

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
INCQS/FIOCRUZ

**DIVERSIDADE DE *Aeromonas* spp. ASSOCIADAS A PERFIS DE
VIRULÊNCIA NAS ÁGUAS DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS**

Mariana de Melo Rodrigues Sobral

Rio de Janeiro
2018

Mariana de Melo Rodrigues Sobral

DIVERSIDADE DE *Aeromonas* spp. ASSOCIADAS A PERFIS DE VIRULÊNCIA NAS ÁGUAS DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Sobral, Mariana de Melo Rodrigues

Diversidade de *Aeromonas* spp. associadas a perfis de virulência nas águas da Lagoa Rodrigo de Freitas. / Mariana de Melo Rodrigues Sobral. Rio de Janeiro: INCQS/ Fiocruz, 2018.

65 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. *Aeromonas* spp. 2. Genes de Virulência. 3. Filogenia. 4. Análise. 5. Lagoa Rodrigo de Freitas. I. Título.

Mariana de Melo Rodrigues Sobral

**Diversidade de *Aeromonas* spp. associadas a perfis de virulência nas
águas da Lagoa Rodrigo de Freitas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado: / /

BANCA EXAMINADORA

Dr Ivano Rafaelle Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Angela Corrêa de Freitas-Almeida (Doutora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Ana Cristina Rivas da Silva (Doutora)
Universidade Castelo Branco

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho às mulheres mais importantes da minha vida. Minha mãe Maria Zélia e avó Maria José, que sempre fizeram de tudo pela minha felicidade. Sem elas não teria tido todo o incentivo e força para lutar contra todos os obstáculos que enfrentamos.

“Nunca existiu uma grande inteligência sem uma veia de loucura.”
(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus. Sem Ele nada disso poderia ter sido conquistado; Agradeço especialmente as minhas três mães Marias; Maria José (*in memoriam*), Maria Zélia e Maria da Conceição. Tenho a grande sorte de vocês estarem ao meu lado sempre;

Aos meus irmãos Mateus e Tadeu, por fazerem parte de mim;

Ao meu amado Pedro Paulo, um grande obrigado por estar comigo neste momento de alegria.

Aos meus primos Eliton, Elton, Danielle, Nilma, Beatriz, Mylene, Sarah e Arthur, tão chegados quanto meus irmãos e que estão comigo desde o berço, e aos que chegaram com o passar do tempo e se fizeram indispensáveis desde então;

Às irmãs que o meu coração escolheu, Caroline e Raquel;

À minha orientadora Dr^a Maysa Beatriz Mandetta Clementino, por ter acreditado em mim e no meu potencial;

Ao meu co-orientador Kayo Cesar Bianco Fernandes e a amiga Camila Coutinho Barreto, obrigada por todo o conhecimento, incentivo e amizade, passados durante esta etapa. Sem a ajuda de vocês nada disso teria acontecido;

As amigas de laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ: Renata, Claudia Flores, Thaís, Rafaela;

À Coordenação do Curso de Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e a Fiocruz, meus agradecimentos pela oportunidade de desenvolver este projeto;

Por fim, agradeço a minha filha do coração. Minha princesa, minha bichinha de estimação: Theodora Maria.

RESUMO

Aeromonas spp. são bactérias ubíquas que vem recebendo crescente atenção como patógenos humanos, devido sua ocorrência generalizada em alimentos, em processos infecciosos humanos e em ambientes aquáticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade taxonômica de *Aeromonas* spp. e a distribuição de genes associados a virulência nas águas da lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. Do total de 87 isolados identificados fenotipicamente como *Aeromonas* spp., 87% (76/87) foram confirmados como pertencentes a esse gênero pela PCR do gene *rrs* do 16S rRNA. A análise filogenética das sequências dos genes *rpoB/gyrB* revelaram a presença de 3 grandes grupos, sendo grupo A (n=42), grupo B (n= 12) e grupo C (n=18). Os isolados dos três grupos alinharam com 98% a 100% com sequências de referência de *Aeromonas punctata/caviae*, *A. hydrofila* e *A. dahkensis*, respectivamente. Foi identificada também uma cepa de *A. jandaei* e três de *A. enteropelogenes*. A pesquisa dos genes de virulência (*atc*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp*) resultou em 19 perfis de virulência com distribuição heterogênea entre os isolados, 14% (11/76) apresentaram os perfis XIV, XV, XVI, XVII e XVIII com 4 genes de virulência e 8% (6/76) apresentaram o perfil XIX que contém todos os genes investigados. Oitenta e seis por cento (65/76) e 94% (71/76) dos isolados também apresentaram atividade enzimática hemolítica e proteolítica, respectivamente. Nossos resultados indicaram que as espécies de *Aeromonas* na lagoa Rodrigo de Freitas são diversas e possuem um considerável potencial de virulência. Assim, a adoção de abordagem molecular na sua identificação faz-se necessária não só para o tratamento de pacientes, mas também para estudos ambientais como, o rastreamento de fontes e a associação com perfis de virulência e resistência aos antibióticos. Além disso, estes dados nos permitem sugerir a necessidade de investigações epidemiológicas mais aprofundadas desses patógenos em ambientes aquáticos no Rio de Janeiro.

Palavras-chaves: *Aeromonas* spp., genes de virulência, análise filogenética, Lagoa Rodrigo de Freitas.

ABSTRACT

Aeromonas spp. are ubiquitous bacteria that have been receiving increasing attention as human pathogens due to their widespread occurrence in food, human infectious and aquatic environments. The objective of this study was to evaluate the taxonomic diversity of *Aeromonas* spp. and the distribution of virulence associated genes in the waters of the Rodrigo de Freitas lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. Out of the 87 isolates phenotypically identified as *Aeromonas* spp., 87% (76/87) were confirmed as belonging to this genus by PCR of the *rrs* gene of 16S rRNA. Phylogenetic analysis of *rpoB/gyrB* gene sequences revealed the presence of three main groups, group A (n = 42), group B (n = 12) and group C (n = 18). Isolates from the three groups showed 98% to 100% identity with reference sequences of *Aeromonas punctata / caviae*, *A. hydrofila* and *A. dahkensis*, respectively. Besides, one strain of *A. jandaei* and three of *A. enteropelogenes* were also identified. The virulence genes (*atc*, *aerA*, *hlyA*, *asp* and *amp*) resulted in 19 virulence profiles with heterogeneous distribution among the isolates, 14% (11/76) presented profiles XIV, XV, XVI, XVII and XVIII with 4 virulence genes and 8% (6/76) presented the XIX profile that contains all the genes investigated. Eighty-six percent (65/76) and 94% (71/76) of the isolates also presented hemolytic and proteolytic enzymatic activity, respectively. Our results indicated that the species of *Aeromonas* in the lagoon Rodrigo de Freitas are diverse and have a considerable virulence potential. Thus, the implementation of molecular approach in its identification is necessary not only for the patients treatments, but also for environmental studies such as the tracing of sources, association with virulence profiles and resistance to antibiotics. In addition, these data allow us to suggest the necessity of further epidemiological investigations of these pathogens in aquatic environments in Rio de Janeiro.

Keywords: *Aeromonas* spp., virulence genes, phylogenetic analysis, Rodrigo de Freitas Lagoon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fontes ambientais de *Aeromonas spp.*

Figura 2 - Localização dos pontos de coleta na lagoa Rodrigo de Freitas (22°57'22"S/43°11'09"W).

Figura 3 - Gel representativo da especificidade dos iniciadores específicos para o gênero *Aeromonas*.

Figura 4 - Gel representativo da certificação dos isolados.

Figura 5 - Gel representativo da detecção do gene *act* nos isolados.

Figura 6 - Gel representativo da detecção do gene *aerA* nos isolados.

Figura 7 - Gel representativo da detecção do gene *hlyA* nos isolados.

Figura 8 - Gel representativo da detecção do gene *asp* nos isolados.

Figura 9 - Gel representativo da detecção do gene *amp* nos isolados.

Figura 10 - Prevalência dos genes de virulência *act*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp* nos isolados de acordo com os pontos de coleta.

Figura 11: Prevalência dos perfis genotípicos nos isolados de acordo com os pontos de coleta.

Figura 12: Árvore filogenética de genes concatenados *gyrB-rpoB* (1008 pb) dos isolados de *Aeromonas spp.* da Lagoa Rodrigo de Freitas relacionada aos perfis genotípicos de virulência.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

16S rRNA - subunidade menor do ácido ribonucléico ribossomal

act - enterotoxina citotóxica

aerA – aerolisina

AIA - *Aeromonas Isolation Agar*

amp – metaloprotease

AN – ágar nutriente

ANA - Agência Nacional de Águas

asp – serina protease

APP - Área de Proteção Permanente

APA - Água Peptonada Alcalina

ATCC - *American Type Culture Collection*

BGN - Bacilos Gram-negativos

BLASTn – *Basic Local Alignment Search Tool*

°C - Graus Celsius

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNase - Desoxyribonuclease

dNTPs - Descarboxirribonucleotídios trifosfatados

OD - Oxigênio dissolvido

EDTA - Ácido Etilenodiamini tetra-Bromide

FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz

GEMS - *Global Environment Monitoring System*

GenBank – banco de dados de sequências

gyrB - subunidade β da DNA girase

hlyA - β - hemolisina

HWTS – *Household Water Treatment and Safe Storage*

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LRF – Lagoa Rodrigo de Freitas

MDDA - Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas

mg - miligrama

mL - mililitro

MLSA - *Multilocus Sequence Analysis*

mS/cm - MiliSiemens por minuto

ng - nanogramas

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb – pares de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia pela Polimerase)

PDTIS/FIOCRUZ - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol

recA – recombinase A

Rio-Águas - Subsecretaria de Águas Municipais

rpoB - subunidade β da RNA polimerase

rpoD - subunidade σ da RNA polimerase

SIM - Sulfato, Indol, Motilidade

SMAC - Secretaria Municipal de Meio-Ambiente

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris-borato EDTA

UNEP - *United Nations Environment Programme*

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

UNT – unidades nefelométricas de turbidez

V - Voltagem

μ l - Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores específicos para os genes de fatores de virulência (*act*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp*).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pontos de coleta.

Tabela 3 – Representação dos perfis de virulência dos isolados.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Qualidade da água e saúde pública	16
1.2 Lagoa Rodrigo de Freitas	18
1.3 <i>Aeromonas</i> spp.	19
1.4 Fatores de virulência em <i>Aeromonas</i> spp.	21
1.4.1 Fatores hemolíticos (<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> e <i>act</i>)	22
1.4.2 Fatores proteolíticos (<i>asp</i> e <i>amp</i>)	24
1.5 Infecções em humanos por <i>Aeromonas</i> spp.	25
1.6 Filogenia de <i>Aeromonas</i> spp.	26
2 RELEVÂNCIA PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA	28
3 OBJETIVO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Processamento das amostras	31
4.2 Identificação de <i>Aeromonas</i> spp.	32
4.3 Confirmação dos isolados	33
4.3.1 Identificação molecular do gênero <i>Aeromonas</i>	33
4.3.2 Identificação das espécies de <i>Aeromonas</i>	34
4.4 Atividade hemolítica e proteolítica	34
4.4.1 Atividade Hemolítica	34
4.4.2 Atividade proteolítica.....	35
4.5 Detecção dos genes de virulência pela PCR convencional	35
4.6 Sequenciamento dos genes <i>gyrB</i> e <i>rpoB</i>	36
4.7 Análise filogenética	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Parâmetros físico-químicos e microbiológicos	38
5.2 Identificação bioquímica	40
5.3 Especificidade dos iniciadores	40
5.4 Confirmação Molecular	41
5.5 Atividade Hemolítica e Proteolítica	41
5.5.1 Atividade Hemolítica	41
5.5.2 Atividade proteolítica.....	42
5.6 Detecção dos genes de virulência	42
5.6.1 Distribuição dos genes de virulência nos pontos de coleta.....	45
5.7 Perfis genotípicos de genes de virulência	45

5.7.1 Prevalência dos perfis genotípicos nos pontos de coleta	46
5.8 Análise filogenética	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES.....	54
8 REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Qualidade da água e saúde pública

A água é um elemento natural essencial à vida no planeta, um recurso limitado que possui papel significativo no desenvolvimento econômico e social de uma região. Suas condições para o consumo constituem atualmente uma das maiores preocupações mundiais e de acordo com a Política Nacional de Recursos Hídricos, é um bem de domínio público e, assim sendo, todos têm o direito ao seu uso (BRASIL, 1998).

O acesso à água potável é essencial para a boa saúde e é uma estratégia na redução da doença diarreica: atualmente, 1,3 milhão de crianças com menos de cinco anos morrem de diarreia todos os anos, sendo que um sexto dessas mortes ocorre na Índia (BLACK et al, 2010). Embora a Índia tenha realizado, recentemente, progressos substanciais na melhoria do abastecimento de água em todo o país, atualmente quase 90% da população rural não possui encanamento e o abastecimento de água potável no país é amplamente comprometido, devido a contaminação por resíduos humanos (BOISSON et al., 2013).

Uma estratégia internacionalmente conhecida como *Household Water Treatment and Safe Storage* (HWTS) que diz respeito ao tratamento e armazenamento seguro de águas por meio de fervura, cloração e filtração pelos moradores, tem sido recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) com objetivo de melhorar a qualidade da água distribuída (UNICEF/WHO, 2009). Revisões sistemáticas de intervenções de qualidade da água demonstram que o HWTS é eficaz na melhoria e na qualidade de água potável e na prevenção da diarreia (FEWTRELL et al., 2005; ARNOLD & COLFORD, 2007; CLASEN et al., 2006).

