolítica em distintas espécies do gênero *Aeromonas*.

Espécie e linhagem	Ativ. Hemolítica			Ativ. proteolítica		Ativ. lipolítica
	Humano	Coelho	Quant. <sup>1</sup>	Qualit.	Quant. <sup>2</sup>	
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	+	+	58,95	+	0,15	+
<i>A. sobria</i> ATCC 43979	+	+	55,79	+	0,30	+
<i>A. ichtiosmia</i> ATCC 49904	+	+	67,37	+	0,20	+
<i>A. media</i> ATCC 33907	-	+	68,42	+	0,55	+
<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	+	-	0,00	+	0,60	+
<i>A. hydrophila punctata</i> ATCC 14498	-	+	95,79	+	0,15	+
<i>A. hydrophila</i> NCIB 9233	-	+	97,89	+	0,15	+
<i>A. caviae</i> ATCC 15468	+	+	28,42	+	0,10	+
<i>A. trota</i> ATCC 49657	+	+	87,37	+	3,90	+
<i>A. hydrophila</i> CECT 839	+	+	100,00	+	0,40	+
<i>A. hydrophila</i> CECT 191	+	+	55,79	+	0,90	+
<i>A. encheleia</i> CECT 4341	-	-	0,00	+	0,15	+
<i>A. veronii</i> ATCC 35624	+	-	0,00	+	0,15	+
<i>A. euchrenophila</i> CECT 4224	-	-	1,05	+	0,15	+
<i>A. allosaccharophila</i> ATCC 51208	+	+	73,68	+	1,70	+

<sup>1</sup> Atividade hemolítica (% de hemólise); <sup>2</sup> Atividade caseinolítica (U/ml), + presença de atividade, - ausência de atividade

As *Aeromonas* apresentam diversas enzimas proteolíticas extracelulares, entre as quais merecem destaque, a metaloprotease termoestável (elastase) de 38-kDa (Leung e Stevenson, 1988; Cascón *et al.*, 2000) e a serina protease termolábil de 68-kDa de *A. hydrophila* (Rivero *et al.*, 1991) de *A. hydrophila*. O papel destas proteases na patogenicidade de *Aeromonas* não tem sido esclarecido havendo discordância entre os diversos trabalhos realizados a respeito (Leung e Stevenson, 1988; Rivero *et al.*, 1991; Vipond *et al.*, 1998; Cascón *et al.*, 2000).

Todas as linhagens de *Aeromonas* avaliadas apresentaram atividade caseinolítica. Entretanto, ampla variação foi observada nas análises quantitativas realizadas sobre azocaseína (Tabela 8), destacando as linhagens *A. trota* ATCC 49657 e *A. allosaccharophila* ATCC 51208.

Como previamente observado por Watanabe *et al.* (2004), todas as linhagens de *Aeromonas* testadas, independente da espécie, apresentaram atividade lipolítica. Assim como no caso das proteases, o papel das lipases na patogenicidade de *Aeromonas* é discutível (Chuang *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2004).

**Tabela 9.** Análise de correlação (Spearman) entre as atividade enzimáticas e a presença de genes potencialmente associados com a patogenicidade de *Aeromonas*.

	H.C	H.Q	PQL	PQN	L	<i>aerA</i>	<i>ahpA</i>	<i>ahyB</i>	<i>lipA</i>	<i>satA</i>
H.H	0,213 <sup>ns</sup>	-0,099 <sup>ns</sup>	---	0,372 <sup>ns</sup>	---	0,000 <sup>ns</sup>	-0,378 <sup>ns</sup>	0,378 <sup>ns</sup>	---	0,189 <sup>ns</sup>
H.C		0,771 <sup>**</sup>	---	0,234 <sup>ns</sup>	---	-0,302 <sup>ns</sup>	-0,564 <sup>*</sup>	0,262 <sup>ns</sup>	---	0,342 <sup>ns</sup>
H.Q			---	0,265 <sup>ns</sup>	---	0,097 <sup>ns</sup>	-0,311 <sup>ns</sup>	0,062 <sup>ns</sup>	---	0,031 <sup>ns</sup>
PQL				---	---	---	---	---	---	---
PQN					---	0,120 <sup>ns</sup>	-0,543 <sup>*</sup>	0,335 <sup>ns</sup>	---	0,208 <sup>ns</sup>
L						---	---	---	---	---
<i>aerA</i>							0,535 <sup>*</sup>	-0,200 <sup>ns</sup>	---	-0,468 <sup>ns</sup>
<i>ahpA</i>								-0,732 <sup>**</sup>	---	-0,607 <sup>*</sup>
<i>ahyB</i>									---	0,607 <sup>*</sup>
<i>lipA</i>										---

n.s.- não significativos; \* - significativos (5%); \*\* - significativo (1%)

H.H- hemólise em sangue humano; H.C- hemólise em sangue de coelho; H.Q- atividade hemolítica quantitativa; PQL- proteólise em azocaseína; PQN- atividade proteolítica quantitativa sobre azocaseína; L- atividade lipolítica; *aerA*, *ahpA*, *ahyB*, *lipA* e *satA*- presença ou ausência de amplificação por PCR.

A análise de correlações entre as 11 variáveis analisadas (Tabela 9), mostra correlação significativa entre a atividade hemolítica sobre sangue humano e de coelho fato até certo ponto esperado. Da mesma forma correlação negativa foi observada entre a amplificação do gene da serina protease e a atividades hemolítica e proteolítica. Tal fato, não seria esperado considerando que a serina-protease é responsável por grande parte da atividade caseinolítica em *A. hydrophila* (Cascón *et al.*, 2000). Por outro lado, diferentes espécies de *Aeromonas* apresentam proteases distintas daquela de *A. hydrophila* cujos genes são amplificados com os primers utilizados no presente trabalho. Tal fato pode ser evidenciado no caso de *A. media*, negativa para ambos os genes avaliados, mas com atividade proteolítica.

