

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* EM OSTRAS (*Crassostrea*
rhizophorea) E ÁGUA DE CULTIVO: CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

Ana Carolina Miranda de Melo

São Luis-MA
2010

ANA CAROLINA MIRANDA DE MELO

BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* EM OSTRAS (*Crassostrea rhizophorea*) E ÁGUA DE CULTIVO: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francisca Neide Costa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozângela Zacarias Machado

São Luis-MA

2010

Melo, Ana Carolina Miranda de.

Bactérias do gênero “Aeromonas” em ostras (*Crassostrea rhizophorea*) e água de cultivo: Caracterização bioquímica e molecular/ Ana Carolina Miranda de Melo. – São Luís, 2010.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Curso em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Neide Costa

1. Acromonas. 2. Ostras. 3. Água. 4. PCR. I. Título.

CDU 594.11:577

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ___/___/___ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior

1º Membro

Prof^a. Dr^a. Alcina Vieira de Carvalho Neta

2º Membro

Prof^a Dr^a. Francisca Neide Costa

Orientadora

Dedico

Ao meu Marido José Ribamar da
Silva Júnior e ao nosso filho José
Gabriel de Melo Silva, pelo sentimento
de amor que nos une.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão –FAPEMA, pelo auxílio financeiro;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pelo financiamento do projeto;

Aos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, de Imunoparasitologia e de Microbiologia de Alimentos e Água da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista-FCAV/UNESP;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Francisca Neide Costa pelos valiosos ensinamentos e pelo apoio dado durante a realização deste trabalho;

À Prof^a Dr^a Rozângela Zacarias Machado pela oportunidade oferecida ao desenvolvimento deste trabalho, pela experiente orientação e ajuda dada durante a realização do mesmo, pela amizade, carinho e pelos momentos agradáveis proporcionados;

Ao Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior por permitir o uso do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água/FCAV-UNESP para realização da parte experimental deste trabalho, pelos ensinamentos e sugestões, pela atenção e por todo apoio dado;

Aos funcionários Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibelli Junior (Diba) pela grande ajuda e pelos momentos de alegria;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água/FCAV-UNESP Thaís, Viviane (vivi), Fernanda e Bruna pela ajuda e momentos agradáveis;

A todos os colegas do Laboratório de Imunoparasitologia/FCAV-UNESP, em especial ao Marcos André (Marquinhos) e a Márcia Jusi pela atenção, ensinamentos e grande ajuda;

As colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água-UEMA, Virami, Daniela Aguiar, Daniele Lopes e Ilderlane, pela ajuda com as análises;

A amiga Rejeana Lima, pela ajuda com as atividades laboratoriais, pelas sugestões e pelos momentos agradáveis vividos;

Ao Prof. Dr. Haroldo Gomes Barroso pela ajuda na indicação dos locais de coleta e pelo auxílio na logística de realização deste trabalho;

Ao Sr. "Juven", responsável pelo cultivo de ostras no município de Raposa, por permitir a realização desta pesquisa e por toda ajuda dada durante as coletas das amostras;

A todos os meus colegas da turma do Mestrado em Ciências Animal-UEMA especialmente Francisca Andréia, Elba, Joyce, Selma e Ana Paula, pelo apoio e pelos momentos felizes;

Aos Professores do Curso de Mestrado em Ciência Animal/UEMA pelos ensinamentos;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

MELO, A. C. M. **Bactérias do gênero *Aeromonas* em ostras (*Crassostrea rhizophorea*) e água de cultivo: Caracterização bioquímica e molecular.** (Bacteria of *Aeromonas* genus in oysters (*Crassostrea rhizophorea*) and pond water: Biochemical and molecular characterization). 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

RESUMO

As bactérias do gênero *Aeromonas* são patógenos emergentes que podem ser isolados de vários meios aquáticos, podendo ser encontrada na água do mar, águas fluviais, água doce, águas subterrâneas e diversos produtos de origem animal. Com o objetivo de identificar bactérias do gênero *Aeromonas*, foram analisadas 60 amostras de ostras e 20 amostras de água, obtidas nos locais de cultivo e pesca de ostras, existentes nos municípios de Raposa e Humberto de Campos, Maranhão. Para isolamento do gênero *Aeromonas* foi utilizado o método convencional, segundo (HAVELAAR & VONK, 1988; MAJEED et al., 1990; SAAD et al., 1995), e a caracterização das espécies foi realizada através da chave de identificação Aerokey II (Carnahan et al., 1991). Após a caracterização bioquímica, os isolados de *Aeromonas* foram submetidos a análise molecular, através da técnica de PCR e RFLP-PCR do 16S rRNA (BORRELL et al., 1997). Foram identificadas 59 (98,3%) amostras de ostras e 15 (75%) amostras de água contaminadas por bactérias do gênero *Aeromonas*. Dos 74 isolados de *Aeromonas* spp. obtidos na análise bioquímica, 53 (71,62%) confirmaram a caracterização do gênero pela análise molecular. Quanto a identificação das espécies 59,3% e 40,6% dos isolados de *Aeromonas* sp. obtidos das amostras de ostra, foram classificados como *A. hydrophila* e *A. caviae*, respectivamente; e para os isolados obtidos das amostras de água, 60% foram classificados como *A. hydrophila* e 40% como *A. caviae*. A classificação através da RFLP-PCR 16S rRNA, mostrou padrões de bandas distintos dos propostos por BORRELL et al. (1997), resultado este que pode estar relacionado a grande heterogeneidade genética das bactérias do gênero *Aeromonas*, evidenciada principalmente em isolados de amostras ambientais. Foi observado neste estudo um grande número de amostras de ostras contaminadas com *Aeromonas* spp., podendo estas oferecerem risco à saúde dos consumidores, uma vez que são consumidas *in natura* e que as espécies identificadas na presente pesquisa já são reconhecidas como potencialmente patogênicas para o ser humano.

Palavras-chaves: *Aeromonas*, ostras, água e PCR

Bacteria of *Aeromonas* genus in oysters (*Crassostrea rhizophorea*) and pond water: Biochemical and molecular characterization

MELO, A. C. M. Bacteria of *Aeromonas* genus in oysters (*Crassostrea rhizophorea*) and pond water: Biochemical and molecular characterization [Bactérias do gênero *Aeromonas* em ostras (*Crassostrea rhizophorea*) e água de cultivo: Caracterização bioquímica e molecular. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

ABSTRACT

The *Aeromonas* bacteria are emerging pathogens that can be isolated from various aquatic environments and can be found in seawater, river water, fresh water, groundwater and various products of animal origin. In order to identify *Aeromonas* bacteria were analyzed 60 samples of oysters and 20 water samples obtained from the local farming and fishing for oysters in the city of Raposa and Humberto de Campos, MA. For isolation of *Aeromonas* used the conventional method, second (SAAD et al. 1995; MAJEED et al. 1990; VONK & Havelaar, 1988), and the characterization of the species was performed using the identification key Aerokey II (Carnahan et al., 1991). After the biochemical characterization, the *Aeromonas* isolates were subjected to molecular analysis by PCR and RFLP-PCR of 16S rRNA (Borrell et al., 1997). We identified 58 (96.67%) samples of oysters and 14 (70%) samples of water contaminated with *Aeromonas*. Of the 74 isolates of *Aeromonas* spp. obtained in biochemical analysis, 53 (71.62%) confirmed the characterization of the genus by molecular analysis. The identification of species 59.3% and 40.6% of isolates of *Aeromonas* spp. obtained from oyster samples were classified as *A. hydrophila* and *A. caviae*, respectively, and for isolates obtained from water samples, 60% were classified as *A. hydrophila* and 40% as *A. caviae*. The classification by RFLP-PCR 16S rRNA showed different band patterns of the proposed by Borrell et al. (1997), a result that may be related to high genetic heterogeneity of *Aeromonas* bacteria, primarily evidenced in isolates from environmental samples. Was observed in this study a large number of samples of oysters contaminated with *Aeromonas* spp., which may offer a health risk for consumers, since they are consumed fresh and that the species identified in this research are already recognized as potentially pathogenic for humans.

Keywords: *Aeromonas*, oysters, water and PCR

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Amostragem	21
3.2. Colheita e transporte das amostras.....	21
3.3 Análise das Amostras.....	21
3.3.1 Enriquecimento Seletivo.....	21
3.3.2 Plaqueamento seletivo.....	22
3.3.3 Identificação do gênero <i>Aeromonas</i> pelos Métodos Bioquímicos.....	22
3.3.4 Identificação das espécies de <i>Aeromonas</i> pelos métodos bioquímicos.....	23
3.4 Métodos Moleculares	25
3.4.1 Identificação do gênero <i>Aeromonas</i> pela técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	25
3.4.2 Identificação das espécies de <i>Aeromonas</i> pela técnica Polimorfismo de Fragmento de Restrição Lento (RFLP) do gene 16S rRNA.....	26
3.5 Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÕES.....	43
6. Considerações Finais.....	44
REFERÊNCIAS	45

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número e percentual de amostras de ostras e água contaminadas por bactérias do gênero <i>Aeromonas</i> , provenientes dos municípios de Raposa e Humberto de Campos, Maranhão, 2009.....	29
Tabela 2. Caracterização bioquímica das espécies de <i>Aeromonas</i> isoladas das amostras de ostras procedentes dos municípios de Raposa e Humberto de Campos - MA, 2009.....	32
Tabela 3. Caracterização bioquímica das espécies de <i>Aeromonas</i> isoladas das amostras de água procedentes dos municípios de Raposa e Humberto de Campos - MA, 2009.....	33
Tabela 4. Resultados da identificação molecular dos 74 isolados de <i>Aeromonas</i> spp. obtidos de amostras de ostra e água, submetidos a técnica da PCR, 2009.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Chave de identificação Aerokey II. Testes bioquímicos para classificação dos isolados do gênero <i>Aeromonas</i>. (CARNAHAN et al.,1991)</p>	24
<p>Figura 2. Gel de agarose contendo o fragmento de 787 bp amplificado a partir de um par de iniciadores gênero-específico para <i>Aeromonas</i>. Linha 1 até 32 – isolados de <i>Aeromonas</i> spp., previamente identificadas por testes bioquímicos. Ct+ : controle positivo (<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966).....</p>	37
<p>Figura 3. Gel de agarose contendo o fragmento de 787 bp amplificado a partir de um par de iniciadores gênero-específico para <i>Aeromonas</i>. Linha 32 até 56 – isolados de <i>Aeromonas</i> spp., previamente identificadas por testes bioquímicos.....</p>	37
<p>Figura 4. Isolados de <i>Aeromonas</i> spp. digeridas com as enzimas de restrição <i>Alu I</i> e <i>MboI</i>. De 1 até 10 – padrão de banda dos isolados obtidos de amostras de ostra; 11 e 12 - isolados obtidos de amostras de água.....</p>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OMS – Organização Mundial de Saúde

EPA – Agência de Proteção Ambiental

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

RFLP - Polimorfismo de Fragmento de Restrição Lento

DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos

HG – Grupos Homólogos

LPS – Lipopolisacarídios

TSB – Caldo tripticase soja

TSA –Ágar tripticase soja

TSI – Ágar tríplice-açúcar-ferro

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, surtos de doenças bacterianas de origem alimentar têm sido reportados em todo o planeta, alguns causados por agentes denominados de clássicos, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., mas a grande maioria ocasionada por bactérias emergentes, entre as quais as *Aeromonas* (LUCENA, 2007).

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 animais, aumentando o interesse de estudo dessa bactéria principalmente pela sua potencialidade de patógeno oportunista em indivíduos imunodeprimidos (MARTINS, 2005).

Além disso, neste papel de “patógeno secundário”, as *Aeromonas* têm sido implicadas como potenciais causadoras de gastroenterites e infecções extra-intestinais, incluindo as infecções de feridas, pneumonia, síndrome urêmica hemolítica, peritonites, sépsis biliares e septicemias (CHAN et al., 2000).

Segundo Lucena (2007), as bactérias do gênero *Aeromonas* estão amplamente difundidas no meio ambiente, estando presentes nos meios aquáticos, nos animais e alimentos.

O isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas* em produtos de origem animal tem sido relatado por diversos pesquisadores em diferentes partes do mundo, sendo que a grande maioria deles está associada ao pescado (COSTA & ROSSI JÚNIOR, 2002).

Dentre os alimentos que compõem o grupo do pescado, as ostras, organismos filtradores capazes de ingerir partículas em suspensão, as quais podem carrear microrganismos patogênicos são consumidas, na grande maioria, na forma *in natura* podendo ocasionar surtos de DTAs (doenças transmitidas por alimentos) em humanos.

Desta forma a rápida identificação dos agentes causadores dessas doenças é um passo importante para tomada de decisão em casos de surtos. Para o isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas*, os métodos microbiológicos são ainda largamente empregados, porém devido a necessidade de um incremento na velocidade e precisão dos testes diagnósticos, principalmente para monitoramento da produção animal, fabricação de alimentos e produto final, aliado a dificuldade de padronização dos resultados bioquímicos e ao tempo elevado para realização destas provas (OZBAZ et al., 2000), tem-se buscado a utilização e desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico, destacando-se a reação em cadeia pela polimerase – PCR (SANTOS et al., 2001) e ainda as técnicas de Polimorfismo de Fragmento de Restrição Lento (RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do 16S rRNA (BORRELL et al., 1997).

Assim, devido a importância das bactérias do gênero *Aeromonas* como microrganismos patogênicos para o ser humano, principalmente no que diz respeito a sua implicação na saúde pública, aliado a escassa literatura científica sobre a presença deste patógeno em ostras, no Estado do Maranhão, motivaram a realização deste trabalho com o objetivo de isolar e caracterizar as bactérias do gênero *Aeromonas* em amostras de água e ostra através de métodos bioquímicos, identificar o gênero *Aeromonas* pela técnica da PCR e classificar as espécies pela técnica de RFLP-PCR do 16S rRNA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os representantes do gênero *Aeromonas* (do grego aer-aire = ar ou gás e monas = unidade, portanto, unidade produtora de gás), são bactérias Gram negativas de forma bacilar, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, monotríquias, ocorrem de forma autóctone em ambientes aquáticos (água doce, costeira, salobras, esgotos, etc.) (MAALEJ et al., 2003). A morfologia celular das espécies de *Aeromonas* é muito variável. Os bacilos podem variar desde formatos cocóides até formas finas e filamentosas. Em geral, as células se descrevem como retas e de forma bacilar com extremidades arredondadas, apresentando-se isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (ICMSF, 1998).

As bactérias deste gênero são catalase e oxidase positivas, redutoras de nitrato a nitrito, inositol negativas, fermentadoras de glicose e vários outros carboidratos, com formação de ácido e/ou gás (LUCENA, 2007). As *Aeromonas* são microrganismos psicotrófilos e mesófilos e produzem diversas exoenzimas e enzimas hidrolíticas, tais como amilase, DNAses, estearase, proteases, lipases, peptidases, entre outras (ALTWEGG, 1987; KONEMAN et al., 2001; ABBOTT et al., 2003; LUCENA, 2007).

