

**Concordância entre perfil de restrição do fragmento
16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do
posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*.**

Flávio Issao Uehara

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública da Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Saúde Pública.**

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

**Orientadora: Profa. Dra.
Associada Maria Helena Matté**



**São Paulo
2008**

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

Agradecimentos

À Francisca Alzira dos Santos pelo incentivo e apoio antes e durante a realização deste trabalho.

À Solange Martone Rocha pela ajuda indispensável prestada desde antes de meu ingresso no mestrado até a sua finalização.

Ao Artemir Coelho de Brito e Vanessa Fernandes Ribeiro pelo companheirismo desde o início do mestrado.

À Camila Fonseca Rizek, Cintia Carolina da Silva Mayer e Elizabeth Mendes Martins de Moura pelo precioso auxílio prestado nas tarefas laboratoriais.

À Licia Natal Fernandes, Lívia Carminato Balsalobre, Martha Virginia Ribeiro Rojas, Milena Dropa, Miriam Lopes Silva e Ronalda Silva de Araújo pela paciência, ajuda e inúmeros ensinamentos que foram imprescindíveis e que facilitaram infinitamente a realização deste trabalho.

Ao Glavur Rogério Matté pelos conhecimentos passados e por sua colaboração durante todo o mestrado.

À Tais Maria Baub e Maria Tereza Pepe Razzolini pelas suas sábias e pertinentes observações, correções e sugestões que visaram apenas o melhoramento do trabalho.

À Maria Helena Matté pela orientação, pelos conhecimentos passados durante toda a elaboração do trabalho. E que além dos valiosos aprendizados na parte técnica e científica me ensinou através de suas atitudes, os verdadeiros significados de palavras como competência,

dedicação e amor ao trabalho. Agradeço por acreditar e pela amizade desenvolvida ao longo de todo o trabalho.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do processo 2007/02238-3.

Às pessoas que não tiveram participação direta na realização deste trabalho, mas que também foram fundamentais:

Maria de Fátima Galiassi e Walkiria Guimarães Zanquini pelo apoio desde o início, conversas, parcerias e amizade.

À Aline Paternostro Martins, Daniella do Carmo Buonfiglio, Eduardo Okuhara, Felipe Carniel de Carvalho, Luis Paulo Goda Perroni, Ricardo Bianchini, Ricardo Yukio Cano, Rogério Marinho e Verônica Simões Fogo pela presença em minha vida durante todos esses anos. Que independente se os momentos são de calma ou turbulência, sempre serão momentos agradáveis, com vocês do meu lado.

À minha família, pois nada seria possível sem a presença dela:

Aos meus irmãos Fernando e Marcelo pela paciência, amor e cumplicidade durante todos esses anos.

Aos meus pais Yoshito e Iurico, pela paciência que vocês têm comigo, até nos momentos em que não há razão para se ter paciência, pela fé, mesmo quando nem eu mesmo acredito em mim e pelo Amor até nos momentos que não mereço, muito obrigado.

RESUMO

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é controversa e sofre mudanças constantemente, isso devido às novas espécies que vêm sendo descritas, reclassificadas ou de estudos mais aprofundados em espécies já conhecidas. Devido a heterogeneidade fenotípica e genotípica apresentada entre as espécies do gênero, consideráveis esforços estão direcionados para o desenvolvimento de métodos que permitam identificar e classificar corretamente as espécies de *Aeromonas*. Com base no 16S rDNA das espécies de *Aeromonas*, o presente estudo propõe um par de iniciadores gênero-específico para o *Aeromonas* e um esquema utilizando enzimas de restrição para identificação das espécies do gênero. Foram analisadas 40 cepas de amostras ambientais, previamente identificadas fenotipicamente como membros do gênero *Aeromonas*, todas as cepas foram confirmadas com o par de iniciadores gênero-específico. Os resultados da identificação das espécies utilizando o esquema de RFLP foi seguinte *A. jandaei* 35%, *A. hydrophila* 30%, *A. trota* 5%, *A. aquariorum* 12,5%. *A. veronii* 10%, e *A. media* 7,5%. Os métodos apresentados no estudo podem ser empregados na rotina laboratorial podendo ser útil no estudo epidemiológico do gênero *Aeromonas* bem como na determinação da real distribuição dos organismos deste gênero nos diferentes ambientes, em alimentos e em casos clínicos.

ABSTRACT

Many studies over the past years showed the phenotypical and genomic heterogeneity among the species of the genus *Aeromonas*. Considerable efforts are aimed at the development of a method that allows identifying and classifying correctly the species of the genus *Aeromonas*. Based on the 16S rDNA of the *Aeromonas* species, the present study proposes a pair of primers genus-specific for *Aeromonas* and a scheme using restriction enzymes to identify the species of the genus. Forty *Aeromonas* strains from different environmental sources, previously identified, by phenotypic tests, as a member of the genus *Aeromonas*, were submitted to PCR using the genus-specific primers, all the forty strains were confirmed as a member of the genus *Aeromonas*. The results of the identification using RFLP scheme were: *A. jandaei* 35%, *A. hydrophila* 30%, *A. trota* 5%, *A. aquariorum* 12,5%. *A. veronii* 10%, e *A. media* 7,5%. The methods proposed in this study could be used in the laboratory routine and could be useful in epidemiological studies of the genus *Aeromonas* contributing to assess the real distribution of this genus in different environments, foods and clinical samples.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	3
	1.1 TAXONOMIA	3
	1.2 PATOGENICIDADE NO HOMEM	8
	1.3 OCORRÊNCIA	12
	1.4 IDENTIFICAÇÃO	18
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	26
	3.1 OBJETIVO GERAL	26
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
	4.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS	27
	4.2 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO 16S rDNA	28
	4.3 SELEÇÃO DE ENZIMAS PARA RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO 16S rDNA DE CEPAS DE <i>Aeromonas sp.</i>	29
	4.4 RESTRIÇÃO do 16S rDNA	29
	4.5 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO 16S rDNA	30
	4.6 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES	31
	4.7 DESENHOS DOS INICIADORES GÊNERO- ESPECÍFICOS	31

5	RESULTADOS	33
	5.1 DESENHOS DOS INICIADORES GÊNERO ESPECIFICOS	33
	5.2 SELEÇÃO DE ENZIMAS PARA RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO 16S RDNA DE CEPAS DE <i>AEROMONAS</i> SP	40
	5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>AEROMONAS</i> UTILIZANDO RFLP	41
	5.4 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO 16S RDNA	43
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	55
8	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 TAXONOMIA

Segundo a 7ª e 8ª edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” o gênero *Aeromonas* pertencia a família *Pseudomonadaceae* e *Vibrionaceae*, respectivamente, atualmente pertence a família *Aeromonadaceae* proposta por COLWELL et al. em 1986 (ROCHA, 2004).

As espécies que compõem o gênero *Aeromonas* são caracterizadas como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, produtores das enzimas catalase e oxidase, fermentadores de glicose e de outros carboidratos e geralmente móveis por flagelos polares. Crescem na ausência de cloreto de sódio (NaCl), em temperatura mínima de 0° a 5°C e máxima de 38°C a 41°C. Algumas cepas hemolíticas quando cultivadas em ágar sangue; são resistentes ao agente vibriostático O129 e, em sua maioria, produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinase (ALTWEGG e GEISS, 1999).

As bactérias do gênero *Aeromonas* compartilham muitas características com os membros das *Enterobacteriaceae*, e são diferenciadas pela positividade da prova de oxidase em *Aeromonas* (WHO, 2002).

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é controversa e sofre mudanças constantes, isso devido às novas espécies que são descritas, reclassificação ou de estudos mais aprofundados em espécies já conhecidas (PIDIYAR et al., 2002). Segundo JANDA (1991) um dos problemas mais frustrantes e complexos que envolve o estudo das espécies de *Aeromonas* é sua identificação tanto em aspectos fenotípicos quanto moleculares.

A diferenciação das espécies do gênero é possível para a maioria das espécies, no entanto a congruência entre os grupos de hibridização DNA-DNA e a identificação fenotípica não é completa, sendo assim algumas espécies permanecem sem classificação (EPA, 2006).

Até 1970, as espécies de *Aeromonas* eram divididas em dois grupos, baseados em propriedades fisiológicas e tipo de hospedeiro. As bactérias móveis do gênero que apresentavam crescimento em temperatura de 35-37°C e que eram reconhecidas como causadoras de infecções no homem foram denominadas de *A. hydrophila*. As bactérias sem motilidade que crescem a 22-28°C e que infectavam peixes eram denominadas de *A. salmonicida*. A taxonomia atual de *Aeromonas* está baseada na hibridização DNA-DNA e no 16S DNA ribossômico (EPA, 2006)

Nas últimas duas décadas o número de espécies reconhecidas do gênero cresceu rapidamente (SAVEENDRA et al, 2006).

PAVAN et al. (2000) propuseram uma nova sub-espécie do gênero *Aeromonas*, estas cepas foram isoladas do rio Matanza localizado próximo a região central do distrito da cidade de Buenos Aires sendo classificado como um rio com elevado nível de poluição. Foram realizados estudos fenotípicos e genotípicos nas cepas isoladas, que foram identificadas como *Aeromonas salmonicida*, porém de acordo com suas propriedades fenotípicas, os autores verificaram que se tratava de uma nova sub-espécie que foi proposto o nome de *Aeromonas salmonicida pectinolytica*.

PIDIYAR et al. em 2002, isolou uma nova espécie de *Aeromonas* dentre a flora bacteriana de duas espécies de mosquitos hematófagos, *Aedes aegyptii* e *Culex quinquefasciatus*, ambas espécies de mosquito possuem importância

médica, e para essa nova espécie de *Aeromonas* foi designado o nome de *A. culicicola*. Recentemente em um estudo realizado por HUYS et al (2005), os autores realizaram testes moleculares e vários fenotípicos com espécie *A.culicicola* e concluíram que a espécie *A. culicicola* é sinônimo da espécie *A.veronii*.

Sete cepas de *Aeromonas* em órgãos internos de rãs (*Rana rugulosa*) com septicemia que pertenciam à fazendas de criação na Tailândia foram isoladas por HUYS et al.(2003) e foram submetidas às técnicas de “Polimorfismo de amplificação de um fragmento (Amplified fragment length polymorphism–AFLP), amplificação de seqüências repetitivas (ERIC-PCR) sequenciamento do 16S rDNA, hibridização DNA/DNA, e com extensa caracterização fenotípica. Mediante a dados coletados nesses estudos, os autores concluíram que se tratava de uma nova sub-espécie de *Aeromonas hydrophila* e o nome *A. hydrophila ranae* foi proposto para essa nova sub-espécie.

HARF-MONTEIL et al. (2004) isolaram duas cepas de *Aeromonas* de fezes em dois macacos (*Macaca fascicularis*) saudáveis, da Ilha Maurício, que estavam sendo mantidos em quarentena no Centro de Primatologia, em Strasbourg na França. Na tentativa de determinar a posição taxonômica das cepas, foram realizados a análise filogenética do 16S rDNA, hibridização DNA-DNA e vários testes fenotípicos. Com base nos resultados obtidos os autores observaram que se tratava de uma nova espécie do gênero, com proposta de classificação de *A. simiae*.

Em 2004 cinco cepas de *Aeromonas* foram isoladas a partir de moluscos bivalves, por MIÑANA-GALBIS e colaboradores. Os autores realizaram um

estudo fenotípico e as cepas foram submetidas às análises de AFLP, sequenciamento do 16S rDNA, determinação da proporção G+C e Hibridização DNA-DNA para determinação da homologia. Nesse estudo genotípico foram incluídas cepas de referência dos grupos de hibridização dos membros do gênero *Aeromonas* que já estão descritos. Os dados obtidos mostraram que as cepas isoladas eram diferentes tanto genotipicamente quanto fenotipicamente das espécies de *Aeromonas* descritas até então, e foi proposto o nome de *A. molluscorum* para essa nova espécie.

SAHA e CHAKARABARTI em 2006 isolaram cepas provenientes de amostras de água de fontes termais em Assam na Índia, que foram submetidas há uma análise preliminar do 16S rDNA. Os achados revelaram uma similaridade dessas cepas com a família *Aeromonadaceae*. Como também foram realizados estudos fenotípicos, quimiotaxonomico e filogenéticos concluíram que se tratava de uma nova espécie de *Aeromonas* e, propuseram o nome de *A. sharmana*.

Em 2007, MARTINEZ-MURCIA et al.(2007) realizaram um estudo mais aprofundado com a cepa tipo da espécie *Aeromonas sharmana* (GPTSA-6) e, por meio da análise filogenética (distancias dos grupos da árvore e nucleotídeos característicos) do 16S rDNA, e características fenotípicas da cepa em questão, os autores concluíram que não se tratava de uma nova espécie, porém o organismo poderia ser classificado como da família *Aeromonadaceae*.

Miñana-Galbis et. al (2007) isolaram em moluscos bivalves, cepas de *Aeromonas*, que não puderam ser identificadas até o nível de espécie utilizando testes fenotípicos. Com o objetivo de determinar a posição

taxonômica dessas cepas de *Aeromonas*, os autores através de evidências fenotípicas e genotípicas descreveram uma nova espécie de *Aeromonas*, denominada *Aeromonas bivalvium*.

