

CARACTERIZAÇÃO DE *Aeromonas* spp ISOLADAS DE AMOSTRAS DE OSTRAS E ÁGUA POR MÉTODO MICROBIOLÓGICO E MOLECULAR

ANA CAROLINA MIRANDA DE MELO SILVA¹, DANIELE LOPES DO NASCIMENTO² ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO³, FRANCISCA NEIDE COSTA⁴

¹Pós Graduada da Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, MA, Brasil.

²Médica Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, MA, Brasil.

³Professora Doutora da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴Professora Doutora da Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, MA, Brasil - francisca.cca.uma@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se isolar e identificar bactérias do gênero *Aeromonas* de amostras de ostras e de água, pelos métodos microbiológico e molecular. A identificação do gênero *Aeromonas* foi realizada pelo método convencional e pela técnica da PCR e a caracterização das espécies foi realizada pela chave de identificação Aerokey II e pela técnica de RFLP-PCR do 16S rDNA. 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 pela análise microbiológica, 53 (71,62%), 38 (65,51%) de amostras de ostras e 15 (100%) de amostras de água, confirmaram a caracterização do gênero pela técnica molecular. Quanto a identificação bioquímica das espécies 59,3% (n=35) e 40,6% (n=24) dos isolados de *Aeromonas*

sp. obtidos das amostras de ostras foram classificados como *A. hydrophila* e *A. caviae*, respectivamente; e para os isolados obtidos das amostras de água, 60% (n=9) foram classificados como *A. hydrophila* e 40% (n=6) como *A. caviae*; entretanto, somente a *A. hydrophila* foi confirmada pelo sequenciamento genético. Quanto a classificação através da RFLP-PCR 16S rDNA, foram obtidos padrões de bandas inespecíficos, impossibilitando a identificação das espécies por esta técnica. O grande número de amostras de ostras contaminadas com *Aeromonas* spp. e a identificação da *A. hydrophila* demonstram que este molusco pode oferecer risco à saúde dos consumidores, principalmente por ser consumido *in natura* e se tratar de um micro-organismo potencialmente patogênico para o ser humano.

PALAVRAS-CHAVE: água, *Aeromonas*, ostras, PCR.

CHARACTERIZATION OF *Aeromonas* spp ISOLATED FROM WATER AND OF OYSTERS SAMPLES BY MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

ABSTRACT

This study aimed to isolate and identify *Aeromonas* bacteria from samples of oysters and water, by microbiological and molecular methods. Identification of *Aeromonas* was performed by the conventional method and by PCR and species characterization was performed by identification key Aerokey II and by RFLP-PCR of 16S rDNA. 59 (98.3%) samples of oysters and 15 (75%) samples of water contaminated by *Aeromonas* bacteria were identified. Of the 74 isolates of *Aeromonas* spp.

obtained by microbiological analysis, 53 (71.62%), 38 (65.51%) oyster samples and 15 (100%) of water samples confirmed the characterization of the genus by molecular technique. As to biochemical species identification, 59.3% (n = 35) and 40.6% (n = 24) of isolates from *Aeromonas* sp. obtained from oyster samples were rated as *A. hydrophila* and *A. caviae*, respectively; and from isolates obtained from water samples, 60% (n = 9) were classified as *A. hydrophila* and 40% (n = 6) as *A. caviae*; however,

only the *A. hydrophila* was confirmed by genetic sequencing. Regarding the classification by RFLP-PCR 16S rDNA, patterns of nonspecific bands were obtained, making it impossible to identify the species by this technique. The large number of oyster samples

contaminated with *Aeromonas* spp. and identification of *A. hydrophila*, demonstrate that this mollusk might present a risk to consumer health, mainly because it is consumed raw and is to a potentially pathogenic micro-organism to humans.

KEYWORDS: *Aeromonas*, oysters, PCR, water.