Durante séculos, as fontes de água foram consideradas inesgotáveis, mas devido ao crescimento da população mundial, ao desenvolvimento industrial e tecnológico, a urbanização e a expansão agrícola, a característica de autodepuração

das águas foi comprometida. Diversos fatores contribuem para a contaminação microbiológica de recursos hídricos, como por exemplo patógenos entéricos, incluindo *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., o vírus da hepatite A, verminoses e protozoários, entre outros, comprometendo a qualidade da água e a disponibilidade da mesma (SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006; BONFIM et al., 2007). A manutenção da qualidade microbiológica e da segurança de ecossistemas aquáticos é imperativa, uma vez que a contaminação desses sistemas representa um sério problema de saúde pública (BONJOCH, BALLESTÉ & BLACH, 2005).

Monitorar a qualidade da água é de extrema importância, não só para fins de consumo humano, mas também nos corpos d'água voltados para recreação, devido ao contato direto com pele e mucosas, e pelo alto risco de ingestão acidental. As águas destinadas a atividades recreativas apresentam o risco de serem poluídas por águas residuais ou dejetos de origem humana/animal, que podem carrear microrganismos patogênicos. Com isso, essas águas se tornam veículo de transmissão de doenças, gerando a necessidade de análises rotineiras para que haja determinação do grau de segurança da água, do ponto de vista microbiológico (MACÊDO, 2001; SOBRAL, 2015).

Em 1975, seguindo as instruções da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente, o *United Nations Environment Programme* (UNEP) entrou no campo do monitoramento ambiental, estabelecendo na sua sede em Nairóbi um Centro de Atividades de Programa para *Global Environment Monitoring System* (GEMS Water). Esse programa mantém uma rede global de monitoramento da qualidade da água com mais de 4 mil estações de pesquisa com objetivo de melhorar a capacidade de monitoramento e avaliação da qualidade da água nos países que a integram e determinam o estado da qualidade regional e global da água. Atualmente estão inseridos nesta rede cerca de 100 países, onde o Brasil é membro desde 2010 através de uma parceria da Agência Nacional de Águas (ANA) com o UNEP (UNEP GEMS/Water, 2010).

No Brasil, o monitoramento da qualidade das águas é regulado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), órgão brasileiro responsável pela deliberação e consulta de políticas nacionais de meio ambiente, criado em 1982, segundo a Lei 6.938/81, de 31 de agosto de 1981. Atualmente, de acordo com a Resolução do CONAMA nº 357/2005, os sistemas hídricos são classificados em 13 classes de acordo com o tipo e usos de suas águas e a qualidade das águas deve

atender a um conjunto de características mensuráveis de natureza química, física e biológica (CONAMA, 2005).

De acordo com o CONAMA, o grupo dos coliformes termotolerantes é adotado como padrão de qualidade microbiológica por pertencerem a um subgrupo de microrganismos que são exclusivamente do trato intestinal. A quantificação de coliformes termotolerantes determina a presença de contaminação fecal humana e indica o risco da presença de outros microrganismos patogênicos. Este grupo é representado por três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. No entanto, a *E. coli* é considerada o principal indicador da qualidade microbiológica da (EDBERG *et al.*, 2000). A sua presença em águas indica contaminação fecal, uma vez que uma série de patógenos podem ser veiculados através das fezes e isto requer ações imediatas no que se diz respeito ao controle de qualidade das águas nos seus mais diversos usos: consumo humano, recreação, irrigação, aquicultura e outros (WHO, 2005). A balneabilidade é estabelecida conforme a Resolução CONAMA Nº 274 de 29 de novembro de 2000, após 5 semanas de coletas e análises microbiológicas para coliformes termotolerante, *E. coli* e/ou *Enterococos*, nos dias e locais de maior afluência do público. Quando da utilização de mais de um indicador biológico as águas terão as suas condições avaliadas de acordo com o critério mais restritivo. As legislações canadenses e europeias também adotam os *Enterococos* e *E. coli* para avaliação da qualidade de águas de recreação (SILVA *et al.*, 2000).

1.2 Lagoa Rodrigo de Freitas

A Lagoa Rodrigo de Freitas está localizada no Estado do Rio de Janeiro na zona sul da cidade e representa uma das principais atrações turísticas do Rio de Janeiro (ALVES, 1998). O uso destas águas é indicado no Decreto nº 18.415/2000 que preconiza que o *uso destas águas deve ser destinado à proteção das comunidades aquáticas, à harmonia paisagística, à pesca artesanal e à recreação de contato secundário* (RIO DE JANEIRO, 2000). Além disso, a lagoa Rodrigo de Freitas foi um dos palcos de competições nas Olimpíadas de 2016, nas modalidades de remo e canoagem de velocidade.

As águas da bacia hidrográfica da Lagoa Rodrigo de Freitas são classificadas nas normas do CONAMA Nº 357/2005, como águas salobras de classe 2 (águas com salinidade superior a 0,5 e inferior a 30%). A bacia é formada pelos rios Macacos, Rainha e Cabeça, que desaguam através do canal do Piraquê na Lagoa. Além disso, há uma ligação com o mar oriunda do canal do Jardim de Alah, por onde suas águas são renovadas periodicamente (RIO-ÁGUAS, 2012). O canal, além de estreito, é constantemente obstruído, necessitando de frequentes dragagens para reestabelecer a entrada de água do mar. Por ser uma área de grande importância da cidade do Rio de Janeiro, a lagoa é regulamentada como uma Área de Proteção Permanente (APP) conforme o artigo 463 da Lei Orgânica do Município do Rio de Janeiro de 05 de abril de 1990, e o seu espelho d'água é tombado pelo Decreto Municipal Nº 9.396/1990 (RIO DE JANEIRO, 1990a; RIO DE JANEIRO, 1990b).

1.3 *Aeromonas* spp.

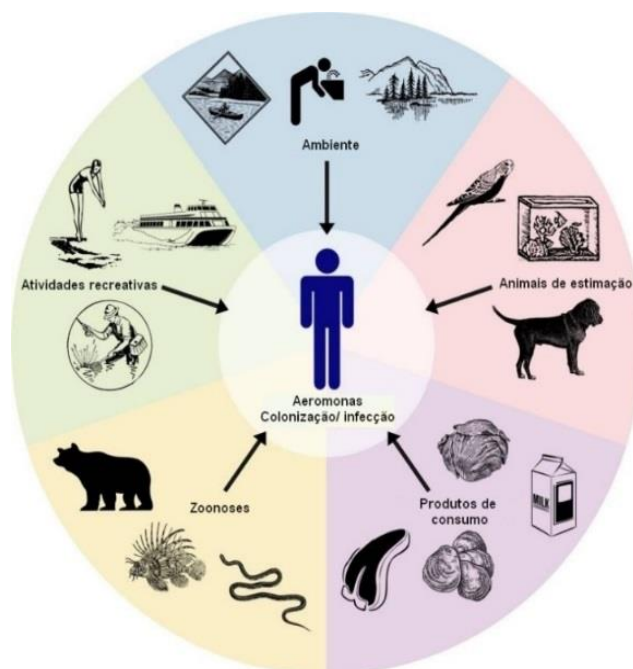
O gênero *Aeromonas* é composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos pertencentes à família Aeromonadaceae. Estes microrganismos são geralmente encapsulados e não esporulados que fermentam glicose com produção de ácido, com ou sem produção de gás. Inicialmente este gênero foi descrito na família Vibrionaceae, e a partir de análises filogenéticas, a família Aeromonadaceae foi criada. Nesta família estão alocados os gêneros *Aeromonas*, *Oceanimonas* e *Tolumonas* (JANDA & ABBOTT, 2010). O gênero *Aeromonas* compreende 31 espécies e 12 subespécies, dentre elas as principais são: *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. schubertii*, *A. veronii* e *A. jandaei* (Euzéby – LPSN, 2015). Entretanto, a identificação das espécies do gênero é complexa, já que novas espécies são cada vez mais frequentemente propostas (PUTHUCHEARY et al., 2012).

São consideradas bactérias oportunistas e manifestam-se em hospedeiros imunocomprometidos e/ou co-infectados por outros agentes etiológicos, sendo considerados invasores secundários, estabelecendo-se ao mesmo tempo em que outras infecções bacterianas, virais, parasitárias ou em decorrências de problemas nutricionais ou de estresse (SESHADRI et al., 2006; PAVANELLI et al., 2008;

IGBINOSA & OKOH, 2012). Estudos sobre a patogenicidade de *Aeromonas* spp. em humanos as associaram a uma diversidade de infecções, principalmente, gastroenterites (PEIXOTO et al., 2012; KÖRKOCA et al., 2014).

O gênero *Aeromonas* está presente em ambientes aquáticos e apresentam alta capacidade de adaptação a uma grande diversidade de condições destes ambientes, sendo observada sua presença em água doce, salobra e salgada, tanto de regiões tropicais como temperadas. Sua presença é mais frequente na superfície e no sedimento de águas de represas de abastecimentos, em rios e lagoas com diferentes graus de poluição e ambientes para fins recreativos e pesqueiros (BOMO et al., 2004; JANDA e ABBOTT, 2010). Além destes ambientes, esses microrganismos podem ser encontrados em solo, alimentos e animais, tais como anfíbios, répteis, aves, mamíferos e peixes (VON GRAEVENITZ, 2007; JANDA & ABBOTT, 2010). Considerando a distribuição ubiqüitária do gênero *Aeromonas*, são diversas as fontes que podem levar à infecção e colonização em animais ou seres humanos (Figura 1).

Figura 1 - Fontes ambientais de *Aeromonas* spp.



Fonte: Modificado de JANDA & ABBOTT (2010).

A exposição constante e interações entre *Aeromonas* spp. e seres humanos ocorre, principalmente, devido à vasta diversidade de ambientes que este gênero bacteriano habita (JANDA e ABBOTT, 2010). Estudos relatam o aumento da resistência à desinfecção destes microrganismos em biofilmes formados nos sistemas de água potável, além disso, há relatos que *Aeromonas* spp. foram a maior causa de infecções de pele e mucosa entre os sobreviventes do tsunami no sul da Tailândia (TOKAJIAN e HASHWA, 2004; HIRANSUTHIKUL et al. 2005).

Dados sugerem que este gênero bacteriano passou a integrar o grupo de patógenos emergentes, principalmente, pela sua prevalência cada vez mais frequente em infecções locais e sistêmicas de hospedeiros imunologicamente competentes (SCOGLIO et al., 2001; PALÚ et al., 2006; SESHADRI et al., 2006). No Brasil, a presença de *Aeromonas* spp. como causadora de doenças é pouco documentada, assim como relatos sobre a ocorrência de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos. Desta forma, são necessárias investigações mais aprofundadas para melhor esclarecimento dos riscos para a Saúde Pública (OLIVEIRA, 2011). Diante desta problemática, estudos com o propósito de compreender a dinâmica de *Aeromonas* spp. e fatores envolvidos em sua patogenicidade no ambiente aquático estão inseridos na esfera da vigilância sanitária, mais especificamente na vigilância ambiental em saúde.

1.4 Fatores de virulência em *Aeromonas* spp.

A virulência bacteriana é definida como a habilidade de provocar patologias nos organismos está diretamente relacionada à patogenicidade do microrganismo. Os fatores de virulência são relacionados a propriedades celulares (aderência, mobilidade e capacidade de invasão das células) e a propriedades extracelulares (secretam substâncias hemolíticas, proteolíticas, endotóxicas, enterotóxicas e citotóxicas) (JANDA & ABBOTT, 2010).

O gênero *Aeromonas* pode apresentar diversos fatores de virulência, como enterotoxinas, hemolisinas, proteases, lipases, adesinas, hidrolases, proteínas de membrana externa, camada S, flagelo e pili, desta forma, a infecção pode se apresentar complexa e multifatorial (RASMUSSEN-IVEY et al., 2016; IGBINOSA et

al., 2017). *Aeromonas* spp. mostraram-se presentes em amostras de fezes diarreicas e não-diarreicas de crianças com idade inferior a 5 anos, sem antibioticoterapia. Em 22% (20/92) das amostras diarreicas foram isoladas cinco espécies de *Aeromonas* spp. (*A. caviae*, *A. salmonicida* var. *salmonicida*, *A. salmonicida* var. *achromogenes*, *A. sobria*, e *A. hydrophila*). Já nas fezes não-diarreicas não foram obtidos isolados desse gênero (NOJIMOTO et al., 1997). Neste estudo apenas os isolados de *A. hydrophila* e *A. caviae* apresentavam atividade hemolítica. Em outro estudo, foi investigada a presença genes de virulência (n=11) e a relação clonal de 227 cepas de *Aeromonas* spp. de água e de origem clínica, isoladas em várias regiões no mundo. Os resultados mostraram que as espécies *A. hydrophila* e o grupo *A. veronii*-*A. sobria* apresentaram maior número de genes de virulência e maior atividade citotóxica e hemolítica quando comparados às outras espécies (KHAJANCHI et al. 2010).