Correlação negativa ao nível de 1% (Tabela 9) foi encontrada entre a amplificação do gene da serina protease e da elastase. Tal correlação indica que distintas espécies de *Aeromonas* possuem uma ou outra protease, podendo varias de acordo com a linhagem ou isolado, como pode ser constatado no caso das quatro representantes de *A. hydrophila*. Da mesma forma, correlação positiva foi observada entre a amplificação do gene *satA* e *ahyB*, e negativa entre *satA* e o gene as serina protease.

#### 4.2. Presença de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas*

Trinta isolados de *Aeromonas* pertencentes ao grupo hydrophila (*A. hydrophila* (22), *A. caviae* (6) e *A. sobria* (2)), sendo 17 isolados clínicos (um deles de peixe) e 13 isolados ambientais foram analisados quanto à presença de genes potencialmente associados com a patogenicidade e a atividade de enzimas extracelulares. Como pode ser observado na Tabela 10 e Figura 2, 21/30 (70%) dos isolados amplificaram o fragmento de 431 pb correspondente ao gene *aerA* que codifica a aerolisina/hemolisina de *Aeromonas*. Esta frequência é semelhante a observada por Chacón *et al.* (2003) em isolados do grupo hydrophila (72,3%) mas superior aquela detectada por Kingombe *et al.* (1999) e Wang *et al.* (2003), 66,5% e 55%, respectivamente.

**Tabela 10.** Amplificação dos genes *aerA*, *ahpA*, *ahyB*, *lipA* e *satA* em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* do grupo hydrophila.

Espécie	Isolado (IB Aer)	Origem	<i>aerA</i>	<i>ahpA</i>	<i>ahyB</i>	<i>lipA</i>	<i>satA</i>
<i>A. caviae</i>	009	C	-	+	+	+	+
<i>A. sobria</i>	010	C	-	+	+	+	+
<i>A. caviae</i>	101	C	-	-	+	-	+
<i>A. caviae</i>	102	C	+	-	+	+	-
<i>A. hydrophila</i>	103	C	+	+	+	+	+
<i>A. caviae</i>	104	C	+	+	-	+	+
<i>A. caviae</i>	105	C	-	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	106	C	-	+	+	+	+
<i>A. caviae</i>	107	C	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	109	C	+	-	+	+	+
<i>A. sobria</i>	110	C	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	111	C	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	112	C	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	113	E	+	+	-	+	+
<i>A. hydrophila</i>	114	E	-	-	-	+	+
<i>A. hydrophila</i>	115	E	+	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	116	E	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	117	E	+	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	118	E	+	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	119	E	+	-	+	-	+
<i>A. hydrophila</i>	120	E	-	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	121	C	+	-	-	+	+
<i>A. hydrophila</i>	126	E	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	127	E	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	128	E	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	129	C	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	130	E	+	-	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	131	E	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>	132	C	+	+	+	+	-
<i>A. hydrophila</i>	133	E	-	-	+	+	+

C- isolado clínico, E- isolado ambiental ou de fezes de indivíduos assintomáticos, + presença de amplificação, - ausência de amplificação.

Como pode ser constatado na Tabela 10, não foi observada diferença significativa na frequência do gene *aerA* entre isolados clínicos e ambientais, dado este que corrobora as observações de Chacón *et al.* (2003) e Sen e Rodgers (2004), e indica que apesar da potencial importância da aerolisina como fator de patogenicidade (Chopra e Houston, 1999; Santos *et al.*, 1999 Wang *et al.*, 2003), este necessita de outros fatores para o desencadeamento do processo gastroentérico.

O fragmento correspondente ao gene da serina-protease (*ahpA*) foi evidenciado em 53% dos isolados analisados (Tabela 10 e Figura 2). Frequência esta um pouco inferior àquela observada por Chacón *et al.* (2003) em isolados de *Aeromonas* do grupo *hydrophila* (62,8%), mas explicável devido à diferença entre os isolados e a origem dos mesmos.

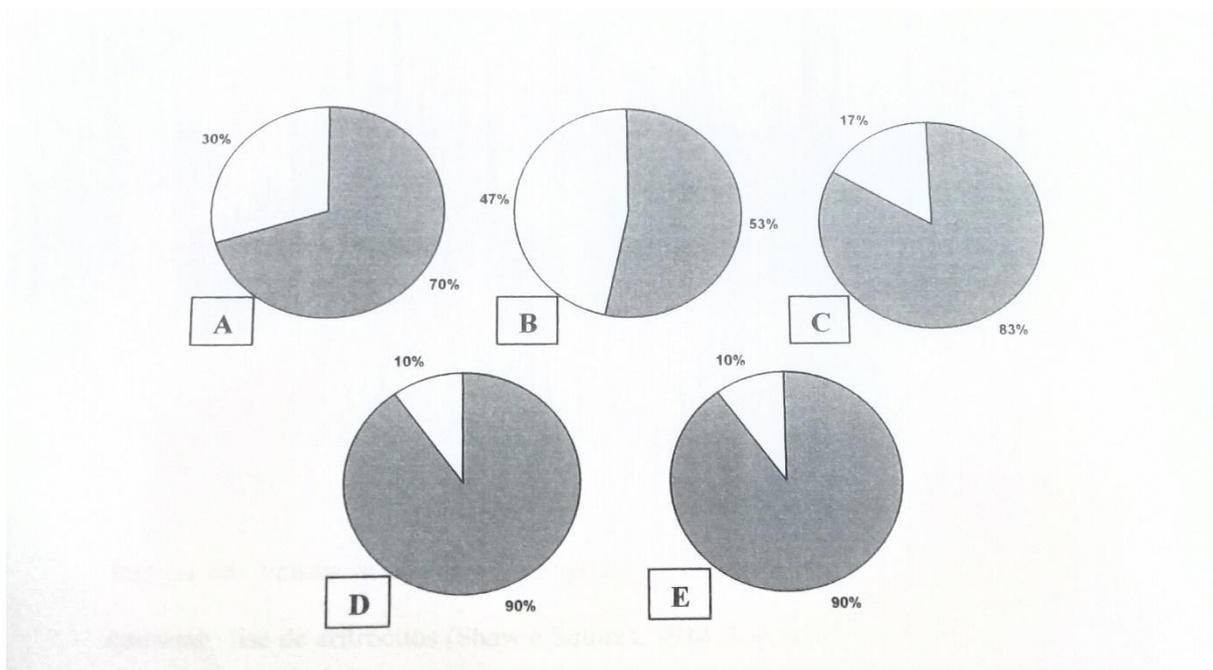


Figura 2. Percentagem de amplificação dos genes *aerA* (A), *ahpA* (B), *ahyB* (C), *lipA* (D) e *satA* (E) em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* do grupo *hydrophila*. Positivo■ e negativo□.