INTRODUÇÃO

As intoxicações alimentares causadas por bactérias patogênicas de origem marinha são normalmente decorrentes do consumo de ostras cruas, de produtos pesqueiros crus, defumados, fermentados e salgados e de crustáceos crus ou insuficientemente cozidos¹. As ostras são normalmente consumidas *in natura* e, neste caso, os moluscos são ingeridos como um todo, levando à transmissão de micro-organismos potencialmente patogênicos para o consumidor, fato que aumenta o risco de doenças transmitidas por alimentos, especialmente quando esses moluscos são provenientes de áreas contaminadas ou tratados em condições higiênico-sanitárias precárias².

Surtos de doenças bacterianas de origem alimentar são reportados em todo o planeta, alguns causados por agentes denominados clássicos, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., mas a grande maioria é ocasionada por bactérias emergentes, entre as quais as do gênero *Aeromonas*³. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2002, e a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos, em 2006, descreveram o gênero *Aeromonas* como patógeno emergente. Esse gênero tem recebido atenção especial nos últimos anos, por estar relacionado com várias doenças em humanos e animais e, principalmente, pela sua potencialidade de patógeno oportunista em indivíduos imunodeprimidos⁴. Bactérias do gênero *Aeromonas* são amplamente difundidas no meio ambiente, estando presentes nos meios aquáticos, nos animais e nos alimentos. Seu isolamento em produtos de origem animal foi relatado por diversos pesquisadores em diferentes partes do mundo, sendo que a grande maioria está associada ao pescado⁵, dentre os quais se destacam as ostras. 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 septicemias⁶.

Dessa forma, a identificação rápida dos

agentes causadores das doenças de origem alimentar é um passo importante para a tomada de decisão em casos de surtos. Para o isolamento das bactérias do gênero *Aeromonas*, os métodos microbiológicos são largamente empregados, porém, devido à necessidade de se diminuir o tempo de isolamento e aumentar a precisão dos testes diagnósticos aliado a dificuldade de padronização dos resultados bioquímicos⁷, tem-se utilizado ferramentas moleculares para diagnóstico, destacando-se a reação em cadeia pela polimerase – PCR⁸ e as técnicas de Polimorfismo de Fragmento de Restrição Lento (RFLP-*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do 16S rDNA⁹.

Assim, devido à importância das bactérias do gênero *Aeromonas* como micro-organismos patogênicos para o ser humano, principalmente no que diz respeito à sua implicação na saúde pública, e devido à escassa literatura científica sobre a presença deste patógeno em ostras, objetivou-se com este trabalho isolar e caracterizar as bactérias do gênero *Aeromonas* em amostras de água e ostras pelos métodos bioquímicos e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se, neste estudo, 60 amostras de ostras e 20 amostras de água, obtidas de locais de cultivo e pesca nos municípios de Raposa e Humberto de Campos no Estado do Maranhão-Brasil. A amostragem das ostras foi realizada conforme metodologia utilizada por Pereira et al.², na qual cada amostra de ostra foi constituída de 12 unidades e as técnicas de coleta, armazenamento e transporte foram realizadas obedecendo-se ao Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos¹⁰. O material oriundo das ostras foi mantido em Caldo Trypticase Soja (TSB), adicionado de ampicilina, e as amostras de água foram filtradas em membranas de éster de celulose, as quais foram picadas e os fragmentos colocados em Erlenmeyer, contendo 100 mL de TSB, e incubadas em estufa à temperatura de 28 °C por 24 horas¹¹. Alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo foram semeadas em ágar

dextrina-ampicilina e ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina e incubadas à temperatura de 28 °C por 24 horas. As colônias sugestivas, em número de até cinco por amostra, foram semeadas em Ágar Tripticase Soja (TSA) inclinado e incubadas em estufa à temperatura de 28 °C, por 24 horas.

