

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

CARINA LUCENA MENDES MARQUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CEPAS DE *AEROMONAS* SPP. ISOLADAS
DURANTE UM SURTO DE DIARRÉIA EM
SÃO BENTO DO UNA, PE, EM 2004**

RECIFE
2011

CARINA LUCENA MENDES MARQUES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *AEROMONAS* SPP. ISOLADAS
DURANTE UM SURTO DE DIARRÉIA EM SÃO BENTO DO UNA, PE, EM 2004

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
em Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo
Cruz, para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Recife

2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M357c Marques, Carina Lucena Mendes.
Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004 / Carina Lucena Mendes Marques.
- Recife: C. L. M. Marques, 2011.
72 f. : il., tab., graf. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.
Orientadora: Nilma Cintra Leal
Co-orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.
1. *Aeromonas* – genética. 2. *Aeromonas* – patogenicidade. 3. Diarreia - etiologia. 4. Clonagem molecular. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Leal, Nilma Cintra. II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. III. Título.

CDU 616.34-008.314.4

CARINA LUCENA MENDES MARQUES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *AEROMONAS* SPP. ISOLADAS
DURANTE UM SURTO DE DIARRÉIA EM SÃO BENTO DO UNA, PE, EM 2004

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
em Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo
Cruz, para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Aprovada em 30/03/2011

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nilma Cintra Leal (Orientadora)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Co-orientador)
CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida (Titular)
CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Milena Paiva Cavalcanti (Titular)
CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Marli Tenório Cordeiro (Titular)
SES-PE

Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva (Titular)
UPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu pai que me ensinou que integridade, honestidade e humildade são as maiores virtudes que alguém pode ter e à minha mãe que me ensinou que um sorriso no rosto (e no coração) derrete até um *iceberg*! Agradeço também às minhas irmãs e irmão e à Rebeca, a sobrinha mais linda do mundo, pelo simples fato de existirem. Amo muito vocês!

Ao meu marido Tiago pela força constante e incondicional, pelos “puxões de orelha” que me dava quando eu negligenciava a escrita da tese, pela ajuda nos cálculos das frequências dos genes quando eu já não conseguia mais somar nem $2+2$... Amor não se agradece, se retribui! E eu espero fazer o mesmo por você sempre. Te amo!

A Dra. Nilma, eu agradeço pela orientação, pela amizade, pelo exemplo de profissional ética. Admiro muito a sua capacidade de ouvir SEMPRE, de olhar nos olhos das pessoas independentemente do título que elas possuam (muitas das quais não possuem nenhum), de estar sempre disposta a ajudar quem precisa. Pode ter certeza de que isso é coisa rara entre as pessoas e esses foram os maiores ensinamentos que eu poderia ter e que levarei para sempre comigo. Muito obrigada!

Agradeço ao Dr. Osvaldo pela co-orientação, em especial, nos experimentos de clonagem e ao técnico do NESC George Tadeu pela realização dos testes estatísticos.

À secretária do Departamento de Microbiologia do CPqAM, Fernanda Pimentel, pela eficiência nos serviços prestados, pelas delicadas lembranças e pelas conversas animadas.

Agradeço aos colegas do Departamento de Microbiologia pelo companheirismo e, em especial, aos grandes amigos Paloma, Vladimir, Mari Andrade e Rosanny. Muito obrigada pelas longas (e altas) risadas na hora do almoço, pelo conforto nos momentos difíceis, pela força nos momentos de dúvida! Diz-se que amigos são irmãos que Deus nos deu a chance de escolher. E eu escolhi vocês. Obrigada por tornarem meus dias mais alegres e coloridos.

Agradeço também a Larissa Mélo pela ajuda e pela possibilidade de ter ensinado o pouco do que sei. E peço perdão se não cumpri meu papel como deveria.

A Ana Paula Costa, companheira nos experimentos de microscopia, agradeço pela força e por compartilhar as angústias e preocupações presentes quando se trata de aprender algo.

Ao Dr. Ernesto Hofer, do IOC, meu muito obrigada pelo carinho, pelo afeto, pela atenção, pelos suportes financeiro, científico e, acima de tudo, emocional! Agradeço também à sua fiel discípula a Dra. Deyse Vallim pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitado. Tenho certeza que Deus coloca anjos à nossa volta para nos socorrer nos momentos de angústia e vocês são dois deles! Obrigada!

Muito obrigada a essa banca examinadora pela disponibilidade em ajudar e, em especial a Dra. Alzira Almeida por também ter revisado a versão pré-banca desta tese.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Microbiologia do CPqAM pelo suporte; ao técnico do NIT Raimundo Nonato pela ajuda e pelos ensinamentos no campo da microscopia óptica; à Dra. Regina Bressan e suas alunas pela colaboração nos experimentos de microscopia confocal.

MARQUES, Carina Lucena Mendes. **Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004.** 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

Diante da alta frequência com que *Aeromonas* spp foram isoladas de fezes de pacientes durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, e tendo em vista que seu papel na etiologia de infecções intestinais ainda não tenha sido comprovado, o potencial patogênico dessas bactérias foi avaliado através da pesquisa de possíveis genes de virulência, da sua capacidade de aderir em células animais e de formar biofilme. Também foi pesquisada a região intergênica espaçadora (ISR) 16S-23S na tentativa de encontrar um perfil clonal entre essas bactérias, além do gene 16S. Diante da dificuldade na identificação laboratorial do gênero *Aeromonas*, foi desenvolvida e padronizada uma duplex-PCR. Dentre os 106 isolados clínicos e 19 ambientais, os genes *lip*, *exu*, *gcat* e *flaA/B* foram encontrados respectivamente em 84,9% e 100%, 85,8% e 94,7%, 100% e 100% e 84% e 89,5% das amostras. O gene *aerA* foi encontrado em menor frequência tanto nos isolados clínicos como nos ambientais (47,2%/36,8%). As cepas de *Aeromonas* testadas apresentaram aderência difusa em células HEp-2 mas não foram capazes de formar biofilme em placa. A ISR 16S-23S dessas bactérias revelou nove perfis diferentes, enquanto a análise do gene 16S mostrou o mesmo perfil para os diferentes ribotipos encontrados. A duplex-PCR foi reprodutível e específica para o gênero *Aeromonas* e após sua validação poderá ser utilizada como diagnóstico complementar dessas bactérias. Embora tenham apresentado um alto potencial patogênico, as cepas de *Aeromonas* isoladas durante o surto de diarreia ocorrido em São Bento do Una, não provêm de um mesmo clone e, portanto, não podem ser responsabilizadas como a causa do surto, sugerindo que essas bactérias eram parte da microbiota intestinal transitória dos indivíduos infectados. Por outro lado, e tendo em vista a preocupação que a comunidade científica tem demonstrado a respeito de *Aeromonas*, considerada patógeno emergente, são necessários outros estudos para tentar definir o papel desses microrganismos em processos diarreicos.

Palavras-chave: *Aeromonas*, diarreia, clonagem, reação em cadeia da polimerase.

MARQUES, Carina Lucena Mendes. **Molecular characterization of *Aeromonas* spp. isolated during a diarrhea outbreak in São Bento do Una, PE, in 2004.** 2011. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

Given the high frequency of *Aeromonas* spp isolated from stools of patients during a diarrhea outbreak in São Bento do Una, Pernambuco, and as their role in the etiology of intestinal infections has not been proven, the pathogenic potential of these bacteria was evaluated by the search of potential virulence genes, their ability to adhere to animal cells and to form biofilm. The intergenic spacer region (ISR) 16S-23S was also investigated in an attempt to find a clonal profile among these bacteria, besides the 16S gene. Given the difficulty in identifying *Aeromonas* genus, a duplex-PCR was developed and standardized. Among the 106 clinical and 19 environmental isolates, *lip*, *exu*, *gcat* and *flaA/B* genes were found respectively in 84.9% and 100%, 85.8% and 94.7%, 100% and 100% and 84% and 89.5% samples. The gene *aerA* was found less frequently in both clinical and environmental isolates (47.2% / 36.8%). *Aeromonas* strains showed diffuse adherence on HEp-2 cells but were unable to form biofilm on plates. The ISR 16S-23S of these bacteria showed nine different profiles, while 16S gene analysis showed the same profile for the different ribotypes found. The duplex-PCR was reproducible and specific for the *Aeromonas* genus and after its validation can be used as a complementary method to identify these bacteria. Although they presented a high pathogenic potential, strains of *Aeromonas* isolated during the outbreak of diarrhea occurred in São Bento do Una, are not a clone and therefore were not the cause of the outbreak, suggesting that these bacteria were part of the intestinal transient microbiota of infected individuals. Furthermore and in view of the concern that the scientific community has shown in respect of *Aeromonas*, considered an emerging pathogen, further studies are necessary to define the role of these microorganisms in diarrhea cases.

Keywords: *Aeromonas*, diarrhea, cloning, polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Espécies do gênero <i>Aeromonas</i> atualmente reconhecidas e sua importância clínica.	15
Quadro 2-	Provas fenotípicas diferenciais para <i>Aeromonas</i> sp., <i>Vibrio</i> sp. e <i>Plesiomonas shigelloides</i> .	19
Figura 1-	Esquema representativo dos genes envolvidos na síntese do flagelo polar de <i>Aeromonas</i> spp..	22
Quadro 3-	Genes pesquisados, sequências dos <i>primers</i> , tamanho esperado dos fragmentos, referências e temperaturas de anelamento (TA) utilizadas neste estudo.	31
Figura 2-	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR gene específica da cepa de <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 ^T .	37
Figura 3-	Fragmentos obtidos após amplificação por PCR do gene <i>fla</i> A/B com uma cepa representante de cada perfil, denominados F1 a F4, e as cepas de referência <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 ^T e <i>Aeromonas veronii</i> bio <i>veronii</i> ATCC 35624 ^T .	37
Figura 4-	Frequência dos perfis para o gene <i>fla</i> A/B em cepas clínicas e ambientais de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas durante um surto de diarreia ocorrido em São Bento do Una, PE, em 2004.	38
Figura 5-	Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências do gene <i>fla</i> A/B de diferentes isolados de <i>Aeromonas</i> spp..	38
Figura 6-	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR específica para o gene <i>aerA</i> em dois isolados do surto.	39
Figura 7-	Adesividade difusa de <i>Aeromonas</i> sp. em células HEP-2 coradas com Giemsa e visualizadas em microscópio óptico.	41
Figura 8-	Fotomicrografia confocal mostrando diferenças na topografia do crescimento bacteriano de diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	42
Figura 9-	Perfis obtidos a partir da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S do rDNA de cepas de <i>Aeromonas</i> .	43
Figura 10-	Distribuição dos nove ribotipos relacionados à região espaçadora intergênica de cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas de humanos durante o surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004.	44
Figura 11-	Distribuição de ribotipos relacionados à região espaçadora intergênica de cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas de ambiente durante o surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004.	44
Figura 12-	Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalV) das sequências 16S-23S clonadas de um representante de <i>Aeromonas</i> dos ribotipos R1, R2 e R3, juntamente com sequências da mesma região de <i>A. hydrophila</i> e <i>A. salmonicida</i> depositadas no NCBI.	45
Figura 13-	Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências 16S-23S clonadas de cepa do ribotipo R1, juntamente com sequências da	46

mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI.

- Figura 14-** Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências 16S-23S clonadas de cepa do ribotipo R2, juntamente com sequências da mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI. 46
- Figura 15-** Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências 16S-23S clonadas de cepa do ribotipo R3, juntamente com sequências da mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI. 47
- Figura 16-** Perfil obtido a partir da amplificação do gene 16S de isolados de *Aeromonas* obtidos durante o surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004. 48
- Figura 17-** Dendrograma obtido a partir do alinhamento (ClustalV) de sequências do gene 16S de um representante de *Aeromonas* de cada ribotipo (R1 a R9), juntamente com sequência do gene 16S de *Vibrio* sp. depositada no NCBI. 48
- Figura 18-** Reprodutibilidade da duplex-PCR. 49
- Figure 19-** Sensibilidade da duplex-PCR. 49

LISTA DE SIGLAS

APA	Água Peptonada Alcalina
ATCC	<i>American Type Collection Culture</i>
BHI	Infusão de Cérebro e Coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
HG	Grupo de Hibridização (<i>Hybridization Group</i>)
ISR	Região Espaçadora Intergênica (<i>Intergenic Spacer Region</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
TSA	Ágar Triptona e Soja (<i>Trypticase Soy Agar</i>)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 TAXONOMIA	14
2.2 ECOLOGIA	15
2.3 TRANSMISSÃO	16
2.4 ETIOLOGIA	17
2.5 DIAGNÓSTICO	19
2.6 TRATAMENTO	20
2.7 PATOGENICIDADE	21
2.7.1 Flagelo polar (genes <i>flaA/B</i>)	21
2.7.2 Aerolisina (gene <i>aerA</i>)	23
2.7.3 Fosfolipase (gene <i>lip</i>)	23
2.7.4 DNase (gene <i>exu</i>)	24
2.7.5 Glicerofosfolípido-colesterol aciltransferase (gene <i>gcat</i>)	24
2.8 ADESIVIDADE EM CÉLULAS ANIMAIS	25
2.9 GENOMA	25
2.9.1 Região Espaçadora Intergênica 16S-23S rDNA	26
2.9.2 Gene 16S do rDNA	27
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 REATIVAÇÃO DAS CEPAS E EXTRAÇÃO DE DNA	30
5.2 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA	30
5.2.1 Sequenciamento dos fragmentos obtidos	31
5.3 ADESIVIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	32
5.4 MICROSCOPIA CONFOCAL	32
5.5 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ESPAÇADORA INTERGÊNICA 16S-23S	33
5.5.1 Clonagem e sequenciamento da região espaçadora intergênica 16S-23S	33
5.6 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S	34

5.7 DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DUPLEX-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Aeromonas</i>	34
6 RESULTADOS	36
6.1 GENES DE VIRULÊNCIA	36
6.2 ADESIVIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	41
6.3 MICROSCOPIA CONFOCAL	41
6.4 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ESPAÇADORA INTERGÊNCIA – ISR 16S-23S	43
6.5 GENE 16S	47
6.6 DUPLEX-PCR	48
7 DISCUSSÃO	50
8 CONCLUSÃO	55
9 PERSPECTIVAS	56
10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Aeromonas são bactérias curvadas, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase positivas. Encontram-se comumente em ambientes aquáticos e são reconhecidas como patógenos eventuais de répteis, peixes, alguns mamíferos e humanos imunocomprometidos causando, nestes últimos, principalmente infecções respiratórias e septicemia.

Algumas espécies de *Aeromonas* já foram identificadas como causa de gastroenterite aguda em pacientes imunocompetentes e, mais recentemente, surtos de diarreia foram atribuídos a esta bactéria. No primeiro semestre de 2004, no município de São Bento do Una, na região agreste de Pernambuco, ocorreu um surto de diarreia bacteriana caracterizado por evacuações aquosas acompanhadas de vômitos, náuseas, cólicas abdominais e, menos frequentemente, febre e desidratação. Dentre os 145 casos analisados bacteriologicamente, foram isoladas 114 cepas de *Aeromonas* spp. como único patógeno presente nas fezes e este foi considerado o primeiro relato desta bactéria como enteropatógeno humano no Brasil.

Apesar de vários estudos darem suporte à evidência de que existe relação entre *Aeromonas* spp. e diarreia, não há consenso na literatura sobre a etiologia desses microrganismos nesse tipo de infecção uma vez que seus mecanismos de virulência ainda não estão bem esclarecidos e não existe um modelo de infecção animal adequado. Além disso, a bactéria é também isolada de fezes de indivíduos saudáveis e, uma vez que está presente em água e alimentos, poderia tratar-se de microbiota transitória no trato intestinal humano de indivíduos, não sendo o verdadeiro agente da diarreia.

Diante das dúvidas sobre o real papel de *Aeromonas* spp. em infecções intestinais, e com o propósito de compreender a dinâmica de *Aeromonas* no ambiente e tentar apontar quais fatores poderiam estar envolvidos na sua patogenicidade, realizou-se uma caracterização molecular dos isolados do surto de São Bento do Una, utilizando métodos moleculares que geralmente fornecem uma identificação correta de linhagens bacterianas em comparação com técnicas baseadas em características fenotípicas, que não são muito discriminatórias em investigações epidemiológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TAXONOMIA

Reconhecidas como patógenos de peixes, répteis e anfíbios desde 1891, espécies do gênero *Aeromonas* só foram associadas a doenças em humanos há poucas décadas (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002). Devido a algumas semelhanças fenotípicas, foram incluídas na família Vibrionaceae durante vários anos (POPOFF, 1984), entretanto, com o avanço dos estudos de hibridização e análise de sequências de DNA, observou-se que esses microrganismos são evolutivamente diferentes do gênero *Vibrio* e família Enterobacteriaceae, o que levou à designação de uma nova família: Aeromonadaceae (COLWELL et al., 1986).