Diferença significativa foi constatada quanto à frequência do gene *ahpA* entre isolados clínicos (68,7%) e ambientais (35,7%). Resultado este, que concorda com as observações de Chacón *et al.* (2003). A maior ocorrência do gene *ahpA* em

isolados clínicos pode ser considerado como indicativo da importância deste fator de virulência nos processos infecciosos por *Aeromonas*. Neste sentido, cabe ressaltar que além da sua possível participação como invasora, as serina proteases atuam no processo de maturação de diversas proteínas (Rao *et al.*, 1998), podendo assim afetar indiretamente a capacidade patogênica de *Aeromonas*.

Uma alta frequência do gene para elastase (Tabela 10 e Figura 2) foi encontrada entre os isolados (83%). Porém, ao contrário do gene *ahpA* (serina protease), não foi constatada diferença significativa na frequência do gene *ahyB* (elastase/metaloprotease) em isolados clínicos e ambientais. Sen e Rodgers (2004), analisando a distribuição de fatores de virulência em *Aeromonas* spp., isoladas de água potável, também identificaram, através de PCR, uma alta frequência do gene *ahyB* (88%).

Estudos realizados mostram que as lipases extracelulares podem ser consideradas como fatores de patogenicidade, já que estas enzimas podem interagir com leucócitos humanos, afetando várias funções do sistema imune através da liberação de ácidos graxos (Chuang *et al.*, 1997). A glicerofosfolípido colesterol aciltransferase (GCAT) pertence à família das lipases de *Aeromonas* atuando na hidrólise dos fosfolípidos de membrana e causando lise de eritrócitos (Shaw e Squires, 1984; Vipond *et al.*, 1998).

Tanto o gene da lipase (*lipA*) quanto da glicerofosfolípido colesterol aciltransferase (*satA*) foram encontrados na grande maioria dos isolados analisados (90%). Fato também constatado por Cascón *et al.* (1996), Chacón *et al.* (2003), Sen e Rodgers (2004). Conforme discutido anteriormente, a alta frequência do gene *lipA* em *Aeromonas*, particularmente naquelas do grupo *hydrophila*, e a sua ausência em outros grupos bacterianos, torna possível a identificação, e eventual quantificação de *Aeromonas* através de PCR, solucionando o grave problema de análise destas bactérias em amostras clínicas, ambientais e de alimentos através dos métodos convencionais (Moyer, 1996).

Por sua vez, a GCTA codificada pelo gene *satA*, tem sido confirmada como importante fator de patogenicidade em peixes, especialmente quando associada com lipopolissacarídeos, exercendo atividades hemolítica e citotóxica responsáveis pela elevada mortalidade decorrente de infecções por *Aeromonas* em diversas espécies de peixes (Lee e Ellis, 1990).

**Tabela 11:** Atividades hemolítica, proteolítica e lipolítica em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* do grupo *hydrophila*.

Espécie	Isolado (IB Aer)	Origem	Ativ. Hemolítica			Ativ. Proteolítica		Ativ. lipolítica
			Humano	Coelho	Quant. <sup>1</sup>	Qualit.	Quant. <sup>2</sup>	
<i>A. caviae</i>	009	C	-	-	8,15	+	0,20	+
<i>A. sobria</i>	010	C	-	+	53,19	+	2,45	+
<i>A. caviae</i>	101	C	+	+	64,89	+	2,50	-
<i>A. caviae</i>	102	C	+	+	68,09	+	0,40	+
<i>A. hydrophila</i>	103	C	+	+	78,72	+	1,00	+
<i>A. caviae</i>	104	C	+	+	85,11	+	0,95	+
<i>A. caviae</i>	105	C	+	+	46,81	+	0,45	+
<i>A. hydrophila</i>	106	C	+	+	10,64	+	0,30	+
<i>A. caviae</i>	107	C	+	+	10,64	+	0,95	+
<i>A. hydrophila</i>	109	C	+	+	42,55	+	1,25	+
<i>A. sobria</i>	110	C	+	+	28,72	+	0,45	+
<i>A. hydrophila</i>	111	C	+	+	43,62	+	2,25	+
<i>A. hydrophila</i>	112	C	+	+	38,30	+	1,70	+
<i>A. hydrophila</i>	113	E	+	+	44,68	+	0,80	+
<i>A. hydrophila</i>	114	E	+	+	45,74	+	2,25	+
<i>A. hydrophila</i>	115	E	+	+	42,55	+	2,40	+
<i>A. hydrophila</i>	116	E	+	+	62,77	+	2,35	+
<i>A. hydrophila</i>	117	E	+	+	31,91	+	2,15	-
<i>A. hydrophila</i>	118	E	-	+	74,47	+	0,95	+
<i>A. hydrophila</i>	119	E	+	+	64,89	+	2,80	-
<i>A. hydrophila</i>	120	E	+	+	84,04	+	2,65	+
<i>A. hydrophila</i>	121	C	+	+	100,00	+	2,00	+
<i>A. hydrophila</i>	126	E	+	+	85,11	+	1,80	+
<i>A. hydrophila</i>	127	E	+	+	63,83	+	1,65	+
<i>A. hydrophila</i>	128	E	-	+	67,02	-	0,00	-
<i>A. hydrophila</i>	129	C	+	+	36,17	+	0,20	+
<i>A. hydrophila</i>	130	E	+	+	45,74	+	0,60	+
<i>A. hydrophila</i>	131	E	-	+	31,91	+	0,20	+
<i>A. hydrophila</i>	132	C	+	+	98,94	+	2,50	+
<i>A. hydrophila</i>	133	E	-	+	44,68	+	0,81	+

C- isolado clínico, E- isolado ambiental ou de fezes de indivíduos assintomáticos, <sup>1</sup> Atividade hemolítica (% de hemólise); <sup>2</sup> Atividade caseinolítica (U/ml).