Para a identificação do gênero *Aeromonas*, realizou-se a coloração de Gram e as culturas que apresentavam forma de bastonetes retos e curtos e gram-negativas foram repicadas em Ágar Tríplice-Açúcar-Ferro (TSI) e incubadas à temperatura de 28 °C por 24 horas. As culturas que apresentaram reação ácida foram repicadas em TSA e submetidas às provas da oxidase e da catalase, considerando-se como *Aeromonas* spp. os cultivos positivos nestas provas. A caracterização dos isolados de *Aeromonas* spp foi realizada utilizando-se a chave de classificação Aerokey II¹².

As bactérias com perfil fenotípico de *Aeromonas* spp foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de restrição enzimática para caracterização das espécies bacterianas. A PCR foi realizada utilizando-se um par de iniciadores, com base nas sequências do 16S rDNA, gênero-específico para o gênero *Aeromonas* (Aero16-Fw 5'-TGACGTTACTCGCAGAAGA-3' e Aero16-rev 5'-GCTTGCAGCCCTCTGT ACG-3'), proposto por Uehara¹³, em que sua amplificação resulta em um fragmento de 787 bp. Foi usada como controle positivo uma cepa de referência de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro. As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 3 µL 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 q.s.p.25µL e para amplificação foi utilizado um ciclo inicial a 95 °C por cinco minutos; 30 ciclos compreendendo desnaturação a 95 °C por um minuto, anelamento a 66 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto; e um único ciclo de extensão final a 72 °C por cinco minutos e manutenção a 4 °C.

Para a identificação das espécies, foi realizada a técnica de RFLP-PCR, gene 16S rDNA, segundo protocolo proposto por Borrell et al.⁹. Para amplificação do gene foram utilizados os primers 16SAer-F 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' e 16SAer-R

5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3'⁹. As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 50 µL, contendo 2µL de DNA; 5 µL de tampão 10x; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,2mM de DNTP; 1 µL de cada iniciador, 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli Q q.s.p 50 µL e para amplificação foi empregado um ciclo inicial a 93 °C por três minutos; 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a 56 °C por um minuto e extensão a temperatura de 72°C por dois minutos; e um único ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos e manutenção a 4°C.

Todas as amostras de DNA de *Aeromonas* spp. foram submetidas a PCR com os primers gênero-específico e cerca de 250 µL do amplicom resultante foram purificados utilizando-se o Kit de Purificação (Purextreme Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, Fermentas). Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento genético, em um sequenciador automático ABI 3730 XL, conforme recomendações sugeridas pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas no GenBank, pelo programa BLASTn. Para um alto nível de qualidade das sequências, admitiram-se índices de confiança para cada nucleotídeo acima de 97% e níveis de identidade de sequência acima de 93%, em que E = 0.0.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização bioquímica dos isolados demonstraram que 98,3% (n=59) e 75% (n=15) das ostras e das águas, respectivamente, estavam contaminadas por *Aeromonas* spp. A identificação do gênero *Aeromonas* pela PCR demonstrou que 38 (65,51%) dos isolados obtidos de amostras de ostras e 15 (100%) dos isolados das amostras de água foram confirmadas e caracterizadas como pertencentes ao gênero da bactéria em estudo, ou seja, 71,62% (n=53) do total dos isolados foram identificados como *Aeromonas* spp pelo método molecular. 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.

Na figura 1 estão apresentados os resultados da caracterização molecular do gênero *Aeromonas* de apenas 31 isolados obtidos de amostras de ostra e água, onde se observa que os

isolados com um fragmento de 787 pb, a semelhança do controle positivo (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966), confirmam ser pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