MARTINEZ-MURCIA et al. (2008) com o objetivo de verificar a prevalência de cepas do gênero *Aeromonas* na água e na pele de peixes ornamentais, isolaram cepas que foram identificadas presuntivamente, por testes bioquímicos, como membros pertencentes do gênero *Aeromonas*, porém estas não puderam ser identificadas ao nível de espécie. Estes mesmos isolados foram submetidos ao sequenciamento dos genes *gyrB*, *rpoD* e 16S rDNA, DNA-DNA hibridização, bem como à extensos testes bioquímicos e resistência à antibióticos na tentativa de determinar sua posição taxonômica. Os autores concluíram que se tratava de uma nova espécie, denominada *Aeromonas aquariorum*.

A classificação atual de algumas espécies de *Aeromonas*, segundo descreve MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH (2005), é questionável. Um dos motivos desses questionamentos é o pequeno número de organismos isolados de espécies que foram reconhecidas recentemente.

Pode-se citar como exemplo, as espécies *A. allosacchrophila* que foi descrita com 3 isolados (MARTÍNEZ-MURCIA et al.,1992), *A. encheleia* foi descrita com 4 isolados (ESTEVE et al.,1996) e a *A. popoffii* foi descrita através de 8 isolados. Os números reduzidos de isolados que as espécies foram descrita dificulta na identificação fenotípica destas (EPA,2006)

Segundo SAVEENDRA (2006) atualmente o gênero compreende as seguintes espécies: *Aeromonas hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biovar *sobria* e *veronii*),

A. jandaei, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii* e os dois grupos homólogos DNA, *Aeromonas* sp. HG 11, *Aeromonas* sp. HG13 que ainda permanecem sem nomes. *Aeromonas ichthiosmia* e *Aeromonas enteropelogenes* agora são consideradas sinônimos de *A. veronii* e *A. trota* respectivamente. Três novas espécies, *Aeromonas culicicola*, *Aeromonas simae* e *Aeromonas molluscorum* foram recentemente descritas. Porém existe um estudo que propõe que *A.culicicola* seja sinônimo de *A.veronii*, mas apenas as cepas de referência foram estudadas.

De acordo com a publicação da EPA: "Aeromonas: Human Health Criteria Document, há outras espécies de *Aeromonas* que foram descritas, porém elas ainda não receberam o reconhecimento taxonômico. Essas espécies são *A.arequipenses*, *A.dechromatica*, *A.guangzeii* e *A.pastoria* (EPA,2006). Além disso algumas decisões judiciais estão pendente sobre os nomes de algumas espécies na Comissão Judicial do Comitê Internacional de Sistemática Bacteriológica (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology) (LPSN, 2006).

1.2 PATOGENICIDADE AO HOMEM

O gênero *Aeromonas* foi descrito como patógeno emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2002 e pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos em 2006 e tem recebido atenção especial nos últimos anos, por estar relacionada com várias doenças em humanos e outros animais. A maioria dos relatos refere-se a gastroenterites (MORITA, 2005). Recentemente tem ocorrido um aumento de publicações nas quais o gênero *Aeromonas* foi considerado como patógeno principal (MATTÉ, 2004).

As espécies mesófilas de *Aeromonas* são comumente isoladas de pacientes com gastroenterites, no entanto o papel que elas exercem na causa da doença ainda não é muito claro. Também estão associadas com casos de septicemias, infecções de ferimentos, olhos, trato respiratório e outras infecções sistêmicas (WHO, 2002).

As espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* e *A. caviae* são isoladas com maior frequência em casos de infecção intestinal em humanos, essas espécies somam 85% dos isolados clínicos do gênero *Aeromonas*. Outras espécies como *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. veronii* biovar *veronii* também causam infecções, porém com uma menor frequência (SEN & RODGERS, 2004; PAPAGEORGIOU et al., 2006).

O mecanismo de patogenicidade das bactérias do gênero *Aeromonas* é complexo e não é bem conhecido, sendo que sua virulência é considerada multifatorial: hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, proteases (serina proteases (AspA), elastase (AhpB) flagelo polar (FlaA e FlaB), têm sido identificadas como fatores potenciais de virulência em *Aeromonas* (SEN e RODGERS, 2004; OTTAVIANI et al., 2006).

A incerteza na definição do posicionamento taxonômico de isolados de amostras clínicas pode ter como efeito muitos casos não elucidados, e desta forma não informados (MATTÉ, 2004).

Vários casos de patogenicidade causado pelo gênero *Aeromonas* estão sendo relatados entre eles, HUA et al. (2004) descreve pela primeira vez a espécie *A. popoffii* isolada, a partir de uma infecção no trato urinário de um garoto de 13 anos, onde até então essa espécie era mais comumente isolada em amostras de água doce.

Em publicações recentes, ROBERTS et al. (2006) relatam caso de um homem de 81 anos que desenvolveu artrite séptica e bacteremia por *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. CHANG et al. (2005) discorreu em seu trabalho dois casos de peritonite causados por *Aeromonas hydrophila*.

Infecções causadas por *Aeromonas* em indivíduos que sofreram queimaduras já foram descritos, apesar de serem raros os casos, LAI et al. (2006), identificaram as espécies *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria*, como sendo responsáveis pela bacteremia em um homem de 81 anos que sofrera queimaduras.

No ano de 2006, foi registrado por DE GASCUN, um caso de abscesso pancreático causado por *Aeromonas*, a espécie em questão foi *A. hydrophila*.

Foram observadas por KREJCI et al.(2006) em amostras de fezes de crianças menores de um ano com diarreia aguda 8 cepas do gênero *Aeromonas*, dentre elas seis pertenciam a espécie *A.caviae*, uma *A. veronii* biovar *sobria* e uma outra cepa não foi possível identificar até o nível de espécie. Os mesmos autores citam que casos de gastroenterites agudas causadas por *Aeromonas* em crianças não são raras e podem provocar problemas sérios de saúde.

Entre o período de julho 1999 a junho de 2001 em estudo realizado por WU et al.(2006) foram isoladas 116 cepas de *Aeromonas* de amostras clínicas, em Taiwan, das quais 62% foram confirmadas como responsáveis por infecções, sendo bacteremia o caso mais freqüente de infecção.

TSAI et al. (2006) realizaram um estudo em Taiwan, em um centro médico, no qual foi realizado um estudo retrospectivo, entre o período de

novembro 1995 a agosto de 2003 onde foram registrados 45 episódios em 41 pacientes com bacteremia causada por *Aeromonas* em adultos.

Em um estudo realizado por GUERRA et al. (2007) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, tinha como objetivos verificar a prevalência das espécies de *Aeromonas* em pacientes com diarreia e determinar a resistência à antibióticos e a presença de fatores de virulência das cepas isoladas. De um total de 408 pacientes admitidos com gastroenterites. Os autores isolaram 27 (6,6%) cepas de membros do gênero *Aeromonas*. As espécies isoladas foram *A. hydrophila* (51,8%), *A. caviae* (40,8%) e *A. veronii* biotipo sobria (7,4%). A maior prevalência ocorreu em lactantes e crianças.

Os mesmos autores verificaram a presença de vários genes e fatores de virulência, e a ocorrência de resistência às várias drogas nas cepas isoladas do estudo. Baseando-se em seus resultados os autores enfatizam a necessidade da inclusão da identificação do gênero *Aeromonas* na rotina laboratorial.

No ano 2002, na Austrália, foi reportado o primeiro surto de infecção de ferimentos causados por *Aeromonas hydrophila*, onde vários indivíduos que participaram de uma competição de “futebol de lama” na cidade rural de Collie, foram atendidos no hospital local com vários ferimentos infeccionados, foi detectada a presença de *Aeromonas hydrophila* em três amostras clínicas e na água do rio que fora utilizado para preparar o local da competição (VALLY et al., 2004).

Na cidade São Bento de Una em Pernambuco, Brasil, em 2004 ocorreu um surto de diarreia associado com o gênero *Aeromonas*. Foram registrados 2170 casos, 582 coproculturas foram realizadas, das quais 145 revelaram um enteropatógeno bacteriano sendo que em 114 casos foi constatada a

participação de alguma espécie do gênero *Aeromonas*, sendo elas: *A. caviae* (57 casos), *A. veronii* biovar *sobria* (23 casos), *A. veronii* biovar *veronii* (15 casos) e outras espécies (19 casos) (HOFER et al., 2006).

Após o tsunami que atingiu a Tailândia em 2004, ferimentos traumáticos foram um dos problemas mais comuns dentre os sobreviventes, e a maioria desses ferimentos estavam infeccionados e as bactérias do gênero *Aeromonas* foram os organismos que foram isolados com maior frequência entre essas infecções. Dos 777 pacientes atendidos em 4 hospitais em Bangkok, 515 pacientes estavam com infecção de pele ou tecido, dos 641 isolados de 305 pacientes, em 145 isolados foi detectada presença de alguma espécie do gênero *Aeromonas* (HIRANSUTHIKUL et al., 2005).

Em 2006, PRESLEY et al. realizaram um levantamento dos patógenos e substâncias tóxicas presentes nas águas que inundaram Nova Orleans, decorrentes do furacão Katrina, o resultado desse estudo indicou uma concentração alta do gênero *Aeromonas*.

Apesar desse reconhecimento como patógeno emergente e o aumento do número de publicações que relatam casos clínicos as bactérias do gênero *Aeromonas*, como patógeno principal. Há ainda poucos relatos de surtos que foram publicados (MATTÉ, 2004).

1.3 OCORRÊNCIA

Mesófilas, as bactérias do gênero *Aeromonas* são ubíquas e autóctones em ambientes aquáticos. Podem ser encontradas em água doce, estuários e esgoto, já foram isoladas de águas potáveis cloradas e não cloradas (EPA, 2006). As bactérias do gênero *Aeromonas* possuem uma grande habilidade de

adaptação a diferentes ambientes e possuem propriedades que permitem que essas sobrevivam nas mais diversas condições (ARORA et al., 2005).

Esta adaptabilidade foi confirmada em um estudo realizado por MATTÉ (2004) no qual, foram caracterizadas, por métodos moleculares, cepas de *Aeromonas* provenientes de diferentes tipos de ambientes: amostras de água da Represa de Guarapiranga, água de lastro e amostras de água do Continente Antártico. Embora já seja conhecida a capacidade do gênero *Aeromonas* crescer em temperaturas próximas a 0° C, o estudo foi o primeiro relato da presença desses organismos no Continente Antártico.

Uma das características que permite essa ampla distribuição no ambiente deste gênero é a sua capacidade de multiplicação independente de hospedeiros humano ou animal, a qual é favorecida em condições adequadas de pH, temperatura e nutrientes (especialmente o fósforo) (ROCHA, 2004).

O gênero *Aeromonas* pode ser isolado tanto de ambientes pobres ou ricos em nutrientes. No entanto, o aumento dos níveis de poluição na água pode resultar em um aumento substancial e modificar a distribuição na população de *Aeromonas* no ambiente. Muitos estudos mostraram que cepas de *A. caviae* são isoladas de ambientes aquáticos com alta carga orgânica. *A. caviae* e *A. hydrophila* apresentam distribuição semelhante em ambientes com algum grau de poluição enquanto que *A. veronii sobria* é mais freqüente em águas não poluídas e salobras (WHO, 2002).

Em um estudo no México, foram coletadas 144 amostras de estações de tratamento de esgoto e 96 amostras de estações de tratamento de água, em 31% das amostras em ambos os tipos de estações foram isoladas *Aeromonas* (VILARRUEL-LÓPEZ et al, 2005).

A resistência de *Aeromonas spp.* à cloração da água e múltiplos antibióticos fez com que esses microrganismos fossem adicionados na Lista de Candidatos Contaminantes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (“Contaminant Candidate List” da Agência Ambiental Americana, EPA) (PILLAI, 2006). Várias publicações recentes têm demonstrado que a presença de espécies de *Aeromonas* em água de abastecimento é um risco potencial a saúde, já que estas são capazes de produzir uma ampla variedade de fatores de virulência (SHARMA et al., 2005).

Muitas estratégias no tratamento de água como filtração rápida ou lenta em filtros de areia, hipercloração/ filtração direta e o uso de carvão ativado, são capazes de reduzir o número de *Aeromonas*, paradoxalmente outros estudos mostram sua habilidade de sobreviver e crescer em águas de abastecimento. Isto porque esses microrganismos têm a capacidade de crescer nos sistemas de distribuição de água integrando a formação de biofilmes, tornando-as resistentes a cloração (SEN e RODGERS, 2004).

A presença de *Aeromonas* em água de abastecimento é um fator de risco principalmente para crianças e idosos, o risco não está em apenas beber a água contaminada, como também quando utilizada para fins recreacionais (VILARRUEL-LÓPEZ et al., 2005).

Além dos ambientes aquáticos as bactérias do gênero também podem ser encontradas no solo, fezes de animais aquáticos, terrestres e de fezes humanas. Nos alimentos as bactérias já foram isoladas em peixes, frutos do mar, vegetais, leite e alimentos processados (EPA, 2006).