A taxonomia de *Aeromonas* é confusa e vários testes são necessários para uma classificação acurada uma vez que as características fenotípicas e genotípicas são dúbias (JOSEPH; CARNAHAN, 2000). Até a década de 70, espécies de *Aeromonas* eram divididas em dois grupos de acordo com a motilidade e temperatura ótima de crescimento: as móveis, em temperatura variando entre 35-37°C, eram classificadas como *Aeromonas hydrophila*, enquanto as não-móveis, que cresciam entre 22-28°C eram denominadas *Aeromonas salmonicida* (AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA, 2006).

Estudos posteriores mostraram grande heterogeneidade estrutural, bioquímica e genética entre bactérias classificadas como *A. hydrophila* e nesse grupo foram também incluídas as espécies *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria* (atualmente designada como *A. veronii* biotipo *sobria*). Através de estudos de hibridização de DNA ficou evidente que havia vários grupos de hibridização (HG) diferentes dentro de cada uma destas espécies e posteriormente outros HG foram identificados (CARNAHAN et al., 1991; JANDA, 1991; POPOFF et al., 1984).

De acordo com a última edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* existem 14 fenoespécies e 18 genoespécies ou HG (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005), nem todas relacionadas a infecções em humanos (JANDA; ABBOTT, 2010). Mais recentemente, três novas espécies (HARF-MONTEIL et al., 2004; MINANA-GALBIS et al., 2004; PIDIYAR et al., 2002) foram descritas e acredita-se que o número tende a aumentar (AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA, 2006; MARTÍNEZ-MURCIA et al., 2008).

Apesar da grande heterogeneidade do gênero, as espécies mais comumente associadas a infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biotipo *sobria* (GHENGHESH et al., 2008). No Brasil, contudo, estudos apontam *A. caviae* como a espécie mais prevalente (FREITAS et al., 1993;1998; HOFER et al., 2006; NOJIMOTO et al., 1997). É importante ressaltar que devido à dificuldade de identificação desse gênero, algumas espécies são erroneamente tipadas como novas quando, na verdade, já foram descritas (JANDA; ABBOTT, 2010). A tabela 1 mostra as espécies de *Aeromonas* atualmente reconhecidas e sua importância clínica.

Espécie	Importância clínica
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sim
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Sim
<i>Aeromonas sobria</i>	Não
<i>Aeromonas media</i>	Sim
<i>Aeromonas caviae</i>	Sim
<i>Aeromonas veronii</i>	Sim
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	Não
<i>Aeromonas schubertii</i>	Sim
<i>Aeromonas jandaei</i>	Sim
<i>Aeromonas trota</i>	Sim
<i>Aeromonas encheleia</i>	Não
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Sim
<i>Aeromonas popofii</i>	Sim
<i>Aeromonas simiae</i>	Não
<i>Aeromonas molluscorum</i>	Não
<i>Aeromonas bivalvium</i>	Não
<i>Aeromonas aquariorum</i>	Não
<i>Aeromonas tecta</i>	Sim
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Não
<i>Aeromonas culicicola</i>	Não
<i>Aeromonas sharmana</i>	Não

Quadro 1. Espécies do gênero *Aeromonas* atualmente reconhecidas e sua importância clínica.
Fonte: Adaptação de Janda e Abbott, 2010.

2 ECOLOGIA

Aeromonas são habitantes autóctones de ambientes aquáticos, tendo sido isoladas de rios, lagos, mar, esgotos e fontes de água mineral (HAVELAAR et al., 1992; HOLMES; NICCOLLS; SARTORY, 1996). Também já foram isoladas de água engarrafada, inclusive

tratada com cloro (FERNANDEZ et al., 2000; FIGUERAS, 2005). A sobrevivência da bactéria no ambiente depende de fatores ambientais físicos e químicos tais como a temperatura, pH e salinidade da água, além da incidência de radiação ultravioleta e disponibilidade de nutrientes. A maioria das espécies cresce bem a 37°C, mas a temperatura ótima de crescimento varia de 22°C a 28°C com pH entre 5.5 e 9.0 (JANDA; ABBOTT, 2010).

O crescimento de *Aeromonas* é inibido pela presença de bactérias heterotróficas, o que sugere que a competição por nutrientes é um fator limitante para a sua manutenção no meio ambiente (MARY et al., 2001). Além disso, em condições de estresse ambiental, *Aeromonas* provoca sua própria morte celular, situação conhecida como “fenômeno suicida” (NAMDARI; CABELLI, 1989). Ballal et al. (2001) mostraram que *Aeromonas* não suicidas são mais letais em camundongos do que as suicidas, sugerindo uma relação entre fenômeno suicida e virulência, que ainda não foi comprovado.

Outra situação comumente encontrada no ambiente é a capacidade de células de *Aeromonas* se agruparem formando um biofilme. Bactérias organizadas dessa forma tornam-se mais resistente às situações de estresse ambiental bem como à ação do cloro, o que dificulta o controle bacteriológico nos sistemas de distribuição de água (EDGE; FINCH, 1987).

Embora ainda não seja comprovadamente reconhecida como um patógeno emergente, *Aeromonas* está incluída na lista de candidato a contaminante (*Contaminant Candidate List – CCL*) da água pela Agência de Proteção Ambiental Americana (*U.S. Environmental Protection Agency*), que recomenda aprofundar os conhecimentos e pesquisar a presença de *Aeromonas* em água para consumo (AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA, 2006). Além disso, também está presente na lista do FDA (*Food and Drug Administration*) como patógeno presente em alimentos (*Foodborne Pathogen Microorganisms*) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004) e deve ser considerado como patógeno emergente (MERINO et al., 1995).

2.3 TRANSMISSÃO

Foram descritos vários casos de contaminação por *Aeromonas* spp. após o contato direto de feridas abertas com água contaminada, causando ulcerações purulentas e, algumas

vezes, evoluindo para sepse (GOLD; SALIT, 1993; MONAGHAN et al., 2008). A transmissão direta pessoa-pessoa, embora rara, já foi relatada (MOYER; LAREW, 1988; TORRE et al., 1996), bem como a transmissão através do uso terapêutico de sanguessugas contaminadas por *Aeromonas* (BRASCHLER et al., 2003; INDERGAND; GRAFF, 2000). Além destes, já foram descritos alguns casos isolados de infecção por *A. hydrophila* após ataque de animais selvagens como urso e serpentes (ANGEL et al., 2002; JORGE et al., 1998; KUNIMOTO et al., 2004).

Para infecções gastrointestinais, a forma mais comum de contaminação por *Aeromonas* spp. é através da ingestão de água contaminada com a bactéria (HOLMBERG et al., 1986), o que provocaria diarreia. Além disso, espécies de *Aeromonas* têm sido isoladas de alimentos como vegetais, leite, carne e frutos do mar (KIROV et al., 1993; MERINO et al., 1995) e, desde 1984, têm sido consideradas como potenciais agentes de infecções alimentares (BUCHANAN, 1984). Infecção alimentar por *Aeromonas* após a ingestão de camarões contaminados foi comprovada por Altwegg et al. (1991).

2.4 ETIOLOGIA

Há mais de um século, espécies de *Aeromonas* são reconhecidas como patógenos de animais peçonhentos, como peixes, anfíbios e répteis (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002). *Aeromonas salmonicida* é considerada o principal agente etiológico de ulcerações em peixes, provocando ulcerações cutâneas que culminam com a morte desses animais, levando a perdas econômicas significativas nos sistemas de aquicultura (AUSTIN; ADAMS, 1996).

A partir da década de 70, alguns representantes do gênero *Aeromonas* foram considerados como patógenos oportunistas de indivíduos imunocomprometidos, provocando infecções cutâneas e, em alguns casos, sepse (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002). Aproximadamente uma década depois, esses microrganismos começaram a ser apontados como causa de infecções gastrointestinais em pessoas que não apresentavam deficiência imunológica (ALTWEGG et al., 1991; BLOOM; BOTTONE, 1990; HOFER et al., 2006; MOYER, 2002; MOYER; LAREW, 1988).

Ultimamente, diferentes espécies de *Aeromonas* têm sido associadas a uma vasta gama de infecções, incluindo pneumonia (KAO et al., 2003; LI et al., 2008; MURATA et al., 2001),

infecções hepatobiliares (KUMAR et al., 2000), endocardite (BROUQUI; RAOULT, 2001), septicemia (KO et al., 2000; LLOPIS et al., 2004), infecções cutâneas (ANGEL et al., 2002; CHENG et al., 2004; LIM, 2005; MINNAGANTI et al., 2000), síndrome urêmica hemorrágica (FIGUERAS et al., 2007a) e artrite séptica (ROUX et al., 2000). Enquanto na literatura não existem dúvidas sobre a responsabilidade de *Aeromonas* na etiologia de infecções extraintestinais, o papel que esses microrganismos desempenham nas doenças diarreicas ainda é causa de controvérsia entre autores (FIGUERAS et al., 2007b).

Apesar de produzirem fatores de virulência similares aos de bactérias que comprovadamente causam diarreia em humanos e serem consideradas potenciais patógenos entéricos (ALBERT et al., 2000), os mecanismos de patogenicidade de espécies do gênero *Aeromonas* ainda não foram elucidados e, portanto, é difícil apontá-las como agentes de gastroenterites (BORCHARDT et al., 2003). Além disso, até agora, o papel dessas bactérias em infecções entéricas tem sido definido a partir de relatos de casos, estudos do tipo caso-controle e de investigação de surtos associados ao isolamento da bactéria nas fezes (KIROV, 2001) o que, embora relacione o microrganismo com a doença, é insuficiente para inferir uma relação de causa e efeito entre estes (ALTWEGG; GEISS, 1989).

Na maioria dos casos onde se acredita que *Aeromonas* spp. seja o agente etiológico, a diarreia é bastante aquosa e pode vir acompanhada de dor abdominal, vômitos, e febre. A presença de sangue e muco nas fezes também já foi relatada. Geralmente a diarreia é auto-limitada e após alguns episódios, o indivíduo acometido apresenta melhora dos sintomas, contudo, em casos mais graves, o quadro pode evoluir para desidratação (GHENGHESH et al., 2008). Há, ainda, alguns relatos de casos diarreicos semelhantes à cólera onde apenas *Aeromonas* foi isolada das fezes (CHAMPSAUR et al., 1982; EARLE et al., 1997; GHENGHESH et al., 1995).

No primeiro semestre de 2004, ocorreu um surto de diarreia em São Bento do Una, localizado na região agreste de Pernambuco, cuja sintomatologia foi similar à da cólera, com diarreia aquosa abundante, vômitos, náuseas e cólicas abdominais. Entre os meses de março e junho daquele ano, foram registrados 1.146 casos de diarreia, dos quais 582 foram submetidos a coprocultura. Em 145 destes, foi isolado ao menos um enteropatógeno, sendo que *Aeromonas* foi encontrada como único microrganismo presente em 114 amostras. Nas outras 31 amostras, foram isolados *V. cholerae* O1 (18) e não-O1/não-O139 (2), *Salmonella* (8), e *Shigella* (3) (HOFER et al., 2006).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico diferencial de *Aeromonas* spp. não é realizado como parte da rotina da maioria dos laboratórios clínicos (GHENGHESH et al., 2008), embora alguns autores recomendem sua pesquisa, principalmente em se tratando de fezes diarréicas de imunocomprometidos (JANDA; ABBOTT, 1998). As amostras suspeitas de conter *Aeromonas* são inoculadas em meio de enriquecimento líquido (*brain heart infusion* – BHI, ou água peptonada alcalina – APA) e incubadas a 35-37°C durante 18-24h. São semeadas em placa de ágar sangue com ampicilina para verificar duas características que facilitam a identificação do gênero: a resistência à ampicilina e a hemólise do tipo β .

As colônias crescidas em placa são submetidas ao teste da oxidase para diferenciar da família Enterobacteriaceae. Para diferenciar de *Vibrio* sp. e *Plesiomonas shigelloides* é realizado semeio em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de NaCl, como mostra a tabela 2 (GHENGHESH et al., 2008).

Teste	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp.	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
Oxidase	+	+	+
	sem NaCl	+	+
Crescimento em meio líquido	NaCl 1%	+	+
	NaCl 6%	-	-
Hidrólise da gelatina	+	v	-
Produção de ácido a partir de inositol	-	v	+

Quadro 2. Provas fenotípicas diferenciais para *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp. e *Plesiomonas shigelloides*.

Fonte: Ghenghesh et al. (2008).

Nota: V= variável.

Apesar dos avanços, a identificação bioquímica de *Aeromonas* spp. continua confusa, levando a classificar esses microrganismos em outros gêneros, principalmente, *Vibrio* (CHACÓN et al., 2002; JANDA; ABBOTT, 2010; SOLER et al., 2003). Os sistemas comerciais de identificação tais como API 20E e Vitek, dentre outros, apresentam limitações em diferenciar corretamente as espécies de *Aeromonas*, tendendo a classificar grande parte das cepas como *A. hydrophila* (PARK et al., 2003; SOLER et al., 2003), o que provoca uma superestimação dessa espécie como agente etiológico de infecções ao mesmo tempo em que mascara a verdadeira incidência das outras espécies (FIGUERAS, 2005). Para evitar esses problemas, alguns autores indicam a utilização de métodos moleculares na identificação

correta desses microrganismos (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002; FIGUERAS, 2005), embora grande parte dos laboratórios clínicos, especialmente nos países em desenvolvimento, ainda não utilizem ferramentas moleculares na rotina de suas análises (GHENGHESH et al., 2008).

Dentre os métodos moleculares de diagnóstico, a análise da sequência 16S do rDNA através de Polimorfismos de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) tem sido bastante utilizada e mostrado resultados satisfatórios inclusive na identificação de novas espécies (FIGUERAS et al., 2000; FIGUERAS et al., 2005; FIGUERAS; GARRO; MARTÍNEZ-MURCIA, 2000; HUA et al., 2004). Outras técnicas moleculares utilizadas na identificação de *Aeromonas* incluem ERIC-PCR e BOX-PCR (DAVIN-REGLI et al., 1998; TACÃO et al., 2005).

Kong et al. (1999) sequenciaram a região espaçadora intergênica (*Intergenic Spacer Region* – ISR) 16S-23S do rDNA de algumas espécies de *Aeromonas* e, apesar da heterogeneidade encontrada, conseguiram desenhar *primers* específicos para cada espécie, contudo, até onde se sabe, esse método não tem sido utilizado como forma de diagnóstico.

2.6 TRATAMENTO

O uso de antibióticos em casos de diarreia associada a *Aeromonas* é controverso uma vez que a maioria dos pacientes apresenta melhora espontânea após alguns dias de infecção e nos casos leves, apenas a terapia de reidratação é suficiente (SAN JOAQUIN; PICKETT, 1988). A medicação antimicrobiana, portanto, só está indicada para doença intestinal crônica ou quando o sítio de infecção é extra-intestinal (PHAVICHITR; CATTO-SMITH, 2003).

Mais de 90% das aeromonas são resistentes à ampicilina, o que permite a utilização desse antibiótico na identificação do gênero (GHENGHESH et al., 2008). De uma forma geral, as aeromonas são sensíveis à grande maioria dos antibióticos utilizados na clínica médica, dentre eles cefalosporinas de terceira geração, quinolonas e imipenem (LUPIOLA-GOMEZ et al., 2003; ZONG et al., 2002). No entanto, o número de relatos sobre o surgimento de cepas de *Aeromonas* resistentes vem aumentando ao longo dos anos (EDWARDS et al., 2001; FOSSE et al., 2003; GONI-URRIZA et al., 2000; SINHA et al.,

2004), o que é um alerta para os sistemas de saúde pública já que a resistência mediada por plasmídeos pode ser transferida de uma cepa a outra (BRUUN et al., 2003).

2.7 PATOGENICIDADE

Os fatores envolvidos no processo de infecção por *Aeromonas* ainda não foram comprovados (CASTRO-ESCAPULLI et al., 2002), devido, em grande parte, à falta de um modelo animal que reproduza a doença. São, portanto, considerados fatores de virulência por inferência, isto é, uma vez que são molecularmente similares a produtos e estruturas de outras bactérias que já tiveram seu papel na infecção comprovado, sugere-se que eles também estejam relacionados à patogenicidade do gênero (JANDA, 2001).

Acredita-se que espécies de *Aeromonas* possuem um amplo espectro de fatores envolvidos no processo de infecção que inclui colonização, invasão e proliferação do microrganismo, além de apresentar a habilidade de escapar do sistema imunológico do hospedeiro (JANDA, 2001; ZONG et al., 2002). São produtoras de fatores de virulência extracelulares, como enterotoxinas, hemolisinas e adesinas, e dispõem de características estruturais, como pili, flagelo, proteínas de membrana externa e camadas “S”, que parecem desempenhar algum papel durante a infecção. Além disso, já foram descritos mecanismos de motilidade, adesividade e invasividade celular (JANDA, 2001). As estruturas e proteínas codificadas pelos prováveis genes de virulência de *Aeromonas* pesquisados nesse estudo são apresentadas de forma mais detalhada a seguir.