O gênero *Aeromonas* foi proposto pela primeira vez por Kluyver & Van Niel (POPOFF, 1984), em 1936 para enquadrar as bactérias de forma bacilar que possuíam propriedades semelhantes à família *Enterobacteriaceae*. O primeiro isolamento notificado de *Aeromonas* foi realizado em ovos, em 1937, quando Ewing et al. (1961) e Altwegg & Geiss (1989) chegaram à conclusão de que as primeiras bactérias isoladas por Sanarelli em rãs, em 1891 e as isoladas por Zimmermann na água, em 1890 eram *Aeromonas* spp. (MARTINS 2005).

Com base em evidências genéticas e moleculares, Colwell et al. (1986) propuseram a criação de uma nova família denominada *Aeromonadaceae* a qual englobaria o gênero *Aeromonas* proposto por Kluyvera & Vanniel (1936).

As *Aeromonas* possuem a enzima citocromo-oxidase e são resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino 6,7 diisopropilpteridina). Desenvolvem numa ampla faixa de condições ambientais: valores de pH entre 4 e 10, concentração salinas de até 6,5%, temperatura de crescimento entre 4°C a 42°C, sendo 28-30°C, a temperatura ideal de crescimento (DELAMARE et al., 2000; ZUCOLOTTI et al., 2006).

A capacidade de algumas cepas se desenvolverem a baixas temperaturas pode levar ao desenvolvimento de um elevado número de bactérias sob condições de resfriamento, tornando-as uma parte importante da microbiota deteriorante de alimentos resfriados (TSAI & CHEN, 1996). O número de bactérias pode aumentar de 10-1000 vezes em amostras de carnes e pescado durante uma semana de armazenamento sob refrigeração (ICMSF, 1998).

Alguns estudos demonstram que as bactérias do gênero *Aeromonas* a 5°C são capazes de quadruplicar sua população em curto espaço de tempo, indicando a possibilidade de desenvolvimento psicrotrófico competitivo em grande variedade de alimentos (PALUMBO et al., 1989; KIROV et al., 1993; LUCENA, 2007) e que algumas espécies, como *Aeromonas hydrophila* quando mantidas sob temperatura de refrigeração (5°C) são capazes de produzir enterotoxinas e hemolisinas (MAJEED et al., 1990).

Segundo Saavedra et al. (2006) atualmente o gênero *Aeromonas* compreende as seguintes espécies: *Aeromonas hydrophila*, *A. bestiarium*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biovar *sobria* e *veronii*), *A. jandae*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii* e os dois grupos homólogos DNA, *Aeromonas* sp. HG 11, *Aeromonas* sp., HG 13 que ainda permanecem sem nomes. *Aeromonas ichthiosmia* e *Aeromonas enteropelogenes* agora são consideradas sinônimos de *A. veronii* e *A. trota* respectivamente. Três novas espécies, *A. culicicola*, *A. simae* e *A. molluscorum* foram recentemente descritas. Porém existe um estudo que propõe que *A. culicicola* seja sinônimo de *A. veronii*, mas apenas as cepas de referências foram estudadas (UEHARA, 2008).

Dentre as espécies atualmente descritas no gênero *Aeromonas*, somente cinco (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. jandae* e *A. schubertii*) são reconhecidas como patógenos humanos, sendo associadas principalmente a gastroenterites em crianças e imunodeprimidos (JANDA & ABOTT, 1998). Outras espécies tais como *A. salmonicida* são bastante conhecidas como patógenos de peixes causando mortalidade em massa em várias espécies.

Quanto à ocorrência, as bactérias do gênero *Aeromonas* são ubíquas em ambientes aquáticos. Podem ser encontradas em água doce, estuários e esgoto e já foram isoladas de águas potáveis cloradas e não cloradas (EPA, 2006).

Segundo Uehara (2008) o gênero *Aeromonas* pode ser isolado tanto de ambientes pobres ou ricos em nutrientes. Entretanto, o aumento dos níveis de poluição na água pode resultar em um aumento substancial e modificar a distribuição da população de *Aeromonas* no ambiente. Vários estudos demonstraram 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* biótipo *sobria* é mais freqüente em águas não poluídas e salobras (WHO, 2009).

Araújo et al. (1989) e Neves et al. (1990) observaram correlação, particularmente em águas poluídas, entre presença de *Aeromonas* spp. e de microrganismos do grupo dos coliformes, normalmente utilizados como indicadores da qualidade higiênico-sanitária da água. Em águas livres de poluição foi observada a presença de *Aeromonas* e não coliformes, o que segundo Abeyta Júnior et al. (1990) pode caracterizar a origem não fecal das *Aeromonas* spp. ou a sua capacidade de desenvolvimento e competição em ambientes aquáticos.

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

Muitas estratégias no tratamento de água como filtração rápida ou lenta em filtro de areia, hipercloração/filtração direta e o uso de carvão ativado, são capazes de reduzir o número de *Aeromonas*. Paradoxalmente outros estudos mostram sua capacidade de sobreviver e desenvolver 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 & RODGERS, 2004; UEHARA, 2008).

Além dos ambientes aquáticos as bactérias do gênero *Aeromonas* também podem ser encontradas no solo, fezes de animais aquáticos, terrestres e fezes humanas. Nos alimentos as bactérias já foram isoladas de pescados, vegetais, leite e alimentos processados (EPA, 2006). Um reservatório importante é representado pelos moluscos e particularmente por ostras (ABEYTA et al., 1986; MARTINS, 2005).

Através de um levantamento realizado por Kirov (1993) sobre a incidência de casos de gastroenterites causados por alimentos contaminados por *Aeromonas*, no período de 1977 a 1991, foi relatado que a maioria dos surtos envolviam alimentos de origem marinha (ostras e camarões) e sashimi.

A frequência de isolamento desta bactéria é mais elevada nos meses de verão, em especial nas zonas temperadas e tropicais. Em geral, não são consideradas como habitante normal do trato gastrointestinal humano. Contudo, nas regiões de clima temperado, estima-se que o número de portadores assintomáticos aproxime-se de 3%, enquanto em regiões tropicais esse percentual pode atingir 30% ou mais (KELLY et al., 1993).

Bactérias do gênero *Aeromonas* foram isoladas de mexilhões do Mar Adriático destinado ao consumo humano (OTTAVIANI et al., 2006). No Brasil também foi relatada a presença destas bactérias em mexilhões destinados ao consumo humano, tanto em amostra *in natura* quanto em amostras pré-cozidas (PEREIRA et al., 2004).

Em um estudo realizado por Evangelista-Barreto et al. (2006), no qual isolaram espécies de *Aeromonas* de amostras de ostras (*Crassostrea rizophorea*), procedentes de um criadouro natural localizado no estuário do rio

Cocó (Fortaleza-CE), utilizando dois métodos, plaqueamento direto e presença/ausência isolando bactérias do gênero em 50% e 43% das amostras respectivamente. Estes resultados, segundo os autores, poderiam acarretar um aumento no risco representativo dos casos de DTAs devido ao hábito de consumir ostras *in natura*.

Sousa & Silva-Souza (2001), isolaram diferentes grupos de bactérias em amostras de água e peixe, procedentes do rio Congonhas (Sertanejo-PR), identificando os grupos *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* e *Flavobacterium* nas amostras de água e peixe, onde o gênero *Aeromonas* foi isolado com maior frequência.

Castro-Escapurlli et al. (2003) evidenciaram a presença de *Aeromonas* em 32,8% das 250 amostras de peixes congelados, obtidas de água doce comercializados no México. A caracterização bioquímica dos isolados identificou as espécies: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv *sobria* e *A. eucrenophila*. Por outro lado, em estudo realizado na Turquia, *Aeromonas* foram isoladas de 15,8% dos salmões retirados do Mar Negro (DUGENCI & CANDAN, 2003).

Em estudo realizado na Espanha, por Herrera et al. (2006), analisando 50 amostras de peixes, foi detectada bactérias do gênero *Aeromonas* em 31 (61%) amostras, sendo que todas elas foram positivas para a presença de genes de virulência, o que segundo os autores poderia contribuir para casos de diarreias.

Bulhões & Rossi Junior (2002) analisaram amostras de queijo minas frescal artesanal, adquiridas no comércio varejista dos municípios de Poços de Caldas-MG e Jaboticabal-SP., constatando a presença de *Aeromonas* em 51,2% das amostras. Foram identificadas as espécies *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. schubertii*, além de cepas consideradas atípicas.

Em um trabalho desenvolvido por Costa & Rossi Júnior (2002), no qual avaliaram 200 amostras de diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frango, *Aeromonas* spp. foram isoladas em 36% das amostras de penas, em 56% de fezes, em 72% de carcaças evisceradas, não evisceradas e

resfriadas, respectivamente e em 80% das amostras de água do pré-resfriamento.

Segundo Bizani & Brandelli (2001) as variáveis que determinam a distribuição e incidência de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de águas, alimentos ou isolados clínicos, assim como os fatores de virulência associados, podem ser alterados de acordo com a localização geográfica da região. Fatores que favorecem a variabilidade e a estabilidade destes microrganismos em alimentos são: pH neutro, umidade, temperatura, considerando uma larga escala de tolerância, que pode oscilar de 5 a 42°C (ABBOTT et al., 2003; BERNADES et al., 2003; LUCENA, 2007). Além de tolerância e capacidade de desenvolvimento em baixas temperaturas, algumas espécies de *Aeromonas* apresentam tolerância à salinidade (DELAMARE et al., 2000), o que lhes confere o potencial de manter elevada viabilidade ou mesmo, crescer em concentrações salinas comumente utilizadas na conservação de produtos alimentícios de origem animal e vegetal (LUCENA, 2007).

As *Aeromonas* são patógenos emergentes e por muito tempo, algumas espécies foram consideradas oportunistas, porém estudos realizados em microbiologia de alimentos permitiram descobrir a relação desses microrganismos com infecções humanas após consumo de alimentos de origem aquática, sob a forma "*in natura*" ou insuficientemente cozidos (MENG & DOYLE, 1998, MARTINS et al., 2002; VIVEKANANDHAN et al., 2002).

Estas bactérias são conhecidas por produzirem vários fatores de virulência dentre os quais estão a secreção de exotoxinas, endotoxinas ou lipopolisacarídeos (LPS), presença de uma camada S, fímbrias ou pêlos adesivos, hemolisinas e produção de cápsulas em meio rico de glicose (MERINO et al., 1995). A endotoxina compõe a membrana externa de muitos patógenos Gram-negativos, tóxico para humanos e para várias espécies de animais (MOYER, 1987); as hemolisinas são proteínas citolíticas extracelulares que agem formando perfurações na membrana celular por sua inserção na camada bi-lipídica destruindo a barreira de permeabilidade da membrana e dissolvendo as células vermelhas do sangue (KÜHN et al., 1997).

As citotoxinas e as enterotoxinas, incluindo aquelas com atividade hemolítica, são as mais importantes para a patogenicidade das *Aeromonas* (BOTTARELLI & OSSIPRANDI, 1999; MARTINS, 2005). As enterotoxinas são produtos extracelulares, excretados para fora da célula bacteriana, que podem agir sobre o epitélio intestinal, produzindo inflamação. As *Aeromonas* também podem produzir substâncias extracelulares, com fatores de difusão significantes, tais como, proteases, amilases, citinases, nucleases e outras com papel de patogenicidade desconhecida. As proteases podem contribuir para a patogenicidade causando danos diretos aos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão (MERINO et al., 1995).

A enterotoxina citotóxica, também conhecida como “aerolisina” com atividade enterotóxica, citotóxica e hemolítica tem sido descrita como o mais poderoso fator de virulência associado com doenças gastrintestinais causados por *Aeromonas* (MARTINS et al., 2002).

Pesquisas relatam que aerolisina contribui para virulência de *A. hydrophila*, estando bem difundidas dentro do gênero (SANTOS et al., 1999; ZHANG et al., 2000). Chacón et al. (2003), detectaram que 72,6% do total de linhagens analisadas eram positivas para o gene da aerolisina sendo que a sua presença foi mais freqüente em isolados clínicos do que em ambientais.

As lipases são enzimas que catalizam a hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos livres e glicerol. O interesse por estas enzimas tem aumentado devido ao seu papel como importante fator de virulência (SNELLMAN et al., 2002), já que estas são capazes de interagir com os leucócitos humanos e afetar várias funções do sistema imune pela liberação de ácidos graxos (CHUANG et al., 1997). Com isso os danos causados por *Aeromonas* spp. manifestam-se em infecções sistêmicas mais usuais em indivíduos imunodeprimidos, caracterizadas por infecções cutâneas e do trato intestinal e (gastroenterites), que podem levar à morte ou provocar graves lesões. As espécies principalmente associadas à gastroenterite são *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar *sobria*. A doença mais comum, causada por *Aeromonas* ao ser humano, é a gastroenterite, podendo afetar qualquer tipo de indivíduo, no entanto, é mais comum o aparecimento em crianças ou pessoas

com um sistema imunitário deficiente. Esta bactéria tem, portanto a capacidade de provocar dois tipos distintos de gastroenterites, sendo uma semelhante à cólera, caracterizada por uma diarreia extremamente líquida e outra denominada de gastroenterite disentérica, muito mais severa do que a anterior, capaz de persistir por várias semanas e que provoca fezes soltas contendo sangue e muco (MIGUEL, 2007).

Na literatura, as espécies mais freqüentemente citadas em associação à patogenia humana são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biótipo *sobria*. Algumas são consideradas patógenos em circunstâncias raras como: *A. jandaei* e *A. schubertii*. Existem ainda aquelas ocasionalmente isoladas de material clínico cujo significado permanece desconhecido tais como: *A. sobria*, *A. media*, *A. trota* e *A. salmonicida*, estas duas últimas adaptadas a pescado e responsáveis por surtos de epizootias (CARNAHAN et al., 1991, WANG et al., 2000; DAVIES et al., 2001).

As populações mais atingidas por essas infecções são crianças, idosos e indivíduos debilitados ou portadores de doenças crônico-degenerativas. Além disso, *Aeromonas* spp. podem causar infecção em animais causando sérios prejuízos econômicos para a aquicultura (furunculose em salmonídeos, como no caso de *A. salmonicida*) e ranicultura (doença da pata vermelha) e até mesmo em animais silvestres criados em cativeiro ou não (NEVES et al., 1992).