Em um levantamento da incidência de casos de gastroenterites causados por alimentos contaminados por *Aeromonas*, entre o período de 1977 a 1991,

Kirov(1993) relata que a maioria dos surtos envolviam frutos do mar (ostras e camarões) e sashimi

Bactérias do gênero *Aeromonas* foram isoladas em mexilhões do Mar Adriático destinados ao consumo humano (OTTAVIANI, 2006). No Brasil também foi relatada a presença das bactérias do gênero em mexilhões (*Perna perna*) destinadas ao consumo humano, tanto em amostras *in natura* quanto em amostras pré-cozidas(PEREIRA,2004).

EVANGELISTA-BARRETO e colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de isolar espécies de *Aeromonas* de ostras (*Crassostrea rizophorea*), em 2002. Foram realizadas 30 coletas quinzenais de um criadouro natural localizado no estuário de rio Cocó (Fortaleza/Ceará/Brasil). Para o isolamento das cepas foram utilizados dois métodos, plaqueamento direto e presença/ausência. Foram identificadas as bactérias do gênero em 50% e 43% respectivamente das amostras, o que segundo o autor, poderia acarretar em um aumento no risco representativo dos casos de infecções devido ao hábito de consumir ostras cruas (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2006).

Bactérias do gênero *Aeromonas* foram responsáveis por uma doença que afetou no cultivo de várias fazendas de caracóis (*Helix aspersa*) na França, que levava esses animais a morte, causando um grande prejuízo para as fazendas afetadas (KIEBRE-TOE et al., 2005).

Em estudo que analisou a comunidade bacteriana do rio Congonhas, próximo à sua foz no rio Tibagi, município de Sertaneja, Paraná, Brasil. Nas amostras de água do rio foram detectados os grupos *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* e *Flavobacterium* e

nas amostras de peixes o gênero *Aeromonas* obteve maior frequência (SOUSA e SILVA-SOUZA, 2001).

Os Estados Unidos fatura anualmente mais de US\$500 milhões em criações de “catfish”. Doenças infecciosas são responsáveis pela redução em aproximadamente 10% na produção anual desses peixes, sendo que a septicemia causada por *A. hydrophila* é uma das doenças mais comuns que provocam esses prejuízos (NAWAZ et al., 2006).

HERRERA et al. (2006) realizaram um estudo na Espanha, com objetivo de verificar a presença de bactérias patogênicas em amostras de porções embaladas de diversas espécies de peixes marinhos. Não foi detectada a presença *Vibrio cholerae* e *Salmonella* em nenhuma das 50 amostras, porém em 31 (61%) amostras foi detectada a presença de alguma espécie do gênero *Aeromonas*, sendo que todas as porções foram positivas para a presença de genes de virulência, o que segundo autor poderia contribuir para diarreia ocasionada por esse microrganismo.

Merino et al.(1995), sugerem que a ocorrência de doenças envolvendo alimentos contaminados por *Aeromonas spp.* possa crescer no futuro, devido ao aumento no consumo de alimentos menos processados e mais “naturais”.

No Brasil, ROSSI et al. (2000) realizaram um estudo em matadouros de bovinos para verificar a presença de *Aeromonas* em amostras oriunda da água dos currais utilizada na dessedentação, da pré-higienização, da tranquilização dos animais, bem como da água residuária da lavagem das carcaças. A partir dos resultados obtidos os autores relatam que a água dos currais pode ser uma importante fonte de contaminação, principalmente para a pele, e através dela

os organismos do gênero *Aeromonas* spp. podem se disseminar até à sala de matança.

Em outro trabalho realizado em matadouros de bovinos no Brasil, foi averiguada a capacidade enterotoxigênica de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas em diferentes produtos e locais no fluxograma de abate bovino. Segundo os resultados do estudo, os autores alertam que é preocupante a presença de cepas enterotoxigênicas em indústria de alto nível higiênico-sanitário (ROSSI et al., 2001).

COSTA e ROSSI (2002) analisaram diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frangos com o objetivo de identificar os pontos de contaminação da carne por bactérias do gênero *Aeromonas*. Foram isoladas *Aeromonas* em amostras de penas, fezes, carcaças não evisceradas, evisceradas, resfriadas e de água do pré-resfriamento. Segundo os autores, independente do controle higiênico-sanitário adotado na indústria, as carcaças de frangos podem se contaminar já a partir de sua obtenção, determinando o aparecimento de *Aeromonas* em carcaças resfriadas e prontas para a comercialização.

Em um estudo que objetivava identificar a contaminação microbiana na água utilizada nos processos de escaldagem, assepsia e resfriamento do frango (*chiller*), e em lingüiças de frango produzidas a partir destes. Foram obtidas contagens de *Aeromonas* que variaram de 5,0 a $3,5 \times 10^4$ UFC/ml na água de escaldagem e 9,0 a $3,7 \times 10^2$ UFC/ml na água do *chiller*. Segundo os autores este acréscimo se deve, provavelmente, por esses microrganismos serem resistentes a temperaturas mais baixas e também devido à retirada das vísceras. As análises de lingüiça de frango demonstraram acréscimo nas

contagens de *Aeromonas*, apresentando até $2,5 \times 10^3$ UFC/g. Os autores ressaltam que esta tendência, de aumento de crescimento no produto final, aliado à capacidade desses organismos causar infecções, demonstram a necessidade de se incluir a análise das bactérias do gênero *Aeromonas* nas avaliações microbiológicas de alimentos (CANSIAN et al., 2005).

Em seu estudo realizado na Irlanda, McMAHON e WILSON verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em vegetais orgânicos, no total dos vegetais analisados 34% apresentaram alguma espécie de *Aeromonas*. Muitas das amostras dos vegetais orgânicos (64%) eram minimamente processados, prontos para o consumo e lavados, sendo que 41% dessas amostras foram isoladas *Aeromonas* (MCMAHON & WILSON, 2001).

Alguns estudos demonstram que vegetais frescos podem conter *Aeromonas* spp. o que pode representar um risco a saúde, já que estes geralmente são consumidos crus (ISONHOOD & DRAKE, 2002).

1.4 IDENTIFICAÇÃO

Os ribossomos são uma das maiores organelas da célula bacteriana e são compostas por proteínas e RNA. Ribossomos das bactérias contém 3 tipos de rDNA 16S, 23S e 5S. Os nomes derivam dos níveis de sedimentação dessas moléculas, em experimento controlado em ultracentrifuga, o coeficiente "S" (Svedberg) é proporcional à massa, à densidade e a forma das moléculas da substância. Além da função estrutural no ribossomo o rDNA pode atuar de forma mais direta na tradução. O 16S rDNA está diretamente envolvido na iniciação e terminação da tradução (SNYDER e CHAMPNESS, 1997).

Marcadores moleculares como as seqüências 16S, 23S rDNA ou seqüências intergênicas são úteis para distinguir microrganismo de vários gêneros, espécies e até mesmo para diferenciar cepas isoladas (SHEN et al., 2005).

Na microbiologia clínica a identificação rápida e correta dos agentes patogênicos é um requisito essencial para um diagnóstico e aplicação de um tratamento adequado. Atualmente a maior parte das bactérias de interesse clínico, podem ser identificadas através de métodos biológicos convencionais que se baseiam em características fenotípicas. Porém, existem situações em que a identificação fenotípica demanda muito tempo ou até mesmo a impossibilidade de identificar o patógeno por esses meios tradicionais. Nessas circunstâncias a identificação molecular baseada na análise do 16S rDNA pode representar vantagens quanto ao tempo gasto e a precisão na identificação (RODICIO & MENDOZA, 2004).

Com esse intuito, de tornar a identificação mais rápida e prática, vários gêneros de microrganismos possuem iniciadores específicos: *Enterococcus*, *Bifidobacteria*, *Brevibacteria* e *Streptomonospora* (MATSUKI et al.,2003; FRANZETTI et al., 2004; GELSOMINO et al., 2004; ZHI et al., 2006)

O sequenciamento do 16S rDNA é considerado uma eficiente ferramenta taxonômica e é amplamente utilizada na taxonomia de bactérias. No gênero *Aeromonas*, o gene fornece regiões para o delineamento e identificação da maioria das espécies, porém em algumas cepas elas são extremamente conservadas (MARTÍNEZ-MURCIA et al.,2005)

Consideráveis esforços estão direcionados para o desenvolvimento de métodos que permitam a identificação e classificação corretas das espécies do

gênero *Aeromonas*, principalmente aquelas que são consideradas patógenas para o homem (SEN, 2005).

Diferentes testes bioquímicos são utilizados para identificação das bactérias do gênero *Aeromonas*, esses testes apesar de úteis, são trabalhosos, demandam tempo e podem gerar resultados duvidosos (FIGUEIRAS et al., 2000; ARORA et al., 2005).

Os testes fenotípicos muitas vezes são incapazes de identificar precisamente as espécies de *Aeromonas* devido à heterogeneidade existente no gênero (FIGUEIRAS et al., 2000; WAHLI et al., 2005).

ABBOT et al. (2003), com a finalidade de definir um grupo de provas bioquímicas úteis na identificação de cepas de *Aeromonas*, avaliaram 62 provas bioquímicas em 193 cepas com representantes de todas as espécies do gênero *Aeromonas*. Com o objetivo de criar uma tabela de referência para identificação das espécies de *Aeromonas*, dentre esses 62 testes apenas 9 apresentaram resultados uniformes. Esses testes foram: presença de citocromo oxidase e nitrato redutase, fermentação da D-glicose e trehalose, não utilização de mucato como única fonte de carbono e a incapacidade de produzir ácido a partir de D-arabitol, dulcitol, erythritol e xilose.

Apesar de todos os esforços, a identificação de algumas espécies ainda é um sério problema, pois os testes bioquímicos convencionais nem sempre são confiáveis e algumas diferenças permanecem entre os grupos fenotípicos e genotípicos (FIGUEIRAS et al., 2000).

ØRMEN et al.(2005) compararam os métodos de identificação fenotípicos (provas bioquímicas) e genotípicos (RFLP do PCR do 16S r-DNA) em 171 cepas de *Aeromonas*, isoladas de amostras clínicas e ambientais. A

identificação fenotípica das espécies e identificação genotípica utilizando RFLP divergiram nos resultados em 96% e 46%, nas amostras ambientais e clínicas, respectivamente.

Desde o primeiro estudo de hibridização DNA-DNA realizado por Popoff et al. (1980), várias metodologias têm sido desenvolvidas para que seja feita uma identificação rápida e acurada das espécies do gênero *Aeromonas*, (TACÃO et al., 2005).

Dentre as várias metodologias destacam-se algumas técnicas moleculares desenvolvidos nas últimas décadas: ribotipagem utilizando diferentes fragmentos do 16S DNA de uma *E.coli* como sonda e AFLP (*amplified fragment analysis*) são técnicas que favorecem resultados muito próximos quando comparados ao método convencional de hibridização do DNA, porém são métodos trabalhosos e que mostram a heterogeneidade entre as espécies do gênero o que pode acarretar em resultados de difícil interpretação, problema semelhante quando se utilizada a técnica RAPD-PCR que mostra a grande variabilidade das espécies. Outra técnica molecular de genotipagem é a RFLP que se mostrou uma ferramenta útil, porém mais uma vez, a técnica demanda tempo e algumas vezes é necessário uma segunda ou terceira análise com enzimas diferentes para que se possa distinguir corretamente alguns grupos (SEN, 2005).

Para a identificação de espécies do gênero *Aeromonas*, um protocolo baseado na RFLP do 16S rDNA amplificado foi descrito por BORREL et al. (1997), o método permite a identificação de 10 espécies usando duas enzimas (*Alu I* e *Mbo I*) simultaneamente. Para distinguir as espécies *A.salmonicida*, *A.encheleia* da *Aeromonas* HG11, eram necessárias mais duas enzimas (*Nar I*

e *Hae* III). Porém esse protocolo não distinguia *A. salmonicida* de *A. bestiarum* e também não identificava *A. popoffii*. Figueiras et al. (2000) baseando-se nesse método, acrescentaram a utilização de mais duas enzimas, *Alw*NI e *Pst*I, para que com esse protocolo fosse possível a identificação de todas as espécies descritas até então (FIGUERAS et al., 2000).

DELAMARE et al. (2002) realizaram um estudo avaliando quinze linhagens pertencentes às 13 espécies de *Aeromonas* utilizando os métodos: eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) e amplificação de segmentos de DNA ao acaso. A comparação entre os padrões obtidos por ambos os métodos permitiu diferenciar todas as linhagens. Segundo os autores, os resultados obtidos por meio das análises protéicas têm potencial para diferenciar espécies de *Aeromonas*, mas baixa variação qualitativa, ou seja, a técnica não é eficiente para a caracterização entre linhagens. Ao contrário, marcadores de RAPD permitem identificar linhagens, mas a alta variabilidade limita seu potencial como método auxiliar na identificação de espécies.