2.7.1 Flagelo polar (genes *flaA/B*)

O flagelo auxilia na adesão da bactéria à célula eucariótica durante o processo infeccioso, além de induzir resposta imunológica do hospedeiro (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004), sendo, portanto, considerado um importante fator de virulência (JOSEPHANS; SUERBAUM, 2002; OTTERMAN; MILLER, 1997). *Aeromonas* mesofílicas, semelhantes a *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*, apresentam um

incomum sistema de flagelo (MERINO et al., 2006) capaz de expressar dois flagelos completamente diferentes: um polar, constitutivo, que confere motilidade à bactéria em meio líquido (*swimming*) e outro lateral, induzido, que permite a aderência da bactéria em meio viscoso ou sobre superfícies (*swarming*) e expresso somente nestas situações e apenas por algumas cepas (CANALS et al., 2006; MANSON et al., 1998).

O flagelo polar é essencial para a colonização intestinal, enquanto a expressão do flagelo lateral contribui para a formação de biofilme, ativando o mecanismo de *quorum sensing* bacteriano (BELAS; COLWELL, 1982; KIROV et al., 2002) que torna as bactérias mais resistentes às defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos. Quando agrupadas em biofilme, as bactérias expressam mais fatores de virulência, o que faz dos flagelos importantes marcadores da patogenicidade em *Aeromonas* (MERINO et al., 2006).

Geralmente, quando a bactéria encontra-se em meio viscoso, a expressão do flagelo polar é reprimida, enquanto os genes que codificam o flagelo lateral são induzidos. Entretanto, a expressão de um sistema não interage na regulação do outro, como ocorre em *Vibrio parahaemolyticus* e *Azospirillum brasiliense*, e o sinal através do qual a bactéria é induzida a expressar o flagelo lateral ainda é desconhecido (MERINO et al., 2006).

O flagelo polar de *Aeromonas* spp. é codificado por 55 genes dispersos em cinco *clusters* (ALTARRIBA et al., 2003; CANALS et al., 2006), e o lateral é codificado por 38 genes distribuídos em uma única região do cromossomo bacteriano (MERINO et al., 2006). Em *A. caviae*, o locus do flagelo polar contém dois genes que codificam flagelinas (*flaA* e *flaB*), um gene de função desconhecida (*flaG*), além de genes que codificam proteínas de superfície (*flaH*) e do tipo chaperona (*flaJ*). O locus do flagelo lateral consiste de dois genes codificantes de flagelinas *lafA1/lafA2* (que apresentam 87% de homologia entre si) e *lafB*, além de outros genes que codificam as demais proteínas envolvidas na biossíntese do flagelo (GAVÍN et al., 2002). A figura 1 mostra uma representação dos genes envolvidos na síntese do flagelo polar de *Aeromonas* spp.

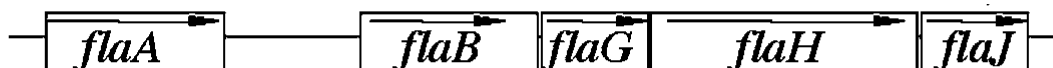


Figura 1. Esquema representativo dos genes envolvidos na síntese do flagelo polar de *Aeromonas* spp.
Fonte: Kirov (2003).

2.7.2 Aerolisina (gene *aerA*)

Cepas de *Aeromonas* spp. são capazes de produzir uma grande variedade de enterotoxinas (KROVACEK; FARIS; MANSSON, 1991; MAJEED; MacRAE, 1991), sendo que algumas têm efeito citotônico, a exemplo das codificadas pelos genes *alt* e *ast*, e outras atuam de maneira citotóxica, como as codificadas pelos genes *act*, *hlyA* e *aerA*. As enterotoxinas citotóxicas causam degeneração das criptas e vilosidades intestinais (CHOPRA; HOUSTON, 1999) e apresentam atividade hemolítica (XU et al., 1998). As enterotoxinas citotônicas, por outro lado, não, causam danos nas vilosidades do intestino (CHOPRA; HOUSTON, 1999). Dentre todas as toxinas produzidas por *Aeromonas* spp., a aerolisina, enterotoxina citotóxica codificada pelo gene *aerA*, é o fator de virulência mais bem estudado e caracterizado (JANDA; ABBOTT, 1998).

A aerolisina é uma proteína termolábil de aproximadamente 50 kDa (CHOPRA et al., 1993) que reage cruzadamente com anticorpos específicos para a toxina colérica, embora não apresente homologia entre suas sequências e não seja neutralizada pelo antissoro colérico (FERGUSON et al., 1997); apresenta alta similaridade com α -toxina de *Clostridium perfringens* e tem um mecanismo de ação similar, formando poros na membrana do hospedeiro (COLE et al., 2004).

Aerolisina é secretada na forma de um precursor solúvel denominado proaerolisina (BURR; DIEP; BUCKLEY, 2001), que é convertida por proteases da bactéria e do hospedeiro em aerolisina. Segue-se o processo de oligomerização, onde um peptídeo C-terminal é removido e a proteína sofre uma mudança conformacional, transformando-se em um anel heptamérico de natureza anfipática que se insere na membrana celular do hospedeiro. Uma série de eventos bioquímicos culmina com mudanças nos gradientes de íons Na^+ , K^+ e Ca^{++} , e levam a vacuolização do retículo endoplasmático e morte celular (FIVAZ et al., 2001).

2.7.3 Fosfolipase (gene *lip*)

Bactérias Gram-negativas apresentam uma fosfolipase integrada à membrana externa que está envolvida no transporte transmembrana e tem implicações na virulência do

microrganismo (SNIJDER; DIJKSTRA, 2000). Segundo Schmiel e Miller (1999), as fosfolipases atuam na manutenção e disseminação da bactéria, interferem nas cascatas de sinalização celular do hospedeiro e modulam sua resposta imunológica sem, contudo, provocar dano tecidual. Acredita-se também que essas enzimas atuem modificando a membrana plasmática das células do hospedeiro, tornando-as mais suscetíveis às toxinas bacterianas (ANGUITA et al., 1993; CHUANG et al., 1997).

O gene da fosfolipase de *A. hydrophila* é conhecido como *lipH3* (ANGUITA et al., 1993), *lip* (CHUANG et al., 1997) e *pla* (MERINO et al., 1999) e também apresenta homologia com o *apl-1* (INGHAM; PEMBERTON, 1995), número de acesso S65123, U63543, AF092033 e U14011, respectivamente.

2.7.4 DNase (gene *exu*)

Quando o hospedeiro é infectado, há aumento da produção de neutrófilos que são recrutados para o sítio de infecção para fagocitar o microrganismo e eliminar a infecção. Após ativação, os neutrófilos liberam histonas e cromatina que juntas formam uma rede fibrosa capaz de prender e eliminar o agente infeccioso. Algumas bactérias, contudo, produzem DNases que degradam a cromatina liberada pelos neutrófilos, impedindo que o sistema imunológico do hospedeiro as elimine (BRINKMANN et al., 2004).

Várias nucleases têm sido descritas como importantes fatores de virulência, apesar de ainda não terem seu papel na patogênese bem definido (PERMBERTON; KIDD; SCHMIDT, 1997), e alguns autores têm pesquisado genes que codificam DNases, associando sua presença à virulência de *Aeromonas* (CHANG et al., 1992; DODD; PEMBERTON, 1996; NAM; JOH, 2007).

2.7.5 Glicerofosfolipídio-colesterol aciltransferase (gene *gcat*)

Glicerofosfolipídio-colesterol aciltransferase (GCAT) é uma lipase secretada por *A. salmonicida* responsável pela formação de furúnculos em peixes (NERLAND, 1996;

THORTON et al., 1998). *A. hydrophila* secreta uma enzima similar que hidrolisa e neutraliza fosfolipídios de membrana, levando à lise celular (PEMBERTON et al., 1997). O gene que codifica GCAT é encontrado praticamente em todas as cepas de qualquer espécie de *Aeromonas* (CHACÓN et al., 2003) e tem sido utilizado como um marcador para o gênero, diferenciando-o de outras enterobactérias (CHACÓN et al., 2002).

2.8 ADESIVIDADE EM CÉLULAS ANIMAIS

A habilidade de aderência das bactérias a células animais é um passo necessário à colonização do trato gastro-intestinal e, portanto, à infecção (CROCIANI et al., 1995). Vários estudos relacionam o padrão de adesividade ao aumento do potencial de virulência de bactérias (MITACHE et al., 2009; MORA et al., 2009; PARSOT, 2005). Por serem mais bem estudados, os padrões de adesividade obtidos com *Escherichia coli* servem de modelo para estudos de infecção de outras bactérias em células eucarióticas. Em *E. coli* pode-se observar adesividade difusa (DA), localizada (LA), agregativa (AA) e um padrão semelhante ao de aderência localizada (LAL) mas observado apenas em experimentos com períodos longos de incubação (SCALETSKY et al., 1999). Acredita-se que este último esteja relacionado à maior virulência bacteriana, em contrapartida ao padrão DA que é visto em bactérias menos virulentas (SCALETSKY et al., 2010).

Devido à falta de um modelo de infecção *in vivo* que reproduza a infecção por *Aeromonas* spp, vários estudos de infecção *in vitro* em linhagens celulares animais dão suporte à capacidade dessas bactérias provocarem danos celulares como citotoxicidade, além da sua habilidade em aderir e invadir as células (BALAJI; JESUDASON; SRIDHARAN, 2004; MARTINS et al., 2002; SCHIAVANO et al., 1998).

2.9 GENOMA

Até o momento, há apenas dois genomas de *Aeromonas* completamente sequenciados na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo um de *A.*

hydrophila e o outro de *A. salmonicida*. *Aeromonas hydrophila* possui um cromossomo circular de 4.744.488 nucleotídeos, 4.286 genes descritos, 160 RNA estruturais e conteúdo GC de 61%. *Aeromonas salmonicida* também possui apenas um cromossomo circular, com 4.702.402 nucleotídeos, composto de 4.387 genes, 147 RNA estruturais e cujo conteúdo GC é de 58%.

2.9.1 Região Espaçadora Intergênica 16S-23S rDNA

Em procaríotos, a região espaçadora intergênica – ISR 16S-23S do rDNA apresenta variabilidade de tamanho e de sequência nucleotídica e de número de cópias (GÜRTLER; STANISICH, 1996), e é composta de operons que contém genes codificadores de tRNA. Dependendo do número de operons de tRNA presentes, a região espaçadora apresenta tamanhos diferentes que variam de acordo com o gênero ou a espécie bacteriana (GARCIA-MARTÍNEZ et al., 1996; GÜRTLER; STANISICH, 1996; KOSTMAN et al., 1992).

A ISR 16S-23S rDNA, talvez por se encontrar entre dois genes altamente conservados em relação à evolução, diverge pouco entre bactérias pertencentes a um mesmo grupo (GARCIA-MARTÍNEZ et al., 1999), o que a torna um marcador bastante utilizado em estudos de investigação epidemiológica (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), possibilitando caracterizar e diferenciar bactérias tanto no que se refere ao gênero, quanto à espécie (GARCIA-MARTÍNEZ et al., 1999), além de inferir diversidade populacional em bactérias de uma comunidade (STEWART; CAVANAUGH, 2007).

O sequenciamento da ISR 16S-23S do rDNA de espécies de *Aeromonas* mostrou que essas bactérias contém dois tipos de espaçadores polimórficos: tRNA^{Glu} (glutamato) e tRNA^{I^A} (isoleucina e alanina), sendo que no primeiro as sequências variam entre 512 a 595 pb, enquanto os genes que codificam tRNA^{I^A} possuem de 464 a 498 pb. Além disso, as espécies de *Aeromonas* apresentaram grande heterogeneidade da ISR 16S-23S apesar de haver também algumas regiões conservadas, permitindo, inclusive, desenhar *primers* específicos para cada espécie (KONG et al., 1999).

2.9.2 Gene 16S do rDNA

A análise do gene 16S do rDNA através de sequenciamento é uma das práticas mais precisas para determinar proximidade entre bactérias, embora alguns autores acreditem que nem sempre ela reflete de forma apropriada a relação taxonômica entre bactérias (MORANDI et al., 2005). Com relação ao gênero *Aeromonas*, existem alguns trabalhos na literatura que fazem uso da pesquisa do gene 16S rDNA, geralmente associada à clivagem com diferentes enzimas de restrição, para identificação das espécies (FIGUERAS et al., 2000; ORMEN et al., 2005).

Martínez-Murcia, Benlloch e Collins (1992) sequenciaram o gene 16S rDNA de 20 cepas de *Aeromonas* e encontraram uma sequência de 1.502 nucleotídeos representando 98% do gene. Foram encontrados altos níveis de similaridade entre as cepas contudo, algumas alterações pontuais tornaram possível a diferenciação de cada genomoespécie.

3 JUSTIFICATIVA

Cepas de *Aeromonas* spp. foram isoladas como único microrganismo presente em fezes de pacientes apresentando diarreia durante um surto da infecção em São Bento do Una, PE, em 2004. Apesar de estarem cada vez mais envolvidas em infecções extraintestinais em humanos e de terem sido relacionadas aos processos diarreicos do surto de São Bento do Una, ainda não há consenso na literatura de que espécies de *Aeromonas* provoquem diarreias em indivíduos imunocompetentes uma vez que, algumas vezes, são encontradas em fezes de pessoas sem a doença.

Diante do exposto, surgiu a dúvida sobre o real papel de *Aeromonas* spp. no surto de diarreia de São Bento do Una: seriam bactérias emergentes contendo um mecanismo de virulência ainda desconhecido, ou seriam microrganismos oportunistas que teriam competido com o agente responsável pelo surto e “mascarado” a verdadeira etiologia daquelas infecções? Ou ainda: seriam bactérias que fazem parte da microbiota transitória normal do intestino de humanos e, uma vez que não são pesquisadas rotineiramente, não se conhece sua frequência em fezes de indivíduos sem sintomatologia?

Tendo em vista a grande frequência de casos de diarreia de onde foram isoladas espécies de *Aeromonas*, bem como a preocupação que a comunidade científica tem levantado acerca dessas bactérias, este estudo foi realizado na tentativa de elucidar o seu caráter patogênico e o seu papel no surto de diarreia ao qual foram relacionadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente isolados de *Aeromonas* obtidos de um surto de diarreia ocorrido no município de São Bento do Una, PE, Brasil, em 2004.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Pesquisar genes de virulência em isolados humanos e ambientais de *Aeromonas* provenientes do surto;
- b) Verificar a capacidade de adesão de *Aeromonas in vitro*;
- c) Avaliar o crescimento bacteriano e correlacionar com uma possível capacidade de formação de biofilme;
- d) Identificar a relação clonal dos isolados pela análise da região espaçadora intergênica 16S-23S e do gene 16S de uma cepa representante de cada perfil obtido com a ISR 16S-23S;
- e) Desenvolver e padronizar uma duplex-PCR para diagnóstico de *Aeromonas* spp.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REATIVAÇÃO DAS CEPAS E EXTRAÇÃO DE DNA

As cepas utilizadas nesse estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ernesto Hofer do Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Cento e seis amostras das 114 cepas isoladas de coproculturas de pacientes envolvidos no surto de diarreia em São Bento do Una (HOFER et al., 2006) foram recuperadas e incluídas neste estudo, além de 19 cepas ambientais também isoladas durante o surto. Do total, 82 cepas foram tipadas genotipicamente através de RFLP do gene 16S (FIGUERAS et al., 2000) e o restante através de testes bioquímicos para o gênero e foram denominadas nesse trabalho como *Aeromonas* sp. As cepas de referência *A. hydrophila* ATCC 7966^T, *A. veronii* biogrupo *veronii* ATCC 35624^T, *A. caviae* ATCC 15468^T e *A. hydrophila* IOC 11036 foram utilizadas como controle.

As culturas estavam mantidas em TSA em camada alta à temperatura ambiente e foram recuperadas pelo enriquecimento em BHI a 37°C, durante 24h. Duzentos microlitros da cultura foram transferidos para outro tubo de BHI e incubados a 37°C por 24h. Um mililitro da suspensão bacteriana foi utilizado para extração do DNA seguindo o protocolo descrito por Leal et al. (2004). Para preservação do material genético as cepas foram estocadas a -80°C em BHI com 25% de glicerol.

5.2 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA

A presença de genes de virulência em *Aeromonas* foi determinada através de amplificação do DNA das cepas em regiões específicas, utilizando *primers* descritos na literatura (SOLER et al., 2002; SEN; RODGERS, 2004), como mostra a tabela 3.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada *primer*; 20 ng de DNA genômico e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Go *Taq* DNA polimerase – Promega), ajustadas para um volume final de 25 µL por tubo. A ciclagem térmica consistiu de: 3 minutos iniciais de

desnaturação a 95°C seguidos de 30 trinta ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento ótima dos *primers* (tabela 3) e 1 minuto de extensão do fragmento a 72 °C e uma extensão final de 72° C por 5 minutos. As reações foram realizadas no termociclador Biometria T-3000. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com SYBR Safe, com tensão de 120v, durante uma hora. O gel foi visualizado em UV e fotografado com câmera digital Kodak, utilizando o programa Kodak 1D Image Analysis Software, versão 3.5 para Windows.