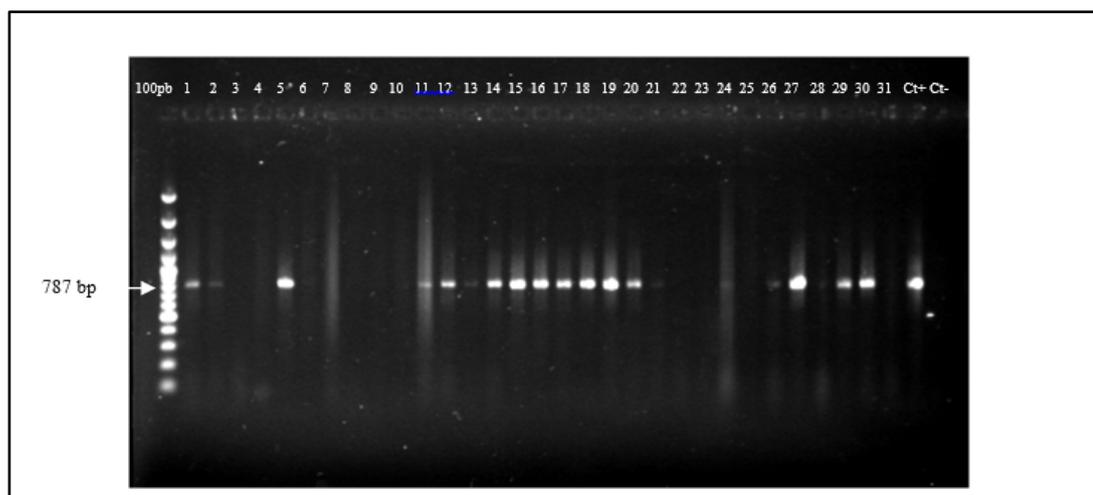


Figura 1. Fragmento de 787 pb amplificado a partir de um par de iniciadores gênero-específico para *Aeromonas* em gel de agarose a 1,5%. Linha 1 até 31 – isolados de *Aeromonas* spp., previamente identificadas por testes bioquímicos. Ct+ : controle positivo (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966). Ct-: controle negativo (água Milli Q).

Os percentuais de contaminação das ostras encontrados nesta pesquisa foram superiores aos encontrados por Evangelista-Barreto et. al.¹⁴, os quais isolaram amostras de *Aeromonas* spp. em 50% das ostras analisadas de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó (Fortaleza/Ceará/Brasil). Já Gomes¹⁵ isolou *Aeromonas* sp. em 10,7% das amostras de ostras comercializadas na cidade de São Paulo, enquanto Colakoglu et al.¹⁶ identificaram 66% (n=84) amostras de ostras, procedentes de mercados de peixes locais e de cozinhas de hotéis na região de Dardanelos/Turquia, contaminadas por *Aeromonas* spp.

O grande percentual de amostras de água contaminadas por *Aeromonas* indicam que os locais são impróprios para a pesca e cultivo de ostra, sendo necessária a realização de algum tipo de tratamento antes da comercialização e consumo desse alimento.

Corroborando com estas afirmações, Galvão et al.¹⁷ afirmaram que a contaminação de águas costeiras pode ameaçar seu uso potencial para o cultivo de moluscos bivalves, pois, sendo organismos filtradores, têm capacidade de concentrar e acumular altas densidades de micro-organismos. Desta forma, é importante ressaltar que o tratamento das águas utilizadas para o cultivo de ostras e o uso de um processo de depuração aliado ou não a um tratamento térmico são alternativas importantes para diminuição da contaminação microbiana dos moluscos bivalves, pois possibilitam um produto

final mais seguro ao consumidor deste alimento. Procedimentos como estes devem ser levados em consideração quando se trata do consumo de ostras.

Com relação à caracterização das espécies, pelo método bioquímico, 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 demais, 24 (40,6%), foram classificados como *Aeromonas caviae*. Quanto às amostras de água, de um total de 15 isolados de *Aeromonas* spp. nove (60%) foram classificados como *A. hydrophila* e seis (40%) como *A. caviae*.

Pelo sequenciamento genético, confirmou-se a presença de *Aeromonas* sp e a espécie *A. hydrophila*, além da espécie *A. media*, não isolada pelo método convencional. A identificação de espécie diferente, como a *A. media*, reforça a importância do uso de ferramentas moleculares, como o sequenciamento genético, para a confirmação dos resultados dos testes bioquímicos, principalmente quando estes apresentam resultados inconclusivos.