A infecção humana causada por *Aeromonas* spp. caracteriza-se por diarreia aguda aquosa autolimitada, de curta duração, podendo ser acompanhada de febre, vômitos e dor epigástrica assemelhando-se à síndrome causada por *V. cholerae*. Manifestações extraintestinais também já foram relatadas como infecções cutâneas, hepatobiliares, urinárias, oculares, endocardites, osteomielites, bacteremias e septicemias. Os acometimentos mais graves podem ocorrer com maior freqüência nos indivíduos com comprometimento do sistema imunológico ou distúrbios hepatobiliares. Apesar disso, o papel dos fatores de virulência descritos não está inteiramente elucidado. Sabe-se que a temperatura de desenvolvimento do microrganismo influencia na expressão de fatores associados à virulência, aumentando sua

patogenicidade, em particular quando isoladas a partir de alimentos estocados sob refrigeração. O maior obstáculo dos estudos sobre a patogenicidade de *Aeromonas* spp. é a inexistência de um modelo animal que reproduza a infecção observada em seres humanos (KIROV et al., 1993; MÉNARD et al., 2002).

No Brasil, existem diversos relatos de isolamento de diferentes espécies de *Aeromonas* de amostras clínicas de casos de diarreia infantil, infecção hospitalar, ou gastroenterites causadas por ingestão de alimentos como ostras, mexilhões, pescado e vegetais (PEREIRA, 2003).

As evidências indicam que as pessoas geralmente são afetadas por *Aeromonas* entéricas e que as mesmas podem ter uma parte natural da microbiota intestinal, de forma transitória ou por períodos longos. Um número de fatores, incluindo idade, sistema imunológico, dose de infecção e doenças implícitas, afetam a capacidade das *Aeromonas* em causar infecções (RHODES & KATOR, 1994).

As *Aeromonas* mesófilas têm sido comumente isoladas de pacientes com gastroenterites, embora seu papel na produção de doenças ainda não tenha sido elucidado. Elas também estão associadas com sépsis, feridas e com infecções oculares, do trato respiratório e outras infecções sistêmicas, as quais aparecem após contágio de fraturas e lacerações com águas contaminadas com a bactéria (CARNAHAN et al., 1991).

Aeromonas sobria tem sido isolada de casos de diarreia aquosa apresentando uma toxina similar à cólera. Em geral, cerca de 20% dos pacientes estudados desenvolveram quadro de infecção intestinal com sintomas de disenteria semelhante às provocadas por espécies de *Shigella* e cepas de *Campylobacter jejuni* invasoras (ARAÚJO, 2001).

Aeromonas hydrophila é uma espécie que cresce a 37°C e possui mobilidade, portanto classificada no grupo das mesófilas, juntamente com *A. caviae* e *A. sobria*. Por outro lado, existe o grupo das psicrófilas que inclui uma única espécie, denominada *A. salmonicida*. Essa espécie não cresce bem a 37°C, é imóvel e sua importância está relacionada à patogenicidade em

peixes, podendo causar danos zootécnicos e econômicos (WANG & SILVA, 1999; VENKAT et al., 2000, MARTINS et al., 2002; RADU, 2003).

A *Aeromonas schubertii* possui importância clínica relacionada ao seu isolamento a partir de infecção de feridas subseqüentes à exposição à água, ao solo ou a alimentos contaminados, com incidência máxima nas estações quentes. Por sua vez, *A. veronii* foi descrita como produtora de bacteremia, infecções de feridas e diarreia. *A. jandaei* foi isolada como agente de infecção em quatro pacientes. *A. trota* é um patógeno freqüente de pescado (truta), mas foi isolada também de amostras fecais humanas (HICKMANN et al., 1988; ISONHOOD & DRAKE, 2002; PETERSEN & DALSGAARD, 2003).

Segundo Pereira (2003), patógenos emergentes veiculados por pescados e moluscos como *Aeromonas hydrophila* são agentes patógenos de diarreia grave em indivíduos saudáveis, acometendo em especial, crianças e idosos.

Dentre as principais doenças causadas por *Aeromonas* em humanos destacam-se dois grupos: as septicemias (causadas por cepas de *A. veronii* biovar *sobria* e *A. hydrophila*), e as gastroenterites provocadas por algumas *Aeromonas* mesófilas como *A. hydrophila* e *A. caviae* (MOYER, 1987) *apud* Martins (2005). As infecções podem ser adquiridas através do contato direto com ambientes ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados (KNOCHEL & JEPPESEN, 1990).

Como métodos de identificação do gênero *Aeromonas* mais comumente são usados os que envolvem a coloração de Gram (bacilos Gram-negativos), testes de oxidase e catalase positivos, e resistência ao agente vibriostático O/129 (KONEMAN et al., 2001; ABBOTT et al., 2003; LUCENA, 2007).

Segundo Bernardes et al. (2003) as características bioquímicas que podem diferenciar as espécies de *Aeromonas* incluem: hidrólise da esculina, utilização da L-histidina, L-arginina, fermentação da salicina, produção de gás a partir da glicose e ácido sulfídrico a partir da cisteína.

De acordo com Koneman et al. (2001), as *Aeromonas* são classificadas em espécies por meio de uma série de testes bioquímicos, dentre os quais os mais importantes são: produção de H₂S a partir de cisteína, atividade β-

hemolítica, motilidade, produção de gás a partir de glicose, produção de indol, atividades de lisina, ornitina e arginina descarboxilase, teste de esculina, e crescimento em arabinose, sacarose, manitol e inositol. Esses testes apesar de úteis, são trabalhosos, demandam tempo e podem gerar resultados duvidosos, além do que muitas vezes são incapazes de identificar com precisão as espécies de *Aeromonas* devido à heterogenicidade existente no gênero (FIGUEIRAS et al., 2000; ARORA et al., 2005; WAHLI et al., 2005).

Carnahan et al. (1991), descreveram uma chave dicotômica e flexível (Aerokey II) para identificação das espécies de *Aeromonas* de importância clínica, baseada em sete testes bioquímicos: hidrólise da esculina, gás de glicose, ácido de arabinose, produção de indol, ácido de sacarose, reação de Voges-Proskauer e resistência a cefalotina. Esta chave de identificação apresentou eficiência de 97% para as espécies comumente associadas a casos clínicos humanos. Além disso, a chave mostrou-se eficiente para a classificação de *A. veronii* biovar *veronii*, *A. schubertii*, *A. jandae* e *A. trota* (AMADOR, 2007; LUCENA, 2007).

Abbot et al. (2003), com a finalidade de definir um grupo de provas bioquímicas úteis na identificação de cepas de *Aeromonas*, submeteram 193 cepas com representantes de todas as espécies do gênero *Aeromonas*, a 62 provas bioquímicas. Com o objetivo de criar uma tabela de referência para identificação das espécies de *Aeromonas*, dentre esses 62 testes apenas 9 apresentaram resultados uniformes, 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-arabinol, dulcitol, erythritol e xilose.

Na microbiologia clínica a identificação rápida e correta dos agentes patogênicos é um requisito essencial para um diagnóstico e prescrição de um tratamento adequado. Atualmente a maior parte das bactérias de interesse clínico, pode ser identificada 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 pelos meios tradicionais (UEHARA, 2008). Nessas

circunstâncias a identificação molecular baseada na análise do gene 16S rDNA pode representar vantagens quanto ao tempo gasto e a precisão na identificação (RODICIO & MENDOZA, 2004).

O desenvolvimento de novas técnicas de detecção e caracterização de microrganismos a partir do emprego da metodologia da PCR, incluindo a detecção e classificação de microrganismos a partir de seqüências de rRNA 16S, amplificadas a partir de DNA/RNA extraídos de cepas microbianas, e do emprego de técnicas de hibridização com sondas grupo-específicas diretamente em amostras de DNA/RNA das mesmas cepas, permitiu grandes avanços na detecção e caracterização taxonômica dos microrganismos em ambientes naturais (CANHOS et. al., 2008).

A PCR é uma técnica rápida e sensível quando comparada com as técnicas que usam meios de cultura, além de ser bastante eficiente, pois requer poucas moléculas de DNA para poder amplificar um fragmento de um modo exponencial. Além disso é um método automatizado que permite a análise simultânea de várias amostras. Assim, esta técnica tem-se evidenciado de grande interesse no que se refere à pesquisa de microrganismos patogênicos presentes em amostras ambientais e alimentos (MIGUEL, 2007).

Segundo Saavedra et al. (2007) a utilização de metodologias moleculares, como a sequenciação de genes “housekeeping”, permite a identificação de espécies raramente isoladas e apresenta um grande potencial relativamente à Taxonomia do gênero *Aeromonas*.

Segundo Ozbas et al. (2000) a PCR é um método de detecção rápida e confiável para a pesquisa de microrganismos patogênicos, como a *Aeromonas hydrophila*. Além disso, o método oferece uma sofisticada maneira de superar as dificuldades existentes nos métodos tradicionais, como diferenciar espécies patogênicas de não patogênicas, menores exigências de tempo de trabalho no laboratório e um elevado grau de especificidade para identificação das espécies patogênicas.

De acordo com Casco et. al. (1996) a detecção de *A. hydrophila* pela amplificação de DNA utilizando a PCR tem um grande potencial para a rápida identificação desta bactéria, pela elevada especificidade desta técnica.

Kingombe et al. (1999) ao realizarem a caracterização e distribuição de genes de virulência em *Aeromonas* spp. pela técnica da PCR, observaram que este é um método rápido, sensível e específico para a detecção dos fatores de virulência em *Aeromonas* spp. Segundo os autores a PCR supera a desvantagem de perda de tempo com os métodos bioquímicos e outros métodos baseados em DNA.

Nos últimos anos, um número relativamente grande de técnicas baseadas na análise de DNA tem sido introduzido no campo da caracterização e taxonomia bacteriana (LUCENA, 2007). Técnicas como hibridização DNA-DNA, marcadores de DNA (RAPD), e amplificação de genes específicos através da PCR, possibilitam a classificação do gênero *Aeromonas* (CARNAHAN & ALTWEGG, 1996; DELAMARE, 1999; SAAVEDRA et al., 2006). Outra técnica molecular de genotipagem é o RFLP que se mostrou uma ferramenta útil, porém 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).

De acordo com Borrel et al. (1997), a técnica de RFLP-PCR, que analisa a sequência do gene 16S rRNA, mostrou ser um bom método para classificar *Aeromonas*. Isto ocorre em virtude de que a sequência deste gene, apesar de possuir alta similaridade entre as espécies, também apresenta sítios de restrição espécie específicos.

Um dos trabalhos mais recente na discriminação das espécies de *Aeromonas* foi proposto por Figueras et al. (2000), um método baseado na análise do gene 16S (16S rDNA RFLP), e é uma extensão do protocolo proposto por Borrell et al. (1997), onde bandas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), obtidas após amplificação do gene por PCR foram capazes de distinguir mais de 10 espécies de *Aeromonas*, usando as endonucleases AluI, MboI. Para distinguir as espécies *A. salmonicida*, *A. encheleia* da *Aeromonas* HG 11, eram necessárias mais duas enzimas (*Nar I* e *Hae III*). Porém esse protocolo não distinguia *A. salmonicida* de *A. bestiarium* e também não identificava *A. popoffii*. Figueira et al. (2000), baseando-se nesse método, acrescentaram a utilização de mais duas

enzimas, *AlwNI* e *PstI* para que com esse protocolo fosse possível a identificação de todas as espécies descritas até então (AMADOR, 2007; UEHARA, 2008). Figueras et al. (2000), identificaram, pela técnica de RFLP, 1302 cepas de *Aeromonas*. Amador (2007) afirma que devido a diversidade nucleotídica intra-específica ou devido à presença de uma nova seqüência pertencente a uma espécie de *Aeromonas* ainda não descritas perfis eletroforéticos podem ser diferentes daqueles descritos.

Ormen et al. (2005), compararam os métodos de identificação fenotípicos (provas bioquímicas) e genotípicos (RFLP-PCR do 16S rDNA) utilizando 171 cepas de *Aeromonas*, isoladas de amostras clínicas e ambientais. A identificação fenotípica das espécies e a identificação genotípica, utilizando RFLP divergiram nos resultados em 96% e 46%, nas amostras ambientais e clínicas, respectivamente.

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 (*gyrB*), lípase (*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.

Nos últimos anos bactérias do Gênero *Aeromonas* têm sido isoladas de diversos alimentos (MESQUITA et al., 1995). Dentre estes alimentos os pescados assumem local de destaque, haja visto o aumento do consumo destes alimentos “*in natura*”, prática outrora restrita aos países orientais, porém já muito presente em nosso continente (SILVA, 2007). Entre estes alimentos, as ostras, organismos pertencentes ao filo Mollusca e a classe bivalva, caracterizada por sua estrutura física composta basicamente por um corpo macio, protegido por duas sessões de conchas calcárias duras e unidas por um ligamento do tipo dobradiça em uma das extremidades (WHEATON, 2007) assume papel importante neste contexto.

Estes animais são considerados organismos com alto valor nutritivo devido ao teor de minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), glicogênio, vitaminas (A, B1, B2, C e D) e proteínas (CHRISTO, 2006), sendo encontrados desde as

zonas estuarinas de baixa salinidade, como ocorre com as espécies brasileiras *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliiana*, até áreas altamente salinas como a ostra japonesa, *Crassostrea gigas* que ocorre predominantemente no leste asiático e que, devido ao seu rápido crescimento e maturação sexual, vem sendo cultivada em vários países (MALOUF & BREESE, 1977; AKABOSHI, 1979).

Uma característica estrutural da classe bivalva é o grande desenvolvimento das brânquias, que são responsáveis pela respiração e filtração do alimento (acima de 400 litros/dia), fazendo com que tenham um rápido crescimento. Ao mesmo tempo este eficiente mecanismo de filtração permite o acúmulo de uma grande quantidade de microrganismos e, conseqüentemente, o armazenamento de uma microbiota bacteriana diversificada, podendo atuar como portadoras passivas de agentes patogênicos ao ser humano quando mantidas em águas poluídas por dejetos humanos, razão pela qual são usadas como bioindicadores (BARNABÉ, 1996; IRIARTE ROTA & RENGEL, 1997; BURKHADT & CALCII, 2000).

A produção de ostras, seja por meio da extração em bancos naturais ou da implantação de estruturas de cultivo, é uma fonte de renda importante para a economia de muitas comunidades pesqueiras espalhadas ao longo da costa brasileira (OSTRENSKY et al., 2008). O seu consumo tem mostrado um crescimento sustentável nos últimos anos, principalmente em países em vias de desenvolvimento. O consumo de produtos marinhos é considerável devido ao seu valor nutricional e baixos níveis de colesterol. Entretanto, os produtos marinhos podem ser um veículo para a maioria de bactérias patogênicas conhecidas (HUSS, 1997; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2006).

A “carne” da ostra pode estar diretamente relacionada ao meio onde ela se encontra, portanto oferece risco ao ser consumida, por serem bioacumuladores de microrganismos (ZAMARIOLI et al., 1997; SILVA et al., 2003). Daí a importância em monitorar a qualidade bacteriológica da água nos locais destinados ao cultivo de ostras, especialmente pelo hábito de consumo “*in natura*” destes organismos.