TACÃO et al. (2005) descreveram um método que permite a análise direta da diversidade de *Aeromonas spp.* em amostras ambientais, utilizando as técnicas PCR e DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) e tendo como região amplificada, o gene *gyr*-B, que segundo os resultados obtidos no estudo mostrou uma região mais eficiente na distinção das cepas estudadas, do que a região 16S rDNA.

SEN (2005) com o objetivo de criar um método que diminuísse a demanda de tempo e facilitasse a identificação das espécies do gênero *Aeromonas*, propôs três regiões alvo para um Multiplex-PCR, utilizando pares de iniciadores que amplificassem regiões dos genes: girase (*gyr*B), lipase

(*pla/lip*), elastase (*ahyB*) e 16S rDNA. O novo método permitiu que das 63 cepas isoladas no estudo, 59 estavam de acordo com os testes fenotípicos.

Em 2006, o sequenciamento do genoma da *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 foi completo, elucidando os mecanismos que contribuem na virulência e na adaptação metabólica, e que permite o microrganismo crescer nos mais variados ecossistemas, fatos que auxiliam no esclarecimento de como *A. hydrophila* é capaz de sobreviver em ambientes poluídos com baixas concentrações de oxigênio, observação do seu mecanismo de patogenicidade no homem, e em outros hospedeiros (SESHADRI et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa microbiológica no ambiente é necessária, para verificar a distribuição e o papel desses microrganismos em um ecossistema. Em Saúde Pública, é necessário o monitoramento de certos microrganismos que são patogênicos, bem como o seu potencial patogênico, para entender seu ciclo epidemiológico e planejar programas de vigilância em saúde.

Devido às semelhanças fenotípicas dentre as espécies de *Aeromonas*, e devido à diversidade desses organismos, sua identificação ao nível de espécie pode representar um processo exaustivo e complexo principalmente para o técnico de laboratório. Por outro lado, a incerteza na definição do posicionamento taxonômico de isolados de amostras clínicas pode ter como efeito muitos casos não elucidados, e desta forma não notificados.

O aumento de publicações onde *Aeromonas* foi considerado o patógeno principal, em muitos casos clínicos poderia sugerir algumas espécies de *Aeromonas* como patógenos emergentes (MERINO et al., 1995). De fato esses se encaixariam perfeitamente na descrição, caso não fosse a taxonomia controversa e a falta de estudos epidemiológicos que incluam esses organismos (RELMAN, 1997; DaSILVA e ICCARINO, 1999; CONWAY e ROPER, 2000; MAYER, 2000; SHEARS, 2000).

Apesar do número crescente de publicações envolvendo o potencial patogênico das bactérias do gênero *Aeromonas* poucos relatos de surtos foram publicados, e somente em algumas ocasiões foi possível observar, na literatura consultada, o direcionamento para a elucidação da epidemiologia dos isolados (MATTÉ, 2004; VALLY, 2004).

Porém as expectativas quanto à utilização de métodos moleculares na solução de divergências taxonômicas, da relação entre isolados ambientais e de casos clínicos e mesmo na busca da diversidade desses organismos têm levado os pesquisadores a utilizarem tais métodos como parte de seus estudos.

Os estudos realizados por diversos grupos que buscam a padronização de métodos para a determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas* revelaram discrepâncias na identificação desses organismos utilizando métodos moleculares e testes fenotípicos. A concordância entre os testes variou entre 55% para as cepas provenientes de clínicas e apenas 4% dos isolados ambientais de *Aeromonas* (BORREL et al., 1998; FIGUEIRAS, 2000; ØRMEN et al., 2005).

Diante disso, é fundamental que mais estudos sejam realizados, para elucidar o posicionamento taxonômico de bactérias do gênero *Aeromonas*, provenientes dos diferentes ecossistemas aquáticos, de amostras de alimentos e de amostras clínicas para um melhor entendimento do papel desses organismos nas doenças diarréicas e sistêmicas, como também desenvolver métodos que possam garantir a melhor forma de classificá-los e identificá-los para um rápido diagnóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Confirmar o posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas* isoladas de diferentes ambientes aquáticos utilizando a digestão dos fragmentos 16S rDNA com enzimas de restrição.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Amplificar e digerir com o grupo de enzimas de restrição selecionadas com base no banco de Dados GenBank, o fragmento 16S rDNA de cepas de *Aeromonas* previamente isoladas, e que não puderam ser identificadas por meio de métodos fenotípicos.

-Sequenciar os amplicons, de exemplares selecionados, e com base no banco de dados GenBank, confirmar a identificação das espécies obtidas através da digestão do 16S rDNA pelas enzimas de restrição.

-Comparar os resultados obtidos para os métodos moleculares com os resultados fenotípicos obtidos previamente.

-Propor um par de iniciadores gênero-específico para as bactérias do gênero *Aeromonas*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *Aeromonas*: que fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública -USP empregadas para este estudo são provenientes de amostras ambientais, foram identificadas por provas fenotípicas.

4.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas de *Aeromonas* foram acondicionadas e mantidas em frascos contendo caldo Lúria adicionado de glicerol a 40%, em freezer -70°C até o momento do uso.

As cepas foram reisoladas em meio de cultura Amido sem adição de ampicilina para verificação de pureza. Após o crescimento das colônias no meio Amido e estas apresentando as características dos membros pertencentes do gênero *Aeromonas*, foram submetidas ao teste de oxidase, e em caso de positividade a colônia era armazenada em meio Luria semi sólido.

Com base na análise da literatura consultada, foram selecionadas provas bioquímicas que pudessem, de acordo com as espécies propostas para o gênero *Aeromonas*, identificar os organismos do presente estudo para triagem. As provas selecionadas foram as seguintes: pesquisa de produção da enzima citocromo oxidase segundo Kovac, utilização de Arginina de hidrolase, lisina e ornitina descarboxilase, acidificação de sacarose, manitol, arabinose, salicina, e manose, hidrólise da esculina, produção de indol e de gás a partir da glicose e motilidade. Os resultados da série bioquímica foram comparados com

Bergey's Manual (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005) para determinação do posicionamento taxonômico das cepas.

4.2 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO 16S rDNA

Para extração do DNA genômico foi utilizado o método com CTAB (Brometo de cetil etil amônio) de acordo com o preconizado por MURRAY e THOMPSON (1980), e descrito por AUSUBEL et al. (1995).

A partir do DNA genômico purificado, o fragmento 16S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores universais descritos por Thompson et al. 2001, MH1: AGTTTGATCCTGGCTCAG e MH2:TACCTTGTTACGACTTCACCCCA. As condições de reação e ciclo de amplificação estão descritas a seguir:

Para cada 25 μ L de reação foram utilizados 5 μ L de DNA (50 μ g/ μ L); 2,5 μ L de tampão 10x; 1,5 Mm de cloreto de magnésio; 0,2 μ L de solução DNTP 25 Mm; 0,4 μ M de cada iniciador, 1,25U de polimerase termoestável (Taq-polimerase) e água Milli Q suficiente para completar o volume de 25 μ L.

Para amplificação foi empregado um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos compreendendo desnaturação a 95°C por 1,5 minutos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

4.3 SELEÇÃO DE ENZIMAS PARA RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO 16S rDNA DE CEPAS DE *Aeromonas sp.*

Para a seleção de enzimas de restrição que diferenciam as espécies de *Aeromonas*, foi utilizado o programa Webcutter (<http://users.unimi.it/~camelot/tools/cut2.html>) que tem como função listar as enzimas de restrição, posição do corte das enzimas e o número de cortes das seqüências submetidas. Entre as enzimas listadas pelo Webcutter foram previamente selecionadas enzimas que cortassem a seqüência de uma até três vezes, outro critério para seleção das enzimas era que o corte teria que ser localizado em regiões de diferenciação entre as espécies e ainda que os fragmentos fossem separados por gel de agarose convencional (superior a 50 pares de bases).

4.4 RESTRIÇÃO do 16S rDNA

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição e seus respectivos tampões e condições de temperaturas sugeridas pelos seus fabricantes para as diferentes enzimas.

- Visualização do perfil de restrição: O produto de digestão de cada cepa de *Aeromonas* foi separado por meio de eletroforese em gel de agarose 3%, em intensidade de corrente de 6V/cm por um período de 2 horas. Os perfis foram corados com Vistra Green (Amershan-GE®) e visualizados em sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP®) e o software Labworks (UVP®).
- Análise do perfil de restrição: Para determinação do peso molecular dos fragmentos obtidos a partir do perfil de restrição do DNA genômico das

cepas de *Aeromonas* estudadas, foi utilizado marcador de peso molecular 50pb (Amresco). A determinação da relação genética entre as cepas foi realizada com o auxílio do programa Gelworks 1D Advanced e Gelworks 1D Database V.4.01 (UVP) utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson.

4.5 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO 16S rDNA

Cerca de 200 µL do amplicom resultante da reação de PCR foi purificado através do sistema comercial disponível (Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System, Promega), e submetido diretamente ao sequenciamento (Genomic Engenharia Molecular Ltda). Os iniciadores empregados para o sequenciamento estão descritos no quadro 1

Quadro 1 Lista de iniciadores empregados para o sequenciamento do fragmento 16S rDNA de cepas de *Aeromonas* (~ 1.500 pares de base).

Iniciador	sequência
MH1	AGT TTG ATC CTG GCT CAG
MH2	TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CA
16F536	CAG CAG CCG CGG TAA TAC

As seqüências resultantes foram alinhadas manualmente contra seqüências disponíveis no banco de dados GenBank (www.ncbi.nih.gov/genbank) utilizando o software BioEdit. As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos Neighbour-joining e máxima parcimônia com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999).

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES

Os resultados obtidos para restrição do fragmento 16S rDNA e do sequenciamento desse mesmo fragmento foram comparados com as identificações obtidas previamente por testes fenotípicos com base na literatura disponível no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2005* (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH)

Para as cepas que haviam sido classificadas anteriormente com base nos testes fenotípicos, os resultados foram expressos em porcentagem de concordância e para as cepas de *Aeromonas* com características atípicas foi fornecido o posicionamento taxonômico.

4.7 DESENHOS DOS INICIADORES GÊNERO-ESPECÍFICOS.

Para realização do alinhamento do DNA genômico diferentes espécies de *Aeromonas* foram utilizadas as seqüências disponíveis das cepas padrão de *Aeromonas* conforme descrito no Quadro 2.

As seqüências do 16S rDNA das espécies conhecidas do gênero *Aeromonas* foram obtidas do GenBank. Para o alinhamento das seqüências foi utilizado o programa Bioedit, o programa também foi utilizado para verificar as regiões conservadas das espécies do gênero da qual derivou o par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*. O quadro 2 apresenta os números de acesso no Genbank, para as seqüências utilizadas para realização do alinhamento e desenvolvimento dos iniciadores gênero-específicos para *Aeromonas*.

Uma vez alinhadas as seqüências de todas as espécies do gênero *Aeromonas*, a etapa seguinte consistia em pesquisar regiões comuns e conservadas em todas as espécies do gênero *Aeromonas*.

Quando localizada uma seqüência comum e conservada entre todas as espécies, contendo entre 20 a 30 pares de bases, essa seqüência era testada no programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) O programa tem como função desenhar iniciadores para a seqüência desejada, apresentando dados como: número de pares de bases, valor de TM (ponto de fusão) e porcentagem de G/C (guanina e citosina) do iniciador desenhado.

A região utilizada para o desenho dos iniciadores gênero-específico precisa ser conservada, comum e específica entre os membros do gênero *Aeromonas*. Para verificar a especificidade teórica dos iniciadores desenhados pelo programa Primer3, foi utilizado o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) O qual utiliza o banco de dados do GenBank, comparando o fragmento com as seqüências disponíveis para os diferentes organismos. O par de iniciadores foi selecionado considerando o menor valor de E (Expect value) fornecido pelo banco de dados. Com base nesses parâmetros foram selecionadas as seqüências (BAUER e RØRVIK, 2007)

5 RESULTADOS

As cepas do gênero *Aeromonas* utilizadas para realização do estudo foram previamente identificadas e pertencentes à coleção de cultura do Laboratório da Faculdade de Saúde Pública – FSP – USP. Todas as cepas são provenientes de amostras ambientais.

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para série bioquímica das cepas utilizadas no presente estudo. Das quarenta cepas de *Aeromonas* selecionadas, 17,5% apresentaram características atípicas e foram classificadas como *Aeromonas* spp., 52,5% das cepas não puderam ser definidas em apenas uma única espécie pelos testes fenotípicos de acordo com o Manual Bergey (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005), e 30% das cepas foram submetidas a sua confirmação taxonômica. A tabela 1 mostra os resultados dos testes fenotípicos, das cepas de *Aeromonas* e os resultados da identificação utilizando as técnicas moleculares.

5.1 DESENHOS DOS INICIADORES GÊNERO-ESPECÍFICOS.

Para a pesquisa dos iniciadores gênero-específicos de *Aeromonas*, foram utilizados os seguintes programas, Bioedit, Primer 3 e BLAST.

As seqüências do 16S rDNA das espécies de *Aeromonas* que foram utilizadas para a pesquisa dos iniciadores gênero-específico e para a pesquisa de enzimas que identificassem as espécies de *Aeromonas*, foram obtidas no banco de dados GenBank, foram levadas em consideração apenas as cepas tipos da ultima edição do Manual Bergey (Quadro 2).