O isolamento da espécie *A. hydrophila*, das amostras em estudo revela o grande risco do consumo de ostras provenientes de águas não tratadas e que não passam por processo de depuração, uma vez que esta espécie é reconhecida como patogênica para o ser humano, pois, segundo Pereira et al.¹⁸, esta espécie está envolvida em casos

de diarreia infantil, infecção hospitalar, ou gastroenterites causadas por ingestão de alimentos como ostras, mexilhões, pescados e vegetais. A presença de espécies de *A. media* nas amostras de ostra também pode oferecer risco aos consumidores. Essa espécie geralmente está envolvida em casos de diarreias agudas amenas e em quadros graves de disenteria

Corroborando com os achados desta pesquisa, ressaltam-se os trabalhos realizados por Mendes¹, identificando a espécie *A. hydrophila* em 77,78% das amostras de ostras, e por Pereira¹⁸ que isolou *A. hydrophila* em 15,50% das amostras de mexilhões na Baía de Guanabara.

Os resultados obtidos pela identificação molecular do gênero *Aeromonas* sugerem que podem existir falhas na identificação bioquímica desta bactéria, uma vez que os testes bioquímicos podem gerar resultados duvidosos^{18,19} e muitas vezes são incapazes de identificar com a devida precisão as espécies de *Aeromonas* face à homogeneidade fenotípica existente dentro deste gênero^{18,20}.

Os padrões de bandas encontrados neste estudo foram diferentes dos descritos por Borrell et al.⁹, não sendo possível, assim, a caracterização das espécies de *Aeromonas* através do método de RFLP-PCR 16S rDNA.

Segundo Kozinska et al.²⁰ e Castro-Escarpulli et al.²², diferenças na caracterização das espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* foram identificadas quando os métodos bioquímicos e moleculares foram comparados por vários pesquisadores. O uso dos testes bioquímicos pode tornar-se difícil, principalmente devido à homogeneidade fenotípica das espécies do gênero *Aeromonas*²¹. Por outro lado, Graf²³ relatou que, em algumas condições clínicas, os testes bioquímicos ainda devem ser usados, especialmente naqueles casos em que as técnicas moleculares geram resultados controversos, como no caso desta pesquisa, em que não foi possível a identificação das espécies de *Aeromonas* pelo método de RFLP-PCR

16S rDNA.

Resultados discrepantes entre estas duas técnicas também foram descritos por Ormen et al.²⁴ na identificação das espécies de *Aeromonas* em isolados clínicos e ambientais. Estes autores citam que os testes bioquímicos usam esquemas de identificação baseados em isolados clínicos e estes não podem ser aplicados por fornecerem incompleta identificação de isolados ambientais, além disso, a grande heterogeneidade genética das amostras ambientais pode influenciar nos resultados. Corroborando com esta afirmação, Huys et al.²⁵ demonstraram por métodos moleculares que há uma grande variação genética dos isolados de *A. hydrophila*, sugerindo a existência de uma subespécie. A grande variação genética dentro do gênero *Aeromonas* foi indicada também por Miñana-Galbis et al.²⁶, os quais identificaram a presença de uma nova espécie nos isolados de moluscos bivalves. Utilizando a técnica de RFLP para identificação das espécies de *Aeromonas*, provenientes de várias fontes, Alperi et al.²⁷ verificaram que 8,1% das amostras apresentaram padrões de bandas diferentes, levando à identificação duvidosa destas amostras. Para esses autores a microheterogeneidade dos nucleotídeos destas espécies deve ser levada em consideração, quando se usam a RFLP ou outras técnicas moleculares.