1.4.1 Fatores hemolíticos (*aerA*, *hlyA* e *act*)

A atividade hemolítica de *Aeromonas* está relacionada prevalentemente a genes de virulência que expressem a produção de toxinas hemolíticas nesses microrganismos. A aerolisina codificada pelo gene *aerA* é um determinante importante de virulência que confere alta invasividade em células epiteliais e gastroenterite (KÖRKOCA et al., 2014, SOLTAN-DALLAL et al., 2016). Além da aerolisina, outros fatores de virulência, como os genes de β -hemolisina (*hlyA*) e a enterotoxina citotóxica (*act*) vêm ganhando destaque, devido ao aumento da incidência dos mesmo em cepas ambientais de *Aeromonas* spp. (SEN e RODGERS, 2004; KÖRKOCA et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2014).

A aerolisina foi descrita em 1974 como uma toxina termolábil que possui atividade hemolítica, enterotóxica e citotóxica, mostra-se o fator de virulência mais bem estudado e caracterizado e pertencente a uma classe de citotoxinas formadoras de poro, que rompem a membrana celular, causando a lise da célula. Apesar de ser também uma hemolisina, ela é produzida exclusivamente pelo gênero *Aeromonas*. É inicialmente secretada pelo microrganismo na forma de um precursor inativo

denominado proaerolisina, o qual se torna ativo quando ocorre a clivagem do peptídeo C-terminal (BERNHEIMER & AVIGAD, 1974; CHU & LU, 2005).

SANTOS et al. (1999) demonstrou que a presença deste gene relacionado a aerolisina, seria o responsável pela produção de uma enzima que promovia hemólise em eritrócitos ocorridas por cepas de *Aeromonas caviae*, *A. eucrenophila*, *A. jandaei* e *A. hydrophila*, isoladas de amostras de diversos peixes.

Adicionalmente, a hemolisina, *hlyA*, é comumente identificada no gênero *Aeromonas*. Este gene, porém, possui dois tipos de hemolisinas codificadas, a α -hemolisina que é produzida durante a fase estacionária bacteriana, e que causa um efeito citotóxico reversível, provocando a lise parcial de eritrócitos, e a β -hemolisina que é produzida na fase de crescimento bacteriano, causando a lise total e, conseqüentemente, a destruição completa dos eritrócitos (THELESTAM e LYUNGH, 1981; KIROV et al., 2000).

Portanto, a principal função conhecida da β -hemolisina, é produzir acúmulo de fluídos no intestino do hospedeiro e provocar a ativação de mediadores inflamatórios nos granulócitos favorecendo a indução de apoptose nas células hospedeiras (EPPLÉ et al., 2004). Esta hemolisina apresenta uma elevada identidade com sequências de aminoácidos em comparação com a hemolisina *hlyA* de *Vibrio cholerae*. Este gene está amplamente disseminado no gênero *Aeromonas* e é praticamente onipresente em *A. hydrophila* (NAHARRO et al., 2011)

HOEL et al., considerou em seu estudo que todos os isolados de *Aeromonas* spp. eram potencialmente patogênicos devido à alta prevalência do gene de *hlyA* que foi encontrado em 99% (117/118) de suas amostras, em conjunto com os genes *aerA*, *act* (enterotoxina citotóxica), *alt* (enterotoxina citotônica termo-lábil) e *ast* (enterotoxina citotônica termo-estável). Além disso, houve uma heterogeneidade na distribuição das toxinas *act/alt/hlyA/aerA* entre os isolados, e esta combinação foi detectada em 63% (53/118) das amostras.

A enterotoxina citotóxica codificada pelo gene *act*, é uma toxina hemolítica, citotóxica e enterotóxica responsável pela degeneração de vilosidades e criptas intestinais (TOMÁS, 2012). Esta toxina desempenha um papel importante na patogênese de *A. hydrophila* associada à aerolisina, onde também pode produzir poros na membrana celular e resultar na morte celular (SOLTAN-DALLAL et al., 2016).

KRÁLOVÁ et al. (2016), em sua pesquisa, sugere que a enterotoxina citotóxica pode causar influência na colonização e/ou infecção específica do sistema gastrointestinal. Neste estudo, a enterotoxina citotóxica foi encontrada em 50% (32/64) dos isolados de água e 35% (7/20) dos isolados clínicos analisados. Em todos os isolados clínicos que o gene do *act* foi encontrado através de infecções ativas ou colonizações assintomáticas do sistema gastrointestinal humano, não foi observada a ligação dessas cepas com outros tipos de infecções, como por exemplo, infecções de boca ou feridas.

A presença desses fatores determinantes de virulência hemolíticos pode ser indicativa de uma condição clínica relacionada à diarreia (IGBINOSA et al., 2017).

1.4.2 Fatores proteolíticos (*asp* e *amp*)

Dentre diversos fatores de virulência, as proteases extracelulares desempenham um importante papel inicial na invasão e no estabelecimento destes microrganismos em infecções (NITTA et al., 2007).

Estas enzimas atuam no rompimento de ligações peptídicas, ocasionando em alguns casos, alterações em funções fisiológicas do hospedeiro. Além disso, proteases produzidas por estas bactérias podem estar associadas à ativação de toxinas como anafilatoxina C5 e a aerolisina, outros grandes fatores de patogenicidade. Por outro lado, as proteases extracelulares também podem desempenhar papel fundamental no processo de utilização de proteínas como fontes de carbono e nitrogênio, garantindo uma sobrevivência saprofítica aos microrganismos em diferentes ambientes (ZACARIA et al., 2010).

Estudos indicam que as proteases extracelulares produzidas por este microrganismo desempenham um importante papel inicial na invasão e no estabelecimento destes microrganismos em infecções. A serina protease codificada pelo gene *asp*, produzida por espécies de *Aeromonas*, faz parte de uma subfamília de substâncias kexinas de serinas proteases que induz a destruição de proteínas estruturais e funcionais, além de também destruir proteínas essenciais para a defesa do hospedeiro (TAKAHASHI et al., 2014, KOBAYASHI et al., 2017).

Esta substância também é capaz de provocar a coagulação do plasma e a queda da pressão sanguínea do hospedeiro devido à liberação do líquido intravascular (NITTA et al., 2007). O gene *asp* é considerado um potente fator de virulência que participa na patogênese da infecção causando edema e choque séptico (IMAMURA et al., 2017).

As metaloproteases são enzimas com maior diversidade e caracterizam-se por necessitarem de um íon divalente metálico para sua plena atividade. Incluem enzimas de diversas origens como colagenases de organismos superiores, toxinas hemorrágicas e termolisinas bacterianas (SHANNON et al., 2007).

A metaloprotease AMP produzida por *A. hydrophila* codificada pelo gene *amp* está envolvida na degradação da elastina, uma proteína insolúvel constitutiva (TAKAHASHI et al., 2013). Dentre as proteases já caracterizadas, a elastase tem sido sugerida como um fator essencial de patogenicidade em *A. hydrophila*. Além da ação elastolítica, essa proteína apresenta uma ação hidrolítica para a caseína (TAKAHASHI et al. 2013; TAKAHASHI et al., 2014).

A análise da sequência desta proteína permitiu observar similaridade com metaloproteases produzidas por outros microrganismos, especialmente com a elastase de *Pseudomonas aeruginosa*, zinco-metaloprotease de *Helicobacter pylori*, e proteases de algumas espécies de *Vibrio*. (CASCÓN et al., 2000).

1.5 Infecções em humanos por *Aeromonas* spp.

O gênero *Aeromonas* apresenta um importante risco para a saúde pública, devido ao fato das infecções causadas por estes microrganismos geralmente serem adquiridas através do consumo de água e alimentos contaminados (SEN e RODGERS, 2004). O reconhecimento desses organismos como agentes causadores de infecções humanas vem aumentando durante os últimos anos, onde as principais doenças ocasionadas por *Aeromonas* spp. podem ser classificadas em dois grupos: septicemias e gastroenterite. Houve também um crescente número de relatos em estudos sobre infecções de feridas em pacientes imunocomprometidos, quadros de meningite, osteomielite e peritonite bacteriana espontânea (ALBERT et al., 2000; CHOI et al., 2008; PARKER e SHAW, 2011).

1.6 Filogenia de *Aeromonas* spp.

Diante da complexidade na identificação das espécies do gênero, estudos que utilizem estratégias polifásicas são indicados para obter resultados conclusivos quanto a determinação das espécies do gênero *Aeromonas* (JANDA & ABBOTT, 2010). O sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA é universalmente usado para entender as relações filogenéticas e realizar a identificação de espécies de microrganismos (NAGAR et al., 2013). No entanto, em estudo realizado por MARTINEZ-MURCIA et al. (1992), no sequenciamento do gene *rrs* de 20 cepas de *Aeromonas* spp. incluindo 10 espécies representadas pelas cepas tipo, foi possível concluir que este gene permitia apenas a diferenciação das cepas ao nível do gênero.

Estudos demonstraram que os genes *housekeeping* são melhores marcadores moleculares do que o gene 16S rRNA para o estudo das relações filogenéticas e taxonômicas a nível de espécie no gênero *Aeromonas* (BEAZ-HIDALGO et al., 2010; NAGAR et al., 2013). Os estudos taxonômicos baseados em genes *housekeeping* têm sido cada vez mais relatados, o que tem aumentado ainda mais as potencialidades do sequenciamento. Estes genes além de codificarem proteínas com funções nobres nas células apresentam uma característica que os permite ser utilizados para filogenia: são genes de cópia única no genoma; o fato de se tratarem de sequências que codificam proteínas, a porcentagem de substituição de nucleotídeos é superior à encontrada no gene 16S rRNA, o que o torna útil para o esclarecimento de relações filogenéticas mais próximas (MARTENS et al., 2008). Estudos mostraram que genes *housekeeping* como *gyrB*, *rpoD*, *rpoB* e *recA* são eficientes marcadores moleculares na inferência das relações taxonômicas no gênero *Aeromonas* (SOLER et al. 2004; KUPFER et al. 2006; SAAVEDRA et al., 2006).

Portanto, análises de sequenciamento baseadas no gene *gyrB*, responsável pela codificação da subunidade β da girase DNA, um tipo II de DNA topoisomerase e o gene *rpoB*, codificante de um dos fatores β que confere a especificidade ao promotor na iniciação da transcrição na RNA polimerase, demonstraram ser

eficientes na diferenciação entre as espécies e na identificação filogenética (PERSSON et al., 2015). Recentemente a análise de duas ou mais sequências concatenadas desses genes *housekeeping* pela técnica de Multilocus Sequence Analysis - MLSA, tem sido aplicada para investigação taxonômica do gênero (ALPERI et al., 2010, MARTÍNEZ-MURCIA et al., 2013).

2 RELEVÂNCIA PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A relação entre saúde e ambiente sempre fez parte da Saúde Pública do Brasil, principalmente, entre a poluição da água e saúde pública estimulando o aumento dos esforços no controle da poluição ambiental (SIEGENER & CHEN, 2002). Os critérios adotados para assegurar essa qualidade têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações a serem implementadas junto à população garantindo a manutenção dos ecossistemas aquáticos (D'AGUILA et al., 2000). Por muito tempo a problemática da qualidade da água foi deixada de lado, devido ao déficit na cobertura dos sistemas de abastecimento de água o que direcionou as políticas de saneamento para a implantação e a ampliação dos sistemas. Em função disso, as ações de controle e vigilância da qualidade da água foram colocadas em segundo plano. Os principais agentes biológicos detectados em águas contaminadas são as bactérias patogênicas, vírus e parasitas, encontrados, principalmente, em locais com más condições sanitárias.

A diarreia é a principal doença relacionada à ingestão, inalação ou penetração pela pele de água contaminada com agentes etiológicos. No Brasil, conforme dados do Sistema de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) da Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS/MS são detectadas, em média, anualmente, cerca de 1,5 milhões de casos de diarreias agudas (FUNASA, 2010). Estudos sugerem que espécies de *Aeromonas* spp. são as principais causadoras de gastroenterite no homem, sendo o ambiente aquático o principal reservatório para ambos os micro-organismos (MIRANDA & CASTILLO, 1998; MEDEIROS et al., 2001). Além disso, apresentam elevado potencial de virulência devido a fatores de virulência associados à presença de enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas, aerolisinas e proteases (WALLET et al., 2005). Entretanto, estudos sobre os fatores de virulência de *Aeromonas* spp. são realizados exclusivamente em cepas clínicas, enquanto poucos são direcionados às cepas ambientais.

O monitoramento sistemático da qualidade de água da lagoa Rodrigo de Freitas é realizado pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC), de acordo

com a Resolução CONAMA nº. 357/05. A lagoa Rodrigo de Freitas é considerada a mais urbanizada e sufocada do Rio de Janeiro, devido à baixa renovação de água, seu ecossistema é altamente eutrofizado, com a qualidade de suas águas afetada tanto por seu padrão de circulação quanto pela entrada de esgoto.