Tabela 1 Resultados obtidos nas provas bioquímicas para as cepas de *Aeromonas* empregadas no estudo e a determinação do posicionamento taxonômico pelo RFLP.

amostra	02	03	04	05	09	11	12	13	14	16
manitol	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Manose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salicina	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Esculina	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Omitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ident. bioq.	<i>A. allosacca rophila</i>	atípica	<i>A. allosacca rophila</i>	atípica	atípica	<i>A. media</i>	atípica	<i>A. encheleia/ eucrenophila</i>	<i>A. allosacca rophila</i>	<i>A. schubertii</i>
ident. RFLP	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. hydrophila</i>	trotta	<i>A. trotta</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
amostra	32	33	34	35	37	39	40	42	44	46
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sacarose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Salicina	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Esculina	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Omitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ident. bioq.	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	atípica	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. hydrophila/ bestiarum/ salmonicida</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>
ident. RFLP	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
amostra	47	48	50	51	52	53	75	77	78	79
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Esculina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Omitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ident. bioq.	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. caviae</i>	atípica	<i>A. shubertii/ jandaei/ trotta</i>	<i>A. shubertii/ jandaei/ trotta</i>
ident. RFLP	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
amostra	80	88	89	90	91	92	93	94	95	96
manitol	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
manose	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
sacarose	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
arabinose	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
salicina	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
esculina	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
arginina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
lisina	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ident. bioq.	<i>A. shubertii/ jandaei/ trotta</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. jandaei/ sobria/ popoffii/ eucrenophila</i>	<i>A. jandaei/ eucrenophila/ popoffii</i>	atípica	<i>A. jandaei/ trotta</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila/ popoffii</i>
ident. RFLP	<i>A. jandaei</i>	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>

Para análise foram acrescentados *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas* spp. HG11 e *Aeromonas arequipensis* (*Aeromonas* spp RC 50) e as seqüências do 16S rDNA das espécies *Aeromonas sharmana*^a, *Vibrio cholerae*, *Shewanella*, *Moritella*, *Plesiomonas shigelloides* foram utilizadas como controle negativo. O programa Bioedit foi utilizado para alinhar as seqüências do 16s rDNA das bactérias.

Durante a pesquisa de iniciadores gênero-específico para o gênero *Aeromonas* vários iniciadores foram desenhados para as regiões conservadas encontradas no 16S rDNA do gênero. Porém, quando era verificada a especificidade com o programa BLAST, a maioria das seqüências dos iniciadores submetidas, além de serem compatíveis ao 16s rDNA dos organismos do gênero *Aeromonas* também apresentavam compatibilidade com segmentos de DNA de organismos como: *Moritella* sp, *Shewanella denitrificans* e *Colwellia piezophila*.

A Figura 1 mostra as seqüências e as posições selecionadas para o desenho dos iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*. As regiões que demonstraram ter uma potencial especificidade para o desenho dos iniciadores gênero-específico corresponde a posição 475 até 495 da *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 para o iniciador foward, denominado Aero16-Fw (5'-GTGACGTTACTCGCAGAAGA-3') e a posição 1243-1263 para o iniciador reverso, Aero16-rev (5'-AGCTTGCAGCCCTCTGTACG-3'), resultando em um fragmento de 787 bp.

^a Segundo Martinez-Murcia et al. (2007) o microrganismo *Aeromonas sharmana* descrito por Saha et al (2006), não pertence ao gênero *Aeromonas*.

A figura 1 mostra que iniciador Aero16F flanqueia uma região de diferenciação entre as espécies de *Aeromonas*. Quando essa seqüência do iniciador foi submetida ao teste de especificidade utilizando o programa BLAST além dos membros do gênero *Aeromonas* os organismos *Moritella* sp, *Shewanella denitrificans* e *Colwellia piezophila* também constaram no resultado, ao contrário do que aconteceu com a seqüência do iniciador Aero16R quando apenas organismos do gênero *Aeromonas* constaram no resultado.

Utilizando os dois iniciadores para a reação obteve-se um fragmento de 787 pares de bases que diferenciou as cepas de *Aeromonas* de outras possíveis espécies que poderiam ser confundidas com os membros do gênero *Aeromonas* como *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides* e ainda *Aeromonas shamama* utilizando provas bioquímicas.

Para reação dos iniciadores gênero-específicos foi padronizado a seguinte reação de PCR, 3 µL de DNA (50 µg/µL); 5 µL de tampão 5x; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 200 µM DNTP; 0,2 µM de cada iniciador, 1.25U Go Taq polimerase (Promega) água Milli Q suficiente para completar o volume de 25 µL.

Para amplificação foi utilizado o equipamento Eppendorf Mastercycle® e foi empregado um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos compreendendo desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 66°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minutos; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. A presença dos fragmentos foi visualizada em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio.

Quadro 2 Relação das cepas tipo das espécies de *Aeromonas* pesquisadas e microrganismos relacionados, com seus respectivos números de acesso no GenBank.

Espécie	Cepa Tipo	Número de acesso GenBank
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	ATCC 51208	S39232.1
<i>Aeromonas bestiarum</i>	ATCC 51108	X60406.1
<i>Aeromonas caviae</i>	ATCC 15467	X60409.1
<i>Aeromonas encheleia</i>	LMG 16331	AJ458409.1
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	ATCC 23309	X74675.1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	X60404.1
<i>Aeromonas jandaei</i>	ATCC 49568	X74678.1
<i>Aeromonas media</i>	ATCC 33907	X74679.1
<i>Aeromonas popoffii</i>	LMG 17541	AJ224308.1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ATCC 33658	X60405.1
<i>Aeromonas shubertii</i>	ATCC 43700	X74682.1
<i>Aeromonas sobria</i>	ATCC 43979	X74683.1
<i>Aeromonas trola</i>	ATCC 49657	X60415.1
<i>Aeromonas veronii</i>	ATCC 35624	X74684.1
<i>Aeromonas bivalvium</i>	LMG 23376	DQ504429.1
<i>Aeromonas aquariorum</i>	MDC 47	EU085557.1
<i>Aeromonas</i> spp. HG11	ATCC 35941	X60417.1
<i>Aeromonas arequipensis</i>	RC 50	AF037271
<i>Aeromonas shamana</i>	GPTSA-6	DQ013306.1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14029	M59159.1
<i>Moritella marina</i>		AB038033.1
<i>Colwellia</i> SP SWI 25		EU432053.1
<i>Shewanella</i> sp		EU365537.1
<i>Vibrio cholerae</i>	CECT 514	X76337.1

Fonte: Genbank, 2008

Os iniciadores Aero16 foram usados para confirmar a posição taxonômica das 40 cepas previamente isoladas e caracterizadas por testes bioquímicos. A PCR demonstrou a presença da banda de 787 pb em todas as cepas testadas. A ausência do fragmento foi observada para *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *Plesiomonas shigelloides* and *Escherichia coli*. As reações utilizando os iniciadores gênero-específicos também foram executadas com DNA extraído por choque térmico e com a colônia, os resultados apresentados foram semelhantes quando usado o DNA purificado.

A figura 2, apresenta o fragmento amplificado (787 pares de bases), de 9 cepas de *Aeromonas* sp., utilizando os iniciadores gênero-específico Aero16F e Aero16R.

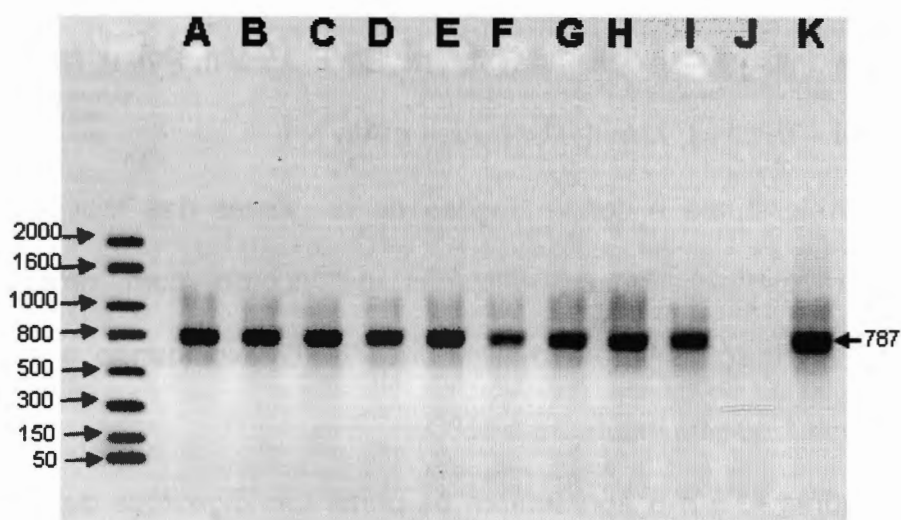


Figura 2 Gel de agarose contendo o fragmento de 787 bp para diferentes cepas de *Aeromonas* empregadas nesse estudo. Linha A até I - cepas de *Aeromonas* sp linha J – branco, linha K- controle: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

5.2 SELEÇÃO DE ENZIMAS PARA RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO 16S rDNA DE CEPAS DE *Aeromonas* sp.

A figura 3 apresenta um exemplo de uma região de diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* quando analisado o 16S rDNA.

Com base no esquema de cortes das enzimas as cepas de *Aeromonas* foram identificadas até o nível de espécie. O resultado da identificação por RFLP foi comparado com a identificação bioquímica previamente realizada (tabela 1).

Após a seleção das enzimas com o programa Webcutter foi realizada uma verificação dos cortes das enzimas no 16s rDNA em cada espécie de *Aeromonas*.

Baseando-se no 16S rDNA das espécies de *Aeromonas* disponíveis no GenBank, as enzimas^b selecionadas foram: *Bgl* II, *Hinc* II, *Pvu* II, *Nru* I, *Psh* A I, *Sfc* I, *Sna* B I, *Tth* 111 I, *Xho* II, *Pst* I, *Alu* I e *Atw* N I.

As temperaturas e concentrações de reagentes das reações com as enzimas de restrição foram realizadas de acordo com protocolo dos fabricantes. As reações foram realizadas à 37°C excetuando a enzima de restrição *Tth* III 1 que foi incubada à 65°C.

As figuras 4, 5 e 6 apresentam os perfis das digestões de 3 cepas de *Aeromonas*, utilizando as enzimas *Pst* I, *Xho* II e *SnaB* I, respectivamente. Que de acordo com esquema proposto de identificação utilizando as enzimas, foram identificadas como *Aeromonas hydrophila*.

^b Biolabs® *Hinc* II, *Nru* I, *Psh* A I, *Sfc* I, *Tth* 111, *Alu* I, *Atw* N I.
Amersham Bioscience® *Pvu* II, *Pst* I.
Promega® *Sna* B I, *Xho* II

A figura 7 mostra o esquema de identificação das espécies utilizando as enzimas restrição. O esquema inicia-se com enzimas que separam as espécies de *Aeromonas* em grupos e posteriormente, se necessário, com enzimas que cortem especificamente uma espécie.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE AEROMONAS UTILIZANDO RFLP

A tabela 1 mostra as características fenotípicas, a identificação baseada nos testes bioquímicos, identificação preliminar e identificação utilizando RFLP das 40 cepas selecionadas. Os resultados da identificação das espécies obtidos pela RFLP do 16S rDNA foram: *A. jandaei* 35%, *A. hydrophila* 30%, *A. trota* 5%, *A. aquariorum* 12,5%. *A. veronii* 10%, e *A. media* 7,5%.

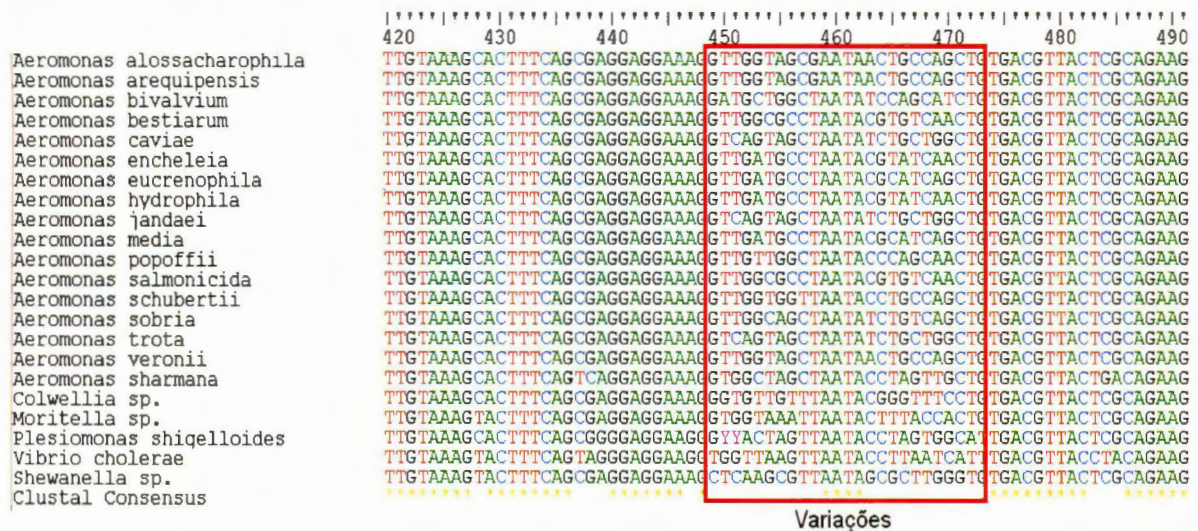


Figura 3 Imagem do programa Bioedit, da região selecionada mostra uma região onde o 16S rDNA apresenta variações entre as espécies de *Aeromonas*.