O exame microbiológico periódico da água de cultivo e dos moluscos bivalves é um excelente parâmetro indicador da contaminação por microrganismos patogênicos, fazendo com que as ostras sejam consideradas bioindicadores da qualidade do ecossistema marinho. Por outro lado, a qualidade das ostras comercializadas no Brasil e a segurança do consumidor deveriam ser baseadas em um programa integrado de monitoramento, que contemple o controle das condições ambientais de cultivo, manejo correto da produção, práticas adequadas de higiene, educação dos manipuladores e medidas eficientes de armazenamento (FAO/IOC/WHO, 2004).

As bactérias patogênicas, que eventualmente estejam presentes na água de cultivo de ostras, após serem filtradas poderão permanecer viáveis no trato digestivo das ostras (MORAES et al., 2000). Segundo Nguyen & Graham (1980) e Pommepeuy et al. (1996) bactérias relacionadas a DTAs em humanos, como a *Escherichia coli*, podem manter-se viáveis mesmo após ser ingerida pelas ostras, o que justifica altas contagens bacterianas em moluscos, mesmo quando as contagens na água do mar não indicam restrições para coleta e consumo dos organismos (FARIAS, 2008).

A microbiota do pescado e da maioria dos moluscos bivalves é bastante variada, podendo incluir: vírus, como o da Hepatite A (COELHO et al., 2003), rotavírus (KITIGUL, et al., 2008), vibrios, como o *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (LEE et al., 2008), bactérias, como *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Moraxella/Acinetobacter*, *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Clostridium* sp. e *Bacillus* spp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (VIEIRA, 2004). Todos estes patógenos podem ser transmitidos do ambiente ao ser humano no momento da ingestão do molusco (CRUZ-ROMERO et al., 2008).

Dentre os vários microrganismos potencialmente patogênicos relacionados ao consumo de ostras, alguns são sabidamente recorrentes, o que fez com que seus limites máximos permitidos em ostras destinadas à alimentação humana fossem estipulados através de legislações nacionais e internacionais (FARIAS, 2008).

Muitos países já definiram as diretrizes legislativas para a produção e comercialização de moluscos bivalves. Nos Estados Unidos, após um surto de febre tifóide transmitido por ostras em 1925, rapidamente se estabeleceu o Programa Nacional de Sanitização de Moluscos. O programa estabeleceu limites e parâmetros para a água nas áreas de produção. Moluscos não podem ser adquiridos de locais com água contendo níveis muito altos de poluição fecal, detectados pela pesquisa de bactérias coliformes (NSSP, 2005). Esta regulamentação surgiu pela percepção de que muitas bactérias e vírus patogênicos estavam relacionados à descarga de esgotos e poderiam causar surtos de doenças (FARIAS, 2008).

No Brasil, de acordo com a atual legislação, a Resolução n. 12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, não é realizada a pesquisa de coliformes termotolerantes para moluscos *“in natura”*, exigindo unicamente a análise para *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva (ANVISA, 2001). A portaria nº. 685, de 27 de agosto de 1998 (BRASIL, 1998) estabelece os limites máximos de tolerância de contaminantes químicos para os alimentos. Para os peixes e produtos de pesca, os metais pesados avaliados são antimônio, chumbo, arsênio, cobre, cádmio, cromo, mercúrio, níquel e zinco.

Os níveis de coliformes termotolerantes e *E. coli* é exigido somente para a qualidade das águas de cultivo, conforme a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Nessa mesma Resolução são estabelecidos os parâmetros físico-químicos das águas de cultivo que devem ser monitorados, como carbono orgânico total, pH, oxigênio dissolvido e presença de elementos químicos como os metais pesados chumbo e mercúrio.

Segundo Pereira (2003) a ingestão de moluscos bivalves marinhos não submetidos ao cozimento ou insuficientemente cozidos, pode transmitir enfermidades para o ser humano, que são causadas por diversos microrganismos. Essa transmissão pode ocorrer diretamente, através da água, ou indiretamente pelo consumo de produtos *in natura* contaminados durante os processos de manipulação, armazenamento, transporte ou preparação para o consumo.

No mundo contemporâneo, estudos diversos mostram que surtos de doenças relacionadas ao consumo de pescados, moluscos e derivados variam de acordo com os hábitos alimentares da população e com o clima local. São mais freqüentes no verão quando a temperatura das águas é mais elevada. No Japão, cerca de 70% das Doenças de Transmissão Alimentar (DTA) estão associadas ao consumo de pescado sem cocção (RIPPEY, 1994).

Contribuem também para a disseminação dos agentes patogênicos veiculados por alimentos, os hábitos de consumo alimentar dos indivíduos. Modernamente, as pessoas têm buscado uma dieta balanceada em termos nutritivos e, de certa forma, mais natural, favorecendo o consumo de alimentos frescos, o que pode aumentar a exposição a diversos patógenos. Algumas preferências alimentares geram riscos para a saúde humana, como é o caso do consumo de ostras *in natura* pois há, neste caso, risco expressivo de veiculação de microrganismos autóctones marinhos como as bactérias do gênero *Aeromonas*, provenientes dos despejos sanitários (PEREIRA, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram analisadas no período de abril de 2008 a novembro de 2009, 60 amostras de ostras e 20 amostras de água, obtidas dos locais de cultivo e pesca de ostras dos municípios de Raposa e Humberto de Campos. Cada amostra de ostra era constituída de 12 unidades, conforme metodologia utilizada por PEREIRA et al. (2006).

3.2 Colheita e transporte das amostras

As amostras de água foram colhidas em frascos de vidro esterilizados de aproximadamente 400mL. As amostras de ostras foram colhidas e acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, devidamente identificadas, e transportadas, juntamente com as amostras de água em caixas isotérmicas, contendo gelo, para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão, onde foram analisadas. No laboratório, as amostras de ostras foram higienizadas externamente com água corrente e a sua abertura foi realizada com o auxílio de uma faca previamente esterilizada. Após a abertura das valvas foi realizada a pesagem do material interno (líquidos do interior das valvas + tecido) de 12 unidades de ostras, quantidade representativa de cada amostra, sendo que o peso médio das amostras de ostra foi de 40g. A pesagem era realizada para se determinar se o valor do peso do material interno de 12 unidades de ostras era semelhante entre todas as amostras.

3.3 Análise das amostras

3.3.1 Enriquecimento seletivo

Para o enriquecimento seletivo das amostras de ostras foi utilizado 100 mL de caldo tripticase soja (TSB) adicionado de ampicilina. As amostras de água foram filtradas em membranas de éster de celulose de 47mm de

diâmetro e poros de 0,45µm. Após a filtração as membranas foram picadas em pedaços pequenos e os fragmentos colocados em Erlenmeyer, contendo 100mL de TSB e incubada à temperatura de 28°C por 24 horas (COSTA, 2002).

3.3.2 Plaqueamento seletivo

Após o período de incubação, os caldos de enriquecimento seletivo foram semeados em ágar dextrina-ampicilina (HAVELAAR & VONK, 1988) e ágar vermelho de fenol-amido- ampicilina (PALUMBO et al., 1985; MAJEED et al., 1990), utilizando-se alça de níquel cromo e em seguida incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas. Após o período de incubação as placas foram examinadas quanto à presença de colônias de cor amarela, rodeadas por um halo transparente, decorrente da hidrólise do amido ou da dextrina, características do gênero *Aeromonas*. As colônias sugestivas, em número de até cinco por amostra, foram semeadas em ágar tripticase soja (TSA), inclinado e incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas.

3.3.3 Identificação do gênero *Aeromonas* pelos métodos bioquímicos

Para o isolamento do gênero *Aeromonas* foi utilizado o método convencional, segundo Saad et al., 1995; Majeed et al., 1990; Havelaar & Vonk, 1988.

Após o período de incubação das colônias sugestivas no TSA, foram realizados esfregaços, corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentavam na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro/TSI (SAAD et al., 1995). Após incubação à temperatura de 28°C por 24 horas, as culturas que apresentavam reação ácida tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em ágar tripticase-soja e, em seguida, submetidas às provas da oxidase, realizada

segundo o protocolo de fabricação do kit e da catalase, considerando-se como *Aeromonas* spp. os cultivos positivos nestas provas.

As cepas caracterizadas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* foram semeadas em TSA, a fim de manter as colônias viáveis, para posterior análise pelos métodos bioquímicos e moleculares.

3.3.4 Identificação das espécies de *Aeromonas* pelos métodos bioquímicos

Foram submetidas à caracterização das espécies, utilizando a chave de classificação Aerokey II (CARNAHAN et al., 1991), um total de 74 isolados de *Aeromonas* spp.

A chave de classificação Aerokey II é composta por sete provas bioquímicas (Figura 1), dentre as quais utilizou-se três: hidrólise da esculina, onde as cepas em estudo foram inoculadas em tubos contendo caldo vermelho de fenol, adicionado de esculina na proporção de um grama por litro. Após incubação à temperatura de 28°C por 24-48 horas, considerava-se como positivas as culturas em que havia mudança da coloração do caldo de vermelho para amarelo. A coloração amarela decorre da mudança de cor do indicador de pH, em função da acidificação do meio, demonstrando a utilização da glicose, originária da hidrólise da esculina; prova da produção de gás a partir da glicose (TSI), onde as culturas foram inoculadas em tubos contendo caldo vermelho de fenol base adicionado de glicose e tubos de Durham invertidos. Após incubação à temperatura de 28°C por 24-48 horas foi realizada a leitura, considerando-se como positivo o teste em que havia a produção de gás, no interior do tubo de Durham; prova da fermentação da arabinose que consiste em inocular os isolados em tubos contendo caldo vermelho de fenol base, adicionado do carboidrato a ser testado. A incubação foi realizada à temperatura de 28°C por 24-48 horas e consideradas positivas as provas em que ocorria acidificação do meio, revelada pela mudança de cor do indicador de pH de vermelho para amarelo.

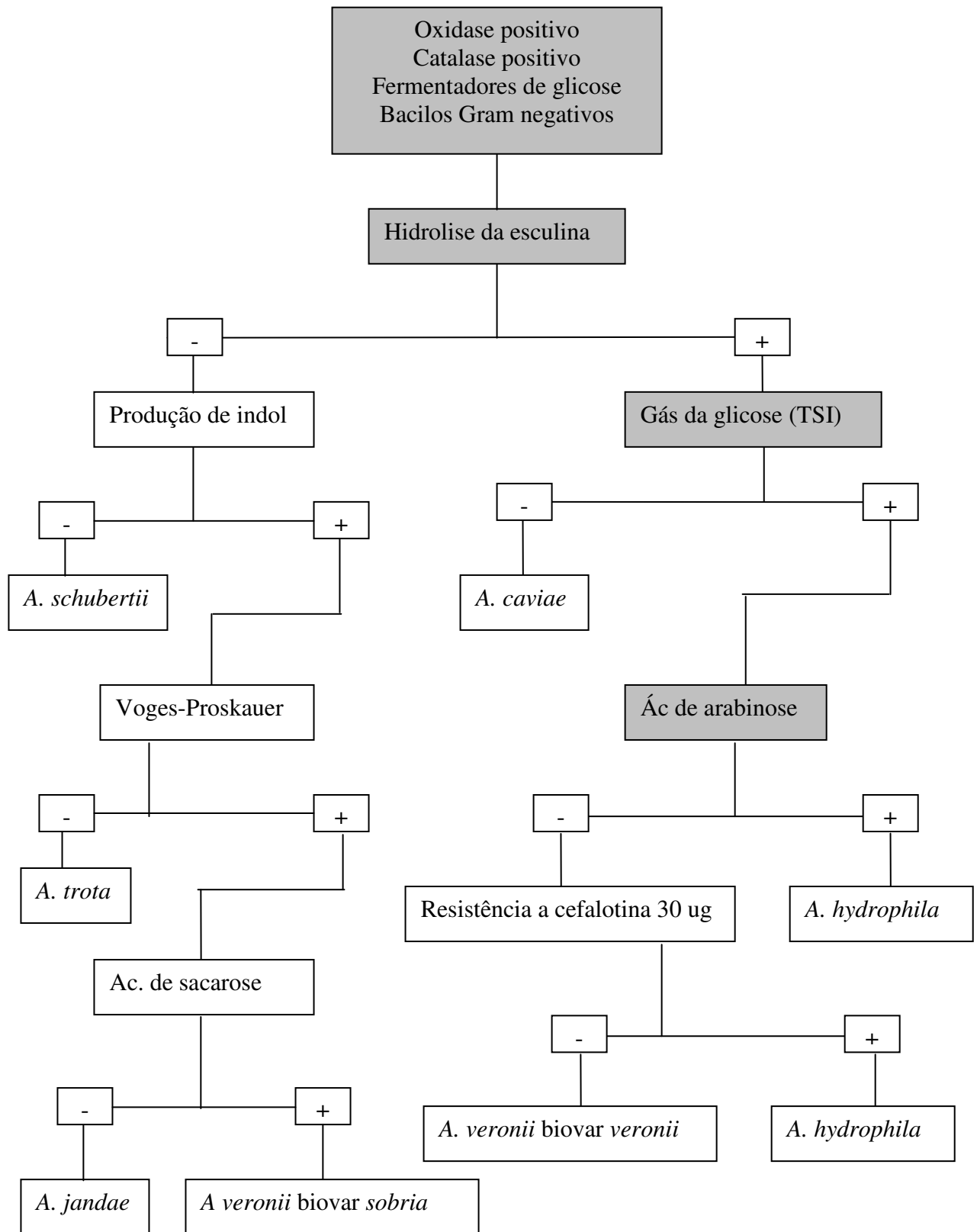


Figura 1- Chave de identificação Aerokey II. Testes bioquímicos para classificação dos isolados do gênero *Aeromonas* (CARNAHAN et al.,1991).

3.4 Métodos Moleculares

3.4.1 Identificação do gênero *Aeromonas* pela técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para identificação do gênero *Aeromonas* pela PCR foram utilizados 74 isolados de *Aeromonas* spp. positivos no teste bioquímico. A extração do DNA genômico foi realizada por Kit de extração¹, segundo as recomendações do fabricante. Após a extração do material genético, a concentração do DNA bacteriano foi medida em espectrofotômetro para avaliar a quantidade e a qualidade do DNA extraído.

A partir do DNA genômico purificado, foi realizada a PCR utilizando um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas* (Aero16-Fw 5'-TGACGTTACTCGCAGAAGA-3' e Aero16-rev 5'-GCTTGCAGCCCTCTGTACG-3'), proposto por Uehara (2008), onde sua amplificação resulta em um fragmento de 787 bp. Foi usado como controle positivo uma cepa de referência de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, obtida na Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25µL, contendo 3µL de DNA (50ug/µL); 5µL de tampão 5x; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 200 µM DNTP; 0,2 µM de cada iniciador, 1,25U de Taq polimerase (Invitrogen) e água Milli Q suficiente para completar o volume final de 25µL.