Desta forma, torna-se necessária a realização de estudos para o monitoramento de *Aeromonas* spp., e seu potencial patogênico nas águas da lagoa Rodrigo de Freitas. Os resultados obtidos neste estudo contribuirão para o melhor entendimento das propriedades patogênicas destas bactérias e o aprimoramento das ações da Vigilância Sanitária Ambiental no que se refere ao impacto do contato humano com estes microrganismos patogênicos em ambientes aquáticos, como a lagoa, destinados a atividades recreativas e a saúde pública.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Identificar as espécies e a relação filogenética de *Aeromonas* spp. isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas e caracterizar esses isolados em relação aos perfis de virulência.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Dosar parâmetros físico-químicos e microbiológicos das águas da Lagoa Rodrigo de Freitas;
- ✓ Identificar os isolados a nível de gênero *Aeromonas* por metodologia bioquímica e molecular;
- ✓ Determinar a atividade hemolítica e proteolítica dos isolados;
- ✓ Identificar as espécies de *Aeromonas* spp. pela análise de sequências concatenadas dos genes *gyrB* e *rpoB*;
- ✓ Detectar os genes de virulência hemolíticos e proteolíticos nos isolados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional;
- ✓ Correlacionar a identificação filogenética das espécies de *Aeromonas* spp. com os perfis de virulência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Processamento das amostras

Foram realizadas duas coletas anuais, sendo a primeira no dia 11 de março de 2015 e a segunda coleta no dia 08 de março de 2016, ambas durante o período chuvoso. Foram selecionados seis pontos de coleta na Lagoa Rodrigo de Freitas sendo estes os pontos de monitoramento em parceria com a Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC) onde LRF 1, 3 e 5 estão localizados próximos a Av. Borges de Medeiros em frente ao Jockey Club Brasileiro, LRF 2 está localizado entre a Av. Borges de Medeiros e a Av. Epitácio Pessoa e os pontos LRF 4 e 6 estão localizados próximos a Av. Epitácio Pessoa entre o Clube de Beisebol da Lagoa e a Ilha dos Caiçaras (Figura 2). Foram coletadas, em garrafas estéreis, amostras de água superficial a uma profundidade de aproximadamente 15 a 20 cm (5-10 L de cada ponto) em triplicata. As amostras foram refrigeradas até serem processadas no Setor de Bactérias e Archaeas de Referência onde foi realizada as dosagens de parâmetros abióticos com o equipamento Water Quality Checker U-10 (HORIBA) e microbiológicos através do método do substrato definido (Colilert, Idexx), segundo protocolo descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012) e o isolamento e caracterização de *Aeromonas* spp.

Figura 2 - Localização dos pontos de coleta na lagoa Rodrigo de Freitas (22°57'22"S/43°11'09"W).



Fonte: SMAC – Boletim de Gestão Ambiental do Sistema da Lagoa Rodrigo de Freitas.

4.2 Identificação de *Aeromonas* spp.

Ao chegarem ao laboratório às amostras foram concentradas por filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de sistema 0,22 µm (MILLIPORE). As membranas foram inoculadas em caldo Água Peptonada Alcalina (APA) e incubados a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação os caldos foram semeados em meio *Aeromonas Isolation Agar* (AIA) e incubados novamente a 37°C durante 24 horas. As colônias verdes com centros escurecidos em meio AIA, sugestivas de *Aeromonas* spp. foram semeadas em ágar nutriente (AN) e incubadas a 37°C durante 24 horas.

Coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais, de acordo com o Manual *Bergey's* (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005) foram realizadas para identificar os isolados. Bacilos Gram-negativos (BGN) foram inoculados em meio Sulfureto, Indol e Motilidade (SIM) e submetidos às provas bioquímicas para verificar a produção e das enzimas catalase, oxidase, urease, DNase e gelatinase, e a utilização dos carboidratos, lactose e glicose. Todos os isolados de *Aeromonas* spp.

foram preservados por criopreservação e liofilização, e depositados na Coleção de Microrganismos de Pesquisa do INCQS/FIOCRUZ.

4.3 Confirmação dos isolados

4.3.1 Identificação molecular do gênero *Aeromonas*

A especificidade dos iniciadores do gene *rrs* do 16S rRNA do gênero *Aeromonas* (aer16S-F: 5'-CTACTTTTGCCGGCGAGCGG-3' e aer16S-R: 5'-TGATTCCCGAAGGCACTCCC-3') (LEE et al., 2002) que resulta na amplificação de um fragmento de 954 pb, foi avaliada frente ao DNA genômico das cepas de referência de *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966, *Aeromonas sobria* INCQS 00291/ATCC 43979, *Aeromonas schubertii* INCQS 00293/ATCC 43700, *Aeromonas caviae* INCQS 00294/ATCC 15468, *Aeromonas veronii* INCQS 00295/ATCC 35624, *Vibrio parahaemolyticus* INCQS 00081/ATCC 17802 e *Vibrio vulnificus* INCQS 00630/ATCC 27562.

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando o protocolo para organismos Gram-negativos do kit Dnaeasy® Blood&Tissuet (Qiagen GmgH, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura da PCR foi composta de 1X PCR MasterMix (PROMEGA CORPORATION); 15 pmol de cada iniciador; aproximadamente 10 ng de DNA molde e água Gibco® completando o volume. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler® EP (Eppendorf) e o programa constituíram-se de 95°C por 5 minutos; 30 ciclos à 95°C por 1 minuto, 57°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; e 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado em gel de eletroforese por 1 hora a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X e corado com GelRed™ (BIOTIUM). O gel foi fotografado e analisado utilizando o digitalizador de imagens ImageQuant 300 (GE). Os fragmentos de seis isolados, selecionados aleatoriamente foram sequenciados e analisados no software BLASTn do GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI) para confirmar a identidade com sequências depositadas no banco de dados.

4.3.2 Identificação das espécies de *Aeromonas*

Os isolados, previamente confirmados pela PCR do gene *rrs* do 16S rRNA como pertencentes ao gênero *Aeromonas* foram submetidos à PCR dos genes *gyrB* (*gyrB*-F2: 5'-GAGGACTACAGCAAGAAGGCCA-3' e *gyrB*-R2: 5'-GACTTGGCCTTCTTGCTGTAGTC-3') e *rpoB* (*rpoB*-F2: 5'-CAACTTCGTCGGTGATCACA-3' e *rpoB*-R2: 5'-TGTGATCACCGACGAAGTGG-3') descritos por PERSSON e colaboradores (2015) para identificação das espécies desse gênero, que resulta na amplificação em fragmentos de 650 pb e 560 pb, respectivamente. A mistura da PCR foi composta de 1X PCR MasterMix (PROMEGA CORPORATION); 15 pmol de cada iniciador; aproximadamente 10 ng de DNA molde e água Gibco® completando o volume. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler® EP (Eppendorf) e os programas constituíram-se de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos à 94°C por 40 segundos, 67°C e 65°C por 50 segundos, respectivamente, e 72°C por 40 segundos; e 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado em gel de eletroforese por 1 hora a 50V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X e corado com GelRed™ (BIOTIUM). O gel foi fotografado e analisado utilizando o digitalizador de imagens ImageQuant 300 (GE).

4.4 Atividade hemolítica e proteolítica

4.4.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada segundo o protocolo descrito por TAKAHASHI e colaboradores (2014), os isolados foram cultivados em caldo nutriente em 37°C durante 24 horas e 2 µl destas culturas foram aplicadas em placas de ágar nutriente contendo 5% de sangue de ovino. Após incubação a 37°C durante

48 horas a formação de halos de α -hemólise ou β -hemólise ao redor das culturas bacterianas indica a ação de atividade hemolítica.

4.4.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada segundo o protocolo descrito por TAKAHASHI e colaboradores (2014), os isolados foram cultivados em caldo nutriente em 37°C durante 24 horas e 2 μ l destas culturas foram aplicadas em placas de ágar nutriente contendo 1% de skin milk. Após incubação a 37°C durante 48 horas a formação de halos ao redor das culturas bacterianas indica a ação de atividade proteolítica em caseína.

4.5 Detecção dos genes de virulência pela PCR convencional

A mistura para a reação da PCR teve o volume final de 25 μ l contendo 1X de PCR Master Mix (PROMEGA); 15 pmol de cada iniciador (Tabela 1); aproximadamente 10 ng de DNA molde e água Gibco® completando o volume. As condições de ciclo consistem de um passo inicial de 95°C durante 5 min, e 30 ciclos de amplificação a 95°C durante 30 segundos, temperatura de anelamento adequado (Tabela 1) durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, e um alongamento final a 72°C durante 1 minuto. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler EP (EPPENDORF). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de eletroforese 1,5% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE) corado com GelRed™ (BIOTIUM). O primeiro poço foi reservado para a adição do padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, INVITROGEN). A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante.

O DNA da cepa de referência de *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 foi empregado como controle positivo nas reações. Como controle negativo, foi

utilizada a cepa de referência de *Vibrio parahaemolyticus* INCQS 00081/ATCC 17802. Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água deionizada estéril (Gibco®) para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura de PCR.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores específicos para os genes de fatores de virulência (*act*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp*).

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene Alvo	Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
act-F	AGAAGGTGACCACCAAGAACA	<i>act</i>	55	232	Khor et al., 2015
act-R	AACTGACATCGGCCTTGAAGTC				
aer-F	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG	<i>aerA</i>	55	600	Körkoca et al., 2014
aer-R	CCAGTTCCAGTCCCACCACT				
hlyA-F	GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG	<i>hlyA</i>	62	597	Igbinosa & Okoh, 2013
hlyA-R	GGCGGCGCCGGACGAGACGGG				
AP-165	CCCTCCAACAGCAACTTCTGGAACCTGGTG	<i>asp</i>	58	322	Takahashi et al., 2014
AP-166	TCCGGGTAGGCGGACATCAGCAGCGCCAT G				
ASMP-03	AGGACGCCACCGGCCCGGGGGGCAA	<i>amp</i>	60	550	Takahashi et al., 2014
ASMP-04	GACCAGCCAGTCGTTGCTCCCCTT				

Fonte: Do autor, 2017.

4.6 Sequenciamento dos genes *gyrB* e *rpoB*

Os produtos purificados dos genes *gyrB* e *rpoB*, foram submetidos ao sequenciamento com objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos amplificados. Em cada poço foi adicionado 3,2 pmol dos respectivos iniciadores (Tabela 1) e cerca de 200 ng dos produtos foram distribuídos em placa de 96 poços MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate (APPLIED BIOSYSTEMS). A placa foi submetida a uma reação de amplificação em termociclador Mastercycler EP

(EPPENDORF), nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações de sequenciamento foram realizadas usando o kit *Big Dye Terminator* por eletroforese capilar em aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ). As sequências com “Phred score” maior ou igual a 20 foram consideradas boas e incluídas nas análises subsequentes.

Os cromatogramas obtidos foram convertidos para o formato “fasta” através do software Sequencher 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Harbor, MI). A análise de similaridade das sequências realizada pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (National Center for Biotechnology Information-NCBI).

4.7 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos dos genes *gyrB* e *rpoB* foram concatenadas em um fragmento único de 1008 pb e alinhadas pelo ClustalW integrado no software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). As estimativas da divergência evolutiva e os agrupamentos foram obtidos usando o método Kimura-2 e as árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo de *neighbor-joining*, disponível no programa MEGA 7. A estabilidade das relações e a significância das ramificações das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando *Bootstrapping* com 1000 repetições.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Na primeira coleta, os valores de pH variaram entre em 7,36 e 7,65 entre os pontos LRF 5 e LRF 3, respectivamente. A turbidez apresentou maior elevação no ponto LRF 1 e menor no ponto LRF 6, variando entre 17 e 6 UNT. Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) variaram entre 4,41 e 5,21 mg/L, e todos apresentaram-se dentro do recomendado pelo CONAMA. A temperatura manteve-se entre 21,5 °C e 27,4 °C entre os pontos LRF 6 e LRF 1, respectivamente. A condutividade apresentou pouca variação entre os pontos, 21,8 mS/cm no ponto LRF 1 e 20,7 mS/cm no ponto LRF 6, assim como a salinidade que apresentou valores entre 1,32% no ponto LRF 1 e 1,26% no ponto LRF 6. A contagem dos coliformes e *E. coli* apresentou valores acima dos limites preconizados pelo CONAMA, onde é permitido o máximo de 2500 NMP/100 mL (Tabela 2).

Já na segunda coleta, os valores de pH variaram entre 7,5 nos pontos LRF 4 e 5, e 8,2 no ponto LRF 6. A turbidez apresentou maior elevação no ponto LRF 1 e menor no ponto LRF 6, variando entre 13 e 3 UNT. Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) variaram entre 4,6 e 6,7 mg/L, e todos apresentaram-se dentro do recomendado pelo CONAMA. A temperatura manteve-se entre 22,7 °C e 24,5 °C entre os pontos LRF 6 e LRF 2, respectivamente. A condutividade apresentou pouca variação entre os pontos, 15,8 mS/cm no ponto LRF 2 e 15,3 mS/cm no ponto LRF 6, assim como a salinidade que apresentou valores de 0,9% em todos os pontos. A contagem dos coliformes e *E. coli* apresentou valores acima dos limites preconizados pelo CONAMA, onde o máximo permitido de 2500 NMP/100 mL (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pontos de coleta.

Parâmetros	Padrão CONAMA 357/05 classe II águas salobras	LRF 1		LRF 2		LRF 3		LRF 4		LRF 5		LRF 6	
		Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
pH	6,5 a 8,5	7,6	7,8	7,5	8	7,65	8	7,43	7,5	7,36	7,5	7,36	8,2
Temperatura (°C)	-	27,4	23,4	27,2	24,5	27,1	23,3	27,1	23,3	23,7	23,3	21,5	22,7
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	>4,0	4,77	4,7	4,75	6,7	5,21	5,2	4,52	4,6	4,41	4,9	4,7	5
Condutividade (mS/cm)	-	21,8	15,4	21,2	15,8	21,2	15,4	21,4	15,4	21,3	15,5	20,7	15,3
Turbidez (UNT ^a)	-	17	13	11	4	12	6	8	8	8	4	6	3
Salinidade (%)	≥0,5 a 30	1,32	0,9	1,27	0,9	1,27	0,9	1,28	0,9	1,28	0,9	1,26	0,9
Coliformes Totais (NMP/100 mL) ^b	2500	6867	10112	24196	10112	7915	10112	19863	10112	10112	10112	11199	9606
<i>E. coli</i> (NMP/100 mL) ^b	2500	4106	10112	5794	10112	3725	10112	24196	10112	7215	10112	8664	9606

Legenda:^a Unidades Nefelométricas de Turbidez;^b Número Mais Provável.**Fonte:** Do autor, 2017.