Genes	Sequências nucleotídicas 5' → 3'	Fragmento amplificado (pb)	Referências	TA
<i>aerA</i>	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG CCAGTTCCAGTCCCACCACT	431	Soler et al., 2002	58°C
<i>gcat</i>	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT	237	Soler et al., 2002	56 °C
<i>flaA/B</i>	TCCAACCGT(C/T)TGACCTC G(A/C)(C/T)TGGTTGCG(A/G)ATGGT	608	Sen; Rodgers, 2004	55 °C
<i>exu</i>	(A/G)GACATGCACAACCTCTTCC GATTGGTATTGCC(C/T)TGCAA(C/G)	323	Soler et al., 2002	58 °C
<i>lip</i>	CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA	247	Soler et al., 2002	56 °C

Quadro 3. Genes pesquisados, sequências dos *primers*, tamanho esperado dos fragmentos, referências e temperaturas de anelamento (TA) utilizadas neste estudo.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.1 Sequenciamento dos fragmentos obtidos

Os produtos das reações de PCR dos genes de virulência pesquisados na cepa de referência ATCC 7966^T e em duas cepas representantes do surto (um isolado clínico e outro ambiental) foram purificados com o QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) e sequenciados em ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências foram submetidas a alinhamento através do programa BLASTn do NCBI para confirmação da identidade dos fragmentos amplificados.

Com relação ao gene *flaA/B*, os produtos de PCR das *Aeromonas* ATCC 7966^T, ATCC 35624^T e de sete cepas do surto, além de alinhadas pelo programa BLASTn, também

foram alinhadas com programas do pacote DNASTar e comparadas entre si e com sequências do gene da flagelina de diferentes espécies de *Aeromonas* depositadas no NCBI.

5.3 ADESIVIDADE CELULAR *IN VITRO*

Para avaliar o padrão de adesividade e buscando correlacionar esse padrão com os achados moleculares para o gene do flagelo polar *flaA/B*, 12 isolados de *Aeromonas* spp., além das cepas *A. hydrophila* ATCC 7966^T e *A. veronii* biogrupo *veronii* ATCC 35624^T, foram submetidos a teste *in vitro* de adesividade celular em células das linhagens Vero (rim de macaco verde africano) e HEp-2 (carcinoma laríngeo humano).

Os experimentos foram realizados com células Vero e com células HEp-2 e foi utilizado o protocolo descrito por Neves, Nunes e Milhomen (1994), com pequenas modificações. Os isolados foram inoculados em tubos contendo cinco mililitros de BHI durante 24h a 37°C. Dois mililitros das culturas diluídas em tampão PBS pH 7,2 para uma OD₆₀₀ ~0.5 foram inoculados em lamínulas contendo a monocamada de células. As lamínulas foram incubadas a 37°C durante 90 minutos e lavadas cinco vezes com PBS pH 7,2 para retirar as bactérias não-aderentes. As células foram fixadas com dois mililitros de metanol e coradas com Giemsa. Após secagem a temperatura ambiente, as lamínulas foram montadas sobre lâminas e visualizadas em microscópio óptico.

5.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

Com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano e tentar correlacioná-lo com uma possível formação de biofilme, uma cepa de *Aeromonas* spp. representante de cada perfil encontrado na PCR do gene *flaA/B* e uma cepa de *Staphylococcus aureus* reconhecidamente capaz de formar biofilme (controle positivo) foram submetidas a microscopia confocal. Para isso, as bactérias foram cultivadas diretamente em placas de cultivo MatTek (MatTek Corp. MA, USA) de 35 mm de diâmetro, por 72 horas, a 37°C. As culturas foram examinadas diretamente e após fixação em metanol, seguindo o procedimento descrito anteriormente para

o teste de adesividade celular. Foi utilizado microscópio confocal a laser, com a reflexão do laser em 488 nm. Cortes ópticos foram realizados e a reconstrução tridimensional com a projeção máxima e topográfica foi feita através do programa Leica Lite 2.0.

5.5 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ESPAÇADORA INTERGÊNICA 16S-23S

Para amplificação por PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S foram utilizados os *primers* 5'TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT3' e 5'ACGAATTCTGACTGCCMRGGCATCCA3' descritos por Chun, Huq e Colwell (1999). As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 µL por tubo contendo KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada *primer*; 20 ng de DNA genômico e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Go *Taq* DNA polimerase – Promega).

O programa de ciclagem térmica consistiu de 30 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C, terminando com 7 minutos de extensão final a 72°C. A ciclagem térmica foi realizada no termociclador Biometria T-3000. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, com tensão de 100v, durante quatro horas. O gel foi visualizado em UV e fotografado com câmera digital Kodak, utilizando o programa Kodak 1D Image Analysis Software, versão 3.5 para Windows.

5.5.1 Clonagem e sequenciamento da região espaçadora intergênica 16S-23S

O produto da PCR de uma cepa de *A. caviae* representante dos ribotipos R1, R2 e R3 foi extraído e precipitado em álcool etílico para clonagem em pGEM3zf⁺ (Promega Inc., Madison, WI) previamente linearizado com as enzimas de restrição *Pst*I e *Eco*RI. Tanto o vetor quanto os insertos (produto das PCR) foram purificados com o QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Células de *E. coli* DH5α foram transformadas com o plasmídeo recombinante, semeadas em placas contendo meio LB com 100 mg/mL de ampicilina, X-GAL e IPTG, e inoculadas *overnight* a 37°C. Em seguida, 96 colônias brancas de cada ribotipo representante foram selecionadas para extração de DNA plasmidial segundo

protocolo adaptado de Sambrook e Russell (2001). Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição previamente utilizadas e os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos insertos clonados. Vinte clones de cada ribotipo contendo insertos compreendidos entre 400-600 pb foram sequenciados em ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências obtidas foram analisadas usando softwares do pacote DNASTar e comparadas entre si e com sequências da ISR 16S-23S de *Aeromonas* depositadas no banco de dados do NCBI.

5.6 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S

Com o objetivo de encontrar um marcador mais conservado, que permitisse fazer uma relação clonal entre as cepas isoladas durante o surto, comparando com os perfis observados na amplificação da região ISR 16S-23S, o gene 16S de um representante de cada ribotipo (R1 a R9) foi amplificado por PCR e sequenciado. Para amplificação foram utilizados os *primers* 5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3' e 5'GGTACCTTGTTACGACTT3' e metodologia descritos por Figueras, Guarro, e Martínez-Murcia (2000). Os produtos das reações foram purificados com o QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) para sequenciamento em ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) com os mesmos *primers* utilizados para a amplificação. As sequências foram analisadas através de programas do DNASTar e comparadas com sequência do gene 16S de *Vibrio* sp. depositada no NCBI e utilizada como controle externo para construção de dendrograma.

5.7 DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DUPLEX-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Aeromonas*

Devido à dificuldade na identificação das espécies do gênero *Aeromonas*, foi desenvolvida uma duplex-PCR para o diagnóstico dessas bactérias. Foram desenhados *primers* dirigidos para uma região conservada do gene 16S específica para o gênero *Aeromonas* (5' ACGCAGGCGGTTGGATAAGT 3' e 5' GGCAACAAAGGACAGGGGT

3'). Sequências de diferentes espécies de *Aeromonas* (números de acesso: X60411, X60412, X60415, X60416, FJ998417, HM007582, AB034760, AJ224309 e FJ998415) foram coletadas do banco de dados EMBL, alinhadas através do programa MegaAlign (DNASTAR) e, para anelamento dos *primers*, foram selecionadas regiões conservadas entre as espécies.

Foi adicionado outro par de *primers* (5' CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG 3' e 5' GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT 3') utilizado por Soler et al. (2002) e voltado ao gene *gcat*, específico de *Aeromonas* (CHACÓN et al., 2002). As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 400 mM de cada dNTP, 40 pmol de cada *primer* GCAT, 20 pmol de cada *primer* 16S, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega) e 20 ng DNA para um volume final de 25 µL. As amplificações ocorreram em um termociclador Biometria T-3000 Genetic Analyzer e consistiram de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C, seguidos de 5 min a 72°C para extensão final. Dez microlitros dos produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), a 100v por 60 minutos. O gel foi visualizado em um transiluminador de UV e fotografado usando o programa Kodak 1D image analysis version 3.5 (Digital Kodak Science).

A reprodutibilidade da técnica foi avaliada através de quatro ensaios com as cepas de referência *A. hydrophila* ATCC 7966^T, *A. veronii* ATCC 35624^T bio *veronii*, *A. caviae* ATCC 15468^T e *A. hydrophila* IOC 11036, além de seis espécies diferentes de *Aeromonas* (*A. caviae*, *A. caviae* atípica, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. veronii*, *A. veronii* atípica e *A. trota*). Para avaliar a especificidade da duplex-PCR, também foram realizados quatro ensaios com sete diferentes espécies de *Vibrio* (*V. cholerae* O1, *V. cholerae* non-O1/non-O139, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissi*, *Vibrio mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*), gênero cuja identificação laboratorial é muito parecida com *Aeromonas*, o que dificulta a identificação (JANDA; ABBOTT, 1998).

Além disso, nove cepas com identificação bioquímica inconclusiva, sendo ora tipadas como *Aeromonas* e ora tipadas como *Vibrio*, foram submetidas à duplex-PCR para confirmação do gênero e avaliação da especificidade da técnica.

6 RESULTADOS

6.1 GENES DE VIRULÊNCIA

Os genes *lip*, *exu*, *gcat* e *flaA/B* foram encontrados em alta frequência nas 106 amostras clínicas e nos 19 isolados ambientais analisados. O gene *aerA* foi encontrado em menor frequência tanto nos isolados clínicos como nos ambientais. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de isolados clínicos e ambientais para quaisquer dos genes estudados (tabela 4). A figura 2 mostra o tamanho dos fragmentos amplificados para os genes *aerA*, *gcat*, *lip*, *exu* (A) e *flaA/B* (B) na cepa de referência ATCC 7966^T.

Tabela 1. Frequência de genes de virulência em potencial em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004.

Gene	Frequência (%)		Valor de p
	Isolados Clínicos	Isolados Ambientais	
<i>lip</i>	84,9	100	0,128
<i>exu</i>	85,8	94,7	0,463
<i>gcat</i>	100	100	1,000
<i>flaA/B</i>	84	89,5	0,971
<i>aerA</i>	47,2	36,8	0,405

Fonte: elaborado pelo autor.

A amplificação do gene *flaA/B* gerou fragmentos de tamanhos ligeiramente diferentes (figura 3). De acordo com os padrões de amplificação/tamanho dos segmentos, foram identificados quatro perfis (F1 a F4). O perfil de amplificação mais frequentemente encontrado entre as cepas foi o perfil F1 de tamanho semelhante ao fragmento amplificado pela cepa *A. hydrophila* ATCC 7966^T, seguido do perfil F2, semelhante ao padrão obtido pela amplificação do gene na cepa de referência *A. veronii* biotipo *sobria* ATCC 35624^T (figura 4). Os perfis F3 e F4 só foram encontrados em isolados clínicos. Uma cepa representante de cada um desses perfis foi submetida aos testes de adesividade celular e formação de biofilme.

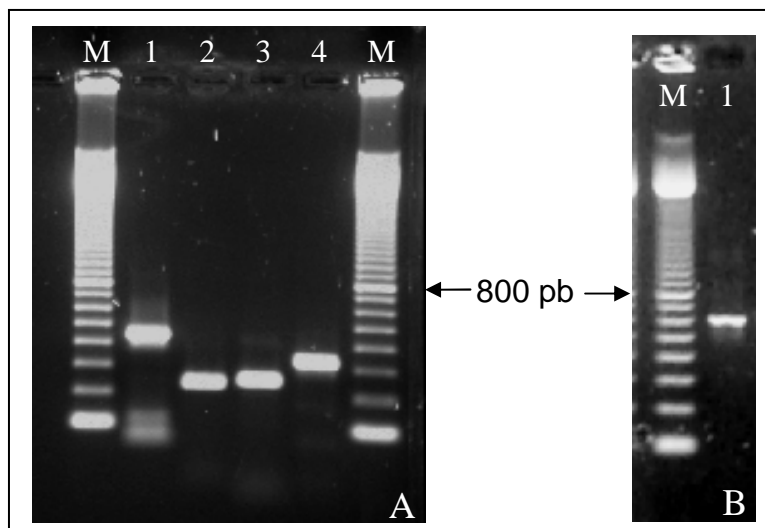


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR gene específica da cepa de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: **A**: linhas: M: marcador de peso molecular (100pb), 1: *aer* (aerolisina), 2: *gcat* (Glicerofosfolípídeo:colesterol acetiltransferase), 3: *lip* (lipase), e 4: *exu* (DNase). **B** – linhas: M: marcador de peso molecular (100pb), 1: *fla* (flagelinaA/B).

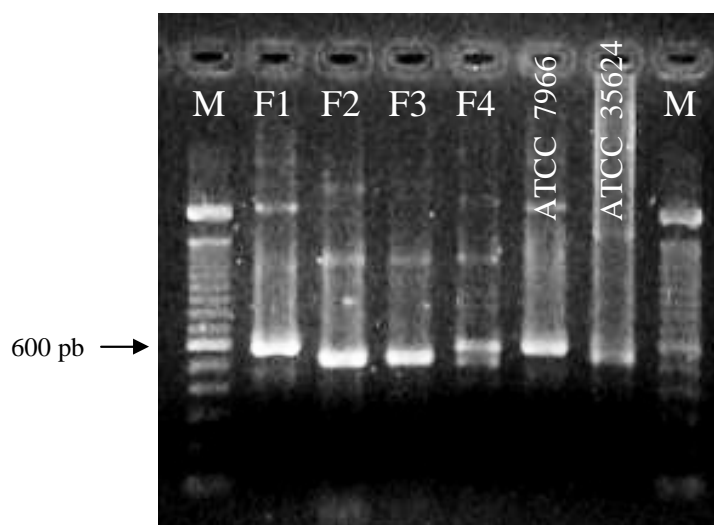


Figura 3. Fragmentos obtidos após amplificação por PCR do gene *fla* A/B com uma cepa representante de cada perfil, denominados F1 a F4, e as cepas de referência *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T e *Aeromonas veronii* bio *veronii* ATCC 35624^T.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: Linha M = marcador de peso molecular.

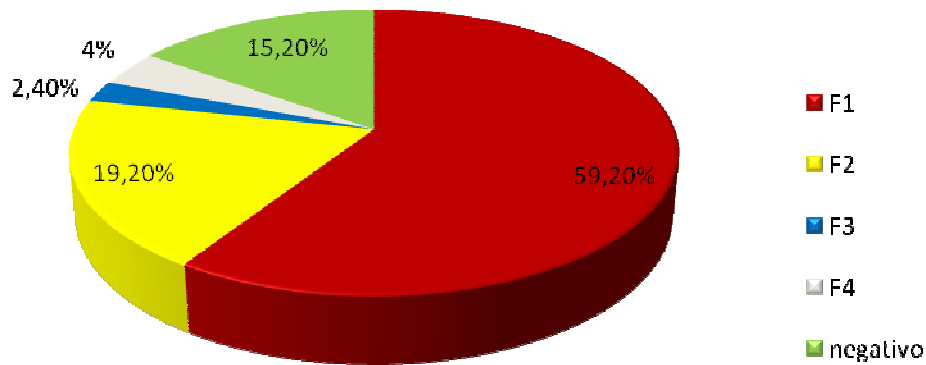


Figura 4. Frequência dos perfis para o gene *flaA/B* em cepas clínicas e ambientais de *Aeromonas* spp. isoladas durante um surto de diarreia ocorrido em São Bento do Una, PE, em 2004.

O sequenciamento de quatro cepas representantes do surto que apresentaram tamanhos de bandas diferentes, bem como das cepas de referência ATCC 7966^T e ATCC 35624^T confirmou a existência de polimorfismo dentro desse gene (figura 5).

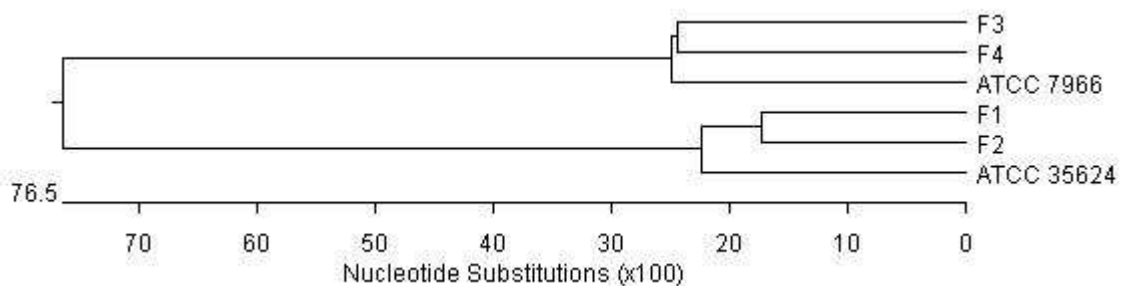


Figura 5. Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências do gene *flaA/B* de diferentes isolados de *Aeromonas* spp.