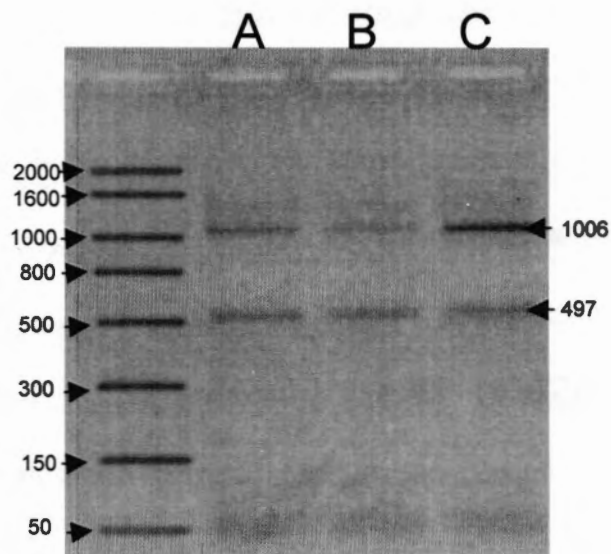


Figura 4 Perfil da digestão do 16S rDNA das espécies de *Aeromonas* com a enzima de restrição *Pst I*. **Linha A-** amostra 11, **linha B-** amostra 12, **linha C-** amostra 13.

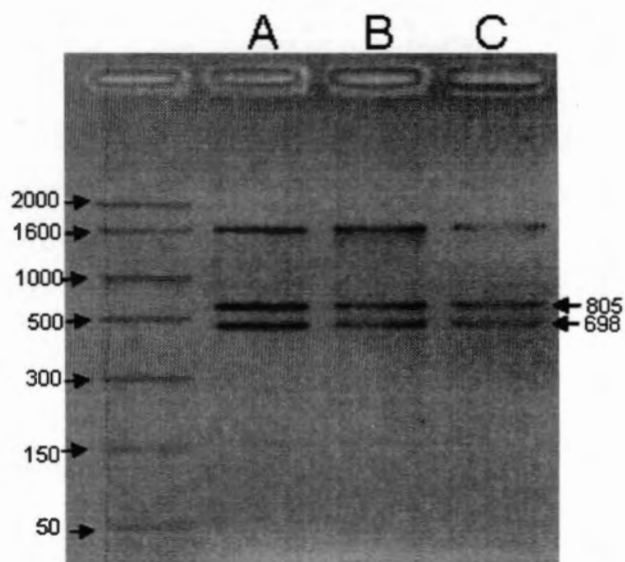


Figura 5 Perfil da digestão do 16S rDNA das espécies de *Aeromonas* com a enzima de restrição *Xho II*. **Linha A-** amostra 11, **linha B-** amostra 12, **linha C-** amostra 13.

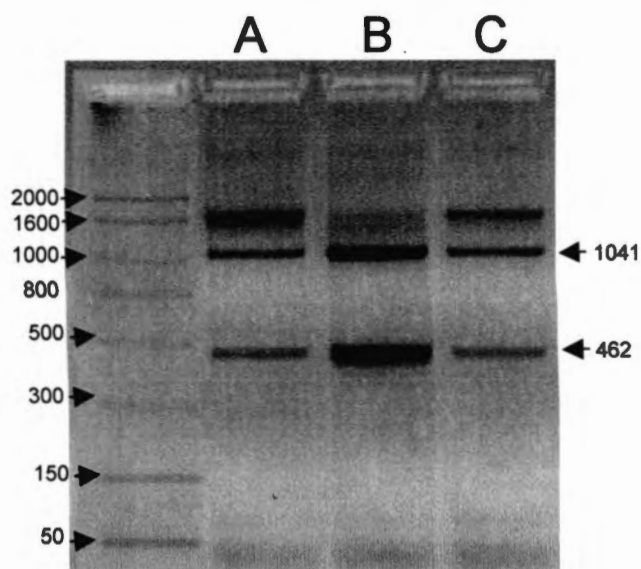


Figura 6 Perfil da digestão do 16S rDNA das espécies de *Aeromonas* com a enzima de restrição *SnaB I*. **Linha A-** amostra 11, **linha B-** amostra 12, **linha C-** amostra 13.

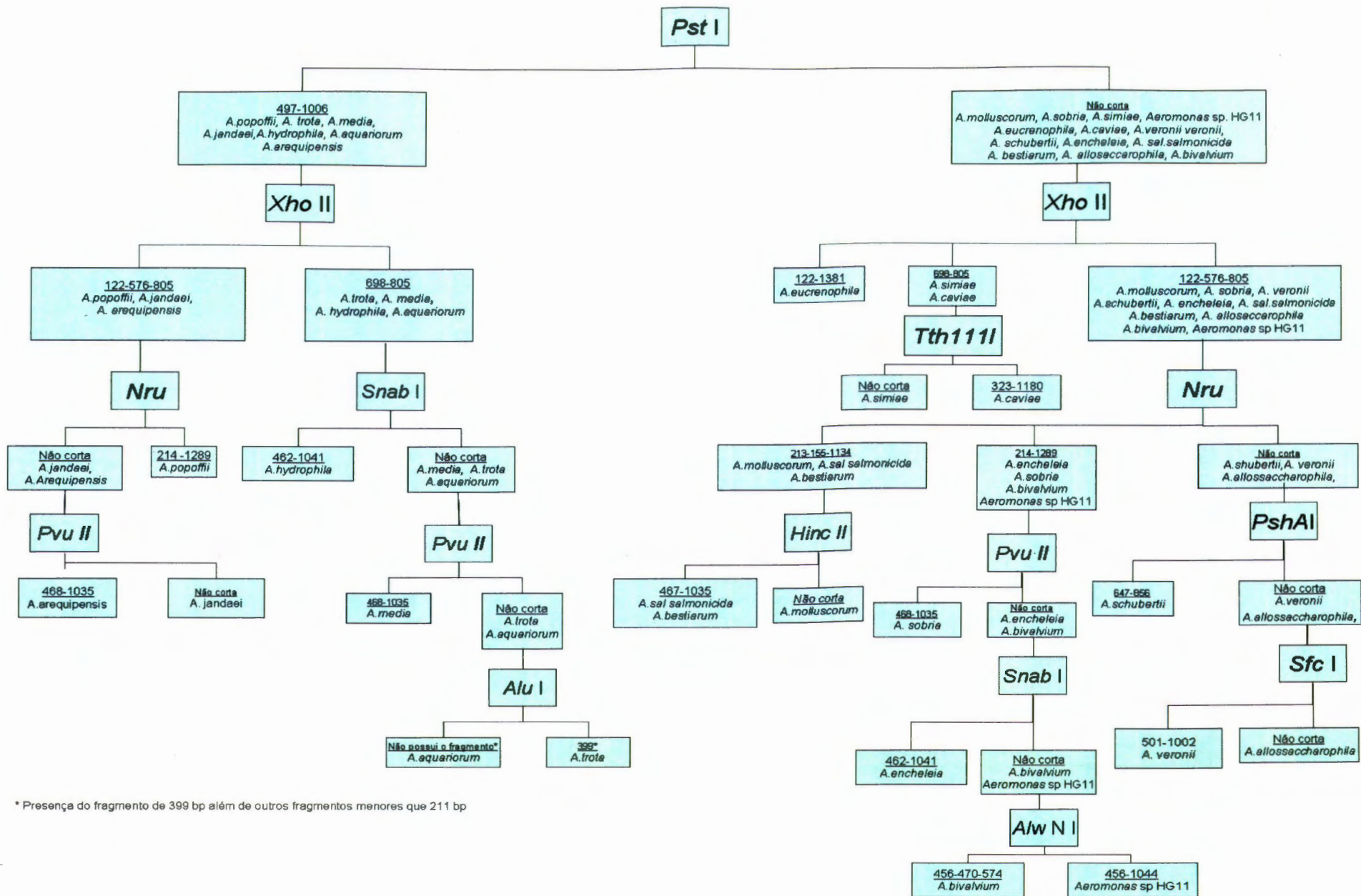
5.4 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO 16S rDNA

Após a identificação das cepas de *Aeromonas* em estudo, utilizando a restrição do fragmento 16S, 14 cepas identificadas pela RFLP do 16S foram selecionadas randomicamente para o seqüenciamento com o objetivo de confirmar a identificação desses organismos.

Os seqüenciamentos do 16S rDNA das 14 cepas de *Aeromonas* demonstraram que o esquema de identificação proposto foi eficaz em 100% na diferenciação das cepas até o nível de espécie. A figura 8 apresenta a posição das cepas selecionadas na árvore filogenética gerada pelo método neighbor-joining baseado nas seqüências do 16S rDNA das espécies de *Aeromonas*.

Os exemplares foram seqüenciados e os resultados obtidos foram submetidos ao sistema Blast que confirmou o posicionamento taxonômico das

cepas. As seqüências obtidas serão depositadas no banco de dados GenBank para que seja disponibilizado internacionalmente.



* Presença do fragmento de 399 bp além de outros fragmentos menores que 211 bp

Figura 7 Esquema de identificação de espécies de *Aeromonas* por RFLP do 16S rDNA. Os números das caixas correspondem aos tamanhos das bandas.

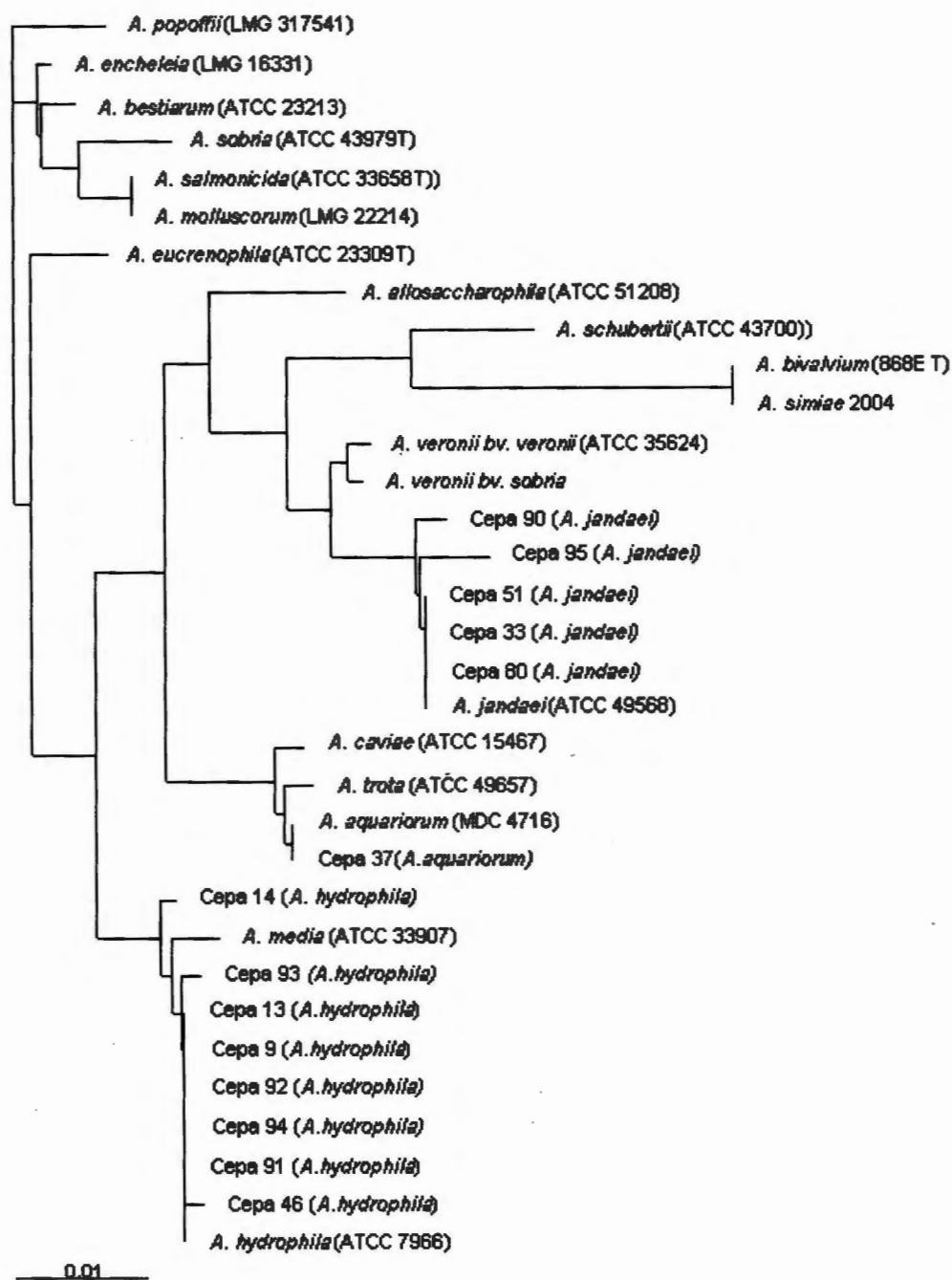


Figura 8 Árvore filogenética baseada no método neighbor-joining, utilizando as seqüências do gene 16S rRNA (1322 pb) da cepa tipo de cada espécie de *Aeromonas*, depois de 1000 simulações. A barra estima as divergências entre as seqüências. As seqüências das cepas tipo das diferentes espécies são originárias do banco de dados GenBank as demais são oriundas de banco de dados do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP

6 DISCUSSÃO

No presente estudo cepas de *Aeromonas* apresentando características atípicas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* utilizando iniciadores gênero-específicos e posteriormente a discriminação entre espécies foi realizada através da digestão do fragmento 16S rDNA com enzimas de restrição.