Para amplificação do DNA foi utilizado 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 minuto; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. Um controle negativo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA bacteriano foi utilizado.

O produto da PCR amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% , corado com brometo de etídio, para a verificação do fragmento

¹ ilustra bactéria genomicPrep Mini Spin Kit- GE Healthcare.

amplificado com seus respectivos pesos moleculares. Para a determinação do peso molecular aproximado das bandas, foram utilizados em cada corrida, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

3.4.2 Identificação das espécies de *Aeromonas* pela técnica de Polimorfismo de Fragmento de Restrição Lento (RFLP) do gene 16S rRNA.

A caracterização das espécies de *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. media*, *A. sóbria*, *A. jandae*, *A. veronii* biótipo *veronii*, *A. schubertii* e *A. trota*) pelo método de RFLP-PCR do gene 16S rRNA, foi realizada com base no protocolo proposto por Borrell et al. (1997). Para amplificação do gene foram utilizados os primers: 16SAer-F 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' e 16SAer-R 5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3' (BORREL et al., 1997).

As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 50µL, contendo 2µL de DNA; 5µL de tampão 10x; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,2mM de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 1µL de cada iniciador, 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli Q suficiente para completar o volume final de 50µL.

Para amplificação foi empregado um ciclo inicial a 93°C por 3 minutos; 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a temperatura de 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. Um controle negativo contendo todos os componentes, exceto o DNA bacteriano foi utilizado.

Após a amplificação, foram utilizadas alíquotas de 8µL do amplificado adicionado de 2µL de tampão de corrida (2,5 mg/L de azul de bromofenol, 2,5 mg/L de xilol, 300 mg/L de glicerol) e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da amplificação e tamanho do fragmento amplificado.

Os produtos da PCR obtidos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *AluI* e *MboI*, conforme as instruções do fabricante.

Alíquotas de 8 μ L de cada mistura da reação de restrição, foram adicionadas a 2 μ L de tampão de corrida. O produto de digestão foi separado por meio de eletroforese em gel de agarose a 4%, corados com brometo de etídio e visualizados sob transiluminador UV.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado ou teste de Fisher, com nível estipulado de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos dados apresentados na tabela 1, verifica-se que do total de 60 amostras de ostras analisadas, 59 (98,3%) estavam contaminadas por *Aeromonas* spp., sendo 30 procedentes do município de Humberto de Campos e 30 do município de Raposa. Quanto ao percentual de contaminação de ostras, por município, verificou-se que das 30 amostras de ostras provenientes do município de Raposa, 29 (96,6%) e 30 (100%) das amostras do município de Humberto de Campos estavam contaminadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, não havendo diferenças estatísticas entre estes municípios quanto a presença da bactéria nas amostras ($p > 0,05$). Estes dados são preocupantes no aspecto da saúde pública, visto que é um alimento consumido “*in natura*”. Ressalta-se que as ostras cultivadas no município de Raposa são consumidas no próprio município, durante os passeios de barcos promovidos pelas agências de turismo local ou nos restaurantes da cidade, portanto não comercializada em outros municípios.

Quanto às ostras do município de Humberto de Campos, verificou-se que são extraídas de regiões de mangue, no período de maré vazante, onde é possível a visualização das ostras fixadas às raízes dos manguezais e são destinadas ao comércio dos municípios de Raposa, São Luís e São José de Ribamar, onde são comercializadas por vendedores ambulantes, nas praias do Araçagy, Olho d’água e São Marcos.

Os percentuais de contaminação das ostras encontrados nesta pesquisa são superiores aos encontrados por Evangelista-Barreto et al. (2006), que ao analisarem 30 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorea*) de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó (Fortaleza/Ceará/Brasil), isolaram cepas de *Aeromonas* spp. em 15 (50%) das amostras; Gomes (2002) que analisou 50 amostras e isolou *Aeromonas* sp. em 10,7% das amostras de ostras comercializadas na cidade de São Paulo; Colakoglu et al. (2006), ao pesquisarem *Aeromonas* spp. em ostras na costa da Turquia, analisaram um total de 127 amostras, identificando 84 amostras contaminadas; Pereira et al.

(2004) no estado do Rio de Janeiro, analisando 86 amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos, isolaram *Aeromonas* spp. em 76 (86%) das amostras.

Tabela 1. Número e percentual de amostras de ostras e água contaminadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, provenientes dos municípios de Raposa e Humberto de Campos, Maranhão, 2009.

Procedência	Ostras/60*				Água/20**			
	Positivas		Negativas		Positivas		Negativas	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Raposa	29	96,6	1	3,3	6	60	4	40
H. de Campos	30	100	0	0	9	90	1	10
TOTAL	59	98,3	1	3,3	15	75	5	25

*Teste exato de Fisher ($p>0,05$).

** Teste exato de Fisher ($p<0,05$).

Quanto às amostras da água utilizada no cultivo das ostras (tabela 1), verifica-se que de um total de 20 amostras de água, 15 (75%) foram positivas para *Aeromonas* spp., onde 9 (90%) das amostras foram provenientes do município de Humberto de Campos, e 6 (60%) das amostras obtidas no município de Raposa estavam contaminadas. Com base no teste exato de Fisher, observou-se que o percentual de amostras de água positivas depende da região de onde essa água é obtida, sendo que a contaminação maior foi evidenciada no município de Humberto de Campos ($p<0,05$).

Estes resultados podem retratar as condições precárias de saneamento básico encontradas em ambos os municípios, sendo mais evidenciada no município de Humberto de Campos, onde foi observado lançamento de esgoto direto à foz do rio. Esta informação explica o percentual elevado de contaminação das ostras, uma vez que o sistema de alimentação desse organismo aquático é do tipo filtração e os pescadores dos Municípios de Raposa e Humberto de Campos não realizam o processo de depuração das ostras, que consiste em colocá-las, após sua colheita, em tanques contendo

água limpa e potável, visando eliminar patógenos presentes nos tecidos dos moluscos por meio de mecanismo de filtração natural.

Corroborando com estas afirmações Mendes (2001), cita que as ostras, normalmente não são submetidas a um processo de sanitização, sendo consumidas na forma "*in natura*", o que sugere a possível veiculação de inúmeros microrganismos capazes de provocar doenças; Evangelista-Barreto (2006), ressalta que o cultivo de animais marinhos, como moluscos bivalves (ostras e mexilhões) além de ser uma fonte alternativa de alimentos, também é uma opção para a subsistência das populações costeiras. No entanto, a descarga de esgotos em reservatórios de água, rios e mar, são as causas poluidoras mais comuns dos ambientes aquáticos, registradas no mundo inteiro, comprometendo a qualidade dos produtos pesqueiros; Galvão et al. (2006), afirmam que a contaminação de águas costeiras pode ameaçar seu uso potencial para o cultivo de moluscos bivalves que sendo organismos filtradores, têm capacidade de concentrar e acumular altas densidades de bactérias, protozoários e vírus patogênicos, além de metais e outros compostos químicos tóxicos e toxinas provenientes de certos microrganismos; Pereira (2003) afirma que os ecossistemas aquáticos submetidos à poluição ou contaminação podem trazer sérios problemas de saúde aos seres humanos. Ainda segundo o autor, as toxiiinfecções alimentares de origem bacteriana representam a conseqüência mais comum relacionada ao consumo de moluscos bivalves provenientes de áreas poluídas.

A legislação referente aos níveis aceitáveis de contaminação em águas destinadas à criação de moluscos bivalves e para os próprios moluscos varia de acordo com cada país. As normas vigentes, nos principais mercados produtores de moluscos no mundo, para a avaliação da qualidade sanitária dos produtos marinhos cultivados para a comercialização são asseguradas pela análise físico-química das águas salinas, bem como pelo monitoramento dos níveis de coliformes que estejam presentes nas águas de cultivo e/ou dos próprios animais (CORRÊA, 2006).

No Brasil, de acordo com a atual legislação, a Resolução n. 12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, não

preconiza a pesquisa de coliformes termotolerantes para moluscos “*in natura*”, exigindo unicamente a análise para *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva (ANVISA, 2001). Os níveis de coliformes fecais e *E. coli* são exigidas somente para a qualidade das águas de cultivo, conforme Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

No Brasil, em 1988, o Ministério da Agricultura (MA), estabeleceu limites referentes à presença de coliformes fecais em águas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves, (Informação DYPES, nº 097/88), estipulando que as áreas proibidas serão aquelas cujo resultado das análises microbiológicas apresentem níveis superiores a 700 coliformes fecais/100mL de água salgada. Esse mesmo dispositivo estabeleceu que as áreas determinadas para cultivo contenha níveis de coliformes fecais entre 70-700 coliformes fecais/100mL, sendo indispensável o tratamento dos moluscos através de depuração. As áreas livres para maricultura são aquelas que contém menos de 70 coliformes fecais/100mL de água salgada (Brasil, 1988).

Em 2005, através do decreto nº 5.564, de 19 de outubro (BRASIL, 2005), foi instituído o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves, formado pelos Ministérios de Aqüicultura e Pesca e Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela Agência Nacional, com a finalidade de estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantia da qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves, visando à proteção da saúde da população e à criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional. Entretanto, sabe-se que as exigências pelos órgãos oficiais de análises microbiológicas para alimentos e águas são ainda muito restritas à pesquisa de poucos microrganismos, fato que ressalta a importância de pesquisas sobre patógenos emergentes, como a *Aeromonas* spp., demonstrando a real necessidade da inclusão pelos Órgãos Oficiais das análises microbiológicas para estes patógenos.

Com relação à caracterização das espécies, pelos métodos bioquímicos (tabela 2), observou-se que de um total de 59 isolados de *Aeromonas* spp. obtidos das amostras de ostras, 35 (59,5%) foram confirmados como

Aeromonas hydrophila e os 24 (40,6%) isolados restantes foram classificados como *Aeromonas caviae*.

Quanto a identificação das espécies por municípios, verifica-se (tabela 2) que dos 29 isolados de *Aeromonas* spp. obtidas das amostras de ostras provenientes do município de Raposa, 19 (65,5%) foram classificados como *A. hydrophila* e 10 (34,4%) como *A. caviae*. Dos 30 isolados de *Aeromonas* spp. (amostras de ostras) provenientes do município de Humberto de Campos, 16 (53,3%) foram identificados como *A. hydrophila* e 14 (46,6%) como *A. caviae*. Constatou-se que, em ambos os municípios, o percentual de amostras de ostras contaminadas por *A. hydrophila* foi superior ao percentual de amostras contaminadas por *A. caviae*.

Tabela 2: Caracterização bioquímica das espécies de *Aeromonas* isoladas das amostras de ostras procedentes dos municípios de Raposa e Humberto de Campos - MA, 2009.

Município	n	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
Raposa	30	29 (96,6%)	19 (65,5%)	10 (34,4%)
Humberto de Campos	30	30 (100%)	16 (53,3%)	14 (46,6%)
Total	60	59 (98,3%)	35 (59,3%)	24 (40,6%)

n= nº de amostras

Quanto as amostras de água, os resultados obtidos nos testes bioquímicos revelaram que de um total de 15 isolados de *Aeromonas* spp., 9 (60%) foram classificados como *A. hydrophila* e 6 (40%) como *A. caviae* (Tabela 3), sendo que dos 15 isolados de *Aeromonas* spp., seis foram provenientes do município de Raposa e nove do município de Humberto de Campos. Assim como nas amostras de ostras, também foi observado nas amostras de água, um maior percentual de contaminação por *A. hydrophila* em ambos municípios.

Tabela 3: Caracterização bioquímica das espécies de *Aeromonas* isoladas das amostras de água procedentes dos municípios de Raposa e Humberto de Campos - MA, 2009

Município	n	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
Raposa	10	6 (60%)	4 (66,6%)	2 (33,3%)
Humberto de Campos	10	9 (90%)	5 (55,5%)	4 (44,4%)
Total	20	15 (75%)	9 (60%)	6 (40%)

n= nº de amostras

A identificação das espécies de *A. hydrophila* e *A. caviae*, encontradas neste estudo, revelam o grande risco que as ostras provenientes do município de Raposa e Humberto de Campos-MA podem oferecer aos consumidores, uma vez que estas espécies são reconhecidas como patogênicas para o ser humano, devido a produção de citotoxinas, enterotoxinas e hemolisinas por estas espécies. Estes fatores de virulência por sua vez podem causar enfermidades principalmente em crianças e em pessoas imunodeprimidas. Segundo Pereira (2003), no Brasil existem diversos relatos de isolamento de diferentes espécies de *Aeromonas* spp. de amostras clínicas de casos de diarreia infantil, infecção hospitalar, ou gastroenterites causadas por ingestão de alimentos como ostras, mexilhões, pescado e vegetais.

Desta forma, se faz necessário a implantação de medidas higiênico-sanitárias por parte dos pescadores e produtores de ostras dos municípios de Humberto de Campos e Raposa, como os processos de depuração que possam garantir um alimento final seguro.

Corroborando com os achados desta pesquisa, ressalta-se os trabalhos realizados por Mendes (2004), em Pernambuco que analisando amostras de ostras, identificou as espécies *A. hydrophila* (77,78%) e *A. caviae* (22,22%); Lucena (2007) que utilizando a chave de identificação Aerokey II classificou 71,67% dos isolados obtidos de carcaças suínas, como *A. caviae*, 20% como *A. hydrophila*, 3,33% como *A. sobria*, e 1,67% como *A. trota*, *A. veronii* e *A.*

schubertii; Miñana-Galbis et al (2002) utilizando uma coleção de 202 cepas de *Aeromonas* isoladas de moluscos bivalves, água e amostras clínicas testaram 64 propriedades fenotípicas, sendo que 91% desses isolados foram identificados em nível de espécie e observaram que *A. caviae* foi predominante nos moluscos bivalves e *A. bestiarum* em amostras de água doce; Pereira (2003), analisando amostras de mexilhões na Baía de Guanabara, isolou as seguintes espécies de *Aeromonas*: *A. media* (31,10%), *A. hydrophila* (15,50%), *A. caviae* (14,80%), *A. veronii* biótipo *veronii* (11,60%), *Aeromonas* spp. (7,36%), *A. sobria* (4,20%), *A. trota* (4,20%), *A. jandaei* (1,31%), *A. schubertii* (1,31%) e *A. veronii* biótipo *sobria* (0,52%) e identificou a espécie *Aeromonas hydrophila* em 14 pontos de coleta da Baía de Guanabara. Segundo o autor estes resultados mostram que essa espécie encontrava-se amplamente distribuída no ecossistema aquático dos mexilhões estudados, e considerando seu importante significado clínico-epidemiológico e sua capacidade de causar doenças oportunistas ou quadros diarreicos graves, após o consumo de mariscos e pescado contaminados ingeridos sob a forma *in natura* ou insuficientemente cozidos, a *A. hydrophila* representa um patógeno emergente de extrema importância para vigilância sanitária de alimentos e saúde pública.