Em relação ao gene codificante da aerolisina – *aerA* – em 57 isolados (45,6%) houve amplificação de um fragmento de cerca de 1000 pb, tamanho aproximadamente três vezes maior que o esperado (figura 6) e 13 amostras (10,4%) amplificaram os dois fragmentos (431 e 1000 pb).

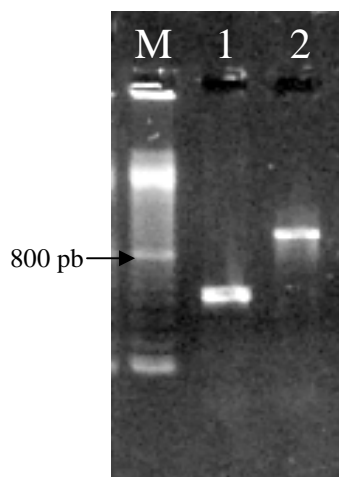


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR específica para o gene *aerA* em dois isolados do surto.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: Linhas: M: marcador de peso molecular (100 pb); 1: fragmento de tamanho esperado para o gene *aerA*, 431 pb; 2: fragmento amplificado de, aproximadamente, 1000 pb.

O sequenciamento das bandas de 431 pb e de 1000 pb clonadas revelou que o fragmento de 431 pb possui sequência homóloga à depositada em bancos de dados públicos para o gene *aerA* de *Aeromonas*. O amplicon de aproximadamente 1,0 kb não possui identidade com o gene *aerA*, mas sim (embora baixa) com gene codificante de uma proteína hipotética de *Aeromonas* (putative Mg²⁺ transporter-C, GI: 117558854 e GI: 142849896). Após aumentar a temperatura de anelamento dos *primers* para 62°C, o fragmento de 1,0 kb não foi amplificado. O achado, portanto, foi considerado inespecificidade da reação de PCR e as cepas que apresentaram apenas esse fragmento foram consideradas negativas para *aerA*.

Dentre as cepas analisadas, apenas 34% dos isolados clínicos e 31,5% das amostras ambientais apresentaram os cinco genes pesquisados. Por outro lado, 94,4% e 100% dos isolados clínicos e ambientais, respectivamente, amplificaram pelo menos três genes de virulência associados, como mostrado na tabela 5.

Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genes *flaA/B*, *exu*, e *lip* entre as espécies de *Aeromonas* encontradas durante o surto ($p=0,6557$, $p=0,5415$ e $p=0,133$, respectivamente). Entretanto, o gene da aerolisina (*aerA*) foi encontrado numa distribuição menor em *A. caviae* e nas cepas que não foram tipadas para espécie, denominadas *Aeromonas* sp. ($p<0$) (tabela 6).

Tabela 2. Associação de genes de virulência em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004.

Genes	Isolados clínicos		Isolados ambientais	
	n	%	n	%
<i>gcat</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺	36	34	6	31,5
<i>gcat</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺	3	2,8	1	5,3
<i>gcat</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺	29	27,4	10	52,6
<i>gcat</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺	5	4,7	–	–
<i>gcat</i> ⁺ , <i>aer</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺	6	5,7	–	–
<i>gcat</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺	8	7,5	1	5,3
<i>gcat</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺	6	5,7	1	5,3
<i>gcat</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺ , <i>fla</i> ⁺	7	6,6	–	–
<i>gcat</i> ⁺ , <i>lip</i> ⁺	3	2,8	–	–
<i>gcat</i> ⁺ , <i>exu</i> ⁺	2	1,9	–	–
<i>gcat</i> ⁺	1	0,9	–	–
Total	106	100	19	100

Fonte: elaborado pelo autor

Nota: n = número de amostras; % = percentual.

Tabela 3. Frequência de prováveis genes de virulência em espécies de *Aeromonas* spp.

Espécie	n	<i>flaA/B</i>	<i>exu</i>	<i>lip</i>	<i>aerA</i>
		%	%	%	%
<i>Aeromonas caviae</i>	52	80,8	84,6	86,5	28,8
<i>Aeromonas caviae</i> atípica	5	80	80	80	0
<i>Aeromonas media</i>	4	100	100	100	100
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	100	100	75	75
<i>Aeromonas veronii</i>	7	100	85,7	100	85,7
<i>Aeromonas veronii</i> atípica	6	66,6	83,3	100	83,3
<i>Aeromonas jandaei</i>	1	100	100	0	100
<i>Aeromonas trota</i>	3	100	100	0	66,6
<i>Aeromonas</i> sp.*	43	79,1	88,4	93	48,8

Fonte: elaborado pelo autor

Nota: *Cepas que não foram tipadas para espécie; n = número de amostras; % = percentual.

A presença dos genes associados variou entre as espécies, sendo que 100% de *A. media* e 100% de *A. veronii* apresentaram os cinco genes pesquisados, seguidas de *A. veronii* atípica (60%), *A. hydrophila* (50%), *Aeromonas* sp. (31,6%) e *A. caviae* (25%). As outras espécies apresentaram quatro ou menos genes associados.

6.2 ADESIVIDADE CELULAR *IN VITRO*

Os testes de adesividade mostraram que nem todas as cepas de *Aeromonas* aderiram às células animais, mas algumas apresentaram adesão difusa, como mostra a figura 7 (aumento 400x). Também foram observadas algumas alterações indicativas de dano citológico, como aumento do volume celular com rarefação citoplasmática, além de áreas focais de necrose (perda de núcleo e nucléolo). As alterações foram mais visíveis nas células da linhagem HEp-2 do que nas da linhagem Vero (dados não mostrados).

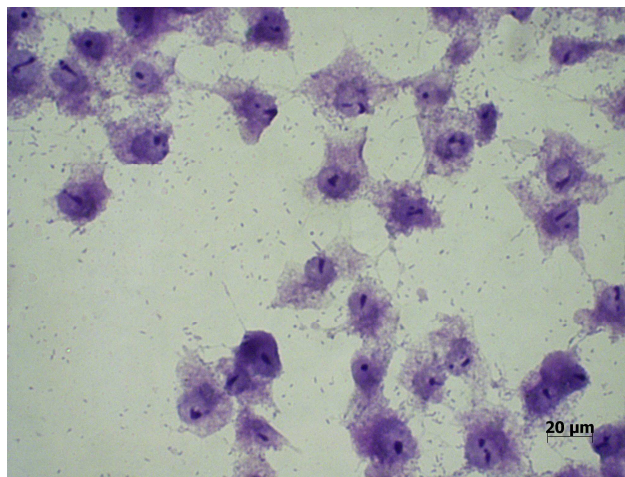


Figura 7. Adesividade difusa de *Aeromonas* sp. em células HEp-2 coradas com Giemsa e visualizadas em microscópio óptico.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: aumento de 400x.

6.3 MICROSCOPIA CONFOCAL

A microscopia confocal do crescimento bacteriano *in natura* mostrou que há

diferenças entre as cepas no que se refere à topografia e à densidade do crescimento bacteriano (figura 8). Não foi observada adesão de bactérias após fixação do crescimento bacteriano, ao contrário do que foi observado para a cepa de *S. aureus* utilizada como controle positivo (dados não mostrados).

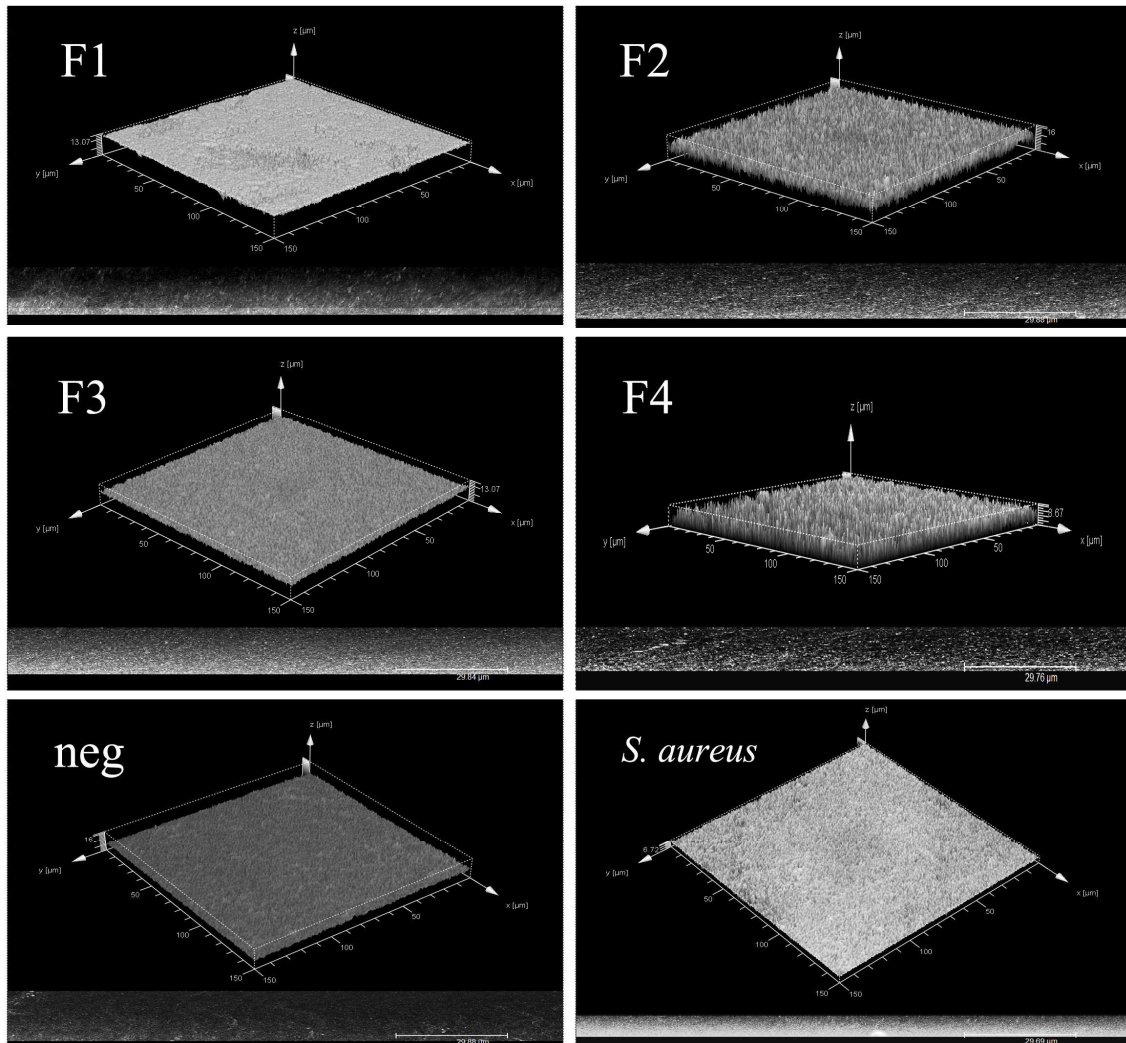


Figura 8. Fotomicrografia confocal mostrando diferenças na topografia do crescimento bacteriano de diferentes cepas de *Aeromonas* spp.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: quadrantes: F1 a F4: cepas com diferentes perfis de amplificação para o gene *flaA/B*; neg: cepa que não possui o gene *flaA/B*; *S. aureus*: cepa de *S. aureus* produtora de biofilme.

6.4 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ESPAÇADORA INTERGÊNCIA – ISR 16S-23S

De acordo com o padrão de bandas obtidas pela amplificação da ISR 16S-23S, nove perfis distintos foram identificados entre os isolados clínicos analisados, reunidos em grupos denominados de R1 a R9 (figura 9).

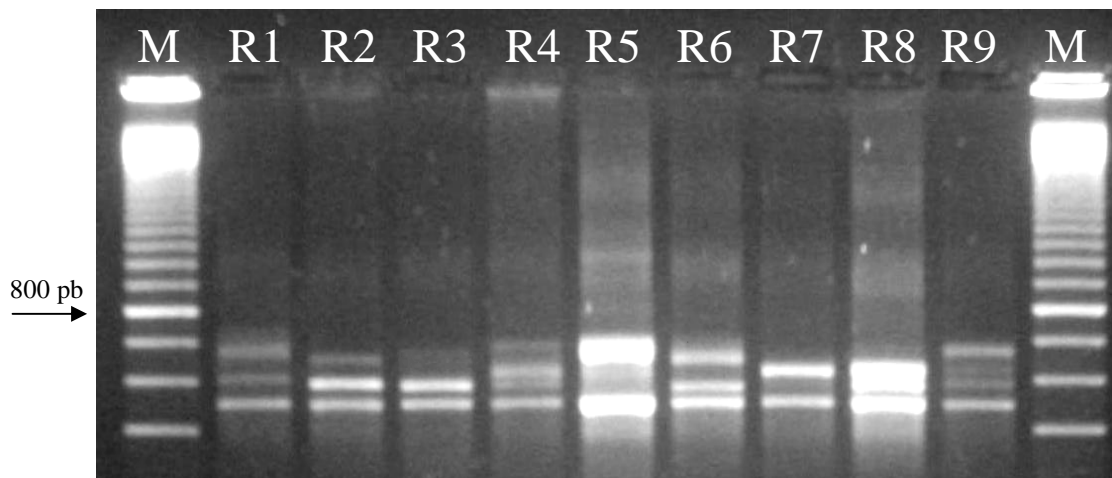


Figura 9. Perfis obtidos a partir da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S do rDNA de cepas de *Aeromonas*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: linha M: marcador de peso molecular.

O perfil mais encontrado é o R1, com 57,5% dos isolados, seguido de R7 (13,2%), R5 (8,5%), R8 (5,7%), R3 (4,7%), R4 (3,8%), R6 (2,8%) R2 e R9 (1,9% cada) (figura 10). Não foi encontrada relação entre ribotipo e espécie, ou seja, cepas de espécies diferentes estão agrupadas no mesmo ribotipo e cepas da mesma espécie estão distribuídas em ribotipos diferentes.

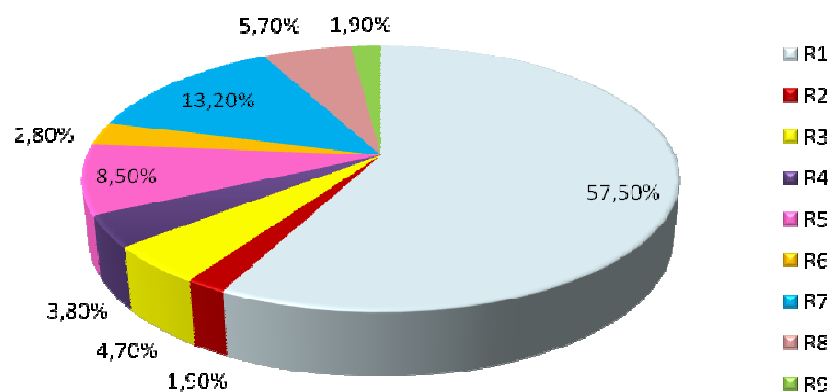


Figura 10. Distribuição dos nove ribotipos relacionados à região espaçadora intergênica de cepas de *Aeromonas* isoladas de humanos durante o surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004. Fonte: elaborado pelo autor.

Com relação à PCR da ISR 16S-23S das cepas ambientais, 57,9% pertenciam ao ribotipo R1, seguidas de R7 (15,8%), R2 e R4 (10,5% cada) e R5 (5,3%). Nenhum isolado ambiental foi classificado nos perfis R3, R6, R8 e R9 (figura 11).

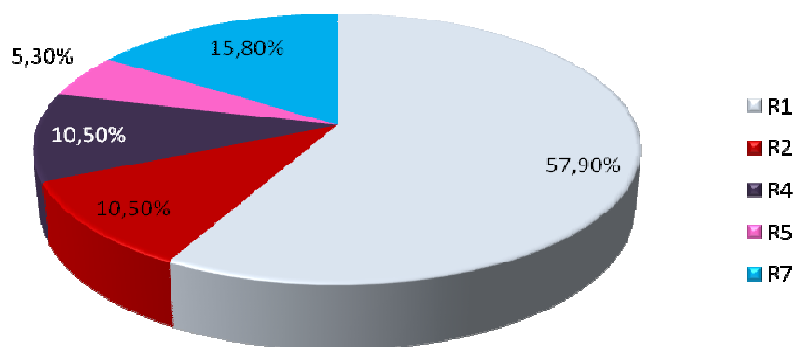


Figura 11. Distribuição de ribotipos relacionados à região espaçadora intergênica de cepas de *Aeromonas* isoladas de ambiente durante o surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004. Fonte: elaborado pelo autor.