A caracterização do gene 16s rDNA é bem estabelecida como um método padrão para a identificação de espécies, gêneros e famílias de bactérias (RODICIO et al., 2004). O gênero *Aeromonas* é facilmente triado por testes bioquímicos, mas podem ocorrer identificações contraditórias que podem levar a determinação equivocada das espécies. (SAHA e CHAKRABARTI, 2006; MARTINEZ-MURCIA et al., 2007). Iniciadores espécie-específicos foram desenhados, porém eles só são úteis em estudos que procuram por apenas uma espécie de *Aeromonas* especificamente (SEN, 2005).

Os iniciadores desenhados neste trabalho são úteis para auxiliar microbiologistas na detecção de *Aeromonas spp.* e diferenciar o gênero de outros organismos proximamente relacionados ou ainda triar colônias provenientes de uma variedade de meios de cultura onde as características de *Aeromonas* podem ser confundidas.

As seqüências completas do 16s rDNA dos membros do gênero *Aeromonas* têm sido publicadas, apresentando um alto nível de similaridade (LAGANOWSKA et al., 2004). Condição que permite com que iniciadores gêneros-específicos sejam pesquisados nessa região.

Devido ao alto nível de similaridade que a região 16S rDNA apresenta entre as espécies do gênero *Aeromonas*, alguns trabalhos utilizam outras regiões ou genes para identificar cepas de *Aeromonas*.

Outros genes são atualmente considerados apropriados para diferenciar espécies de *Aeromonas*, *rpoB*, *rpoD*, *gyrB* e mais recentemente *recA*, mas ainda é necessário seqüenciar um numero maior de cepas para se obter uma fonte de dados considerando as variações geográficas e a diversidade de cada espécie de *Aeromonas*, permitindo assim, determinar a variabilidade destes genes na determinação da taxonomia destes organismos. Além disso, o seqüenciamento não é uma ferramenta que pode ser aplicada na rotina laboratorial para se ter um retorno rápido dos resultados.

CÁSCÓN et al.(1997) identificaram as cepas de *Aeromonas* realizando uma RFLP-PCR do gene *aroA*, segundo os autores, a seqüência deste gene é conservado entre bactérias gram-negativas e pode ser usado como uma ferramenta apropriada para identificação até o nível de gênero em bactérias.

LAGANOWSKA et al. (2004) identificaram cepas de *Aeromonas*, utilizando RFLP na região intergênica 16S-23S rDNA, pois segundo os autores, devido a sua variação a região 16S-23S rDNA seria mais adequada do que a região 16S rDNA para identificar as espécies do gênero *Aeromonas*, os autores separaram as seguintes espécies *A.hydrophila*, *A.bestiarum*, *A. salmonicida*, *A.caviae*, *A.media*, *A.schubertii*, *A.allosaccharophilla*, *A.popoffii* e *A.culicicola*.

Ao contrário do que ocorre na rotina laboratorial, em um trabalho de pesquisa, como por exemplo, na descrição de uma nova espécie, indubitavelmente, são necessários diferentes estratégias para confirmar a real posição taxonômica do novo organismo.

RFLP é usado amplamente para se identificar as espécies de bactérias, inclusive na rotina laboratorial. O RFLP do 16S rDNA para se determinar a posição taxonômica de cepas de *Aeromonas* usando um esquema de diferentes enzimas está disponível na literatura (GRAF, 1999). No entanto, muitos desses esquemas não permitem a identificação de todas as espécies de *Aeromonas*, ou sempre há um grupo de duas ou três espécies que não podem ser separadas das outras e alguns autores se utilizam de enzimas que geram um grande número de fragmentos, dificultando a análise dos resultados (BORRELL et al., 1997; FIGUERAS et al., 2000; LEE et al., 2002; GHATAK et al., 2007).

BORRELL et al.(1997) com o intuito de identificar cepas de *Aeromonas*, utilizaram o método RFLP do 16s rDNA, as enzimas selecionadas para o estudo foram as seguintes, *Alu I*, *Mbo I* e *Hae III* porém, segundo FIGUERAS et al. (2000), o método utilizado por BORRELL et al. não permitia separar as espécies *A.salmonicida*, *A.bestiarum*, e *A.popoffii*.

FIGUERAS et al. (2000) para identificar espécies de *Aeromonas*, também utilizaram RFLP porém, os autores estenderam o método utilizado por Borrell et al. acrescentando mais três enzimas, *Nar I*, *Alw NI* e *Pst I* (ou *SfaNI*), possibilitando desse modo, segundo os autores, a identificação de todas espécies de *Aeromonas* descritas até então.

LEE et. al (2002) com o objetivo de investigar a distribuição de espécies do gênero *Aeromonas* em trutas de fazendas e nos riachos, desenharam um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*, diferente do par proposto do presente estudo, e identificaram as espécies utilizando RFLP com as enzimas *Alu I*, *Cfo I*, *Pvu II* e *Xho II*.

Com o objetivo de caracterizar apenas as espécies de *Aeromonas* que possui importância médica, Ghatak et al. em 2007 realizaram um estudo para identificar cepas de *Aeromonas* através do método RFLP na região 16s rDNA, foram utilizadas três enzimas: *BstSNI*, *Mbo I*, e *Pvu II*. Que segundo os autores estas, eram responsáveis por determinar cortes específicos para as seguintes espécies de *Aeromonas* que possuem importância médica: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *Aeromonas veronii* (GHATAK et al., 2007).

No presente estudo as enzimas selecionadas *Pst I*, *Xho II*, *Nru I*, *Pvu II*, *Sna BI*, *Tth111I*, *Hinc II*, *Psh AI*, *Sfc I*, *Alu I* e *Alw NI* foram distribuídas no esquema que permite a identificação de todas as espécies de *Aeromonas*, incluindo a mais recente espécie descrita *Aeromonas aquariorum* (MARTINEZ-MURCIA et al., 2008) (Figura 7) O esquema proposto é capaz de diferenciar todas as espécies descritas do gênero *Aeromonas*, mesmo aquelas que possuem diferenças mínimas na seqüência do 16S rDNA.

O presente estudo propõe um esquema de identificação utilizando RFLP, porém, foram selecionadas enzimas que cortem o 16S rDNA dos membros do gênero *Aeromonas* em regiões que as diferenças sejam bem conhecidas, pois como já observado por MORANDI et al.(2005), entre as seqüências do 16S rDNA de cepas *Aeromonas* há uma heterogeneidade

intragenômica e a utilização de enzimas que cortem os 16S rDNA em vários sítios aumentaria a probabilidade dessas regiões heterogêneas serem cortadas, podendo levar assim um erro na identificação das espécies de *Aeromonas*.

Em estudo realizado por MARTINEZ-MURCIA et al. 2005, que tinham como objetivo analisar as discrepâncias fenotípicas, genotípicas e filogenéticas entre as espécies *A.salmonicida* e *A.bestiarum*, os autores verificaram a impossibilidade de separar as duas espécies por testes bioquímicos, bem como, por RFLP do gene 16S rDNA ou RFLP do espaço intergenico 16-23S rDNA.

Como observado em estudos filogenéticos do gênero *Aeromonas*, as espécies *A. bestiarum* e *A. salmonicida* são muito próximas, tanto como a seqüência do 16S rDNA como os outros genes. (YANEZ et al., 2003, KUPFER et al. 2006, SAAVENDRA et al, 2006). Os resultados do presente estudo demonstram que estas duas espécies não podem ser separadas baseando-se na seqüência do 16S rDNA (YANEZ et al., 2003, KUPFER et al., 2006, SAAVENDRA et al., 2006).

Os resultados do presente estudo corroboram com o estudo publicado por SAAVEDRA et al. (2006), que demonstram a proximidade entre as espécies *A.veronii* e *A. allosaccharophila* e a dificuldade na determinação da posição taxonômica destas espécies, por métodos bioquímicos. Devido ao comportamento bioquímico variável da espécie *A. allosaccharophila*, ela pode ser a espécie classificada quando características atípicas estão presentes nos testes bioquímicos para muitas espécies de *Aeromonas*,

como por exemplo, *A. veronii*, *A. hydrophila* ou *A. trota* (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

A congruência entre os testes fenotípicos e genotípicos foram avaliados neste trabalho e foi demonstrado que há variações nas respostas das bactérias aos testes bioquímicos, podendo levar a uma identificação controversa das cepas, principalmente de amostras de origem ambiental (ABBOT et al., 2003; MARTINEZ-MURCIA et al., 2005; ØRMEN et al., 2005).

Devido ao aumento do número de espécies reconhecidas do gênero *Aeromonas*, e do número de cepas que apresentam reações bioquímicas atípicas, identifica-las vêm se tornando cada vez mais difícil tanto para as espécies antigas quanto para as novas espécies do gênero (ABBOT et al., 2003).

A discordância entre os resultados obtidos em ambos os métodos também foi observada por ØRMEN e colaboradores em trabalho no qual o autor apresenta os seguintes dados, 55% (52/95) da identificação das amostras clínicas obtidas através de métodos bioquímicos estava em concordância com os resultados obtidos com a RFLP, e nas cepas isoladas a partir de amostras ambientais, 4% (3/72) dos resultados da identificação bioquímica estavam de acordo com os resultados obtidos através da RFLP. As diferenças nos métodos de identificação das cepas isoladas do ambiente foram mais divergentes, os autores sugerem que o fato se deve ao esquema bioquímico de espécie-diagnóstica ter sido desenvolvido baseado em dados de cepas clínicas envolvendo apenas sete espécies (ØRMEN et al., 2005).

Segundo os mesmos autores, amostras isoladas do ambiente são mais heterogêneas do que as isoladas de fezes humanas, os perfis bioquímicos das amostras ambientais são menos conhecidos comparando com amostras clínicas, como também, não há dados suficientes para realizar uma identificação fenotípica completa .

Diversos autores que utilizaram os métodos convencionais para identificação de cepas de *Aeromonas* relatam a presença de características atípicas. Para essas amostras é usualmente designado o termo *Aeromonas sp.* (MATTÉ, 1995; ABBOT et al., 2003; HARF-MONTEIL et al., 2004).

Mesmo em cepas ambientais que apresentaram características fenotípicas atípicas, com a utilização do par de iniciadores gênero-específico, aliado ao esquema de identificação utilizando enzimas de restrição, descritos no presente trabalho, foi possível identificar os membros do gênero *Aeromonas* com uma maior precisão. Uma vez que, observando a árvore filogenética (figura 8): 14 cepas identificadas por RFLP que foram submetidas ao seqüenciamento do fragmento 16S rDNA tiveram uma maior aproximação com as seqüências do 16S rDNA das cepas tipo de suas respectivas espécies.

Os métodos convencionais dependem da expressão fenotípica de certas características bacterianas que podem ser variáveis; já os métodos moleculares permitem a observação direta dos genótipos, sendo que a aplicação desta tecnologia na área clínica ou ambiental proporciona interpretação com base em dados altamente reprodutíveis (MATTÉ, 1996).

Diversos trabalhos foram publicados nos quais microorganismos do gênero *Aeromonas* foram isolados em diversos tipos de fonte: em ambientes aquáticos já foram isolados em água doce, água salgada, água de abastecimento e em água poluídas. Em infecções já foram isolados microorganismos do gênero *Aeromonas* em: peixes, répteis, anfíbios e humanos. Como também em alimentos tais como: em amostras de carne bovina, frangos, leite, queijo, frutos do mar, ovos, peixes, ovos de peixe, camarão, abatedouro de suínos e em vegetais (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Devido a essa vasta distribuição e ao aumento de publicações envolvendo membros do gênero *Aeromonas* como patógenos principal, a identificação desses microrganismos até o nível de espécie se torna importante, não só para casos clínicos isolados, como também para água de abastecimento, para que se possa ter um melhor entendimento de sua ecologia e mecanismo de patogênese (MERINO et al., 1995; SEN e ROGERS, 2004).