A análise da atividade hemolítica dos isolados, apresentada na Tabela 11, mostrou que todos os isolados, com exceção do isolados IB Aer 009 (*A. caviae*), apresentam atividade hemolítica sobre sangue de coelho, entretanto, 5 dos 30

isolados foram incapazes de hemolisar o sangue humano. Handfield *et al.* (1996) observou diferenças na atividade hemolítica de *Aeromonas* sobre eritrócitos de distintas espécies, constatando que a percentagem de hemólise é maior sobre sangue de coelho do que sobre sangue humano.

Ampla variação foi observada na atividade hemolítica extracelular dos isolados (Tabela 11 e Figura 3), sobressaindo os isolados IB Aer 103, 104, 120, 121, 126 e 132, com percentagens de hemólise superiores a 75%. Apesar da atividade hemolítica ser considerada um importante fator de patogenicidade em *Aeromonas* (Krovacek *et al.*, 1994; Handfield *et al.*, 1996; entre outros).

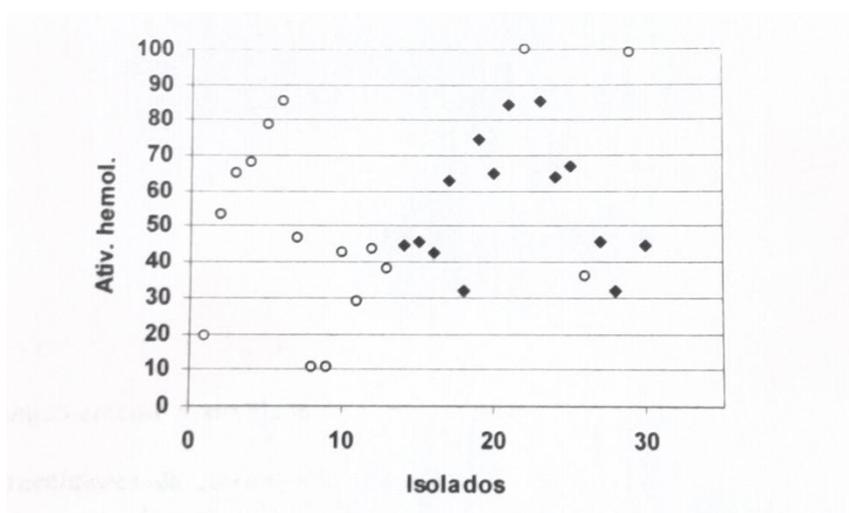


Figura 3. Variação na atividade hemolítica em isolados clínicos (o) e ambientais (●).

Duas hemolisinas foram identificadas por Wretlind *et al.* (1971) através da focalização enzimática. Uma destas hemolisinas apresenta atividade citotóxica sendo uma aerolisina/hemolisina (Berheimer *et al.*, 1975; Buckley, 1991), muito provavelmente envolvidas nos processos infecciosos por *Aeromonas* (Chakraborty *et al.*, 1987) e codificada pelo gene *aerA* (Chopra *et al.*, 1993). A outra hemolisina, codificada pelo gene *hlyA* é semelhante àquela produzida por *Vibrio cholerae* (Zhang *et al.*, 2000). Assim sendo, a atividade hemolítica observada nos isolados corresponde à somatória da atividade destas duas hemolisinas ou a apenas uma delas, não sendo possível através dos métodos utilizados determinar a atividade específica de cada hemolisina.

As proteases de um modo geral são consideradas invasinas importantes nos processos patogênicos de diversas bactérias (Rao *et al.*, 1998), entre as quais as *Aeromonas*. No presente trabalho, a atividade proteolítica foi identificada em todos os isolados (clínicos e ambientais) com exceção de IB Aer 128. A alta prevalência de atividade proteolítica em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* foi constatada por diversos autores, entre os quais, Howard *et al.* (1996) e Chacón *et al.* (2003). Entretanto, em contraste com os resultados de Leung e Stevenson (1988) e Chacón *et al.* (2003), os dados obtidos não evidenciaram diferença significativa na atividade proteolítica entre isolados clínicos e ambientais (Tabela 11 e Figura 4), indicando que as proteases têm um papel tão importante na vida livre quanto na patogenicidade destas bactérias.

Como ocorre com a atividade hemolítica, a atividade proteolítica determinada através da capacidade de degradação da azocaseína constitui-se uma medida geral avaliando conjuntamente a atividade da metaloprotease e de serina protease presentes nos extratos extracelulares de *Aeromonas* (Leung e Stevenson, 1988; Rivero *et al.* 1991; Cascón *et al.*, 2000). Entretanto, segundo Cascón *et al.* (2000) a serina protease apresenta alta atividade caseinolítica, enquanto a metaloprotease (elastase) possui especificidade pela elastina. Desta forma, 90% da atividade identificada corresponde à serina protease, e apenas 10% à elastase.

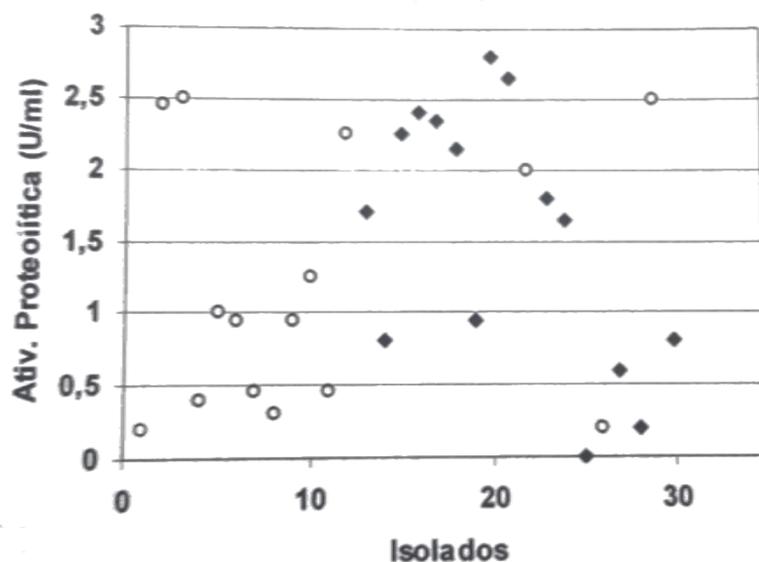


Figura 4. Variação na atividade proteolítica (azocaseína) em isolados clínicos (○) e ambientais (●).