O sequenciamento e alinhamento de clones contendo a ISR 16S-23S do rDNA mostrou que existem dois tipos de ISR polimórficos nas cepas de *Aeromonas*: ISR^{Glu}, que

contém genes de tRNA de glutamato e ISR^{IA}, que contém genes para tRNA de alanina e isoleucina. A figura 12 mostra o dendrograma construído a partir do alinhamento das sequências dos clones dos ribotipos R1, R2 e R3, além das sequências referentes aos *rrn* de *A. hydrophila* (Seq# 1h a 9h) e *A. salmonicida* (Seq# 1s a 9s).

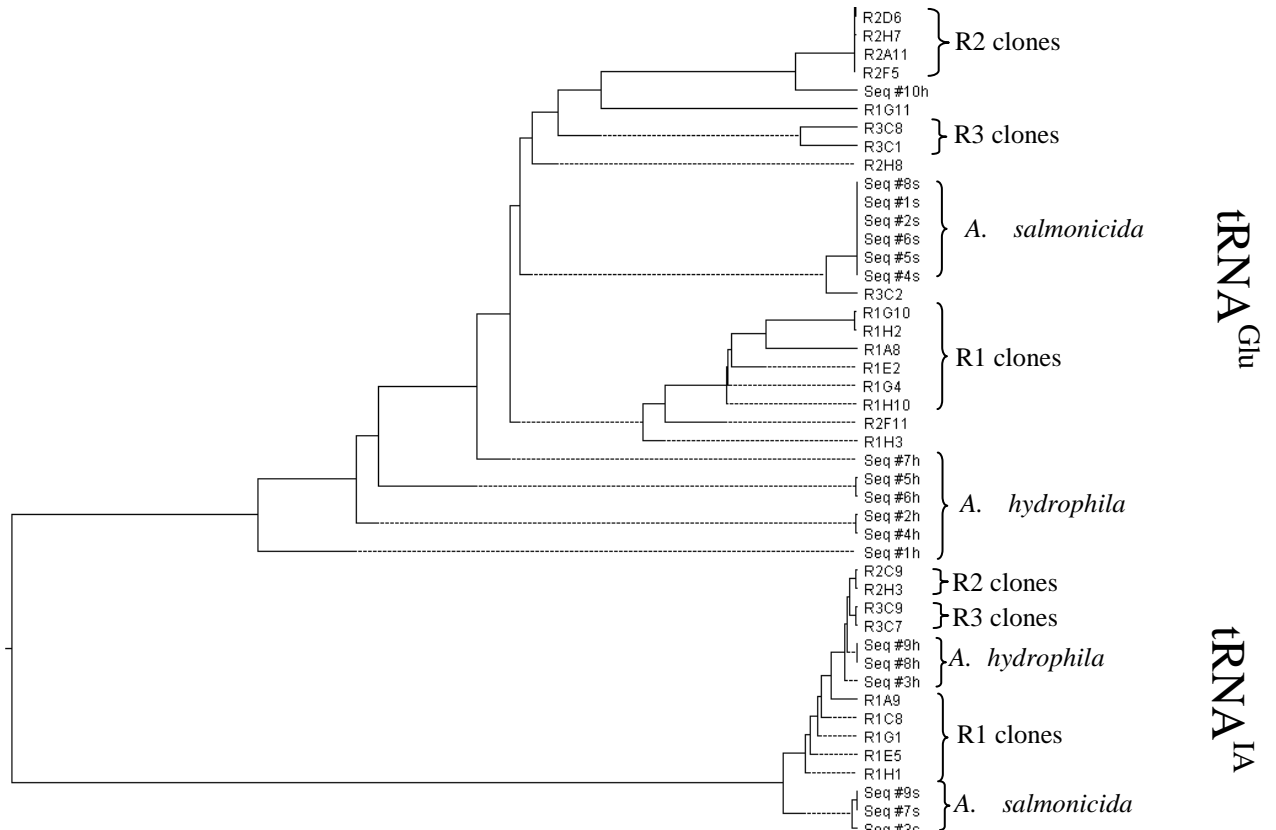


Figura 12. Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalV) das sequências 16S-23S clonadas de um representante de *Aeromonas* dos ribotipos R1, R2 e R3, juntamente com sequências da mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI.

Fonte: elaborado pelo autor.

O alinhamento isolado das sequências referentes a cada ribotipo mostrou que existem espaçadores com sequências nucleotídicas diferentes mas de tamanho igual ou muito próximas (507 pb, 510 pb e 512 pb) para os três ribotipos analisados (figuras 13, 14 e 15), ou seja, cada banda visualizada no gel corresponde a mais de um tipo de sequência espaçadora que por serem de tamanho igual ou muito semelhante, sobrepõem-se umas às outras no gel.

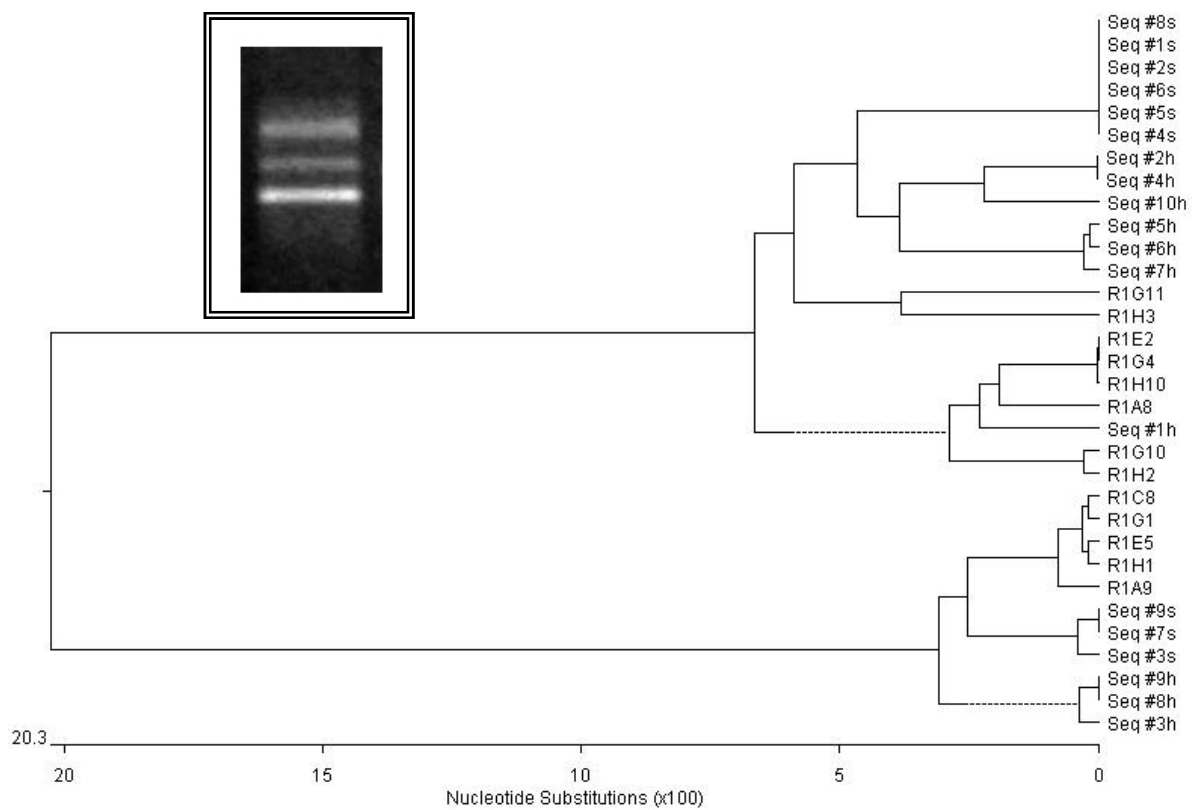


Figura 13. Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências 16S-23S clonadas de cepa do ribotipo R1, juntamente com seqüências da mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI.

Fonte: elaborado pelo autor.

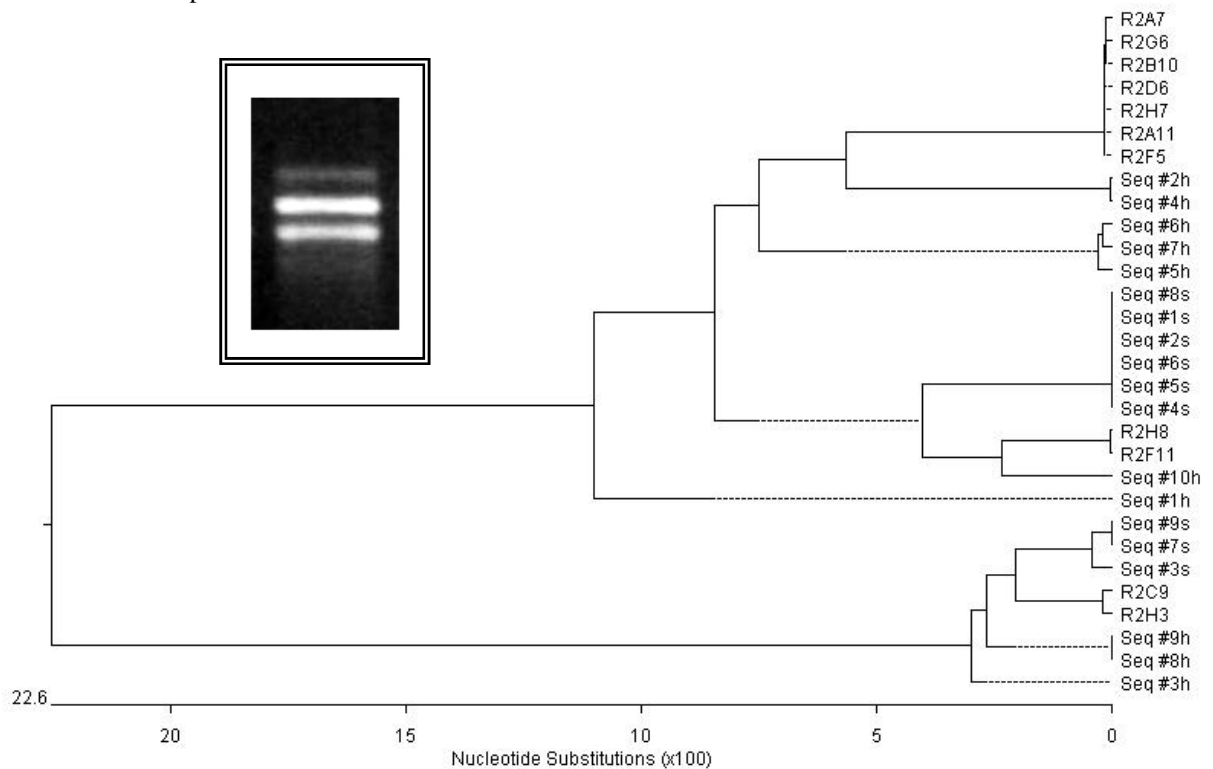


Figura 14. Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências 16S-23S clonadas de cepa do ribotipo R2, juntamente com seqüências da mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI.

Fonte: elaborado pelo autor.

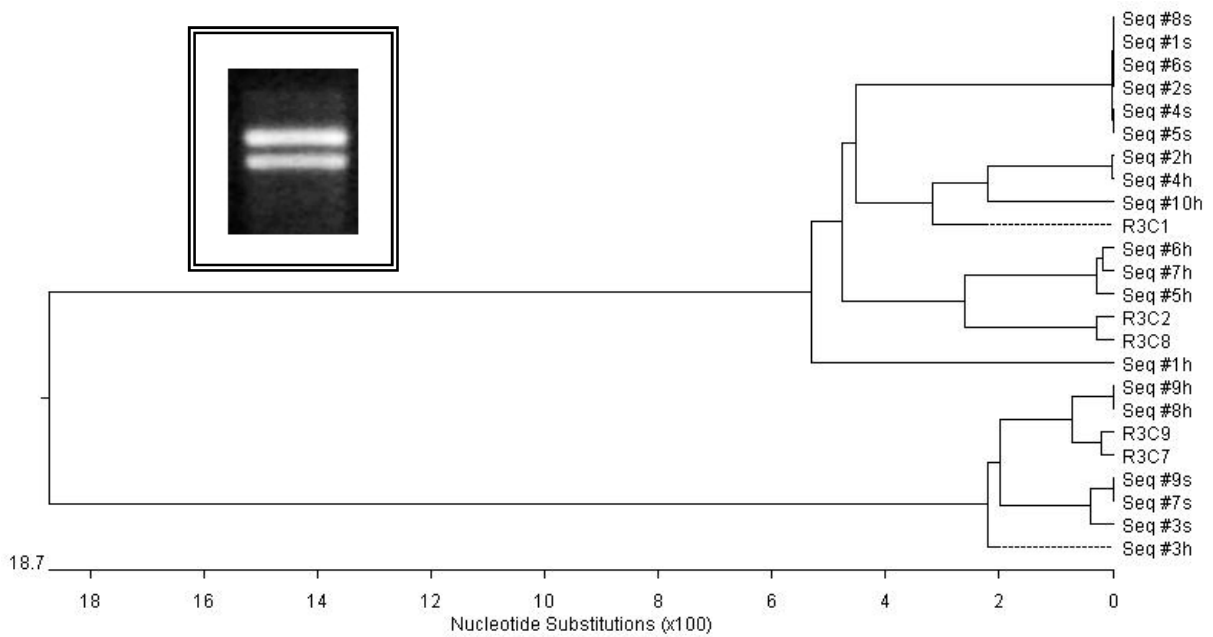


Figura 15. Dendrograma obtido após alinhamento (ClustalW) das sequências 16S-23S clonadas de cepa do ribotipo R3, juntamente com sequências da mesma região de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* depositadas no NCBI.

Fonte: elaborado pelo autor.

6.5 GENE 16S

A figura 16 mostra os produtos de PCR para o gene 16S de um representante de cada ribotipo R1 a R9 e pode-se observar que não há diferença no tamanho desses fragmentos. Contrariamente à heterogeneidade encontrada na ISR 16S-23S, o sequenciamento do produto de PCR do gene 16S de uma cepa de *Aeromonas* representante de cada perfil (R1 a R9) mostrou que esse gene é mais homogêneo do que a região espaçadora, como se observa na figura 17.

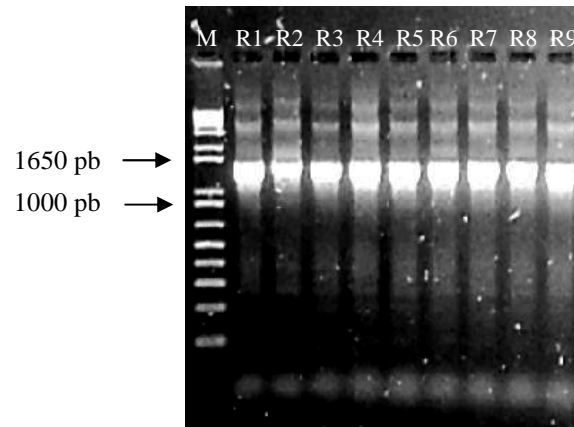


Figura 16. Perfil obtido a partir da amplificação do gene 16S de isolados de *Aeromonas* obtidos durante o surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: linha M: marcador de peso molecular.

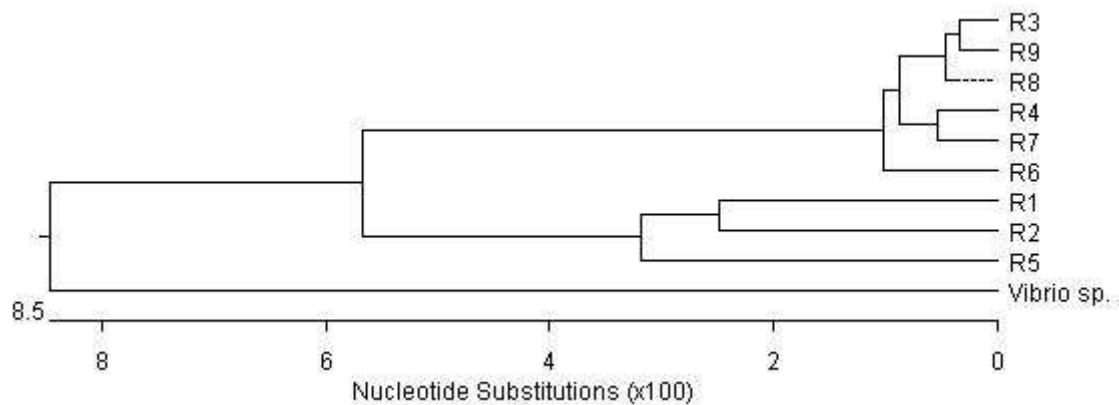


Figura 17. Dendrograma obtido a partir do alinhamento (ClustalV) de seqüências do gene 16S de um representante de *Aeromonas* de cada ribotipo (R1 a R9), juntamente com seqüência do gene 16S de *Vibrio* sp. depositada no NCBI.