Quanto à análise molecular, os isolados confirmados no teste bioquímico para o gênero *Aeromonas*, foram submetidos à técnica da PCR, utilizando-se o primer gênero-específico descrito por Uehara (2008), para caracterização do gênero por este método.

Com base nos resultados da identificação molecular do gênero *Aeromonas*, observa-se que de um total de 74 isolados (59 isolados obtidos de amostras de ostras e 15 isolados obtidos de amostras de água), previamente caracterizados nos testes bioquímicos como *Aeromonas* spp., 38 (65,51%) dos isolados obtidos de amostras de ostras confirmaram a caracterização do gênero *Aeromonas* pelo método molecular e 20 (34,48%) não confirmaram a caracterização do gênero; e para os isolados obtidos das amostras de água, 15 (100%) confirmaram a caracterização (Tabela 4).

Estes resultados demonstram que podem existir falhas na identificação bioquímica do gênero *Aeromonas*, uma vez que os testes bioquímicos podem

gerar resultados duvidosos (FIGUEIRA et al., 2000; ARORA et al., 2005) e muitas vezes são incapazes de identificar precisamente as espécies de *Aeromonas* devido à homogeneidade existente no gênero (FIGUEIRA et al., 2000; WAHLI et al., 2005).

Comparando os resultados obtidos na análise bioquímica com os da análise molecular (tabela 4), observa-se que 53 dos 74 isolados identificados pelos testes bioquímicos, foram identificados na PCR como pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Aplicando-se o teste do Qui-quadrado para verificar a interdependência dos resultados frente ao teste diagnóstico efetuado, verificou-se que houve dependência dos testes ($\chi^2=11,59$; $P=0,0007$), ou seja, os resultados obtidos podem variar de acordo com o teste usado. Para as amostras de ostra e água obtidas no município de Raposa foram confirmados como gênero *Aeromonas* 16 (55,17%) e 6 (100%), respectivamente.

Tabela 4 – Resultados da identificação molecular dos 74 isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de amostras de ostra e água, submetidos a técnica da PCR, 2009.

Município	Ostra(59 isolados de <i>Aeromonas</i>)			Água (15 isolados de <i>Aeromonas</i>)		
	Confirmou	N/confirmou	Total	Confirmou	N/confirmou	Total
Raposa	16(55,17%)	13 (44,82%)	29	6 (100%)	0	6
H. de Campos	22(73,33%)	8 (26,66)	30	9 (100%)	0	9
Total	38(65,51%)	20 (34,48%)	59	15 (100%)	0	15

Quanto às amostras procedentes do município de Humberto de Campos de um total de 30 isolados de *Aeromonas* (amostras de ostras), houve confirmação do gênero, pelo método molecular, em 22 isolados, representando um percentual de 73,33%; em relação às amostras de água procedentes deste município, todos os isolados de *Aeromonas* foram confirmados pela técnica da PCR.

Nas figuras 2 e 3, estão apresentados os resultados da caracterização molecular do gênero *Aeromonas* de 57 dos 74 isolados obtidos de amostras de ostra e água, onde pode-se observar que os isolados, inclusive o controle positivo (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966) que apresentaram um fragmento de 787 pb, foram confirmados como pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Uehara (2008), realizaram um estudo para verificar a concordância entre o perfil de restrição do fragmento 16 rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*. Para tal, desenvolveu um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*, submetendo 40 cepas, previamente isoladas e caracterizadas por testes bioquímicos e três diferentes espécies de bactérias (*V. cholera*, *Plesiomonas shigelloides* e *E. coli*) à amplificação com o primer Aero16-Fw 5'-TGACGTTACTCGCAGAAGA-3' e Aero16-rev 5'-GCTTGCAGCCCTCTGTACG-3', verificando ausência de amplificação nas três espécies de bactérias utilizadas como controle negativo e amplificação, caracterizada pela presença de uma banda de 787pb de todas as 40 cepas de *Aeromonas* testadas. Segundo o pesquisador, estes iniciadores são úteis para auxiliar microbiologistas na detecção de *Aeromonas* spp. e diferenciar o gênero de outros organismos proximalmente relacionados.

Diferenças na identificação das espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* quando comparados os métodos bioquímicos e moleculares já foram descritas por vários pesquisadores como Kozinska et al. (2002) e Castro-Escarpulli et al. (2003).

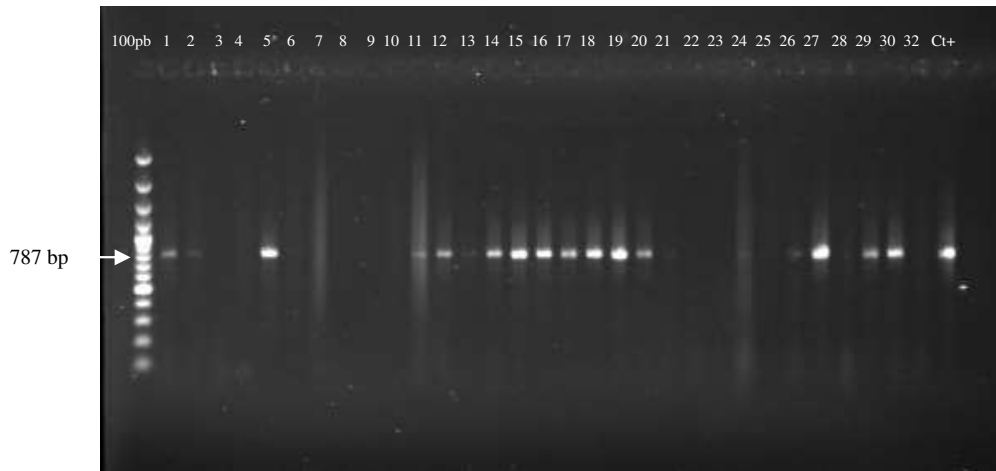


Figura 2 – Gel de agarose contendo o fragmento de 787 bp amplificado a partir de um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*. Linha 1 até 32 – isolados de *Aeromonas* spp., previamente identificadas por testes bioquímicos. Ct+ : controle positivo (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966).

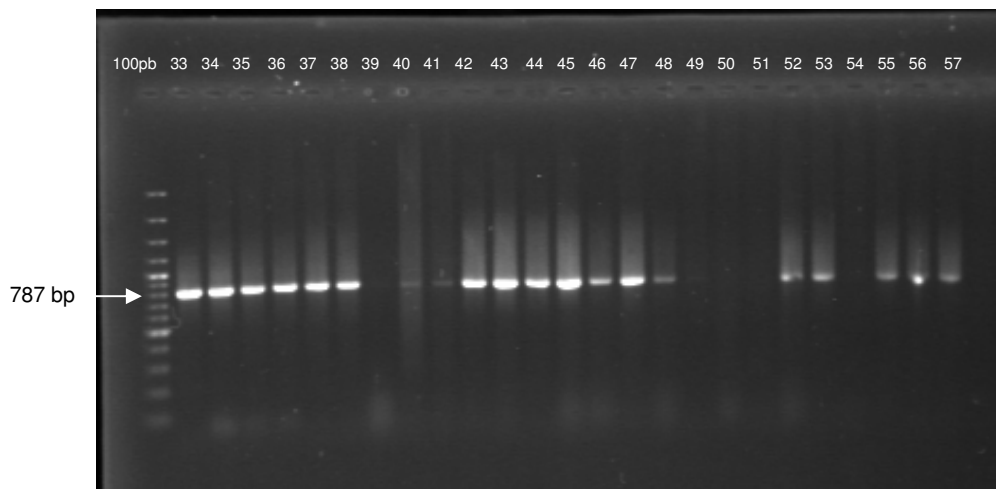


Figura 3 – Gel de agarose contendo o fragmento de 787 bp amplificado a partir de um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*. Linha 33 até 57 – isolados de *Aeromonas* spp., previamente identificadas por testes bioquímicos.

Para Kozinska et al. (2002) o uso de primers gênero-específicos e a combinação de enzimas de restrição resultam em classificações mais claras para as espécies de *Aeromonas*, podendo ser usadas com facilidade em amostras ambientais. Segundo estes autores, o uso dos testes bioquímicos pode tornar-se difícil, principalmente devido a homogeneidade fenotípica das

espécies do gênero *Aeromonas*. Por outro lado, Graf (1999) relata que em algumas condições clínicas os testes bioquímicos ainda devem ser usados, especialmente naqueles casos onde as técnicas moleculares geram resultados controversos.

Lee et al. (2002), com o objetivo de investigar a distribuição de espécies de *Aeromonas* em trutas de fazendas e nos riachos, desenharam um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas*, diferente do par proposto por Uehara (2008) e identificaram as espécies utilizando RFLP com as enzimas *Alu I*, *Cfo I*, *Pvu II* e *Xho II*.

Cáscon et al. (1997) identificaram cepas de *Aeromonas* realizando uma RFLP-PCR do gene *aroA*. Segundo os autores, a sequência deste gene é conservada entre bactérias Gram-negativas e pode ser usado como uma ferramenta apropriada para identificação do gênero de bactérias.

No presente trabalho, foram submetidas à caracterização pelo método de RFLP-PCR 43 dos 53 isolados confirmados como *Aeromonas* spp. pela técnica de PCR. Destes 43 isolados, 32 foram obtidos de amostras de ostras e 11 das amostras de água.

Como pode ser observado na Figura 4, foram obtidos três padrões de bandas após digestão com as enzimas de restrição *MboI* e *AluI*. Padrão 1: caracterizado por apresentar bandas com peso molecular de 69bp, 78bp, 85bp, 165bp, 207bp, 300, 346bp e 430bp; padrão de banda 2: caracterizado por apresentar bandas com peso molecular de 69bp, 78bp, 85bp, 165bp, 207bp, 300bp e 430bp e padrão 3: caracterizado por apresentar as bandas de 69bp, 78bp, 85bp, 118bp, 207bp, 250bp, 300bp e 346bp. Padrões estes que foram diferentes dos descritos por Borrell et al. (1997), ao utilizarem estas enzimas em cepas de referência de *Aeromonas*.

Dentre os 32 isolados das amostras de ostra, obteve-se 13 isolados que apresentaram o padrão de banda 1, sete que apresentaram o padrão de banda 2 e 12 dos isolados se caracterizaram por apresentar o padrão de banda 3. Ainda com base nos três tipos de padrões encontrados, os 11 isolados de *Aeromonas* das amostras de água apresentaram os padrões 1 e 3, com quatro e sete isolados, respectivamente.

Desta forma, não foi possível caracterizar as espécies de *Aeromonas*, utilizando o método de RFLP-PCR 16S rRNA proposto por Borrell et al. (1997). Estes resultados podem ser explicados pela alta heterogeneidade genética deste gênero, implicando em resultados inespecíficos, como demonstrados por vários pesquisadores. Portanto, sendo necessário à realização do sequenciamento genético dos isolados de *Aeromonas* para se determinar a classificação das espécies.

Ormen et al. (2005) comparando os testes bioquímicos com os métodos moleculares (PCR-RFLP) de identificação das espécies de *Aeromonas* em isolados clínicos e ambientais descreveram resultados discrepantes entre estas duas técnicas, chegando a 96% e 46% de resultados diferentes ao compararem os isolados ambientais e clínicos respectivamente

Ainda segundo os mesmos autores, 56% dos isolados identificados como *A. caviae* e *A. hydrophila* pelos métodos bioquímicos não se confirmaram pela PCR, sendo esta divergência maior para amostras ambientais. Para estas diferenças os autores citam que testes bioquímicos que usam esquemas de identificação baseados em isolados clínicos não podem ser aplicados ou fornecem incompleta identificação de isolados ambientais, além disso os autores citaram que a grande heterogeneidade genética das amostras ambientais pode influenciar nestes resultados. Corroborando com esta afirmação Huys et al. (2002) usando técnicas moleculares em isolados de *A. hydrophila* relataram grande variação genética nesta espécie, sugerindo a existência de uma subespécie.

Laganowska & Kaznowski (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*.

Existem na literatura diferentes esquemas de digestão com base no RFLP do 16S rDNA para se determinar a posição taxonômica de cepas de *Aeromonas* (GRAF, 1999). No entanto, muito 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 utilizam enzimas que geram um grande número de fragmentos, dificultando a análise dos resultados (BORRELL et al., 1997; FIGUEIRAS et al., 2000; LEE et al., 2002; CHATAK et al., 2007).

Iaganowska & Kaznowski (2004) utilizando um esquema de RFLP, diferente do realizado neste trabalho, com 69 isolados de *Aeromonas* spp., obtiveram um total de 15 grupos de hibridização, concluindo que a técnica pode ser empregada para algumas espécies de *Aeromonas*. Todavia Abdullah et al. (2003) relataram que, embora o método molecular de RFLP tenha maior capacidade de promover discriminação entre as espécies de *Aeromonas* do que quando comparado a outras técnicas, resultados insatisfatórios podem ocorrer se o primer usado não for adequado.

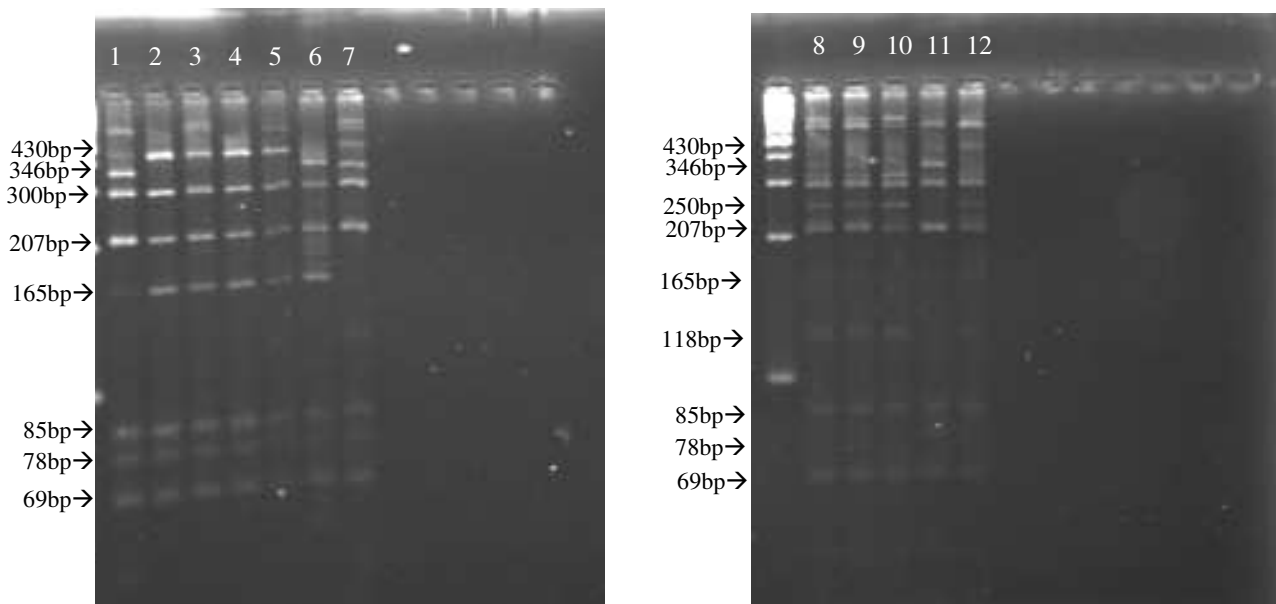


Figura 4– Isolados de *Aeromonas* spp. digeridas com as enzimas de restrição *Alu I* e *MboI*. De 1 até 10 – padrão de banda dos isolados obtidos de amostras de ostra; 11 e 12 - isolados obtidos de amostras de água.