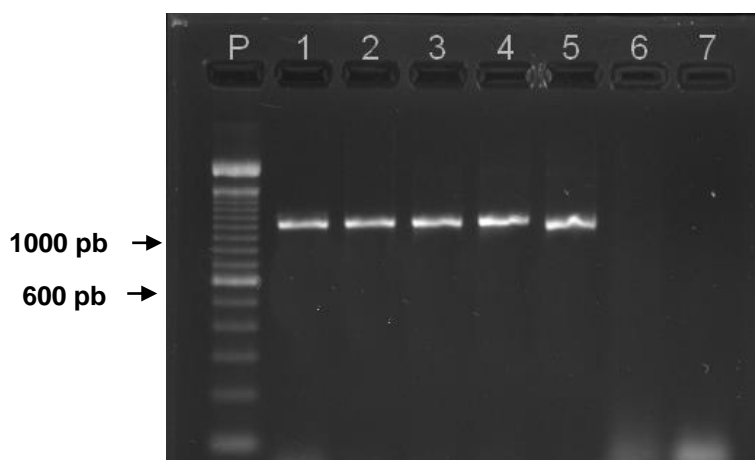
5.2 Identificação bioquímica

O total de isolados obtidos nas duas coletas que apresentaram crescimento característico do gênero *Aeromonas* nos meios AIA foi de 154. Após a coloração de Gram, 138 isolados se apresentaram como BGN. Posteriormente, na identificação bioquímica 63% (87/138) dos isolados foram considerados presuntivos de *Aeromonas* spp. e seguiram para a confirmação molecular.

5.3 Especificidade dos iniciadores

Os iniciadores do gene *rrs* do 16S rRNA para confirmação do gênero *Aeromonas* spp., apresentaram um único fragmento de aproximadamente 954pb após amplificação do gDNA das cepas de referência de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii*. As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* não apresentaram fragmentos visíveis confirmando a especificidade dos iniciadores (Figura 3).

Figura 3: Gel representativo da especificidade dos iniciadores específicos para o gênero *Aeromonas*.



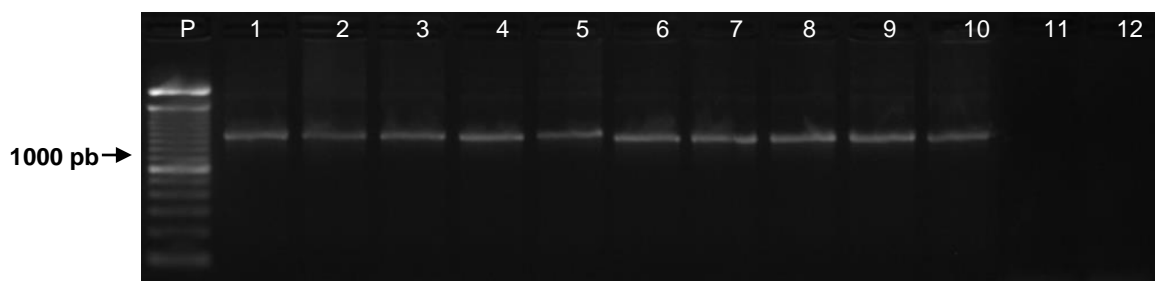
Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966; Linha (2) *Aeromonas sobria* INCQS 00291/ATCC 43979; Linha (3) *Aeromonas schubertii* INCQS 00293/ATCC 43700; Linha (4) *Aeromonas caviae* INCQS 00294/ATCC 15468; Linha (5) *Aeromonas veronii* INCQS 00295/ATCC 35624; Linha (6) *Vibrio parahaemolyticus* INCQS 00081/ATCC 17802; Linha (7) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

5.4 Confirmação molecular

Setenta e seis dos 87 isolados analisados apresentaram um único fragmento de aproximadamente 954 pb (Figura 4), compatível com o fragmento detectado na cepa de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 utilizada como controle positivo da reação. Os produtos da PCR dos seis isolados selecionados apresentaram 98-99% de identidade com sequências de *Aeromonas* spp.

Figura 4: Gel representativo da Certificação dos isolados.



Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); **Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966**; Linha (2) P4750; Linha (3) P4751; Linha (4) P4752; Linha (5) P4553; Linha (6) P4754; (7) P4755; Linha (8) P4756; Linha (9) P4757; Linha (10) P4758; Linha (11) *Vibrio parahaemolyticus* INCQS 00081/ATCC 17802; Linha (12) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

5.5 Atividade hemolítica e proteolítica

5.5.1 Atividade hemolítica

Após o período de incubação, foi observada a formação de halo ao redor de 86% (65/76) dos isolados. As cepas de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 e *Escherichia coli* INCQS 00033 INCQS 00033/ATCC 25.922, foram utilizadas como controles positivos e negativos, respectivamente. A cepa *A. hydrophila* apresentou crescimento e formação de halos.

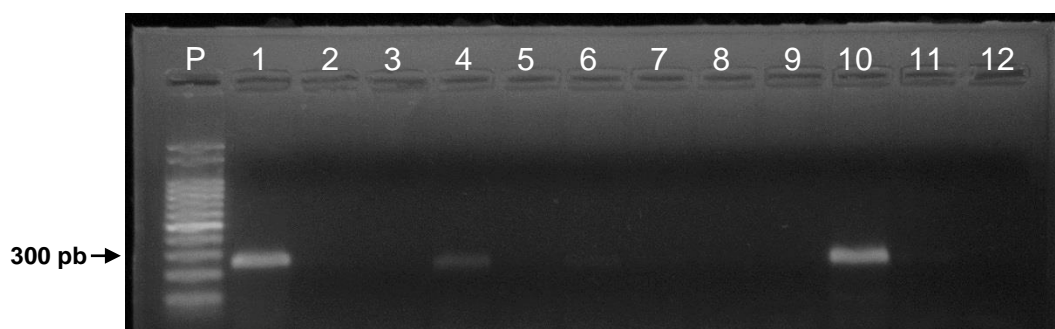
5.5.2 Atividade proteolítica

Após o período de incubação a 37°C durante 24 horas, foi observada a formação halos ao redor de 94% (71/76) dos isolados. As cepas de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 e *Escherichia coli* INCQS 00033/ATCC 25.922, foram utilizadas como controles positivos e negativos, respectivamente. A cepa *A. hydrophila* apresentou crescimento e formação de halos.

5.6 Detecção dos genes de virulência

O DNA dos isolados confirmados como *Aeromonas* spp. foi submetido a reações de amplificação com iniciadores específicos para os genes *act*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp*. Entre os setenta e seis isolados, 54% (41/76) apresentaram um único fragmento de aproximadamente 232 pb do gene *act* (Figura 5), compatível com o fragmento detectado na cepa de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 utilizada como controle positivo da reação.

Figura 5: Gel representativo da detecção do gene *act* nos isolados.

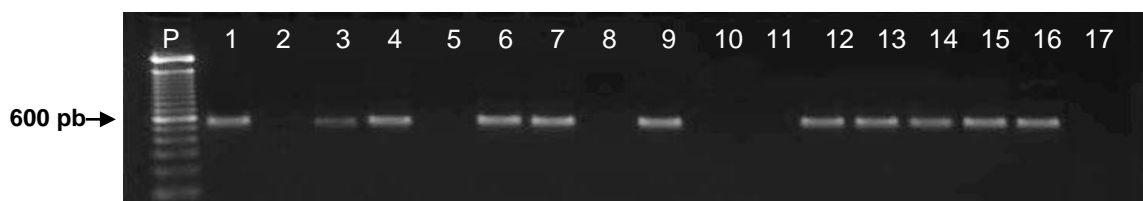


Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); **Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966**; Linha (2) P5739; Linha (3) P5740; Linha (4) P5741; Linha (5) P5742; Linha (6) P5743; (7) P5744; Linha (8) P5745; Linha (9) P5746; Linha (10) P5747; Linha (11) P5748; Linha (12) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

A amplificação do gene *aerA* apresentou um único fragmento de aproximadamente 600 pb (Figura 6) em vinte e sete (35%) dos setenta e seis isolados analisados, compatível com o fragmento detectado na cepa de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 utilizada como controle positivo da reação.

Figura 6: Gel representativo da detecção do gene *aerA* nos isolados.

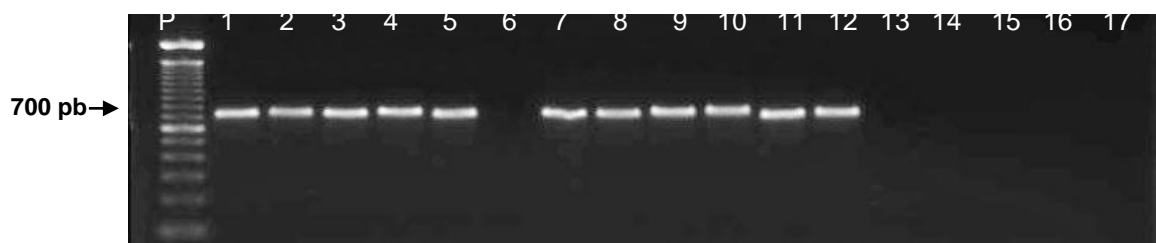


Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); **Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966**; Linha (2) P4750; Linha (3) P4751; Linha (4) P4752; Linha (5) P4553; Linha (6) P4754; (7) P4755; Linha (8) P4756; Linha (9) P4757; Linha (10) P4758; Linha (11) P4759; Linha (12) P4760; Linha (13) P4761; Linha (14) P4762; Linha (15) P4763; Linha (16) P4764; Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); Linha (17) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

O gene *hlyA* foi detectado em dezenove isolados (25%) dos setenta e seis analisados, apresentando um único fragmento de aproximadamente 700 pb (Figura 7), compatível com o fragmento detectado na cepa de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 utilizada como controle positivo da reação.

Figura 7: Gel representativo da detecção do gene *hlyA* nos isolados.

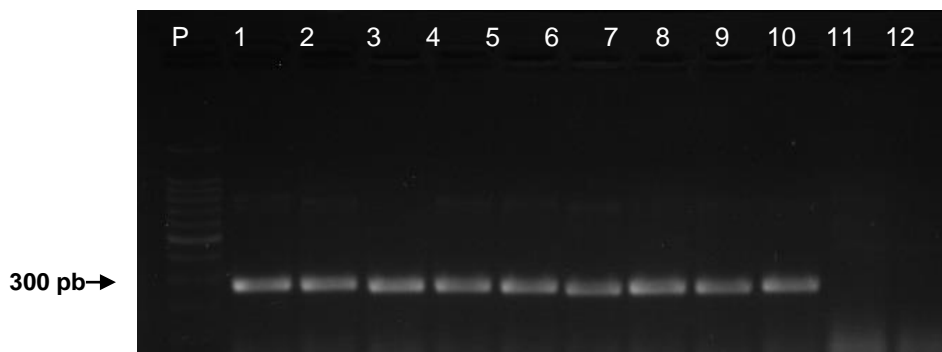


Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); **Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966**; Linha (2) P4750; Linha (3) P4751; Linha (4) P4752; Linha (5) P4553; Linha (6) P4754; (7) P4755; Linha (8) P4756; Linha (9) P4757; Linha (10) P4758; Linha (11) P4759; Linha (12) P4760; Linha (13) P4761; Linha (14) P4762; Linha (15) P4763; Linha (16) P4764; Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); Linha (17) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

Vinte e cinco isolados (35%) dos setenta e seis analisados, apresentaram um único fragmento de aproximadamente 322 pb do gene *asp* (Figura 8), compatível com o fragmento detectado na cepa de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 utilizada como controle positivo da reação.

Figura 8: Gel representativo da detecção do gene *asp* nos isolados.

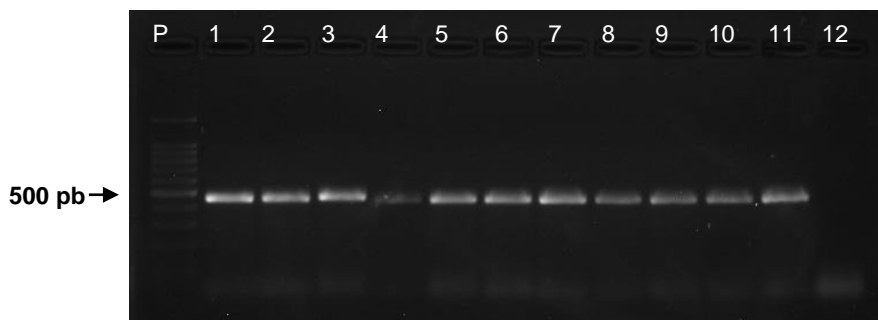


Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); **Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966**; Linha (2) P4750; Linha (3) P4751; Linha (4) P4752; Linha (5) P4553; Linha (6) P4754; (7) P4755; Linha (8) P4756; Linha (9) P4757; Linha (10) P4758; Linha (11) P4759; Linha (12) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

Sessenta e dois isolados (82%) dos setenta e seis analisados, apresentaram um único fragmento de aproximadamente 500 pb do gene *amp* (Figura 9), compatível com o fragmento detectado na cepa de referência *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966 utilizada como controle positivo da reação.