Assim como evidenciado por outros autores, a prevalência de atividade lipolítica nos isolados de *Aeromonas* avaliados no presente trabalho foi muito elevada (86,7%), não havendo diferenças significativas entre isolados clínicos e ambientais ou entre espécies. Este resultado indica que a atividade lipolítica, assim como ocorre com a atividade proteolítica, é importante tanto na forma saprofítica quanto parasítica destas bactérias.

A análise de correlação entre as variáveis avaliadas (Tabela 12) mostra, apesar de baixa, correlação positiva entre a atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos e de coelho. A baixa correlação pode estar relacionada com a presença ou não das duas hemolisinas de *Aeromonas* e a sua especificidade sobre os tipos eritrócitos. A correlação observada entre a presença do gene *aerA* e a hemólise de sangue humano aponta no sentido de maior especificidade da aerolisina/hemolisina sobre estes eritrócitos, fato este que reforça a importância da aerolisina, e em particular da sua atividade hemolítica, na patogenicidade de *Aeromonas* em humanos (Hsu *et al.*, 1981; Allan e Stevenson, 1981; Handfield *et al.*, 1996; Chacón *et al.*, 2003). Provavelmente, a inespecificidade do teste de hemólise, e o frequente uso de sangue de carneiro e de coelho na realização dos mesmos, seja responsável por dados contraditórios quanto ao papel ou importância da aerolisina na patogenicidade de *Aeromonas* (Thune *et al.*, 1993).

**Tabela 12.** Análise de correlação (Spearman) entre as atividade enzimáticas e a presença de genes potencialmente associados com a patogenicidade em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* do grupo *hydrophila*.

	H.C	H.Q	PQL	PQN	L	<i>aerA</i>	<i>ahpA</i>	<i>ahyB</i>	<i>lipA</i>	<i>satA</i>
H.H	0,371*	0,087 <sup>ns</sup>	0,371*	0,347 <sup>ns</sup>	0,111 <sup>ns</sup>	0,400*	0,033 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,111 <sup>ns</sup>	0,111 <sup>ns</sup>
H.C		0,268 <sup>ns</sup>	0,034 <sup>ns</sup>	0,269 <sup>ns</sup>	0,062 <sup>ns</sup>	0,284 <sup>ns</sup>	0,174 <sup>ns</sup>	0,083 <sup>ns</sup>	0,062 <sup>ns</sup>	0,062 <sup>ns</sup>
H.Q			0,140 <sup>ns</sup>	0,395*	0,212 <sup>ns</sup>	0,055 <sup>ns</sup>	0,239 <sup>ns</sup>	0,300 <sup>ns</sup>	0,212 <sup>ns</sup>	0,353 <sup>ns</sup>
PQL				0,311 <sup>ns</sup>	0,557**	0,284 <sup>ns</sup>	0,199 <sup>ns</sup>	0,415*	0,557**	0,557**
PQN					0,154 <sup>ns</sup>	0,059 <sup>ns</sup>	0,166 <sup>ns</sup>	0,114 <sup>ns</sup>	0,154 <sup>ns</sup>	0,154 <sup>ns</sup>
L						0,267 <sup>ns</sup>	0,356 <sup>ns</sup>	0,149 <sup>ns</sup>	1,000**	0,259 <sup>ns</sup>
<i>aerA</i>							0,262 <sup>ns</sup>	0,098 <sup>ns</sup>	0,267 <sup>ns</sup>	0,024 <sup>ns</sup>
<i>ahpA</i>								0,120 <sup>ns</sup>	0,356 <sup>ns</sup>	0,134 <sup>ns</sup>
<i>ahyB</i>									0,149 <sup>ns</sup>	0,149 <sup>ns</sup>
<i>lipA</i>										0,259 <sup>ns</sup>

n.s.- não significativo; \* - significativo (5%); \*\* - significativo (1%)

H.H- hemólise em sangue humano; H.C- hemólise em sangue de coelho; H.Q- atividade hemolítica quantitativa; PQL- proteólise em azocaseína; PQN- atividade proteolítica quantitativa sobre azocaseína; L- atividade lipolítica; *aerA*, *ahpA*, *ahyB*, *lipA* e *satA* – presença ou ausência de amplificação por PCR.

Correlação positiva foi evidenciada entre a atividade hemolítica e a atividade proteolítica dos isolados (Tabela 12 e Figura 5). Tal correlação pode estar associada ao papel das proteases na maturação das hemolisinas de *Aeromonas*. A aerolisina é secretada na forma de proaerolisina (inativa), a qual é ativada através da remoção de uma fração peptídica C-terminal resultante da ação proteolítica de proteases produzidas pela própria bactéria (Howard e Buckley, 1996) ou pelo hospedeiro (Abrami *et al.*, 1998). Recentemente, Song *et al.* (2004) identificaram a metaloprotease como enzima responsável pela maturação da aerolisina de *A. sobria*.

Entretanto, no presente trabalho não foi observada correlação entre a atividade hemolítica e a presença do gene que codifica a elastase (*ahyB*). A ausência de correlação entre estas variáveis pode estar associada a inespecificidade do método de análise de atividade hemolítica, e a participação de outras proteases (serina-protease e zinco-protease) no processo de maturação da aerolisina/hemolisina. Por outro lado, correlação positiva foi observada entre a atividade proteolítica qualitativa e a presença do gene *ahyB*.