Miñana-Galbis et al. (2007) relataram a grande variação genética da *Aeromonas* ao identificarem a presença de uma nova espécie de isolados de moluscos bivalves. Alperi et al. (2008) usando técnica de RFLP para identificação de espécies de *Aeromonas*, provenientes de várias fontes,

verificaram que 8,1% das amostras apresentaram padrões de bandas diferentes, levando a identificação duvidosa destas amostras. Para estes autores a microheterogeneidade dos nucleotídeos destas espécies deve ser levada em conta quando do uso da RFLP ou de outras técnicas moleculares.

Segundo Rosado et al. (1997) os genes que codificam o rRNA (operons do rRNA) tem sido extensivamente estudado para muitas espécies bacterianas, sendo que o número de operons varia de uma (em micoplasmas) a doze cópias (em bacilos) por cromossomo. Assim, como outros genes que ocorrem em múltiplas cópias no genoma, os genes ribossomais estão sujeitos a um processo de homogeneização o que significa que todas as cópias tendem a ser similares umas às outras. No entanto, segundo Stralioetto & Rumjanek (1999), recentes estudos têm detectados que pequenas variações podem existir entre as cópias destes genes, sendo relatadas a presença de variações alélicas, ou microheterogeneidade, entre os genes do 16S de várias espécies bacterianas.

Corroborando com esta afirmação, Graf (1999) sugere a possibilidade de variação na sequência de 16S rRNA deste gênero. Outro fato importante, segundo o autor se refere a utilização de cepas de referência, pois, a não utilização destas cepas para comparação nas técnicas de RFLP pode determinar resultados inconclusivos.

Cascón et al. (1996) citaram que as técnicas moleculares são sensíveis para identificar cepas de *Aeromonas hydrophila*, porém em culturas com menos de 10^6 UFC os resultados podem ser insatisfatórios.

Padrões de bandas diferentes podem ser observados devido a concentração e qualidade do gel de agarose nas técnicas moleculares, esta afirmação foi feita por Ghatak et al. (2007) que obtiveram pequenos desvios nos padrões de banda gerados em esquema de enzima de restrição quando comparados aos valores teóricos, porém segundo os autores, não comprometeram os resultados dos seus estudos.

Conforme mostra a literatura, a formação dos padrões de bandas diferentes encontrados neste estudo podem ser resultado de um conjunto de causas citadas anteriormente, podendo estar principalmente relacionada a

grande variação genética das bactérias do gênero *Aeromonas*, principalmente em amostras ambientais.

5 CONCLUSÕES

- As ostras provenientes dos Municípios de Raposa e Humberto de Campos e comercializadas no Município de São Luís representam um risco em potencial de veicular bactérias do gênero *Aeromonas* para os consumidores deste alimento, uma vez que foram identificadas as espécies, *A. hydrophila* e *A. caviae*, que são potencialmente patogênicas para o ser humano.
- As águas procedentes dos locais de cultivo (Raposa) e pesca (Humberto de Campos) das ostras estão poluídas, o que pode influenciar na qualidade das ostras obtidas destas regiões.
- A Reação em Cadeia de Polimerase-PCR deve ser usada como ferramenta para identificar o gênero *Aeromonas* por ser um método rápido e eficiente.
- Não foi possível caracterizar as espécies de *Aeromonas* pela técnica do RFLP, sugerindo que em se tratando de ferramentas moleculares esta não seja a de escolha para caracterizar espécies de *Aeromonas*, em face da heterogeneidade genética das espécies deste gênero.
- Apesar das crescentes pesquisas utilizando métodos moleculares para identificação de patógenos, ressalta-se a importância dos testes bioquímicos na identificação de bactérias do gênero *Aeromonas*, uma vez que estes são importantes no diagnóstico de surtos envolvendo este microrganismo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Faz-se necessário adotar processos de purificação, como cozimento e depuração, diminuindo os riscos desse molusco veicular doenças para o consumidor;
- Há a necessidade de um maior rigor, por parte dos órgãos competentes, quanto à fiscalização dos produtos marinhos, comercializados no estado do Maranhão, em especial ao comércio ambulante de ostras, nas praias da ilha de São Luís.
- Espera-se que os dados obtidos na presente pesquisa possam contribuir, de maneira satisfatória, para subsidiar as ações das autoridades sanitárias e alertar os consumidores desse molusco bivalve sobre os perigos de consumir alimentos de origem marinha crus.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p. 2348-2357, 2003.

ABDULLAH, A.I.; HART, C. A.; WINSTANLEY, C. Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. **J. Appl. Microbiol.** v.95, p. 1001–1007, 2003.

ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C. A.; WEKELL, M. M. Incidence of motile *Aeromonas* from United States west coast shellfish growing estuaries. **J. Food Prot.** v.53, p. 849-855, 1990.

ABEYTA,C.; KAYSNER,C.A.; WEKELL,M.M.; SULLIVANJ.J.; STELMA,G.N. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oyster implicated in an outbreak of foodborne illness. **J Food Prot**, v.49, p. 643,1986.

AKABOSHI,S. Notas sobre o comportamento da ostra japonesa, *Crassostrea gigas* (Thumberg,1975), no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, v.6, p. 93-104, 1979

ALPERI A; FIGUERAS M. J; INZA I; MARTINEZ-MURCIA A. J. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. **Int Microbiol.** v.11, n. 3, p.185-94, 2008.

ALTWEGG, M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*: Isolation procedures for pathological specimens. **Cell Mol Life Sci**, v. 43, n. 4, p. 354-355,1987.

AMADOR, L. V. Estudio Taxónomico de *Aeromonas* móviles y *Salicina* negativas. Tese. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução n^o 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>, Brasília, DF. **Acesso em 18 de janeiro de 2010.**

ARAÚJO, R. M.; ARRIBAS, R. M.; LUCENA, F. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh Waters. **J. Appl. Bacteriol.** v. 67, p.213-217, 1989.

ARAÚJO, V.S. **Estudo de marcadores de virulência em cepas de *Aeromonas* isoladas de alimentos.** 2001. 66f. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2001.

ARORA, S. K.; NEELY, A. N.; BLAIR, B.; LORY, S.; RAMPHAL, R. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. **Infect Immun.** v. 73, n. 7, p. 4395–4398, 2005.

AVELAAR, A. H.; VONK, M. The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 7, p. 169-171, 1998.

BARNABÉ, G. **Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura.** Ed. Acribia, Zaragoza, 519 f. 1996.

BERNADES, M. V. S.; MESQUITA, A. J.; NUNES, I. A.; SILVA, P. C.; RIOS, E. R.; MARQUES, L. R. S. Avaliação de três diferentes sanitizantes em viveiros de piscicultura pela contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Cienc Anim Bras.** v.4, p.69-83, 2003.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Perfil de resistência/sesibilidade e virulência de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água obtidas em abatedouros de bovinos. **Braz. J. Microbiol.** v.32, p. 334-339, 2001.

BORRELL, N.; ACINAS, S. G.; FIGUERAS, M. J.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, p. 1671–1674, 1997.

BOTTARELLI, E.; OSSIPRANDI, M.C. *Aeromonas* infections: an update. Artigo apresentado no Curso: “A nova cultura da produção animal no contexto da União Européia”, Universidade de Parma, Faculdade de Medicina Veterinária, Parma, 1999. Disponível em: http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bottarelli2_bottarelli.htm. **Acesso em: 12 outubro de 2009.**

BRASIL, 1988. Informação DIPES nº 097/88, dispõe sobre os níveis de coliformes fecais permitidos para áreas de cultivo de mexilhões. Serviço de Inspeção de Produtos Animais- SERPA-SC., Ministério da Agricultura (MA), Brasília-DF.

BRASIL, Decreto n. 5.564, de 19 de Outubro de 2005. **Institui o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves.** Diário Oficial da União, n. 202, p. 2, 20 de Outubro de 2005.

BRASIL, Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde Aprova Regulamento Técnico “Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximo e Mínimos de Contaminantes Químicos em Alimentos”. Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998.

BURKHARDT, W. ; CALCII, K.R. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, n.4, p. 1375-1378, 2000.

BULHÕES, C. C. C.; ROSSI JUNIOR, O. D. Occurrence of the genus *Aeromonas* in minas frescal cheese. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.54, n. 3, p.320-324, 2002.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARI, V. H. Diversidade no DFomínio Bactéria. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v1cap01.pdf>. Acesso em 08 de outubro de 2008.

CARNAHAN, A. M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S. W. Aerokey II: a flexible Key for identifying clinical *Aeromonas* sp.pecies. **J. clin. Microbiol.** v.29, p. 2843-2849, 1991.

CARNAHAN, A. M. & ALTWEGG, M. Taxonomy In: AUSTIN, B.; ALTWEGG, M.; GOSLING, P. J.; JOSEPH, S. Editors, **The genus *Aeromonas***, Wiley, New York, p. 1–38, 1996.

CASCÓN, S. A.; ANGUITA, C. J.; HERNANZ, M. C.; SÁNCHEZ, S. M.; YUGUEROS, M. J.; NAHARRO, C. G. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 156, n.2, p. 199-204, 1997.

CASCÓN, A.; ANGUITA, J.; HERNANZ, C.; SANCHEZ, M.; FERNANDEZ, M. AND NAHARRO, G. Identification of *Aeromonas hydrophila* Hybridization Group 1 by PCR Assays. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, n. 4, p. 1167–1170, 1996.

CASTRO-ESCARPULLI, F.; FIGUERAS, M.J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNANDEZ-RENDON, E.; APARÍCIO, G.O; GUARRO, J.; CHACON, M.R. Characterisation of *Aeromonas* spp.. isolated from frozen fish intended for human consumption in México. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 84, n. 1, p. 41– 49, 2003.

CHACÓN, M. R.; FIGUEIRAS, M. J.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; SOLER, L.; GUARRO, J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.84, p. 269-278, 2003.

CHAN, F.K.L., CHING, J.Y.L., LING, T.K.W., CHUNG, S.C.S., SUNG, J.J.Y. *Aeromonas* infection in acute suppurative cholangitis: review of 30 cases. **J Infection**, v.40, n. 1, p. 69-73, 2000.

CHRISTO, S. W. **BIOLOGIA REPRODUTIVA E ECOLOGIA DE OSTRAS DO GÊNERO CRASSOSTREA SACCO, 1897 NA BAÍA DE GUARATUBA (PARANÁ – BRASIL): UM SUBSÍDIO AO CULTIVO**. 2006, 110f. Tese. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

CHUANG, Y. C.; J. W.; LIU, W. C.; KO, K. Y.; LIN, J. J.; WU, A.; K.Y. HUANG. In vitro synergism between cefotaxime and minocycline against *Vibrio vulnificus*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 41, n. 10, p. 2214–2217, 1997.

COELHO, C.; HEINERT, A. P.; SIMÕES, C. M. O. ; BARARDI, C. R. M. Hepatitis A virus detection in oysters *Crassostrea gigas* in Santa Catarina, Brazil, by RT-PCR. **J Food Prot**. v. 66, n. 3, p. 507-511, 2003.

COLAKOGLU, F. A.; SARMASIK, A.; KOSEOGLU, B. Occurrence of *Vibrio* spp. And *Aeromonas* spp. In shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. **Food Control**. v. 17, n. 8, p.648-652, 2006.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. DAS CONDIÇÕES E PADRÕES DE QUALIDADE DAS ÁGUAS. CAPÍTULO III. RESOLUÇÃO N 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. **Acesso em 16 de outubro de 2009**.

CORRÊA, A. A. **Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*.** 2006, 100f. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2006.

COSTA, F. N. **Bactérias do Gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos: aspectos epidemiológicos, enterotoxigênicos e susceptibilidade a antimicrobianos.** 2002. 90f. Tese. Universidade Estadual Paulista- UNESP., Jaboticabal, 2002.

COSTA, F. N.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arq. Bra. Méd. Vet. Zoot**, v. 54, n. 5, p.534-535, 2002.

CRUZ-ROMERO, M., KERRY, J.P., KELLY, A.L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1139-1147, 2008.

DAVIES, A.R.; CAPELL, C.; JEHANNO, D.; NUCHAS, G. J. E.; KIRBY, R. M. Incidence of foodborne pathogens on European fish. **Food Control**, v.12, n.2, p. 67-71, 2001.

DELAMARE, A.P.L. **Produção de Anticorpos Monoclonais, Identificação Molecular e Tolerância à Salinidade em *Aeromonas*.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil. 1999.

DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P.; DA SILVEIRA, M. M.; ESHEVERRIGARAY, S. Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Lett. Appl. Microbiol.** v.30, p. 57-60, 2000.

DUGENCI, S. K.; CANDAN, A. Isolation of *Aeromonas* Strains from the Intestinal Flora of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L. 1758). **J. Vet. Anim. Sci.** v.27, p. 1071-1075, 2003.

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

EVANGELISTA-BARRETO N. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; CARVALHO, F. C. T.; TORRES, R. C. O.; SANT'ANNA, E. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, C. M. F. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophoerea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v.48, n.3, p. 29-133, 2006.

FARIAS, H. **Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea* sp., cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil.** Dissertação. Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FIGUEIRAS. M.J., SOLER. L., CHACÓN. M.R., GUARRO.J AND MARTINEZ-MURCIA.A. J. "Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp.. by 16s rDNA RFLP analysis". **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p. 2069-2073. 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION/
INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION/WORLD
HEALTH ORGANIZATION. *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs.* Noruega, p. 24, 2004.
Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin_report_en.pdf>.
Acessado em janeiro de 2009.