Figura 9: Gel representativo da detecção do gene *amp* nos isolados.



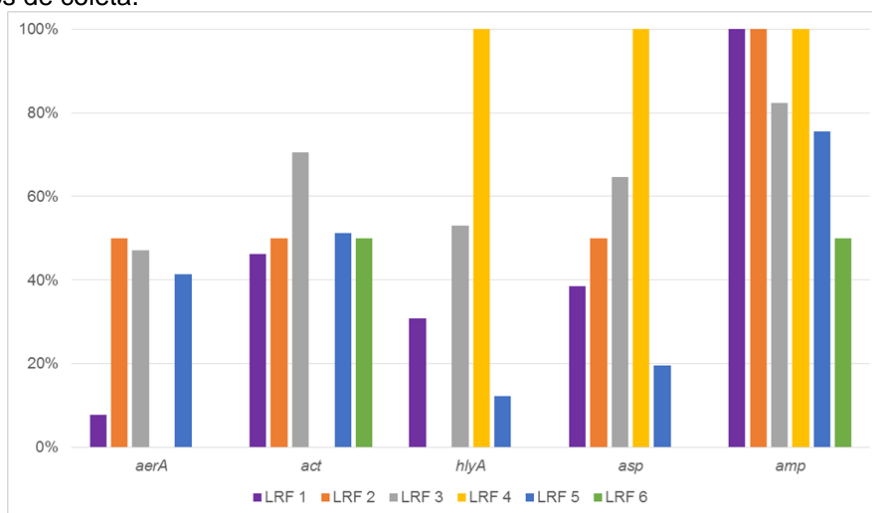
Legenda: Linha (P) Peso molecular (100bp Invitrogen); **Linha (1) *Aeromonas hydrophila* INCQS 00289/ATCC 7966**; Linha (2) P4750; Linha (3) P4751; Linha (4) P4752; Linha (5) P4553; Linha (6) P4754; (7) P4755; Linha (8) P4756; Linha (9) P4757; Linha (10) P4758; Linha (11) P4759; Linha (12) Água Gibco®.

Fonte: Do autor, 2017.

5.6.1 Distribuição dos genes de virulência nos pontos de coleta

O gene de virulência *amp* mostrou-se disseminado em isolados de todos os seis pontos de coleta. Em seguida, os genes *act* e *asp* mostraram-se presentes em isolados de cinco pontos da lagoa. E por fim, os genes *aerA* e *hlyA*, foram detectados em quatro pontos de coleta (Figura 10).

Figura 10: Prevalência dos genes de virulência *act*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp* nos isolados de acordo com os pontos de coleta.



Fonte: Do autor, 2017.

5.7 Perfis genotípicos de genes de virulência

Com base nos resultados obtidos, foi possível realizar perfis genotípicos de acordo com a presença e ausência de hemolíticos e proteolíticos. Os genes de virulências estudados (*atc*, *aerA*, *hlyA*, *asp* e *amp*) apresentaram dezenove perfis distintos. O perfil IV apresentou a maior taxa de ocorrência de 25% (19/76), onde os isolados investigados apresentavam apenas o gene proteolítico *amp*. Já o perfil IX, que apresentou 17% (13/76) dos isolados apresentando os genes *act* de hemólise e *amp* de proteólise. Oito por cento dos isolados apresentaram o perfil XIX que contém todos os genes investigados (Tabela 3).

Tabela 3 – Representação dos perfis de virulência dos isolados.

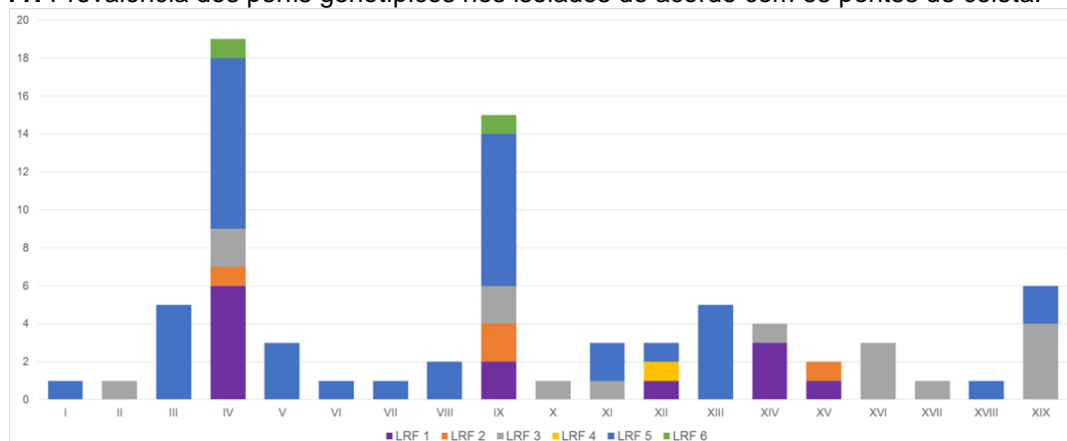
Perfil	Genótipos	Número de isolados / %
I	Nenhum gene	1 (1%)
II	<i>act</i>	1 (1%)
III	<i>aerA</i>	5 (7%)
IV	<i>amp</i>	19 (25%)
V	<i>act/aerA</i>	3 (4%)
VI	<i>aerA/amp</i>	1 (1%)
VII	<i>hlyA/amp</i>	1 (1%)
VIII	<i>asp/amp</i>	2 (3%)
IX	<i>act/amp</i>	13 (17%)
X	<i>act/asp</i>	2 (3%)
XI	<i>act/asp/amp</i>	3 (4%)
XII	<i>hlyA/asp/amp</i>	3 (4%)
XIII	<i>aerA/act/amp</i>	5 (7%)
XIV	<i>hlyA/act/asp/amp</i>	4 (5%)
XV	<i>aerA/act/asp/amp</i>	2 (3%)
XVI	<i>aerA/hlyA/asp/amp</i>	3 (4%)
XVII	<i>aerA/hlyA/act/amp</i>	1 (1%)
XVIII	<i>aerA/hlyA/act/asp</i>	1 (1%)
XIX	<i>aerA/hlyA/act/asp/amp</i>	6 (8%)
Total		76

Fonte: Do autor, 2017.

5.7.1 Prevalência dos perfis genotípicos nos pontos de coleta

O ponto LRF 5 contendo o maior número de isolados (n=41) apresentou 13 perfis de virulência com alta heterogeneidade entre eles. Os isolados do ponto LRF 3 também apresentaram diversidade nos 9 perfis encontrados. Os isolados dos pontos LRF 1 foram reunidos em 5 perfis de virulência distintos e o LRF 2 com 3 perfis. Já os isolados dos pontos LRF 6 e LRF 4, apresentaram 2 e 1 perfis de virulência, respectivamente (Figura 11).

Figura 11: Prevalência dos perfis genotípicos nos isolados de acordo com os pontos de coleta.

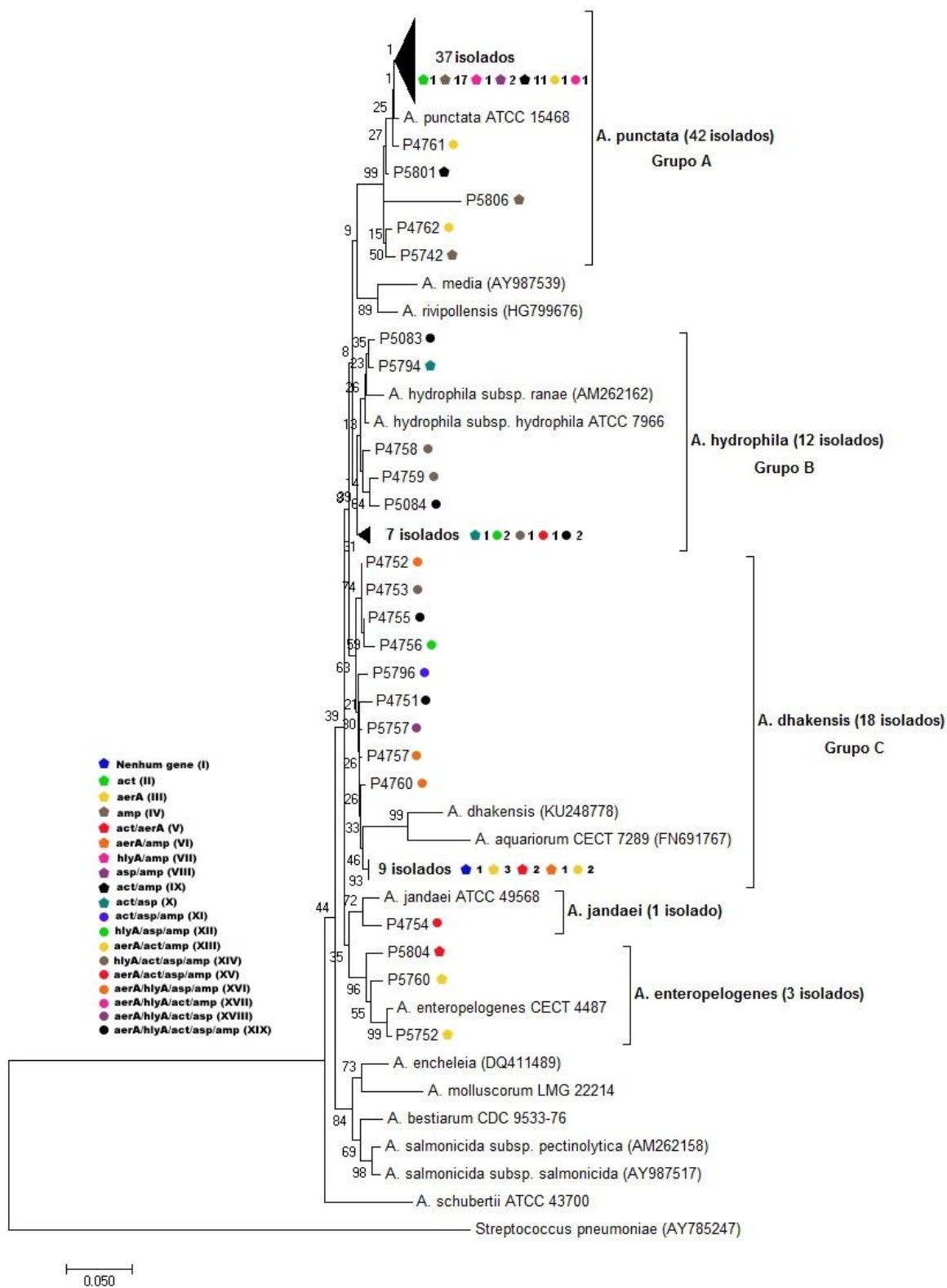


Fonte: Do autor, 2017.

5.8 Análise filogenética

As sequências dos genes *gyrB* e *rpoB* apresentaram 98-99% de identidade com sequências de *Aeromonas* spp. do banco dados. Em seguida, o posicionamento filogenético das sequências concatenadas dos genes *gyrB* e *rpoB* e sua relação com as 16 cepas de referência do gênero *Aeromonas* foi determinada pela construção de uma árvore filogenética (Figura 10). A análise das sequências resultou na formação de três grandes grupos (A, B e C). No grupo A, foram alocados 37 dos 76 isolados que agruparam com a sequência de referência *A. punctata*, além de outros 5 isolados considerados da mesma espécie, totalizando 42 isolados (55%). No grupo B, 7 isolados de *Aeromonas* spp. agruparam com a espécie *A. hydrophila*, junto de outros 5 isolados, resultando em 12 (16%) isolados desta espécie. O grupo C, composto por 9 isolados agrupou com as sequências de referência de *A. dhakensis*/*A. aquariorum*, além de outros 9 isolados, totalizando 18 isolados da espécie *A. dhakensis*. O isolado P4754 agrupou com a espécie *A. jandaei* (n=1) e os isolados P5752, P5760 e P5804 agruparam com a espécie *A. enteropelogenes* (n=3).

Figura 12: Árvore filogenética de genes concatenados *gyrB-rpoB* (1008 pb) dos isolados de *Aeromonas* spp. da Lagoa Rodrigo de Freitas relacionada aos perfis genotípicos de virulência.



Legenda: Sequências de referência retiradas do banco de dados GenBank estão indicadas com o número de acesso. A topologia da árvore baseia-se na análise de *Neighbor-joining* e o bootstrap foi calculado com 1000 repetições.

Fonte: Do autor, 2017.

6 DISCUSSÃO

A água além de ser um dos recursos naturais mais importantes do planeta, é o elemento principal para todas as formas de vida conhecidas. Sendo assim, o controle de qualidade microbiológica da água deve ir além das águas destinadas ao consumo humano, como por exemplo aquelas voltadas para a pesca, agricultura e recreação.

Durante décadas a lagoa Rodrigo de Freitas vem sofrendo com diversos impactos ambientais (CRESPO & LA ROVERE, 2002a, CRESPO & LA ROVERE, 2002b). Vários rios e riachos deságuam na lagoa e, no período de chuvas, esses rios recebem matéria orgânica que é transportada para suas águas. Além disso, vários outros impactos negativos prejudicam a qualidade das águas da lagoa, e com isso comprometem a qualidade de pescados e a saúde dos pescadores e dos desportistas. (SCOTT et al., 2002; BONJOCH, BALLESTÉ & BLANCH, 2005; BALLESTÉ et al., 2010).