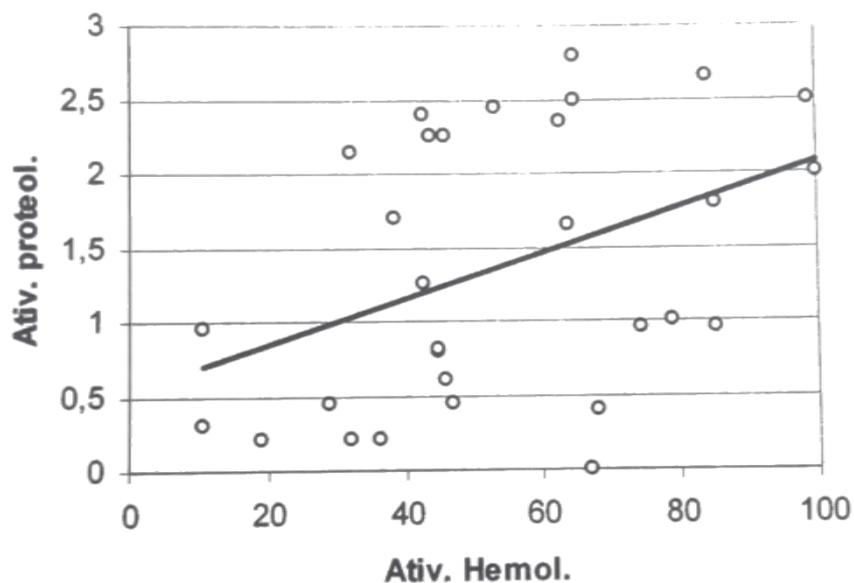


Figura 5. Relação entre a atividade hemolítica e a atividade proteolítica em isolados de *Aeromonas*.

A alta correlação entre a presença do gene *lipA* responsável por uma lipase extracelular com atividade esterásica, e a atividade lipolítica é esperada apesar da existência de outros genes codificadores de lipases identificados em distintos isolados e espécies de *Aeromonas* (Watanabe *et al.*, 2004).

De um modo geral, os resultados obtidos mostram que os genes responsáveis pelos principais fatores de patogenicidade descritos em *Aeromonas* encontram-se presentes nas diversas espécies deste gênero, e tanto em isolados clínicos como ambientais de *Aeromonas* do grupo *hydrophila*, de forma que a sua presença não indica, necessariamente, a patogenicidade dos isolados, mas apenas o seu potencial. Adicionalmente, a ausência de diferenças significativas na presença de genes, possivelmente associados a patogenicidade entre isolados clínicos e ambientais pode ser tomado como mais um indicativo da necessidade de diversos fatores para o desencadeamento dos processos patogênicos por parte destas bactérias.

A elevada prevalência de atividade hemolítica, proteolítica e lipolítica, assim como dos seus genes em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* é indicativo de que tais invasinas apresentam um importante papel na persistência destes microrganismos, tanto no ambiente como no organismo hospedeiro. Entretanto,

além dos diversos trabalhos já realizados, visando esclarecer a função dos vários fatores de patogenicidade em *Aeromonas*, novos estudos devem ser realizados no sentido de elucidar a importância dos distintos fatores de patogenicidade nos diversos tipos de afecções causadas por estas bactérias, assim como a interação entre fatores na determinação da patogenicidade das mesmas.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho é possível tecer as seguintes conclusões:

1. A presença de genes que codificam potenciais fatores de patogenicidade foram observados na maioria das espécies de *Aeromonas*, incluindo espécies patogênicas e não patogênicas, mostrando que tais genes encontram-se amplamente distribuídos no gênero e que a presença dos mesmos não pode ser tomada como indicativo do potencial patogênico da espécie.
2. Ampla variação interespecífica foi observada quanto ao nível de atividades hemolítica e proteolítica. Entretanto, todas as espécies avaliadas apresentaram atividade proteolítica e lipolítica, evidenciando o importante papel destes dois grupos de enzimas na vida saprofítica e parasítica de *Aeromonas*.
3. Elevada prevalência dos genes *aerA*, *ahpA*, *ahyB*, *lipA* e *satA* foi constatada tanto em isolados clínicos como ambientais (ou controles) de *Aeromonas* do grupo *hydrophila*, sendo que mais de 50% dos isolados apresentaram amplificação mais de três genes considerados como potenciais fatores de patogenicidade.
4. Utilizando os primers escolhidos 90% dos isolados avaliados exibiram amplificação dos genes *lipA* e *satA*. Desta forma, a amplificação destes genes poderia ser utilizada na identificação rápida de *Aeromonas* em amostras clínicas, de alimentos ou ambientais, sem a necessidade de isolamento bacteriano.
5. Não foram detectadas diferenças significativas na prevalência dos genes *aerA*, *ahyB*, *lipA* e *satA* entre isolados clínicos e ambientais, indicando que a simples presença destes genes não pode ser tomado como indicativo de patogenicidade.
6. A presença do gene *ahpA* (serina protease) foi maior em isolados clínicos do que em isolados ambientais apontando sua importância direta como invasina, ou indireta na maturação de proteínas, na patogenicidade de *Aeromonas*.

7. Ampla variação foi observada na atividade hemolítica e proteolítica tanto em isolados clínicos como ambientais, não sendo encontradas diferenças significativas nas atividades enzimáticas extracelulares destes dois grupos.
8. Correlação positiva entre a hemólise de sangue humano e a presença do gene *aerA* (aerolisina) pode ser indicativo de que esta citotoxina com atividade hemolítica possui maior especificidade por eritrócitos humanos do que de coelho.