O presente estudo propõe a utilização de iniciadores específicos para a identificação inicial de cepas sugestivas de pertencerem ao gênero *Aeromonas*, e descreve um esquema para determinação das diferentes espécies através da restrição do fragmento 16S rDNA que podem ser empregados na rotina laboratorial, como também facilitar em estudos epidemiológicos em relação ao gênero *Aeromonas*, e na determinação da real distribuição desses organismos nos diferentes ambientes, em alimentos e em casos clínicos.

7 CONCLUSÃO

- Com a utilização da digestão do fragmento 16S rDNA foi possível determinar a posição taxonômica das quarentas cepas do gênero *Aeromonas* isoladas de diversos ambientes aquáticos. A identificação das espécies de *Aeromonas* utilizando o método RFLP apresentou o seguinte resultados: *A. jandaei* 35%, *A. hydrophila* 30%, *A. trota* 5%, *A. aquariorum* 12,5%. *A. veronii* 10%, e *A. media* 7,5%.
- Com a amplificação do fragmento 16S rDNA e sua digestão, utilizando as enzimas de restrição selecionadas para identificação das espécies de *Aeromonas*, foi possível identificar até o nível de espécie quarenta cepas de *Aeromonas* previamente isoladas
- O sequenciamento foi congruente com o resultado obtido através da identificação utilizando as enzimas de restrição.
- Com base nas seqüências do 16S rDNA das espécies do gênero *Aeromonas* obtidas no banco de dados Genbank foi proposto um par de iniciadores gênero-específicos para o gênero *Aeromonas*.

8 REFERÊNCIAS

- Abbott SL, Cheung WKW, Michael Janda JM. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2348-57.
- Altwegg M, Geiss HK. *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit Vet Microbiol.* 1999;16:253-86.
- Arora S, Agarwal RK, Bist B. Comparison of ELISA and PCR vis-a-vis cultural methods for detecting *Aeromonas* spp. in foods of animal origin. *Int J Food Microbiol.* 2006; 106: 177-83.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short protocols in Molecular Biology* 1995. John Wiley & Sons, USA
- Bauer A , Rørvik LM. A. Bauer and L.M. Rørvik. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Lett in Appl Microbiol.* 2007;45:371-5
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1671-4.
- Cansian RL, Floriani STR, Valduga E. Microbiological analysis of critical points in the chicken industry. *Braz. arch. biol. technol.* 2005; 48: 403-406.
- Cascón SA, Anguita CJ, Hernanz MC, Sánchez SM, Yugueros MJ, Naharro CG. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;156(2):199-204.
- Chang CF, Chen TL, Chen TW, Yang WC, Lin CC. Recurrent dialysis-associated *Aeromonas hydrophila* peritonitis: reports of two cases and review of the literature. *Perit Dial Int.* 2005; 25: 496-9.
- Conway DJ e Roper C. Micro-evolution and emergence of pathogens. *Int J Parasitol* 2000; 30:1423-1430.

Costa FN, Rossi Jr OD. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. Arq Bras Med Vet Zootec.2002; 54: 534-535.

DaSilva E e Iccarino M. Emerging diseases: a global threat. Biotech Advances 1999; 17:363-384.

De Gascun CF, Rajan L, O'Neill E, Downey P, Smyth EG. Pancreatic abscess due to *Aeromonas hydrophila*. J Infect. 2006.

Delamare APL, Ártico LA, Grazziotin FG, Echeverrigaray S, Costa SOP. Total protein electrophoresis and RAPD fingerprinting analysis for the identification of *Aeromonas* at the species level. Braz. J. Microbiol. 2002; 33: 358-62.

EPA. United States Environmental Protection Agency. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington, DC; 2006.

Esteve C, Gutiérrez MC, Ventosa A. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. Int J Syst Bacteriol. 1995 Jul;45(3):462-6.

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

Evangelista-Barreto NS, Vieira RHSF, Carvalho FCT, Torres RCO, Sant'Anna ES, Rodrigues DP, Reis CMF. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2006;48: 129-133.

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

Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. Curr Microbiol. 2004; 49: 255-60.

- Gelsomino R, Vancanneyt M, Vandekerckhove TM, Swings J. Development of a 16S rRNA primer for the detection of *Brevibacterium* spp. Lett in Appl Microbiol. 2004; 38: 532-5.
- Ghatak S, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. Lett Appl Microbiol. 2007; 44(5):550-4.
- Graf J. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. J Clin Microbiol. 1999;37(10):3194-7.
- Guerra IMF, Fadanelli R, Figueiró M, Schreiner F, Delamare APL, Wollheim C, Costa SOP, Echeverrigaray S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. Braz. J. Microbiol., Dec 2007; 38(4): 638-643.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98. [Disponível on line].
- Harf-Monteil C, Flèche AL, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Inter J Syst Evolut Microbiol. 2004; 54: 481-5.
- Herrera FC, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. J Appl Microbiol. 2006; 100: 527-36.
- Hiransuthikul N, Tantisiriwat W, Lertutsahakul K, Vibhagool A, Boonma P. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. Clin Infect Dis. 2005; 42: 93-6.
- Hofer E, Reis CM, Theophilo GN, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques M de F. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39: 217-20.

Hua HT, Bollet C, Tercian S, Drancourt M, Raoult D. *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5427-8.

Huys G, Pearson M, Kämpfer P, Denys R, Cnockaert M, Inglis V, Swings J. *Aeromonas hydrophyla* subsp. *Ranae* subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. Int J Syst Evolut Microbiol. 2003; 53: 885-91.

Huys G, Cnockaert M, Swings J. *Aeromonas culicicola* Pidiyar et al. 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner et al. 1987. Syst Appl Microbiol. 2005;28(7):604-9.

Isonhood JH, Drake M. *Aeromonas* species in foods. J Food Prot. 2002; 65:575-82.

Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndrome associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Review. 1991; 4:397-410.

Kiebre-Toe MB, Lacheretz A, Villard L, Richard Y, Kodjo A. Pulsed-field gel electrophoresis profiles of aeromonads isolated from healthy and diseased *Helix aspersa* from French snail farms. Can J Microbiol. 2005; 51: 817-20.

Kirov SM. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. Int J Food Microbiol. 1993;20(4):179-98.

Krejci E, Andelova A, Porazilova I, Sedlacek I. *Aeromonas* spp. as the causative agent of acute diarrhoea in children under 1 year of age. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2006; 55: 92-8.

Laganowska M, Kaznowski A. Restriction fragment length polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer of *Aeromonas* spp. Syst Appl Microbiol. 2004;27(5):549-57.

Lai CC, Shiao CC, Lu GD, Ding LW. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: Rare pathogens of infection in a burn patient. *Burns*. 2006.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [homepage na internet]. [atualizado em 12 dez 2006; acesso em 17 dez 2006]. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/a/aeromonas.html>

Lee C, Cho JC, Lee SH, Lee DG, Kim SJ. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J Appl Microbiol*. 2002;93(6):976-85.

Martin-Carnahan, A. & Joseph, S. W. (2005). Order XII. Aeromonadales ord. nov. In: Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. ed. Nova York: Springer; 2005. v.2, parte B, p.556.

Martinez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E, Collins MD. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992 Mar 15;70(3):199-205.

Martinez-Murcia AJ, Soler L, Saavedra MJ, Chacon MR, Guarro J, Stackebrandt E, Figueras MJ. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *Int Microbiol*. 2005; 8: 259-69.

Martínez-Murcia AJ, Figueras MJ, Saavedra MJ, Stackebrandt E. The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol*. 2007 Mar;10(1):61-4.

Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008 Mai; 58:1169-75.

Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2003; 4: 61-9.

Matté MH. Ribotipagem de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sóbria* e *Aeromonas jandaei* potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga, São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1996.

Matté MH. Aplicação de métodos moleculares no estudo de organismos do gênero *Aeromonas* [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

Mayer JD, Geography, ecology and emerging infectious diseases. *Social Science Medicine* 2000; 50:937-952.

McMahon MA, Wilson IG. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2001; 70: 155-62.

Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomas JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol.* 1995; 28: 157-68.

Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas molluscorum* sp.nov. Isolated from bivalve molluscs. *J Appl Microbiol.* 2004; 54: 2073-8.

Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57(3):582-7.

Morandi A, Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Graf J. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol.* 2005; 187(18):6561-4.

Morita M. Avaliação da qualidade sanitária e ocorrência de *Aeromonas* spp em lagoas de pesque-pague da região metropolitana de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

Murray MG e Thompson WF. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 4321-5.

Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan AA, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 6461-6.

Ørmen O, Granum PE, Lassen J, Figueiras MJ. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp.. *APMIS* 2005; 113:203-7.

Ottaviani D, Santarelli S, Bacchiocchi S, Masini L, Ghittino C, Bacchiocchi I. Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. *Food Microbiol.* 2006; 23 :418-22.

Papageorgiou DK, Melas DS, Abraham A, Angelidis AS. Growth of *Aeromonas hydrophila* in the whey cheeses Myzithra, Anthotyros, and Manouri during storage at 4 and 12 degrees C. *J Food Prot.* 2006; 69:308-14.

Pavan ME, Abbot SL, Zorzópulos J, Janda JM. *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int J Syst Evolut Microbiol.* 2000; 50: 1119-24.

Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2004;24: 562-566.

Pidiyar V, Kasnowski A, Narayan NB, Patole M, Shouche YS. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Ins J Syst Evolut Microbiol.* 2002; 32 :1723-8.

Pillai L, Sha J, Erova TE, Fadl AA, Khajanchi BK, Chopra AK. Molecular and functional characterization of a ToxR-regulated lipoprotein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* 2006; 74: 3742-55.

Popoff M, Coynault C. Use of DEAE-cellulose filters in the S1 nuclease method for bacterial deoxyribonucleic acid hybridization. *Ann Microbiol (Paris)*. 1980; 131A(2):151-5

Presley SM, Rainwater TR, Austin GP, Platt SG, Zak JC, Cobb GP, Marsland EJ, Tian K, Zhang B, Anderson TA, Cox SB, Abel MT, Leftwich BD, Huddleston JR, Jeter RM, Kendall RJ. Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following Hurricane Katrina. *Environ Sci Technol*. 2006; 40: 468-74.

Rehulka J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Vet Brno*. 2002; 71: 351-360

Relman DA. Emerging infections and newly-recognised pathogens. *Netherlands J Med* 1997; 50:216-220.

Roberts MT, Enoch DA, Harris KA, Karas JA. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 241-3.

Rocha SM. Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no Município de Lins – SP [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

Rodicio Mdel R, Mendoza Mdel C. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22: 238-45.

Rossi Jr OD, Amaral LA, Filho NA. Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000; 52: 549-553.

Rossi Jr OD, Amaral LA, Filho NA, Schocken-Iturrino RP. Enterotoxigenicidade de cepas de *Aeromonas* sp. isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001; 53: 589-594.

Saha P, Chakrabarti T. *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56: 1905-9.

Saveedra MJ, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Update phylogeny of the genus *Aeromonas*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56: 2481-7.

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

Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. Can J Microbiol. 2005; 51: 957-66.

Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q, Rosovitz MJ, Madupu R, Tallon L, Kim M, Jin S, Vuong H, Stine OC, Ali A, Horneman AJ, Heidelberg JF. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. J Bacteriol. 2006; 188: :8272-82.

Sharma A, Dubey N, Sharan B. Characterization of aeromonads isolated from the river Narmada, India. Int J Hyg Environ Health. 2005; 208: 425-33.

Shears P. Emerging and reemerging infections in africa: the need for improved laboratory services and disease surveillance. Microbes Infect 2000; 2:489-495.

Shen FT, Young CC. Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus *Gordonia* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. FEMS Microbiol Lett. 2005; 250: 221-7.

Snyder L, Champness W. Molecular genetics of bacteria. Washington DC: ASM; 1997.

Sousa JA, Silva-Souza AT. Bacterial Community Associated with Fish and Water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil. Braz. arch. biol. technol.2001; 44: 373-381.

Tacão M, Moura A, Alves A, Henriques I, Saavedra MJ, Correia A. Evaluation of 16S rDNA- and gyrB-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol Lett. 2005; 246: 11-8.

Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol*. 2001; 24(4):520-38.

Tsai MS, Kuo CY, Wang MC, Wu HC, Chien CC, Liu JW. Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006; 39: 150-4.

Vally H, Whittle A, Cameron S, Dowse GK, Watson T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* wound infections associated with mud football. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 1084-9.

Villarruel-Lopez A, Fernandez-Rendon E, Mota-de-la-Garza L, Ortigoza-Ferado J. Presence of *Aeromonas* spp in water from drinking-water- and wastewater-treatment plants in Mexico City. *Water Environ Res*. 2005; 77: 3074-9.

Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *J Fish Dis*. 2005; 28: 141-50.

WHO- World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality [guia na internet]. [acesso em 27 nov. 2006]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob2.pdf

Wu CJ, Wu JJ, Yan JJ, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Hsin-I Shih, Wu HM, Wang LR, Ko WC. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *J Infect*. 2006.

Yanez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53:875-883.

Zhi XY, Tang SK, Li WJ, Xu LH, Jiang CL. Newgenus-specific primers for the PCR identification of novel isolates of the genus *Streptomonospora*. FEMS Microbiol Lett. 2006; 263: 48-53.