Os riscos à saúde ambiental e da população gerados pela presença de patógenos oportunistas carreadores de fatores de virulência, como as *Aeromonas* spp. muito provavelmente não se limitam somente à lagoa Rodrigo de Freitas, uma vez que há constante troca de água entre a lagoa e a praia de Ipanema através do canal do Jardim de Alah. A praia do Leblon também recebe água proveniente da bacia da lagoa através do canal do Leblon, o que pode contribuir para a disseminação desse patógeno.

No presente estudo, os parâmetros físicos e químicos analisados apresentaram algumas pequenas variações de temperatura, pH, OD e condutividade (Tabela 2). Pequenas variações nesses parâmetros não alteram o crescimento de *Aeromonas* spp, pois apesar da temperatura ótima de crescimento ser em torno de 28°C, eles são capazes de se multiplicar em temperaturas mais extremas entre 5°C e 41°C (POPOFF, 1984). Outro dado relevante é a presença de crescimento desse microrganismo em pH 5,5 a 9,0, de acordo com a temperatura de incubação (KHARDORI & FAINSTEIN, 1988). Espécies desse gênero são geralmente sensíveis a pH abaixo de 6, embora isolados de alimentos apresentaram um aumento na tolerância de pH baixos (HWANG, 2010).

Estudos observaram que a contagem de *Aeromonas* spp. foi maior no período com a temperatura da água mais elevada, onde a contagem máxima obtida foi de $4,0 \times 10^5$ UFC/g (grama) em amostras do sedimento (SEIDLER et al. 1980; PATHAK et al. 1988).

Embora, neste estudo a turbidez tenha apresentado índices seis vezes superiores em diferentes pontos de coleta, essa variação não interferiu no isolamento de *Aeromonas* spp. entre os pontos de coleta LRF1 e LRF6. Vale ressaltar, que o ponto de coleta LRF 3 com valores de turbidez entre 6 e 12 UNT apresentou o maior número de isolados identificados como *A. hydrophila*. POFFÉ & BEECK (1991) também encontraram concentrações de *A. hydrophila* entre 10^4 e 10^6 UFC/ml em águas que recebiam esgotos. Entretanto, não se pode relacionar unicamente a turbidez às impurezas no ambiente aquático, pois diferentes fatores interferem na absorção e na reflexão da luz, como o tamanho das partículas, sua forma geométrica dispersiva da luz e sua coloração (LUÍZ, PINTO & SCHEFFER, 2011). No entanto, esse não parece ser o caso da lagoa Rodrigo de Freitas, pois verificamos altos índices de coliformes totais e *E. coli* em todos os pontos de coleta analisados, muito provavelmente devido ao descarte de esgoto em suas águas.

No entanto, é importante ressaltar que a diminuição da salinidade em todos os pontos estudados da segunda coleta, pode estar associada ao aumento da entrada de água doce na lagoa, devido ao aumento da pluviosidade. Este fato pode estar relacionado ao aumento ao aumento dos níveis de *E. coli* também na segunda coleta em 5 dos 6 pontos estudados. Além disso, a queda da salinidade pode também justificar o maior número de isolados de *Aeromonas* spp nos pontos LRF 1, 3 e 5.

Assim, a avaliação de parâmetros físico-químicos de um determinado ambiente permite traçar um perfil de condições e potencial ecológico do mesmo, visando não somente a valorização biológica local, mas também evidenciando os aspectos ambientais que permitam conduzir investigações e a prevenção de possíveis riscos à saúde humana (PEREIRA & MEDEIROS, 2009).

No presente estudo, o isolamento de *Aeromonas* spp. em meios seletivos, bem como a identificação fenotípica dos mesmos revelou limitações, pois dentre os 154 isolados iniciais, apenas 76 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Aeromonas* através da PCR do gene 16S rRNA, utilizando iniciadores específicos. Testes fenotípicos convencionais não necessariamente correspondem aos

resultados obtidos pela metodologia molecular, como já evidenciado em isolados ambientais de *Aeromonas* spp.. (ØRMEN et al., 2005; PUTHUCHEARY et al., 2012). Discrepâncias na identificação de *Aeromonas* spp. resultantes de uma fraca correlação entre esquemas fenotípicos e abordagens moleculares são bem documentadas na literatura (KOZINSKA, 2007; BEAZ-HIDALGO et al. 2010).

Além disso, a determinação da atividade hemolítica foi observada em 86% (65/76) dos isolados. Desses 65, 11 isolados não apresentaram nenhum dos genes hemolíticos pesquisados. Os 14% (11/76) que não apresentaram atividade hemolítica foram identificados como *A. punctata* e *A. dhakensis*. HOEL e colaboradores (2017) demonstraram a presença de β -hemólise em 91% de seus isolados e esse resultado foi altamente relacionado à identidade das espécies obtidas. Além disso, todos os seus isolado de *A. media* e *A. caviae* (*A. punctata*) não foram hemolíticos, incluindo a cepa de referência *A. caviae*. Os genes de virulência proteolíticos pesquisados *asp* e *amp* estiveram presente em 87% (66/71) dos 94% (71/76) de isolados que apresentaram atividade proteolítica. Essa atividade também foi revelada pela maioria dos isolados de *A. hydrophila*, *A. veronii biotipo sobria*, e *A. caviae* isoladas de pacientes internados com gastroenterite aguda no Rio Grande do Sul (GUERRA et al. 2007)

Neste estudo foi possível obter dados, ainda não revelados a respeito da diversidade de *Aeromonas* spp. nas águas da lagoa Rodrigo de Freitas. A posição filogenética de sequências concatenadas dos genes *rpoB* e *gyrB* mostrou um claro agrupamento dos isolados com sequências de referência das respectivas espécies. *Aeromonas punctata* (formalmente *A. caviae*) foi prevalente com 42 isolados (54 %) seguida por 12 isolados (16%) de *A. hydrophila*, 18 isolados (24%) de *A. dhakensis* (formalmente *A. aquariorum*), 3 isolados (4 %) de *A. enteropelogenes* (formalmente *A. trota*) e 1 isolado (2 %) de *A. jandaei* (Figura 10). Assim como em nosso estudo, a análise combinada de sequências dos genes *rpoD* e *gyrB*, aumentou a resolução e permitiu a especiação inequívoca de isolados analisados em água de aquários no Sri Lanka (JAGODA et al., 2014). Das 31 espécies reconhecidas do gênero *Aeromonas* (MARTÍNEZ-MURCIA et al., 2016), um subgrupo de quatro espécies é o mais frequentemente implicado em infecções humanas e compreende as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv *sobria* e *A. dhakensis* (JANDA E ABBOTT, 2010; TEUNIS & FIGUERAS, 2016). *Aeromonas punctata/caviae* também foi prevalente em estudos na Europa, Estados Unidos e Índia, seguida por *A. hydrophila*

e *A. veroni* biovar *sobria* (ALBERT et al., 2000; BORCHARDT et al., 2003; SINHA et al., 2004). Estes dados estão de acordo com um estudo na Espanha, onde foi observado que entre 1989 e 1999 essas três espécies foram responsáveis por 90% dos casos associados a gastroenterites (VELASCO-MUÑOZ et al., 1999).

Embora nossos pontos de amostragem fossem distintos, o isolamento dessas cinco espécies nos seis pontos de coleta sugere que elas estão amplamente difundidas na lagoa estudada. Esses dados são preocupantes, pois, recentemente um estudo demonstrou evidências sugestivas de colonização e infecção bem-sucedida por linhagens de certas espécies do gênero *Aeromonas* em humanos, transmitidas pela água (KHAJANCHI et al., 2010). VOSS e colaboradores (1992) também verificaram que 13 de 28 infecções de feridas e tecido mole durante um período de 4 anos foram associadas a lesões relacionadas a contaminação pela água e 43% do total poderia estar diretamente relacionada à água de lagos ou rios.

A presença de espécies frequentemente implicadas em infecções humanas e a probabilidade de transmissão de *Aeromonas* spp. para seres humanos a partir de ambientes aquáticos, reforçam a relevância do presente estudo, além da necessidade da continuidade dessa investigação.

No presente estudo, a distribuição de genes de virulência nas cinco espécies do gênero *Aeromonas* revelou que 99% (75/76) dos isolados apresentou pelo menos um dos genes pesquisados, enquanto 8% (6/76) apresentaram todos os genes de virulência, estes incluíam quatro isolados de *A. hydrophila* e dois de *A. dhakensis*. Resultado semelhante foi verificado em uma pesquisa realizada em águas de criadouros de peixes ornamentais, onde todos os isolados apresentaram perfis de virulência heterogêneos (3 a 5 genes de virulência). Isolados de *Aeromonas veronii* e *A. dhakensis* apresentaram os cinco genes de virulência (*aerA/ser/fla/exu/act*) estudados (JAGODA et al., 2014).

A pesquisa de genes de virulência tem sido utilizada em muitos estudos como uma abordagem prática para avaliar o potencial genético de *Aeromonas* spp. de expressar fatores de virulência (PUTHUCHEARY et al., 2012). No presente estudo, foi demonstrada uma alta heterogeneidade na distribuição de genes de virulência entre as espécies encontradas, o que resultou em 19 perfis de virulência. A presença de alta diversidade de perfis de virulência também foi verificada em diferentes regiões geográficas como o Sri Lanka, China, Estados Unidos e Coreia (NAWAZ et al., 2010, HU et al., 2012, YI et al. 2013; JAGODA et al., 2014).

Devido à patogênese complexa de espécies do gênero *Aeromonas*, nenhum fator associado à virulência deve ser unicamente responsabilizado por sintomas ou infecções pontuais (ALBERT et al., 2000). A heterogeneidade de perfis de virulência encontrados, principalmente em *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. dhakensis* no presente estudo, nos leva a sugerir um alto potencial patogênico dessas espécies nas águas da lagoa. Alguns estudos mostraram que a presença dos genes *aerA*, *alt*, *act*, *eprCAI* e *ahp* foi um importante fator de virulência em *Aeromonas* e sua presença pode ser vista como indicadores de virulência (SHA et al., 2002; WANG et al., 2008).

Nossos resultados indicaram que as espécies de *Aeromonas* em ambientes aquáticos são diversas e possuem um considerável potencial de virulência. Assim a identificação confiável de espécies de *Aeromonas* é necessária não só para o tratamento de pacientes, mas também para estudos ambientais como, o rastreamento de fontes e a associação com perfis de virulência e resistência aos antibióticos.

7 CONCLUSÕES

A presença de maiores concentrações de *Aeromonas* spp. carreando o maior número de genes de virulência nos pontos LRF 1, LRF 3 e LRF 5 pode estar relacionada a níveis mais elevados de descargas de efluentes nesses pontos.

Os resultados obtidos a partir da determinação das atividades hemolítica e proteolítica em relação a seleção dos genes de virulência pesquisados confirmam a prevalência desses genes em *Aeromonas* spp., como relatado na literatura.

A presença de atividade hemolítica e/ou proteolítica em isolados que não revelaram a presença dos genes de virulência pesquisados pode ter ocorrido devido ao envolvimento de outros genes não investigados.

A utilização de sequências concatenadas dos genes *gyrB* e *rpoB* mostrou-se uma abordagem adequada na identificação e na determinação da prevalência de espécies do gênero *Aeromonas* na lagoa Rodrigo de Freitas.

A alta heterogeneidade na distribuição de genes associados a virulência entre as espécies identificadas, resultou na formação de 19 perfis de virulência, além de altos percentuais de atividade hemolítica e proteolítica, demonstrando o potencial patogênico das mesmas.

Como conclusão final, nossos dados permitem sugerir que o controle da qualidade das águas da lagoa Rodrigo de Freitas necessita de maior atenção da Vigilância Ambiental em Saúde, no que se refere ao desenvolvimento de ações preventivas aos possíveis impactos causados por esses microrganismos nos ambientes aquáticos e a saúde pública.

8 REFERÊNCIAS

ALBERT, M.J. et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **J Clin Microbiol.**, v. 38, n. 10, p. 3785-90, 2000.

ALPERI, A. et al. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 60, pt 9, p. 2048-55, 2010. DOI:10.1099/ijms.0.014621-0.

ALVES, Daniella Tancredo de Matos. Qualidade ambiental da lâmina d'água da lagoa Rodrigo de Freitas – RJ subsídios aos estudos de impactos ambientais em lagoas costeiras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 9., 1998, Santos. **Anais...** Santos: INPE, 1998, p. 79-88.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22. ed., Washington, APHA, USA, 2012.

ARNOLD, B.F.; COLFORD, J.M. Treating water with chlorine at point-of-use to improve water quality and reduce child diarrhea in developing countries: a systematic review and meta-analysis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, p. 354-364. 2007.

BALLESTE, E. et al. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 6, 1789-1795. 2010.

BEAZ-HIDALGO, R. et al. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Syst Appl Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 149-53, 2010. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.02.002.

BERNHEIMER, A. W.; AVIGAD, L. S. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Infect Immun.**, v. 9, n. 6, p. 1016-21, 1974.

BLACK, R. E. et al. Global, regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987. 2010.

BOISSON, S. et al. Effect of household-based drinking water chlorination on diarrhoea among children under five in Orissa, India: a double-blind randomised placebo-controlled trial. **PLoS Med.**, v. 10, n. 8, p. e1001497, 2013.