Fonte: elaborado pelo autor.

6.6 DUPLEX-PCR

A técnica revelou boa reprodutibilidade uma vez que ambos os genes alvo foram amplificados nas cepas de referência nos quatro ensaios realizados (figura 18).

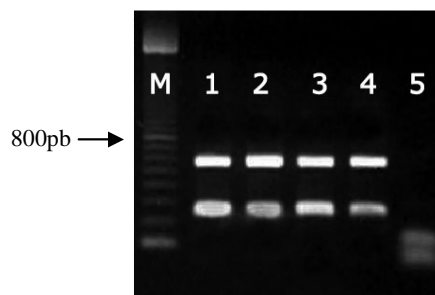


Figura 18. Reprodutibilidade da duplex-PCR.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: linhas: M: marcador de peso molecular 100 pb; 1: *Aeromonas caviae* ATCC 7966^T; 2: *Aeromonas veronii* biogrupo *veronii* ATCC 35624^T; 3: *Aeromonas caviae* ATCC 15468; 4: *Aeromonas hydrophila* IOC 11036 e 5: controle negativo.

Também foi específica para o gênero *Aeromonas*, com os fragmentos para os genes *gcat* (237 pb) e 16S (aproximadamente 600 pb) sendo amplificados nas seis espécies testadas, nos quatro ensaios realizados (figura 19, linhas 1-8). O gene *gcat* não foi amplificado em nenhuma das espécies de *Vibrio* testadas (figura 19, linhas 9-16). Por outro lado, bandas de pequena intensidade da altura do 16S, foram observadas com *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* e *V. parahaemolyticus* (figura 19, linhas 10, 11, 14 e 15 respectivamente).

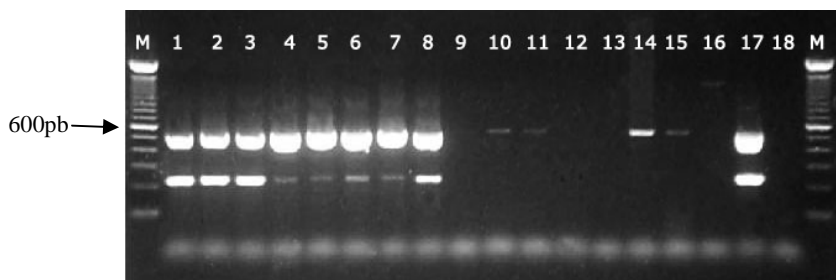


Figure 19. Sensibilidade da duplex-PCR.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: linhas: M: marcador de peso molecular 100 pb; 1: *Aeromonas caviae*; 2: *Aeromonas caviae* atípica; 3: *Aeromonas hydrophila*; 4: *Aeromonas jandaei*; 5: *Aeromonas media*; 6: *Aeromonas veronii*; 7: *Aeromonas veronii* atípica; 8: *Aeromonas trota*; 9: *Vibrio cholerae* O1; 10: *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139; 11: *Vibrio alginolyticus*; 12: *Vibrio fluvialis*; 13: *Vibrio furnissi*; 14: *Vibrio mimicus*; 15: *Vibrio parahaemolyticus*; 16: *Vibrio vulnificus*; 17: controle positivo e 18: controle negativo.

Com relação à identificação de isolados com tipagem bioquímica inconclusiva, todos foram negativos para *Aeromonas* pela duplex-PCR, resultado confirmado através de RFLP-PCR, técnica considerada padrão-ouro para identificação dessas bactérias (FIGUERAS et al., 2000).

7 DISCUSSÃO

Segundo alguns autores, a patogenicidade de *Aeromonas* spp é multifatorial e inclui mecanismos complexos e vários fatores de virulência (AGUILERA-ARREOLA et al. 2005; JANDA; ABBOTT, 2010). Entretanto, ainda existem muitas dúvidas sobre o seu papel na etiologia de gastroenterites, considerando que essas bactérias já foram isoladas tanto de doentes, quanto de indivíduos saudáveis, além de não existir um modelo animal que reproduza o processo diarreico. Além do mais, o papel dessas bactérias em infecções entéricas tem sido definido a partir de relatos de casos e investigações de surtos com isolamento de *Aeromonas* spp. de fezes de pacientes (KIROV, 2001) o que, embora relacione esses microrganismos à doença, não inferem relação de causa e efeito (ALTWEGG; GEISS, 1989).

Como esperado, no nosso estudo o gene *gcat* foi encontrado em todas as amostras analisadas, confirmando a importância deste gene como marcador específico para distinguir *Aeromonas* spp. de outros enteropatógenos, como sugerido por Chacón et al (2002). Soler et al. (2002) também encontraram frequência semelhante na análise dos seus isolados clínicos, no entanto, outros estudos apontam que o gene *gcat* não está presente em todas as cepas analisadas (CHACÓN et al., 2003; GUERRA et al., 2007; NAM; JOH, 2007) e isso pode ser devido às condições de estrigência da PCR. No presente trabalho, a estrigência foi reduzida através da diminuição da temperatura de anelamento dos *primers* de 56°C, para 54°C, o que pode justificar a amplificação do gene em todas as cepas.

Os genes *lip* e *exu*, codificadores respectivamente de uma lipase extracelular e de uma DNase também foram encontrados em alta frequência tanto nos isolados clínicos quanto nos ambientais. Sabe-se que as lipases extracelulares alteram a membrana celular e as DNases degradam o material genético do hospedeiro porém ainda não foi mostrado o seu papel na patogenicidade de *Aeromonas*. Mesmo assim, ambos os fatores são considerados importantes para a nutrição e o desenvolvimento bacteriano (PEMBERTON et al., 1997) e por isso foram incluídos nesse estudo.

Surpreendentemente, o fragmento de aproximadamente 1000pb foi encontrado na amplificação do gene *aerA* sugerindo alteração por inserção neste gene, ou ainda a existência de dois alelos distintos para codificação de mesmo produto o que poderia influenciar a expressão da toxina e, conseqüentemente, o grau de virulência das cepas que apresentaram a variação. A clonagem e posterior sequenciamento desse fragmento revelou que a banda de

1000pb era artefato da PCR ocasionado, provavelmente, por inespecificidade dos *primers* utilizados.

A amplificação de fragmentos de tamanhos diferentes do gene *flaA/B*, tanto entre as cepas do surto, quanto entre as cepas de referência ATCC 7966^T e ATCC 35624^T, sugere que esse gene é polimórfico em *Aeromonas*, o que foi comprovado pelo sequenciamento dos produtos de PCR de quatro cepas do surto, além das cepas de referência ATCC 7966^T e ATCC 35624^T. Todas as sequências apresentaram similaridade com a região codificante do flagelo de diversas espécies de *Aeromonas* depositadas no banco de dados do NCBI. Embora tenha mostrado diferenças, a análise nucleotídica não é muito esclarecedora e, nesse caso, é interessante conduzir estudos posteriores com ênfase na análise das proteínas codificadas pelo *flaA/B* dos diferentes perfis obtidos na PCR.

A análise dos genes de virulência em conjunto revelou que existe uma associação significativamente mais frequente de três ou mais genes, em comparação com a presença de um único gene. Segundo Guerra et al. (2007) e Nawaz et al. (2010), existe um maior potencial patogênico das cepas que albergam um maior número de genes de virulência. Dessa forma, o fato de todas as cepas de *A. media* apresentarem os cinco genes de virulência pode ser um indicativo do maior potencial patogênico dessa espécie dentre os isolados do surto. Contudo, o pequeno número de cepas dessa espécie pode estar levando a um viés nesse resultado.

Guerra et al. (2007) apontam um maior potencial patogênico em *A. hydrophila* e *A. veronii* biotipo *sobria* em comparação com *A. caviae*. Infelizmente, no nosso estudo, um grande número de cepas correspondente a 34,4% do total, não puderam ser tipadas para espécie, o que prejudicou nossas conclusões.

As frequências similares dos genes de virulência nos grupos de isolados clínicos e ambientais sugerem que houve contaminação ambiental por fezes das pessoas infectadas e, possivelmente, de animais portadores. Isso pode ser explicado pelas condições inadequadas de saneamento em São Bento do Una, com sistemas de fornecimento de água e tratamento de esgoto precários. Por outro lado, na época do surto, parte da população da cidade consumia água dos rios de onde as amostras de *Aeromonas* spp. foram isoladas (HOFER et al., 2006) e, uma vez que o ambiente aquático é nicho ecológico destas bactérias, as pessoas podem ter se infectado através da água contaminada.

A presença do flagelo polar está diretamente relacionada à capacidade de *Aeromonas* spp. formar biofilme (KIROV et al., 2004), sendo portanto, um indicador de virulência das cepas que abrigam esse gene. Nos testes de infecção celular, as cepas de *Aeromonas* testadas

mostraram um perfil de aderência difuso, sem diferenças significativas entre os perfis de amplificação do *flaA/B*. Contudo, devido ao pequeno número de cepas testadas os resultados obtidos não são conclusivos. Além disso, o tempo de infecção de 90 minutos pode não ter sido suficiente para que houvesse multiplicação bacteriana necessária ao processo de adesão. Por isso recomenda-se repetir os testes com um número maior de cepas e com tempo de infecção de três e seis horas, semelhante aos testes realizados em *E. coli*, e só então correlacionar o padrão de adesão obtido com uma maior ou menor virulência da cepa.

Em relação à microscopia confocal, o fato de visualizar uma maior densidade bacteriana em uma lâmina de crescimento mais compacto poderia ser um indício do começo da formação de biofilme. Entretanto, quando o experimento foi realizado após fixação do crescimento bacteriano, não foi observada adesão bacteriana nas placas, o que indica que as *Aeromonas* testadas não têm capacidade de aderir e, portanto, não formam biofilme. É importante destacar, contudo, que o número de isolados pesquisados foi pequeno e não existem muitos trabalhos na literatura que relatem a formação de biofilme em *Aeromonas* através de microscopia confocal, o que enfraquece essa hipótese. Outros experimentos são necessários para confirmar que as cepas testadas não são produtoras de biofilme.

Devido à grande heterogeneidade encontrada na amplificação da região espaçadora intergênica (ISR) 16S-23S do rDNA, não foi possível apontar um clone entre os isolados analisados, o que enfraquece a hipótese de que essas bactérias tenham sido a causa do surto. Pela heterogeneidade encontrada nas cepas, acredita-se que as aeromonas estão presentes naquele ambiente há bastante tempo e vêm acumulando mutações nas sucessivas gerações. Também não foi surpresa encontrar dois tipos de ISR polimórficos nas cepas de *Aeromonas* – ISR^{Glu} e ISR^{IA} – pois resultados similares foram descritos por Kong et al. (1999).

Contrariamente à heterogeneidade encontrada na ISR 16S-23S, a análise por PCR do gene 16S revelou grande homogeneidade, o que significa que a análise desse gene por PCR não é útil na investigação de surtos. Por outro lado, a análise por sequenciamento do produto de PCR para esse gene, realizada neste trabalho, indica que apesar de evolutivamente mais conservado do que a região 16S-23S, o gene 16S apresenta diferenças que podem ser determinadas através de RFLP-PCR ou de sequenciamento, o que torna esse gene um marcador em potencial para investigações epidemiológicas. Outros estudos são necessários no que se refere à análise do 16S dos isolados de *Aeromonas* spp.

Embora ainda seja realizada na maioria dos laboratórios clínicos, a identificação de *Aeromonas* através de métodos fenotípicos é muito falha. O fato de ser confundida com

Vibrio mostra essa limitação e fortalece a ideia de que o diagnóstico de *Aeromonas* spp deve ser realizado através de métodos moleculares que são mais precisos e confiáveis. Atualmente, vários métodos moleculares são recomendados para a identificação genotípica de *Aeromonas* (FIGUERAS et al., 2000; HOIE et al., 1999; NAM; JOH, 2007; SEN; RODGERS, 2004; YU et al., 2008), contudo grande parte desses métodos são específicos para uma espécie em particular. Baseando-se neste conceito, desenvolvemos uma duplex-PCR para identificação de espécies do gênero *Aeromonas*.

A duplex-PCR apresentada neste trabalho amplifica dois genes-alvo de *Aeromonas* e pode ser utilizada como complemento aos métodos fenotípicos, ou triagem na identificação desse gênero. Chacón et al (2002) consideram que *gcat* é encontrado em todas as cepas de *Aeromonas* spp, e o mesmo resultado foi observado por Castro-Escarpulli et al. (2003) e no presente trabalho. Entretanto, alguns estudos não mostram 100% de frequência deste gene em *Aeromonas* (GUERRA et al., 2007; NAM; JOH, 2007; NAWAZ et al., 2010).

Por isso, e buscando fortalecer o resultado do teste, a análise do gene 16S foi incluída na técnica. A duplex-PCR é considerada positiva para *Aeromonas* quando os dois genes alvo são amplificados simultaneamente e, portanto, o fato do gene 16S ter sido amplificado em algumas espécies de *Vibrio* não invalida o teste. Ainda, a duplex-PCR mostrou-se útil na identificação de bactérias que apresentavam diagnóstico bioquímico inconclusivo entre *Vibrio* e *Aeromonas*, o que indica que a técnica pode ser utilizada em laboratórios clínicos para diagnóstico diferencial destes gêneros.

Diante do grande número de isolados de *Aeromonas* nas fezes dos pacientes do surto de São Bento do Una, acreditou-se inicialmente que essas bactérias provinham de um mesmo clone e eram responsáveis pela etiologia do surto. Entretanto, os resultados obtidos através da ISR 16S-23S apontam que essas bactérias estão presentes há bastante tempo naquela região e não foram, portanto, responsáveis pelo surto de diarreia. Por outro lado, as 20 cepas de *V. cholerae* isoladas no surto apresentaram o mesmo perfil tanto na ISR 16S-23S quanto por RAPD (HENRIQUES et al., 2005), eliminando qualquer dúvida quanto à etiologia do surto de São Bento do Una.

Heuzenroeder et al. (1999) apontam a presença do gene *aerA* como um indicativo da patogenicidade de *Aeromonas*. O fato de esse gene ter sido encontrado em uma frequência baixa entre os isolados é um indício de que elas não são tão patogênicas, o que fortalece a hipótese de que essas bactérias eram parte da microbiota transitória dos indivíduos e competiram no meio de cultura com *V. cholerae*, o verdadeiro agente do surto.

Por outro lado, a alta frequência dos genes de virulência pesquisados aliada às alterações celulares descritas, ainda que inconclusivas, chamam a atenção para a possibilidade de existir um marcador de patogenicidade ainda desconhecido nestas bactérias. Além do mais, vários trabalhos relatam a presença de plasmídios e outros elementos genéticos móveis que contém genes de resistência a antimicrobianos (DAS; SAHA; PAL, 2009; VERNER-JEFFREYS et al., 2009; YE; XU; LI, 2010), o que levanta a possibilidade de que cepas de *Aeromonas* adquiram esses elementos. Portanto, recomenda-se que seja realizada pesquisa de *Aeromonas* spp. tanto em coproculturas quanto em ambientes aquáticos de regiões susceptíveis e, de posse desses dados, tentar definir o papel desses microrganismos em processos diarréicos.

8 CONCLUSÃO

Apesar de ter sido encontrado um potencial de patogenicidade nas cepas de *Aeromonas*, pela alta frequência dos genes de virulência, além da capacidade de produzirem alterações em células eucarióticas animais, não foi encontrado um perfil clonal entre essas bactérias e, portanto, elas não podem ser apontadas como responsáveis pelo surto de diarreia ocorrido em São Bento do Una, PE, em 2004. Contudo, diante do alto número de isolados presentes em fezes de indivíduos da região e da preocupação da comunidade científica acerca deste patógeno, considerado por alguns autores como emergente, é importante realizar outros estudos naquela região, com foco na pesquisa de *Aeromonas* spp. tanto de fezes, quanto do ambiente.

9 PERSPECTIVAS

- a) Aprofundar os estudos relacionados ao gene 16S e à formação de biofilme por cepas de *Aeromonas* spp;
- b) Validar a duplex-PCR descrita neste trabalho aplicando como método de rotina para pesquisa de *Aeromonas* spp no Laboratório Central de Pernambuco;
- c) Caracterizar molecularmente *Aeromonas* spp isoladas em coproculturas e em ambientes aquáticos do estado de Pernambuco, apoiado no que é realizado para *Vibrio* spp.

10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto não tem implicações éticas uma vez que as cepas estudadas foram obtidas por ocasião da investigação de um surto suspeito de cólera, pelo LACEN-PE, Secretaria de Saúde do Estado e Ministério da Saúde. As referidas cepas foram encaminhadas ao Serviço de Referência em Cólera/Fiocruz para confirmação. Podem ser consideradas como de demanda espontânea e como são identificadas com uma numeração de registro laboratorial não se tem identificação do paciente. Além disso, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM e foi aprovado (parecer nº 064/2007).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington, 2006.