Conforme mostra a literatura, a formação dos padrões de bandas diferentes encontradas neste estudo (Figura 2) pode ser resultado de um conjunto de causas, podendo estar principalmente relacionada à grande variação genética das bactérias do gênero *Aeromonas*, principalmente em amostras ambientais.

O uso de outros métodos moleculares associados à técnica da RFLP poderia aumentar o potencial discriminatório por detectar um número maior de polimorfismos, aumentando, assim, a confiança no resultado. Portanto, a combinação de mais de um método molecular para caracterização genética das *Aeromonas* sp. deve ser levada em consideração.

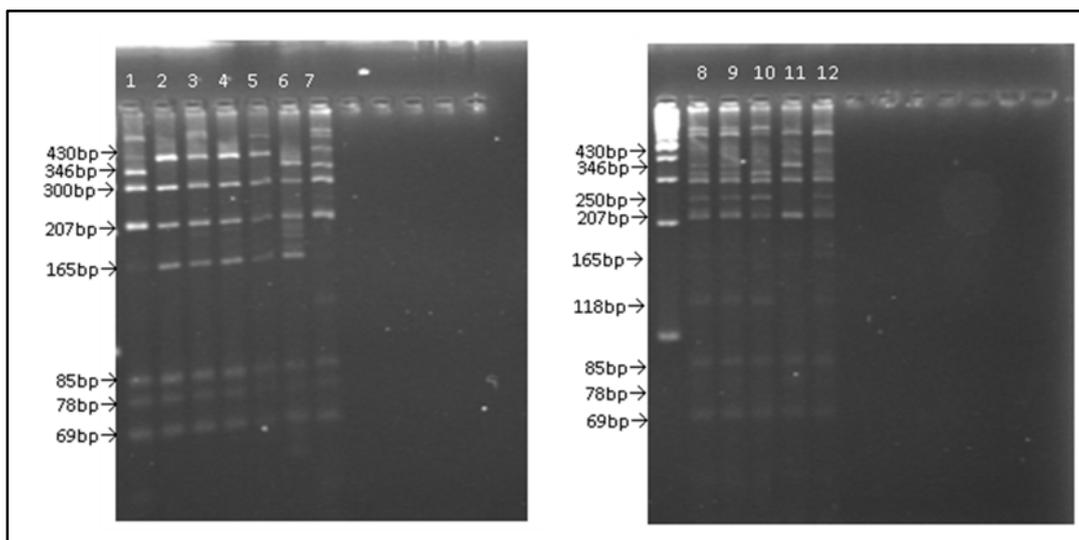


Fig. 2. Isolados de *Aeromonas* spp. digeridas com as enzimas de restrição *Alu I* e *MboI*. De 1 até 10 – padrão de banda dos isolados obtidos de amostras de ostra; 11 e 12 - isolados obtidos de amostras de água.

CONCLUSÃO

A identificação da espécie *Aeromonas hydrophila* nas amostras de ostras demonstra que este molusco pode oferecer risco à saúde dos consumidores e reforça a necessidade de atenção com a segurança microbiológica deste alimento. Enfatiza-se ainda que para a identificação das bactérias do gênero *Aeromonas* o uso de ferramentas moleculares, como o sequenciamento genético, torna-se importante, uma vez que resultados duvidosos podem ser obtidos na identificação bioquímica e a impossibilidade de identificação das espécies de *Aeromonas* pode ocorrer quando do uso da técnica de RFLP.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista - UNESP (Campus de Jaboticabal), por permitir a realização dos estudos bioquímicos e moleculares desta pesquisa. Ao laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde foi realizada a primeira etapa da pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA, pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Mendes ES, Lopes PP, Magalhães CA, Coelho MIS, Souza JCR, Cruz MCS, et al. Sazonalidade dos micro-organismos em ostras consumidas na grande Recife, PE. Hig. Alim. 2004; 18: 79-87.
- Pereira MA, Nunes MM, Nuernberg L, Schulz D, Batista CRV. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. Braz. J. Microbiol. 2006 Fev 26; 37 (2): 159-62.
- Lucena RF, Delamare APL, Thomazi G, Ferrarini S, Zacaria, J e Echeverrigaray S. *Aeromonas* detection and characterization using genus-specific PCR and single-strand conformation polymorphism (SSCP). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012; 28 (8): 3007-3013.
- Martins AGLA, Nascimento AR, Vieira RHSF, Serra JL, Rocha MMRM. Quantificação e identificação de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís / MA (Brasil). Boletim Ceppa. 2009; 27: 107-18.
- Costa FN, Rossi Júnior OD. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. Arq. Bra. Méd. Vet. Zoot, 2002; 54 (5): 534-5.
- 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, 2000; 40 (1): 69-73.
- Ozbas ZY, Lehner A, Wagner M. Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in rawmilk. Food Microbiol. 2000; 17 (2): 197-203.
- Santos LR, Nascimento VP, Oliveira SD, Flores ML, Pilotto F, Pontes AP, et al. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Arq. Fac. Vet. 2001; 29 (2): 87-92.
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martinez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. J. Clin. Microbiol. 1997;