BOMFIM, M. V. J. et al. Avaliação físico-química e microbiológica da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da UERJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 152, p. 99-103. 2007.

BOMO, A.M.; STOREY, M.V.; ASHBOLT, N. J. Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. **J Water Health.**, v. 2, n. 2, p. 83-96, 2004.

BONJOCH, X.; BALLESTÉ, E.; BLACH, A. R. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. **Water Res.**, v. 29, n. 8, p. 1621-1627, 2005.

BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 224–228, 2009.

BRASIL. Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC). **Relatório de notícias**. Rio de Janeiro, 1998.

CASCÓN, A. et al. A Major Secreted Elastase is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3233-2341, 2000.

CHOI, J.P. et al. Clinical significance of spontaneous *aeromonas* bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a matched case-control study. **Clin Infect Dis.**, v. 47, p. 66–72, 2008.

CHU, W.H.; LU, C.P. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. **J Fish Dis.**, v. 28, p. 437-41, 2005.

CLASEN, T. et al. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD004794, 2006.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 06 maio 2015.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 274**, de 29 de novembro de 2000. Revisa os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 05 set. 2015.

CRESPO, S. & LA ROVERE, A. L. N. Estado do meio ambiente. In: CRESPO, S.; LA ROVERE, A. L. N. (Ed.). **Projeto geo cidades**: relatório ambiental urbano integrado: informe GEO, 65-112. Rio de Janeiro: Consórcio Parceria 21, 2002a.

CRESPO, S.; LA ROVERE, A. L. N. Impactos. In: CRESPO, S.; LA ROVERE, A. L. N. (Ed.). **Projeto geo cidades**: relatório ambiental urbano integrado: informe GEO, 113-124. Rio de Janeiro: Consórcio Parceria 21, 2002b.

D'AGUILA, P. S. et al. **Quality assessment of the public water supply in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro**. Cad. Saúde Pública. v. 16, n. 3, p. 791-8. 2000.

EDBERG, S. C. et al. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Symposium Series Society for Applied Microbiology**, v. 29, p. 106S–116S, 2000.

EPPLE, H. J. et al. *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). **Infect. Immun.**, v. 72, n. 8, p. 4848-58, 2004.

EUZEBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 2015.

FEWTRELL, L. et al. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 42–52, 2005.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Impactos na saúde e no sistema único de saúde decorrentes de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado**: relatório final. Brasília: Funasa, 2010.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213. In: GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: the Proteobacteria: part b the Gammaproteobacteria**. New York: Springer-Verlag, 2005.

GUERRA, I. M. F. et al. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.638-643. 2007.

HIRANSUTHIKUL, N. et al. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. **Clin Infect Dis.**, v. 41, n. 10, p. e93-6. 2005.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. N. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi. **Front Microbiol.**, v. 24, n. 8, p. 931, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00931.

HU, M. et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. **Lett Appl Microbiol**, v. 55, p. 224–233, 2012.

HWANG, C. A.; HUANG, L. (Eds.). “**Delicatessen salads,**” in ready-to-eat foods: microbia concerns and control measures. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 61–74. 2010. DOI: 10.1201/EBK1420068627-c2.

IGBINOSA, I. H.; OKOH, A. I. Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. **J. Basic Microbiol.**, v. 53, p. 895–901, 2012.

IGBINOSA, I. H. et al. Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. **Microb Pathog.**, v. 107, p. 185-192, 2017. DOI:10.1016/j.micpath.2017.03.037.

IMAMURA, T.; MURAKAMI, Y.; NITTA, H. *Aeromonas sobria* serine protease (ASP): a subtilisin family endopeptidase with multiple virulence activities. **Biol Chem.**, v. 398, n. 10, p. 1055-1068, 2017. DOI: 10.1515/hsz-2016-0344.

JAGODA, S. S. et al. Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicaemia. **Dis Aquat Organ.**, v. 109, n. 2, p. 127-37, 2014. DOI: 10.3354/dao02733.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin Microbiol Rev**; v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

KHAJANCHI, B. K. et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. **Appl Environ Microbiol.**, v. 76, p. 2313-25, 2010.

KHARDORI, N.; FAINSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Anais in Veterinary Microbiology**, v. 42, p. 395-419, 1988.

KHOR, W. C. et al. Phenotypic and genetic diversity of *aeromonas* species isolated from fresh water lakes in Malaysia. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145933, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0145933.

KIROV, S. M. et al. Investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **Infect Immun.**, v. 68, n. 7, p. 4040-8, 2000.

KOBAYASHI, H. et al. Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0186392, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0186392.

KÖRKOCA, H. et al. Detection of putative virulence genes in *Aeromonas* isolates from humans and animals. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 11, p. 1398-1406, 2014.

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of motile aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **J Fish Dis**, v. 30, p. 293–301, 2007.

KRÁLOVÁ, S.; STAŇKOVÁ, E.; SEDLÁČEK, I. Classification of *Aeromonas* spp. isolated from water and clinical sources and distribution of virulence genes. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 61, n. 6, p. 513-521, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol.**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 2016. DOI:10.1093/molbev/msw054.

KÜPFER, M. et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 56, pt. 12, p. 2743-51, 2006.

LEE, C. et al. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 976–985, 2002.

MACÊDO, J. A. B. de. **Águas & águas**. São Paulo: Varela, 263p, 2001.

MARTENS, M. et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, p. 200-214, 2008.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M.D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 42, n. 3, p. 412-21, 1992.

MARTÍNEZ-MURCIA, A. et al. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. **Curr Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 197-204, 2013. DOI: 10.1007/s00284-012-0253-x.

MEDEIROS, M. I. C. et al. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 21-24, 2001.

MIRANDA, C.D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Sci Total Environ.**, 1998.

NAGAR, V.; SHASHIDHAR, R.; BANDEKAR, J. R. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 29, n. 4, p. 745-52, 2013. DOI:10.1007/s11274-012-1212-1.

NAHARRO, G.; RUBIO, P.; LUENGO, M.J. **Molecular detection of human bacterial pathogens**. 2011. Chapter 68.

NAWAZ, M. et al. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. **Food Microbiol**, v. 27, p. 327–331, 2010.

NITTA, H. et al. Activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. **FEBS Lett.**, v. 581, n. 30, p. 5935-5939, 2007.

NOJIMOTO, I. T. I. et al. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995 - 1996. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 5, p. 385-8, 1997.

OLIVEIRA, D. E. **Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e β -lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados.** 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ØRMEN, Ø. et al. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **APMIS**, v. 113, p. 203–207, 2005. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130308.x.

PALÚ, A. P. et al. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiol.**, v. 23, n. 5, p. 504-9, 2006.

PARKER, J.L.; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **J Infect.**, v. 62, n. 2, p. 109-18. 2011.

PATHAK. S. P. et al. Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p. 347-352, 1988.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia diagnóstico e tratamento.** 3.ed. Maringá: Eduem, 2008. 311 p.

PEIXOTO, L. J. S. et al. *Aeromonas* spp: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, 2012.

PEREIRA, R. M. V.; MEDEIROS, R. A aplicação dos instrumentos de gestão e do Sistema de Gerenciamento dos Recursos Hídricos na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, Brasil. **Ambi-Água.**, v. 4, n. 3, p. 211-229, 2009.

PERSSON, S. et al. Identification of Clinical *Aeromonas* Species by *rpoB* and *gyrB* Sequencing and Development of a Multiplex PCR Method for Detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, 2015.

POFFÉ, R.; BEECK, E. O. P. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 366-370, 1991.

POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel. In: DRIEG, Noel R. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 545-548, 1984.

PUTHUCHEARY, S. D.; PUAH, S. M.; CHUA, K. H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **PLoS One**. v. 7, n. 2, p. e30205, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0030205.

RASMUSSEN-IVEY, C. R. et al. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. **Front Microbiol.**, v. 25, n. 7, p. 1337, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01337.

RIO DE JANEIRO. **DECRETO Nº 18.415**, de 01 de março de 2000. Estabelece parâmetros de uso para o espelho d'água da lagoa Rodrigo de Freitas. Disponível em: <<http://200.141.78.79/dlstatic/10112/2972533/DLFE-245312.pdf/4DecretoMunicipal18415de2000.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2015.

RIO DE JANEIRO. **DECRETO Nº 9.396**, de 13 de junho de 1990b. Determina o tombamento do bem cultural que menciona e dá outras providências. Disponível em <<http://www2.rio.rj.gov.br/smu/caderno/site%20lagoa/legisacao/especifica/9396.htm>>. Acesso em: 05 maio 2015.

RIO DE JANEIRO. **Lei orgânica do município do rio de janeiro**, de 05 de abril de 1990a. Disponível em: <<http://www.leismunicipais.com.br/lei-organica/riodejaneiro-rj/3613>>. Acesso em: 03 maio 2015.

RIO-ÁGUAS – Fundação Instituto das Águas do Município do Rio de Janeiro. 2012. **Plano de contingências e monitoramento da lagoa Rodrigo de Freitas**. Disponível em: <<http://200.141.78.79/dlstatic/10112/2972533/DLFE-245314.pdf/6RIOAGUASPlanoContingencia2012.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2015.

SAAVEDRA, M. J.; FIGUERAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 56, pt. 10, p. 2481-7, 2006.

SANTOS, J. A. et al. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. **Appl Environ Microbiol.**, v. 65, n. 12, p. 5612-4, 1999.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research.**, v. 40, n. 13, p. 2463–2476, 2006.

SCOGLIO, M.E. et al. Virulence factors in *Vibrios* and *Aeromonads* isolated from seafood. **New Microbiol.**, v. 24, n. 3, p. 273-80, 2001.

SCOTT, T. M. et al. Microbial source tracking: current methodology and future directions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 12, p. 5796-5803, 2002.

SEIDLER, R. J. et al. Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1010-1018, 1980.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **J App Microbiol.**, v. 97, n. 5, p. 1077-86, 2004.

SESHADRI, R. et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack-of-all-trades. **J Bacteriol.**, v. 188, n. 23, p. 8272-82, 2006.

SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; CHOPRA, A. K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin genedeficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infect Immun.**, v. 70, n. 4, p. 1924-35, 2002.

SHANNON, K.E. et al. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. **Sci Total Environ.**, v. 382, p. 121-129, 2007.

SIEGENER, R; CHEN, R. F. Caffeine in Boston Harbor seawater. **Mar Pollut Bull.**, v. 44, n. 5, p. 383-387, 2002.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** Campinas: ITAL, 2000.

SINHA, S. et al. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **J Med Microbiol**, v. 53, p. 527–534, 2004.

SOBRAL, MARIANA DE MELO RODRIGUES. **Detecção dos genes de virulência hemolíticos *aerA* e *hlyA* em *Aeromonas* spp. isoladas de águas da Lagoa Rodrigo de Freitas**. 2015. 42 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2015.

SOLER, L. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 54, pt. 5, p. 1511-9, 2004.

SOLTAN-DALLAL, M. M. et al. Prevalence, virulence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea. **Germs.**, v. 6, n. 3, p. 91-6, 2016. DOI: 10.11599/germs.2016.1094.

TAKAHASHI, E. et al. Analysis of carboxy terminal domain of metalloprotease of elastolytic *Aeromonas hydrophila*. **Biol Pharm Bull.**, v. 36, n. 7, p. 1174-82, 2013.

TAKAHASHI, E. et al. Properties of hemolysin and protease produced by *Aeromonas trota*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91149, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0091149.

TEUNIS, P.; FIGUERAS, M. J. Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic *Aeromonas* Species. **Front Microbiol.**, v. 21, n. 7, p. 1395, 2016.

THELESTAM, M.; LJUNGH, A. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha- and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. **Infect Immun.**, v. 34, n. 3, p. 949-56, 1981.

TOKAJIAN, S.; HASHWA, F. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* spp. isolated from a chlorinated intermittent water distribution system in Lebanon. **J Water Health.**, v. 2, n. 2, p. 115-22, 2004.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiol**, p. 1–22. 2012.

UNEP GEMS/WATER. **Global Water Quality Modelling**. Canada, 2010.
UNICEF/WHO. **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**. Geneva: WHO. 2009.

VELASCO-MUÑOZ, L.; CANO-PORTERO, R.; DE MATEO-ONTAÑÓN, S. *Aeromonas* infection surveillance in Spain. Years 1989-1999. Spain. Boletín Epidemiológico Semanal. **Instituto de Salud Carlos III. MSC**, v. 7, p. 197-208, 1999.

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection.**, v. 35, n. 2, p. 59-64, 2007.

VOSS, L. M.; RHODES, K. H.; JOHNSON, K. A. Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: an environmental disease. **Mayo Clin Proc.**, v. 67, p. 422-7. 1992.

WALLET, F. et al. *Vibrio metschnikovii* Pneumonia. **Emerging Infectious Diseases.** v. 11, n. 10, p. 1461-1462, 2005.

WANG, C. L. et al. Detection of biochemical characters and extracellular proteases in the different isolates of *Aeromonas hydrophila*. **Anim Hus Vet Med**, v. 40, p. 16-19, 2008.

WHO – World Health Organization. “**Risk assessment of vibrio vulnificus in raw oysters**”. 2005. (Microbiological Risk Assessment Series). Chapter 8.

YI, S. W. et al. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). **Vet Microbiol**, v. 164, p. 195–200, 2013.

ZACARIA, J. et al. Diversity of extracellular proteases among *Aeromonas* determined by zymogram analysis. **J Appl Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 212-9, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04645.x.