- Borrel, N.; Silvia, G.A.; Fugueras, M.J.; Martinez-Murcia, J.A. (1997). Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1671-1674.
- Botarelli, E.; Ossiprandi, M.C. (1999). *Aeromonas* Infections: An update. **Disponível(online)**<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bottarelli2/bottarelli2/bottarelli.htm>
- Brooks, F.G.; Butel, J.S.; Morse, S. A. (2000). Jawetz, Melnick e Adelberg – **Microbiologia Médica.** 21 ed. RJ: Guanabara Koogan.
- Buchanan R.L.; Palumbo S.A. (1985). *Aeromonashydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Safety.** 7:15 – 29.
- Buckley, J.T.(1991). Secretion and mechanism of action of the hole forming toxin aerolysin. **Exper.** 47:418-419
- Callister, S.M.; Agger, W.A. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(2): 249 – 253.
- Carnahan, A.M.; Altwegg, M. (1996). **Taxonomy.** In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed.) **The Genus Aeromonas.** John Wiley & Sons, New York, NY. pp 1 – 38.
- Cascón, A.; Anguita, J.; Hernanz, C.; Sánchez, M.; Fernández, M.; Naharro, G. (1996). Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group1 by PCR assays. **Appl. Environ. Microbiol.** 62(4):1167 – 1170.
- Cáscon, A.; Jugueros, J.; Temprano, A.; Sánchez, M.; Hernanz, C.; Lunego, M. J.; Naharro, G. (2000). A Major Elastase is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 68: 3233-2341.
- Chacón, M.R.; Figueras, M.J.; Castro-Escarpulli, G.; Soter, L.; Guavro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* sp. **Antonie van Leeuwenhoek.** 84: 269-278.

- Chakraborty, T.; Huhle, H.; Bergbauer, H.; Goebel, W. (1987). Cloning, expression., and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 167: 368-374
- Chopra, A.K.; Houston, C.W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*- associated gastroenteritis. **Microbiol Infect.** 1: 1129-1137
- Chopra, A.K.; Houston, C.W.; Peterson, J.W.; Jin, G.F. (1993). Cloning, expression., and sequence analysis of a cytotoxic enterotoxin gene from *Aeromonashydrophila*. **Can. J. Microbiol.** 39: 513-523.
- Chuang, Y.C.; Chiou, S.F.; Su, J.H.; Wu, M.L.; Chang, M.C. Molecular analysis and expression. Of the extracellular lipase of *Aeromonashydrophila* MCC-2. (1997). **Microbiology.** 143: 803-812.
- Delamare, A.P.L. Costa, S.O.P.; Da Silveira, M.M.; Echeverrigaray, S. (2000). Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 57 – 60.
- Fuzihara, T.O.; Murakami, K.A.; Vannuci, L. (1995). *Aeromonas hydrophila*: ocorrência em águas de consumo humano. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Resumos.**p.28. Santos, 1995.
- Gavin, R.; Rabaan, A.A.; Merino, S.; Tomas, J.M.; Gryllos, I.; Shaw, J.G. (2002). Lateral Flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Mol. Microbiol.** 43: 383-397.
- Gillespie, S.H. (1994). **Medical Microbiology Illustrated.** 4 ed. France: Pollina. 209p.
- Gilligan, P.H.; Janda, J.M.; Karmali, M.A.; Miller, J.V. (1992). Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. **Cumitech 12<sup>a</sup>, Amer. Soc. Microbiol.** Washington. pp. 1-28.
- Goodwin, C.S.; Harper, W.E.S.; Stewart, J.K.; Gracey, M.; Burke, V.; Robinson, J. (1983). Enterotoxigenic *Aeromonashydrophila* and diarrhoea in adults. **The Med. J. Aust.** 1(8): 25 – 26.
- Gosling, P.J. (1996). ***Aeromonas* species in disease of animals.** In: Austin B.; Altwegg M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed.), **The Genus *Aeromonas*,** John Wiley & Sons, New York, NY. Pp175 – 196.



- Kanai, K.; Wakabayashi, H. (1984). Purification and some properties of protease from *A. hydrophila*. **Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fishers**. 50: 1360 – 74.
- Khan, A.A.; Kim, E.; Cerniglia, C.E. (1998). Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of a hemolytic toxin (aerolysin) gene from *Aeromonastrota*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2473-2478
- Kingombe, C.J.B.; Huys, G.; Tonolla, M.; Albert, M.J.; Swings, J.; Peduzzi, R. (1999). PCR detection characterization and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. **Appl. Environ Microbiol.** 65: 5293-5302
- Kirov, S.M.; Tassell, B.C.; Semmler, A.B.T.; O'Donovan, L.A.; Rabaan, A.A.; Shaw, J.G. (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **J Bacteriol.** 184: 547-555.
- Koneman, E.W. (1997). *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Allen, S.D.; Jandam, W.N.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. (Ed). **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5th. E.J.B. Lippincott Company, Philadelphia. pp.348-361.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. (2001). **Diagnóstico Microbiológico**, Editora Médica e Científica Ltda., RJ. 1465p.
- Krovacek, K.; Pasquale, V.; Baloda, S.B.; Soprano, V.; Conti, M.; Dumontet, S. (1994). Comparison of putative virulence factors in *Aeromonashydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in Southern Italy. **Appl. Environ. Microbiol.** 60(4): 1379-1382.
- Lee, K.; Ellis, A.E.; (1990). Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytollysin of *Aeromonassalmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. **J. Bacteriol.** 172 (9): 5382-5393.
- Leung, K.Y.; Stenvenson, R.M.W. (1988). Tnn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonashydrophila* with reduced virulence for fish. **Infect. Immun.** 56: 2639-2644.

- Loewy, A.G.; Santer, U.V.; Wieczorek, M.; Blodgett, J.K.; Jones, S.W.; Cheronis, J.C. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase of *Aeromonashydrophila*. **J. Biol Chem.** 268: 9071-9078.
- Lynch, M.J.; Swift, S.; Fish, L.; Kirke, D.F.; Dodd, C.E.R.; Stewart, G.S.A.B.; Keevil, C.W.; Williams, P. (2002). The regulation of biofilm development by quórum sensing in *Aeromonashydrophila*. **Evirom. Microbiol.** 4: 18-28.
- Majeed, K.N.; Egan, A.F.; Mac, R.I. (1990). Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. At 5°C. **J. Appl Bacteriol.** 69: 332-337.
- Merino, S.; Aguilar, A.; Noguera, M.M.; Regue, M.; Swift, S.; Tomás, J.M. (1999). Cloning, Sequencing, and Role in Virulence of Two Phospholipases (A1 and C) from Mesophilic *Aeromonassp.* Serogroup O: 34. **Infection and Immunity.** 67(8): 4008-4013.
- Millership, S.E. (1996). **Identification.** In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed). The Genus *Aeromonas*. Ghoem Wiley & Sons, New York, NY, pp: 1-38.
- Morena, L.M.; Van, R.; Singh, K.; Brian, M.; Murray, E.B.; Pickering, K.L. (1993). Diarrhea associated with *Aeromonas* species in children in day care centers. **The J. Infec. Dis.** 168: 215-218.
- Moyer, P.N. (1996). **Isolation and enumeration of *Aeromonas*.** In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. John Wiley & Sons Ltd (Ed.). The Genus *Aeromonas*. Pp. 39-76
- Neves, M.S.; Nunes, M.P.; Ricciardi, I.D. (1990). Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro. **J. Food Protec.** 53: 78-80
- Palumbo, S.A.; Maxino, F.; Williams, A.C.; Buchanan, L.R.; Thayer, W.D. (1985). Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonashydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 50(4): 1027-1030.
- Palumbo, S.A. (1996). **The *Aeromonas hydrophila* group in food.** In: Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph SW. The Genus *Aeromonas*. New York: John Wiley & Sons. p. 287-304