- 35 (7): 1671–4.
10. Silva, N da, Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 2º edição. Editora Varela. São Paulo, 2001
 11. Costa FN, Rossi Júnior OD. Enterotoxigenicidade e espécies de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate de frangos. Arq. Inst. Biol. 2007; 74 (1): 5-9.
 12. Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: aflexible Key for identifying clinical *Aeromonas* sp.ecies. J. clin.Microbiol.1991; 29 (12): 2843-9.
 13. Uehara FI. Concordância entre o perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas* [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2008.
 14. Evangelista-Barreto NS, Vieira RHSF, Carvalho FCT, Torres RCO, Sant’anna ES, Rodrigues DP, et al. *Aeromonas* spp. Isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 2006; 48 (3): 129-133.
 15. Gomes ML. Quantificação de *Aeromonas* sp em amostras de ostras e relação com coliformes fecais e estreptococos fecais. Produção de enterotoxina e sensibilidade a antibióticos a partir das cepas isoladas [internet] 2002 [acesso em 15 de outubro de 2009]. Disponível em: <http://en.scientificcommons.org/33797824>.
 16. Colakoglu FA, Sarmasik A, Koseoglu B. Occurrence of *Vibrio* spp.And *Aeromonas* spp. In shellfish harvested off Dardanelles cost of Turkey. Food Control. 2006; 17 (8): 648-52.
 17. Galvão JA, Furlan EF, Salán EO, 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. 2006; 30 (6): 1124-9.
 18. Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. Ciênc. Tecnol. Aliment.2004; 24 (4).
 19. Figueiras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez- Murcia AJ. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp.. by 16s rDNA RFLP analysi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000; 50: 2069-73.
 20. Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. Infect Immun. 2005; 73 (7): 4395–8.
 21. Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. J. Fish Dis. 2005; 28: 141-50.
 22. Kozinska A, Figueras MJ, Chacon MR, Soler L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomo species isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Appl. Microbiol. 2002; 93 (6): 1034–41.
 23. Castro-Escarpulli F, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparício GO, et al. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in México. Int. J. Food Microbiol. 3003; 84 (1): 41– 49.
 24. Graf J. Diverse Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of the PCR-Amplified 16S rRNA Genes in *Aeromonas veronii* Strains and Possible Misidentification of *Aeromonas* Species. J. Clin. Microbiol. 1999; 37 (10): 3194–7.
 25. Ormen O, Granum PE, Lassen J, Figueiras MJ. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. APMIS. 2005; 113: 203-7.
 26. Huys G, Kampf P, Albert MJ, Kuhn I, Denys R, 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. 2002; 52: 705–12.
 27. Miñana-Galbis D, Farfán MM, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve mollusks. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007; 57: 582–7.

Protocolado em: 18 fev. 2014. Aceito em: 02 set. 2014