AGUILERA-ARREOLA, M.G. et al. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 242, p. 231-240, 2005.

ALBERT, M.J. et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3785-3790, 2000.

ALTARRIBA, A. et al. A polar flagella operon (*flg*) of *Aeromonas hydrophila* contains genes required for lateral flagella expression. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, p. 249-259, 2003.

ALTWEGG, M. et al. *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 10, p. 44-45, 1991.

ALTWEGG, M.; GEISS, H.K. *Aeromonas* as a human pathogen. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 16, p.253-286, 1989.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANGEL, M.F. et al. Necrotizing fasciitis of the upper extremity resulting from a water moccasin bite. **Southern Medical Journal**, Birmingham, v. 95, p. 1090-1094, 2002.

ANGUITA, J. et al. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 2411-2417, 1993.

AUSTIN, B., ADAMS, C. Fish pathogens. In: AUSTIN, B. et al. **The Genus *Aeromonas***. Queensland: Wiley, 1996. p.197-243.

BALAJI, V.; JESUDASON, M.V.; SRIDHARAN, G. Cytotoxin testing of environmental *Aeromonas* spp. in Vero cell culture. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 119, p. 186-189, 2004.

BALLAL, M. et al. Correlation of the suicide phenomenon in *Aeromonas* species with virulence and enteropathogenicity. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, v. 44, p. 421-425, 2001.

BELAS, M.R.; COLWELL, R.R. Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 150, p. 956-959, 1982.

BLOOM, H.G., BOTTONE, E.J. *Aeromonas hydrophila* diarrhea in a long-term care setting. **Journal of the American Geriatrics Society**, New York, v. 38, p. 804-806, 1990.

BORCHARDT, M.A. et al. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, p. 224-228, 2003.

BRASCHLER, T.R. et al. Complement resistance is essential for colonization of the digestive tract of *Hirudo medicinalis* by *Aeromonas* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4268-4271, 2003.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, Washington, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

BROUQUI, P.; RAOULT, D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 177-207, 2001.

BRUUN, M.S. et al. Conjugal transfer of large plasmids conferring oxytetracycline (OTC) resistance: transfer between environmental aeromonads, fish-pathogenic bacteria, and *Escherichia coli*. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 15, p. 69-79, 2003.

BUCHANAN, R.L. The 'New' pathogens: An update of selected examples. **Association of Food and Drug Officials**, Louisville, v. 48, p. 142-155, 1984.

BURR, S.E., DIEP, D.B., BUCKLEY, J.T. Type II secretion by *Aeromonas salmonicida*: evidence for two periplasmic pools of proaerolysin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 5956-5963, 2001.

CANALS, R. et al. Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 852-862, 2006.

CARNAHAN, A. et al. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 560-564, 1991.

CASTRO-ESCARPULLI, G. et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, Mexico, v. 22, p. 206-216, 2002.

CHACÓN, M.R. et al. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 44, p. 221-225, 2002.

CHACÓN, M.R. et al. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 84, p. 269-278, 2003.

CHAMPSAUR, H. et al. Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 145, p. 248-254, 1982.

CHANG, M.C. et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular deoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. **Gene**, Amsterdam, v. 94, p. 175-180, 1992.

CHENG, N.C. et al. Nosocomial infection of *Aeromonas hydrophila* presenting as necrotizing fasciitis. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taipei, v. 103, p. 53-57, 2004.

CHOPRA, A.K. et al. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 513-523, 1993.

CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, p. 1129-1137, 1999.

CHUANG, Y.C. et al. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology**, Reading, v. 143, p. 803-812, 1997.

CHUN, J.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2202-2208, 1999.

- COLE, A.R. et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. **Nature Structural and Molecular Biology**, New York, v. 11, p. 797-798, 2004.
- COLWELL, R.R. et al. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 36, p. 473-477, 1986.
- CROCIANI, J. et al. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, p. 146-148, 1995.
- DAS, A.; SAHA, D.; PAL, J. Antimicrobial resistance and in vitro gene transfer in bacteria isolated from the ulcers of EUS-affected fish in India. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, p. 497-502, 2009.
- DAVIN-REGLI, A.C. et al. A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 47, p. 499-504, 1998.
- DODD, H., PEMBERTON, J.M. Cloning, sequencing and characterization of the *nucH* gene encoding an extracellular nuclease from *Aeromonas hydrophila* JMP636. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 3926-3933, 1996.
- EARLE, C.S., et al. Severe acute gastroenteritis due to *Aeromonas* in a patient colectomized for Crohn's disease. **Revista Espanola de las Enfermedades del Aparato Digestivo**, Madrid, v. 89, p.48-50, 1997.
- EDGE, J.C.; FINCH, P.E. Observations on bacterial after growth in water supply distribution systems: implications for disinfection strategies. **Water and Environment Journal**, London, v. 1, p. 104-110, 1987.
- EDWARDS, M.L. et al. Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 295-304, 2001.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. New York, International Medical Publishing, Inc.; 1 edition, 2004.

FERGUSON, M.R. et al. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, p. 4299-4308, 1997.

FERNANDEZ, M. C.B.N. et al. *Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentina. **Genetica**, The Hage, v. 108, p. 35-40, 2000.

FIGUERAS, M.J. et al. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading v. 50, p. 2069-2073, 2000.

FIGUERAS, M.J. Clinical relevance of *Aeromonas*. **Reviews in Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 16, p. 145-153, 2005.

FIGUERAS, M.J. et al. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 538-541, 2005.

FIGUERAS, M.J. et al. *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 58, p. 231-234, 2007a.

FIGUERAS, M.J. et al. Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 56, p. 996-998, 2007b.

FIGUERAS, M.J.; GUARRO, J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. Use of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified 16S rRNA Gene for the Identification of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2023-2025, 2000.

FIVAZ, M.L. et al. Not as simple as just punching a hole. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 1637-1645, 2001.

FOSSE, T.C. GIRAUD-MORIN, C; MADINIER, I. Beta-lactam-resistance phenotypes in the genus *Aeromonas*. **Pathologie et Biologie**, Paris, v. 51, p. 290-296, 2003.

FREITAS, A.C. et al. *Aeromonas* species isolated from human urine; biological characterization and antibiotic susceptibility. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, p. 203-206, 1993.

FREITAS, A.C. et al. *Aeromonas* species associated with gastroenteritis in children: prevalence, characteristics and virulence properties. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 152-157, 1998.

GARCIA-MARTÍNEZ, J. et al. Comparation of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 6374-6377, 1996.

GARCIA-MARTÍNEZ, J. et al. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 36, p. 55-64, 1999.

GAVÍN, R. et al. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 43, p. 383-397, 2002.

GHENGESH, K.S., et al. Cholera-like diarrhea due to *Aeromonas caviae*. **First European Conference on Tropical Medicine**, Hamburg, Germany, 1995.

GHENGESH, K.S. et al. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 2, p. 81-98, 2008.

GOLD, W.L., SALIT, I.E. *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 16, p. 69-74, 1993.

GONI-URRIZA, M., et al. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 46, p. 297-301, 2000.

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

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer. **Microbiology**, Reading, v. 142, p. 3-16, 1996.

HARF-MONTEIL, C.G. et al. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 481-485, 2004.

HAVELAAR, A.H. et al. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking-water. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 72, p. 435-444, 1992.

HENRIQUES, F.M. et al. Surto de diarreia com isolamento de *Vibrio cholerae*/*Aeromonas*, Pernambuco, Brasil, 2004. Congresso de Investigación en Salud Pública, 11, 2005, Cuernavaca. **Libro de resúmenes do XI Congreso de Investigación en Salud Pública**. Mexico: Instituto de Salud Pública, 2005. v. 1, p. 206-207.

HEUZENROEDER, M.W.; WONG, C.Y.; FLOWER, R.L. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 174, p. 131-136, 1999.

HOFER, E. et al. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, p. 217-220, 2006.

HOIE, S. et al. Polymerase chain reaction (PCR) based typing of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 22, p. 403-411, 1999.

HOLMBERG, S.D. et al. *Aeromonas* intestinal infections in the United States. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 105, p. 83-89, 1986.

HOLMES, P.; NICCOLLS L.M.; SARTORY, D.P. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In: Austin, B. et al. **The genus *Aeromonas***. London, p. 127-150, 1996.

HUA, H.T. et al. *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 5427-5428, 2004.

INDERGAND, S., GRAF, J. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4735-4741, 2000.

INGHAM, A.B., PEMBERTON, J.M. A lipase of *Aeromonas hydrophila* showing nonhemolytic phospholipase C activity. **Current Microbiology**, New York, v. 31, p. 28-33, 1995.

JANDA, J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, p. 397-410, 1991.

JANDA, J. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: SUSSMAN, M. **Molecular Medical Microbiology**, London: Academic Press, 2001. p. 1237-1270.

JANDA, J.M., ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, p. 332-344, 1998.

JANDA, J.M., ABBOTT, S.L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, p. 35-73, 2010.

JESUDASON, M.V.; JOHN, M.; KOSHI, G. Comparison of three assays to detect enterotoxigenicity of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhoea in Vellore, south India. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, Dhaka, v. 7, p. 77-80, 1989.

JORGE, M.T. et al. *Aeromonas hydrophila* soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 92, p. 213-217, 1998.

JOSENHANS, C., SUERBAUM, S. The role of motility as a virulence factor in bacteris. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 605-614, 2002.

JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.M. Update on the genus *Aeromonas*. **ASM News**, Philadelphia, v. 66, p. 218-223, 2000.

KAO, H.T. et al. Fatal bacteremic pneumonia caused by *Aeromonas hydrophila* in a previously healthy child. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, v. 36, p. 209-211, 2003.

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

KIROV, S.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology**: Washington: ASM Press, 2001. p. 301-327.

KIROV, S.M. et al. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, p. 547-555, 2002.

KIROV, S.M. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 151-159, 2003.

KIROV, S.M. et al. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 1939-1945, 2004.

KO, W.C. et al. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. **Journal of Infection**, London, v. 40, p. 267-273, 2000.

KONG, R.Y.C. et al. Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA intergenic spacers for genus and species-specific detection of *Aeromonads*. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 38, p. 802-808, 1999.

KOSTMAN, J.R. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2084-2087, 1992.

KROVACEK, K.; FARIS, A.; MANSSON, I. Growth of and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 13, p. 165-175, 1991.

KUMAR, A. et al.. *Aeromonas caviae* as a cause of cholecystitis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, v. 43, p. 169-170, 2000.

KUNIMOTO, D. et al. Bacteriology of a bear bite wound to a human: case report. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 3374-3376, 2004.

LEAL, N.C. et al. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 447-454, 2004.

LI, L. et al. Severe pneumonia caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria*: a case report and review of the literature. **Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases**, Beijing, v. 31, p. 736-739, 2008.

LIM, P.L. Wound infections in tsunami survivors: a commentary. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, Singapura, v. 34, p. 582-585, 2005.

LLOPIS, F., et al. Epidemiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by *Aeromonas* spp. as compared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 36, p. 335-341, 2004.

LUPIOLA-GOMEZ, P. A., et al. Group 1 beta-lactamases of *Aeromonas caviae* and their resistance to beta-lactam antibiotics. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 207-215, 2003.

MAJEED, K.N., Mac RAE, I.C. Experimental evidence for toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in a meat extract at low temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 181-188, 1991.

MANSON, M.D. et al. Bacterial locomotion and signal transduction. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 1009-1022, 1998.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. Aeromonadaceae. In: BRENNER, D.J. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, 2005. p. 556.

MARTINEZ-MURCIA, A.J., BENLLOCH, S., COLLINS, M.D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 42, p. 412-421, 1992.

MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. et al. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1169-1175, 2008.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 237-42, 2002.

MARY, P., et al. Growth and survival of clinical vs. environmental species of *Aeromonas* in tap water. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, p. 191-198, 2001.

MERINO, S., et al. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 157-168, 1995.

MERINO, S. et al. Cloning, sequencing and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, p. 4008-4013, 1999.

MERINO, S. et al. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 263, p. 127-135, 2006.

MINANA-GALBIS, D.M. et al. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2073-2078, 2004.

MINNAGANTI, V.R. et al. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. **Heart and Lung**, St. Louis, v. 29, p. 306-308, 2000.

MITACHE, M. et al. Phenotypic and genetic virulence and antibiotic resistance markers in *Escherichia coli* strains isolated from hospital surfaces. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, Bucuresti, v. 68, p. 158-165, 2009.

MONAGHAN, S.F. et al. Necrotizing Fasciitis and Sepsis Caused by *Aeromonas hydrophila* after Crush Injury of the Lower Extremity. **Surgical Infections**, Larchmont, v. 9, p. 459-467, 2008.

MORA, A. et al. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. **International Microbiology**, Barcelona, v. 12, p. 243-251, 2009.

MORANDI, A. et al. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 6561-6564, 2005.

MOYER, N.P.; LAREW, M.S. Recurrent gastroenteritis caused by *Aeromonas* species: A case history. **Journal of diarrhoeal diseases research**, Dhaka, v. 8, p. 144, 1988.

MOYER, N.P. **The Quest for Understanding: A history of *Aeromonas* Research** International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*, 7, 2002, Orihuela, p.26.

MURATA, H., et al. Fulminant pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* in a man with chronic renal failure and liver cirrhosis. **Internal Medicine**, Tokyo, v. 40, p. 118-123, 2001.

NAM, I.Y., JOH, K. Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, p. 297-304, 2007.

NAMDARI, H.; CABELLI, V.J. The suicide phenomenon in motile aeromonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 543-547, 1989.

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

NERLAND, A.H. The nucleotide sequence of the gene encoding GCAT from *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 19, p. 145-150, 1996.

NEVES, M.S.; NUNES, M.P.; MILHOMEM, A.M. *Aeromonas* Species Exhibit Aggregative Adherence to HEp-2 Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 1130-1131, 1994.

NOJIMOTO, I.T.I. et al. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarreicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 30, p. 385-388, 1997.

ORMEN, O. et al. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 113, p. 203-207, 2005.

OTTERMAN, K.M., MILLER, J.F. Roles for motility in bacterial-host interactions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 24, p. 1109-1117, 1997.

PARK, T.S. et al. Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 349-353, 2003.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, p. 11-18, 2005.

PEMBERTON, J.M. et al. R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, p. 1-10, 1997.

PHAVICHITR, N.; CATTO-SMITH, A. Acute gastroenteritis in children: what role for antibacterials? **Pediatric Drugs**, Auckland, v. 5, p. 279-290, 2003.

PIDIYAR, V.A. et al. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1723-1728, 2002.

POPOFF, M. Genus III, *Aeromonas*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 545-548.

RAMOS, H.C., RUMBO, M., SIRARD, J.C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, p. 500-517, 2004.

ROUX, M. et al. Septic arthritis caused by *Aeromonas hydrophila*. **Presse Medicale**, Paris, v. 29, p. 839, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAN JOAQUIN, V.H.; PICKETT, D.A. *Aeromonas*-associated gastroenteritis in children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 7, p. 53-57, 1988.

SCALETISKY, I.C.A. et al. A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETISKY, I.C.A. et al. Adherence Factors in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Expressing the Localized Adherence-Like Pattern in HEp-2 Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, p. 302-306, 2010.

SCHIAVANO, G.F., et al. Virulence factors in *Aeromonas* spp and their association with gastrointestinal disease. **New Microbiologica**, Pavia, v. 21, p.23-30, 1998.

SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, p. 1103-1112, 1999.

SEN, K., RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 97, p. 1077-1086, 2004.

SINHA, S.; et al. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 53, p. 527-534, 2004.

SNIJDER, H.J.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1488, p. 91-101, 2000.

SOLER, L., et al. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 243-247, 2002.

SOLER, L. et al. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 5732-5734, 2003.

STEWART, F.J.; CAVANAUGH, C.M. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 65, p. 44-67, 2007.

TACÃO, M. et al. BOX-PCR is an Adequate Tool for Typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 88, p. 173-179, 2005.

THORTON, J. et al. Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin-cholesterol acyltransferase and other lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 959, p. 153-159, 1998.

TORRE, I. et al. Intestinal colonization by *Aeromonas* spp. in neonatal intensive care units. **Igiene Moderna**, Genova, v. 106, p. 147-155, 1996.

VERNER-JEFFREYS, D.W. et al. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, p.1-9 e8388, 2009.

XU, X.J. et al. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: Development of transposon and isogenic mutants. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 3501-3509, 1998.

YE, Y.; XU, X.H.; LI, J.B. Emergence of CTX-M-3, TEM-1 and a new plasmid-mediated MOX-4 AmpC in a multiresistant *Aeromonas caviae* isolate from a patient with pneumonia. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.59, p. 843-847, 2010.

YU, C.P. et al. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and aerolysin gene-containing *Aeromonas* in source, intermediate, and finished drinking water. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 42, p. 1191-1200, 2008.

ZONG, Z. et al. *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. **Reviews in Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 13, p. 151-162, 2002.