GALVÃO, J. A.; FURLAN, E. F.; SALÁN, E. O.; PORTO, P.; OETTERER, M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e

Bacillus cereus) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. **Ciênc. agrotec.** v. 30, n.6, p.1124-1129, Lavras Nov./Dec. 2006

GHATAK, S.; AGARWAL, R.K.; BHILEGAONKAR, K.N. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Lett. Appl. Microbiol.** v.44, n.5, p. 550–554, 2007.

GOMES M. L. Quantificação de *Aeromonas sp* em amostras de ostras e relação com coliformes fecais e esterptococos fecais. Produção de enterotoxina e sensibilidade a antibióticos a partir das cepas isoladas (2002). Disponível em: <http://en.scientificcommons.org/33797824>. acesso em 15 de outubro de 2009.

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.** v. 37, n. 10, p. 3194–3197, 1999.

HAVELAAR, A. H.; VONK, M. The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. **Let. Appl. Microbiol.** v.7, n.6, p.169-171, 1988.

HERRERA, F. C.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCIA-LOPES, M. L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **J. Appl. Microbiol.** v.100, n.3, p.527-536, 2006.

HICKMAN-BRENNER, F.W.; FANNING, G.R.; ARDUINO, M.J.; BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol negative species found in human clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.** v.26, n.8, p. 1561-64, 1988.

HUSS, H.H. - Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v.8, n.2, p. 91-98, 1997

HUYS, G.; KAMPFER, P.; ALBERT, M. J.; KUHN, I.; DENYS, R. AND SWINGS, J. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (Approved Lists 1980). **Int. J. System. Evol. Microbiol.**, v.52, p. 705–712, 2002.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

A Microbiología de los Alimentos: Características de los Patógenos Microbianos. 4 Ed. Zaragoza, España: Acribia, 1998.

IRIARTE ROTA, M. M.; RENGEL, A. Microbiological quality indicators of *Crassostrea rhizophorae*) and Las Marites Lagoon water, Margarita Island, oyster Mem. **Soc. Cienc. Nat. La Salle**, v.57, n.147, p. 93-108. 1997.

ISONHOOD, J.H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **J Food Prot.** v.65, n.3, p. 575-82, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clin Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 332–344, Aug.1998.

KELLY, K.A.; KOEHLER, M.; ASHDOWN, L. R. Spectrum of extraintestinal disease due to *Aeromonas* species in tropical Queensland, Australia. **Clinical of Infectious Diseases.** v.16, p. 574-579, 1993.

KINGOMBE, C. I. B.; HUYS, G.; TONOLLA, M.; ALBERT, M. J.; SWINGS, J.; PEDUZZI, R. & JEMMI, T. PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in *Aeromonas* spp. **Appl Environ Microbiol.** v. 65, n. 12, p. 5293-5302, 1999.

KIROV, S. M.; HUI, D. S.; HAYWARD, L. J. Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **J. Food. Protection.** v.56, p.306-312, 1993.

KIROV, S. M. The public health significance of *Aeromonas* spp. In foods. **Int J. Food Microbiol.** v. 20, n.4, p. 179-198, 1993.

KITTIGUL, L.; POMBUBPA, K.; RATTANATHAM, T.; DIRAPHAT, P.; UTRARACHKIJ, F.; PUNGCHITTON, S.; KHAMRIN, P.; USHIJIMA, H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. **Int J Food Microbiol.** v. 122, n.1-2, p. 204-210, 2008.

KNOCHEL, S. & JEPPESEN, C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. **Int J Food Microbiol**, v.10, n.3-4, p. 317-322, 1990.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHREKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Molecular.** Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica Ltda, 2001.

KOZINSKA, A.; FIGUERAS, M. J.; CHACON, M.R. and SOLER, L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomosp.ecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Appl. Microbiol.** v. 93, n.6, p1034–1041, 2002.

KÜHN, I.; ALLESTAM, G.; HUYS, G.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; KROVACEK, K.; STENSRTÖM, T. A. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden, **Appl Environ Microbiol.** v. 63, n. 7, p. 2708–2715, 1997.

LAGANOWSKA M; KAZNOWSKI A. Restriction fragment length polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer of *Aeromonas* spp. **Syst Appl Microbiol.** v.27, n.5, p.549-57, 2004.

LEE, C.; CHO, J. C.; LEE, S. H.; LEE, D. G.; KIM, S. G. Distribution of *Aeromonas* spp. As identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. **J. Appl Microbiol.** v. 93, n. 6, p. 976-985, 2002.

LEE, J.K.; JUNG, D. W.; EOM, S. Y.; OH, S. W.; KIM, Y.; KWAK, H. S.; KIM, Y. H. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 990-994, 2008.

LUCENA, R. F. **Isolamento e Caracterização de *Aeromonas* em carcaças suínas.** Dissertação. Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2007

MAALEJ, S.; MAHJoubi, A.; ELAZRI, C.; DUKAN, S. Simultaneous effects of environmental factors on motile *Aeromonas* dynamics in an urban effluent and in the natural seawater. **Water Res**, v.37, n.12, p. 2865-2874, 2003.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria:** Batimore: The Williams & Wilkins, 1976, p 312.

MALOUF, R.E.; BREESE, W.P. Seasonal changes in the effects of temperature and water flow rate on the growth of juvenile Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquacult.** v.12, n.1, p.1-13. 1977.

MAJEED, K. N.; EGAN, A. F.; Mac ERA, I. C. Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. **J. Appl. Bacteriol.** v. 69, p. 332-337, 1990.

MARTINS, A. G. L. A. **Efeitos da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas sp.* em águas de superfície e pescado do estuário do Rio Bacanga, São Luís/Ma.** Dissertação em Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, 2005.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immun Med Microbiol.** v.32, p.237-242, 2002.

MÉNARD, G.; BRISON, P.; MUZELLEC, Y. Fasciite nécrosante à *Aeromonas hydrophila*: à propos d'un cas. **Medicine de Maladie Infectieuse.** v.32, n.5, p. 252-253, 2002.

MENDES, E. S., LOPES, P. P., MAGALHÃES, C. A., COELHO, M. I. S., SOUZA, J. C. R., CRUZ, M. C. S., ASSIS, A. A. S. Sazonalidade dos microrganismos em ostras consumidas na grande Recife, PE. **Higiene Alimentar.** v.18, p. 79-87, 2004.

MENDES, E. S., **Avaliação Microbiológica de ostras consumidas na grande Recife-PE.** Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em DoençasTropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.

MENG, J.; DOYLE, M.P. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. **Bulletin de l'Institut Pasteur,**v. 96, p.151-163, 1998.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas sp.* **Int J Food Microbiol,** v.28, n.2, p.157-168, 1995.

MESQUITA, A. J., NUNES, I. A., OLIVEIRA, A.N., LAGE, M.E., SOUZA, E. M. B. *Aeromonas* spp. em produtos de origem animal e em água de consumo de Goiânia-GO. **Anais Esc Agron Vet**, v.25, n.2, p.61-66, 1995.

MIGUEL, A. L. C. S. F. **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL**. Dissertação. Mestrado em Engenharia Biológica. Universidade Técnica de Lisboa. 2007.

MIÑANA-GALBIL, D. Biochemical Identification and Numerical Taxonomy of *Aeromonas* spp.. Isolated from Environmental and Clinical Samples in Spain. **J. Appl. Microbiol.** v.93, p. 420-430, 2002.

MIÑANA-GALBIS, D.; FARFÁN, M.; M. FUSTÉ, M. C. AND LORÉN, J. G. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve mollusks. Int. **J. Syst. Evol. Microbiol.** v.57, p. 582–587, 2007.

MORAES, I. R.; MASTRO, N. L.; JAKABI, M.; GELLI, D. S. Estudo da radiosensibilidade ao 60CO do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n° 1, 2000.

MOYER, N. P. Clinical significance of *Aeromonas* species from patients with diarrhoea. **J Clin Microbiol.** v.25, p. 2044-2048, 1987.

NEVES, M. S.; NUNES, M. P.; RICCIARDI, I. D. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro. **J. Food Prot.** v.53, p.78-80, 1992.

NGUYEN, T. S.; GRAHAM H. F. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying, and storage. **Appl Environ Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 994-1002, 1980.

NSSP. – NATIONAL SHELLFISH SANITIZATION PROGRAM. *Guide for the control of molluscan shellfish. Food and drug administration.* 2005. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/nss3-toc.html>>. **Acessado em dezembro de 2009.**

OTTAVIANI, D.; SANTARELLI, S.; BACCHIOCCHI, S.; MASINI, L.; BACCHIOCCHI, i. Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp.. In mussels from the Adriatic Sea. **Food Microbiol.** v.23, n. 418-22; 2006.

ORMEN, O.; GRANUM, P. E.; LASSEN, J.; FIGUEIRAS, M. J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp.. **APMIS.** v.113, p. 203-207, 2005.

OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J. R.; SOTO, D. *Aqüicultura no Brasil – O desafio é crescer.* **Brasília**, 2008, 276 p.

OZBAS, Z. Y., LEHNER, A. E WAGNER, M. Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in raw milk. **Food Microbiol.** v. 17, n. 2, p. 197-203, 2000.

PALUMBO, S. A.; BENCIVANGO, M. M.; DEL CORRAL, F. Characterisation of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. **J. Clin. Microbiol.** v.27, p.854-859, 1989.

PALUMBO, S. A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.; THAYER, D. W. Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of *Aeromons hydrophila*. **Appl. Environm. Microbiol.** v. 50, p. 1027-1030, 1985.

(PARANÁ – BRASIL): UM SUBSÍDIO AO CULTIVO. Tese. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da

Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006. In vitro synergism between cefotaxime and minocycline against *Vibrio*. 6 (único):93-104. 91-98, 1997.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquacult.** v. 219, p. 71-82, 2003.

PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v. 37 n. 2, São Paulo, 2006.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 24; 562-566, 2004,

PEREIRA, C. S. **A Cultura de Mexilhões na Baía de Guanabara e suas Implicação para a Saúde Pública – Contexto Político-Social e Microbiológico.** Tese. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2003.

POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, M.; COLWELL, R. R.; CORMIER, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Appl Environ Microbiol.** Washington, v. 62, n.12, p.4621-4626, 1996.

POPOFF, M. *Aeromonas*, In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 8 ed., Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, p. 545-548, 1984

RADU, S., AHMAD, N., LING, F.H., REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **Int J Food Microbiol.** v. 81, n.3, p. 261-66, 2003.

RHODES, M.W. & KATOR, H. Seasonal occurrence of mesophilic *Aeromonas* sp. as a function of biotype and water quality in temperate freshwater lakes. **Water Res.** v.28, p.2241-2251, 1994.

RIPPEY, S.R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clin Microbiol.** v.7, p.419-425, 1994.

RODICIO, MDEL R.; MENDOZA MDEL, C. Identification of bacteria through 16S r RNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. **Enferm. Infecc. Microbiol.** v.22, p. 238-245, 2004.

SAAD, S. M.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PILOTTO, F.; PONTES, A. P.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arq. Fac. Vet.** v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001.

SANTOS, J. A.; GONZALEZ, C. J.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. I. Hemolytic activity and siderophore, production in different *Aeromonas* species isolated from fish. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, p. 5612-5614, 1999.

SAAVEDRA, M. J., FIGUEIRAS, M. J., MARTINEZ-MURCIA, A. J. Update phylogeny of the genus *Aeromonas*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.56, p. 2481-7, 2006.

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

SEN, K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. **Can. J. Microbiol.** v.51, p. 957-66, 2005.

SOUSA, J. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial Community Associated with Fish and water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Arch. Biol. Technol.** v.44, p. 373-381, 2001.

SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.F., MENEZES, F.G.R.; LIMA, L.N.G.C.; NASCIMENTO, S.M.M. & CARVALHO, F.C.T. Bactérias fecais em ostras, *Crassostrea rhizophorae*. **Arq. Ciên.** v.36, p. 63-66. Mar.2003.

SILVA, M. L. **Pesquisa de *Aeromonas* ssp., *Vibrio* ssp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo.** 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2007

SNELLMAN, E.A.; SULLIVAN, E.R.; COLWELL, R.R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **Eur. J. Biochem.** v. 269, n. 23, p. 5771 - 5779, 2002.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio. Seropédica: Embrapa **Agrobiologia**, nov. 1999. 58p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93).

TSAI,G.J. & CHEN, T.H. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. **Int J Food Microbiol**, v.31, p.121-131, 1996.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMASLDAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **Int J Food Microbiol**, v.76, n. 165-168, 2002.

VENKAT, R., MINNAGANTI, M.D., PANKAJ, J., PATEL, M.D. , DANFANCER, M.P, SCHOCH, P.E., CUNHA, B.A. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. *Hearth & Lung*. **J Acute Critical Care**, v.29, n. 306-308, 2000.

UEHARA, F. I. **Concordância entre o perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas***. Dissertação . Programa de Pós-graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

VIEIRA, R. H. S. F.; ***Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática***. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 380 p.

VILLARRUEL-LOPEZ, A.; FERNANDEZ-RENDON, E. MOT-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.** v.77, p.3074-3079, 2005.

WAHLI, T. BURR, S. E.; PUGOVKIN, D.; MUELLER, O.; FREY, J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. **J. Fish Dis.** v.28, p.141-50, 2005.

WHEATON, F. Review of the properties of Eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Part I- Physical properties. **Aquacult Eng.** v. 37, p. 3–13, 2007.

WHO – World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob2.pdf. Acesso em 03 de novembro de 2009.

WANG AND SILVA, 1999 C. WANG AND J.L. SILVA, Prevalence and characterization of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish, **J Food Prot.** v.62, n.1, p. 30–34, 1999.

WANG, J.-T., FANG, C.-T., HSUEH, P.-R., CHANG, S.-C. & LUN, K.-T. (2000). Spontaneous bacterial empyema caused by *Aeromonas veronii* biotype sobria. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.37, p. 271–273, 2000.

ZAMARIOLI, L.A.; PEREIRA, O M.; FAUSTINI, J.S.; HENRIQUES, M.B.; VASQUES, R.O ; ANDRADE, T.C. & SANTOS, M.A 1997. Estudo microbiológico do tecido mole de bivalves *Crassostrea basiliana*, *Perna perna* e *Mytella falcata* recém coletados nos bancos naturais da baixada santista. Relatório apresentado ao Grupo de Vigilância Sanitária DIR XIX Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo.

ZHANG, Y. L.; ONG, C. T.; LEUNG, K. Y. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. **Microbiol.** v.146, p. 999-1009, 2000.

ZUCOLOTO, T.; DELAMARE, A. P. L. ; [COSTA, S. O. P.](#); [ECHEVERRIGARAY, S.](#) *Aeromonas* growth under low temperatures. In: A. Mendez-Vilas. **Modern multidisciplinary applied microbiology: Exploiting microbes and their interactions.** . Ed. Weinheim: Willey-VCH, 2006, p. 276-280.