- Popoff, M.Y.; Coynault, C.; Kiredjan, M.; Lemelin, M. (1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. **Curr. Microbiol.** 5:109-114.
- Popoff, M.Y.; Lallier, R. (1994). Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. **Methods in Microbiology.** 16: 127-145.
- Quiroga, M.I.; Franceschini, N.; Rossolini, G.M.; Gutkind, G.; Bonfiglio, G.; Franchino, L.; Amicosante, G. (2000). Interaction of celastrol and the metallo-β-lactamases produced in *Aeromonas* sp. and *in vitro* activity. **Chem.** 46:177-183.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, S.M.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiol. And Molecular Biol. Reviews.** 62(3): 597-635.
- Rivero, O.; Anguita J.; Mateos, D.; Paniagua, C.; Naharro, G. (1991). Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiol.** 65:1-7.
- Saad, S.M.I.; Iaria, S.T.; Furlanetto, S.M.P. (1995). Motile *Aeromonas* sp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.** 26(1): 22-27.
- Sakai, D.K. (1985). Significance of extracellular protease for growth of a heterotrophic bacterium, *Aeromonas salmonicida*. **Appl Environ Microbiol.** 50: 1031-1037.
- Santos, J.A.; Gonzáles, C.J.; Otero, A.; Lopez, M.L.G. (1999). Hemolytic Activity and Siderophore Production in Different *Aeromonas* species Isolated from Fish. **Applied and Environmental Microbiol.** 65: 5612-5614.
- 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): 1077-1086.
- Serrano, C.J.; Santos, J.A.; Lopez, G.M.L. (2002). Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater and from diarrhoea case. (2002). **J. Appl. Microbiol.** 98(3):414.
- Shaw, D.H.; Squires, M.J. (1984). O-antigen in virulent strain of *A. hydrophila*. **Fems. Microbiol. Lett.** 24:277-280.

- Shibata, M.; Morita, K.; Watanabe, N.; Wada, H.; Okitsu, T.; Yamai, S.; Itoh, K.; Shimada, T.; Watanabe, H.; Kanamori, M. (1996). Rapid detection of the hemolysin genes in *Aeromonas sobria* by the Polymerase Chain Reaction. **Kansenshogaku Zasshi**. 70(12): 1266-70
- Singh, D.V.; Sanyal, S.C.:(1992). Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity on *Aeromonas* spp. **J Med Microbiol**. 37:262-267.
- Snellman, E.A.; Sullivan, E.R.; Colwell, R.R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter*.sp. RAG-1. **Eur. J. Biochem**. 269:5771-5779.
- Song, T.; Toma, C.; Nakasone, N.; Iwanaga, M.; (2004). Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. **J. Medical Microbiol**. 53:477-482.
- Teka, T.; Faruque, G.S.A.; Hossain, I.M.; Fuchs, J.G. (1999). *Aeromonas*-associated diarrhoea in Bangladeshi children: clinical and epidemiological characteristics. **Ann. Trop. Paediatrics**. 19:15-20.
- Thune, R.L.; Stanley, L.A.; Cooper, K. (1993). Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warm fish. **Ammu. Rev. Fish Dis**. 3:37-68.
- Vipond, R.; Bricknell, I.R.; Durant, E.; Bowden, T.J.; Ellis, A.E.; Smith, M.; MacIntyre, S. (1998). Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. **Infec. Immun**. 66(5): 1990-1998.
- Zanella, J.F.P. (2002). Incidência de *Aeromonas* em trabalhadores de aviários e estudo da resposta ao contato permanente com *Aeromonas*. **Dissertação de mestrado**. Instituto de biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Zhang, Y.L.; Ong, C.T.; Leung, K.Y. (2000). Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. **Microbiology**. 146:999-1009.
- Wakabayashi, H.; Kanai, K.; Hsu, T.C.; Egusa, S. (1981). Pathogenic activities of *A. hydrophila* (Chester) Popoff and Veron. **Fish Pathology**. 15:319-325.

Wang, G.; Clark, C.G.; Liu, C.; Pucknel, C.; Munro, C.K.; Kruk, M.A.C.; Caldeira, R.; Woodward, D.; Rodgers, F.G. (2003). Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonashydrophila* and *Aeromonassobria* by Multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1048-1054.

Watanabe, N.; Morita, K.; Furukawa, T.; Manzoku, T.; Endo, E.; Kanamori, M. (2004) Sequence and Analysis of Amplified DNA Fragments Containing the Region Encoding the Putative Lipase Substrate-Binding Domain and Genotyping of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiol.** 70(1): 145-151.

Wilcox, M.H.; Cook, A.M.; Eley, A.; Spencer, R.C. (1992). *Aeromonas* sp. as a potential cause of diarrhoea. **J. Clin. Pathol.** 45: 95-963.

Wong, C.Y.F.; Heuzenroeder, M.W.; Flower, R.L.P. (1998). Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonashydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. **Microbiol.** 144: 291-298

Wretling, B.; Molby, R.; Wadstrom, T. (1971). Separation of two Hemolysins from *Aeromonashydrophilaby* Isoelectric Focusing. **3** 4:503-505.