

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO GÊNERO *Aeromonas*,
POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES, EM DIVERSAS
ETAPAS DO ABATE BOVINO.**

Thaís Miotto Martineli
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Estudo epidemiológico do gênero *Aeromonas*, por meio
de técnicas moleculares, em diversas etapas do abate
bovino.**

Thaís Mioto Martineli

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

M385e **Martineli, Thaís Mito**
Estudo epidemiológico do gênero *Aeromonas*, por meio de técnicas moleculares, em diversas etapas do abate bovino / Thaís Mito Martineli. -- Jaboticabal, 2010
x, 79 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Oswaldo Durival Rossi Junior

Banca examinadora: Naiá Carla Marchi de Rezende Lago, José Paes de Almeida Nogueira Pinto, Luiz Augusto do Amaral, Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho

Bibliografia

1. *Aeromonas* sp. 2. Epidemiologia molecular. 3. Abate bovino.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.31:636.2

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO GÊNERO *Aeromonas*, POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES, EM DIVERSAS ETAPAS DO ABATE BOVINO.

AUTORA: THAÍS MIOTO MARTINELI

ORIENTADOR: Dr. OSWALDO DURIVAL ROSSI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Dr. OSWALDO DURIVAL ROSSI JUNIOR


Dra. NAIA CARLA MARCHI DE REZENDE LAGO


Dr. JOSÉ PAES DE ALMEIDA NOGUEIRA PINTO


Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL


Dra. ANGELA CLEUSA DE FÁTIMA BANZATTO DE CARVALHO

Data da realização: 09 de fevereiro de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. OSWALDO DURIVAL ROSSI JUNIOR

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THAÍS MIOTO MARTINELI - nascida em Birigüi, São Paulo, em 27 de junho de 1978. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, em fevereiro de 1997. Em março de 1999, através de processo seletivo, realizou transferência para a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, onde se graduou Médica Veterinária em dezembro de 2003. Durante a graduação realizou trabalho de iniciação científica como bolsista do CNPq e participou da execução de outros projetos nas áreas de Enfermidades Parasitárias e Obstetrícia Veterinária. Em agosto de 2004 ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva desta Universidade como bolsista da CAPES. Concluiu o curso de Mestrado em fevereiro de 2006 com a dissertação intitulada “Avaliação microbiológica da superfície muscular de carcaças ovinas, após as operações de abate”. No mesmo ano iniciou o curso de Doutorado pela mesma Universidade como bolsista do CNPq.

OFEREÇO ESTE TRABALHO

Aos meus pais Florival e Luiza Terezinha,
pelo amor, dedicação, apoio, conselhos
proferidos e os ensinamentos de toda a
vida,

À minha irmã Paula, pela palavra amiga e
apoio,

Ao meu noivo Sérgio, pela amizade e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Oswaldo D. Rossi Júnior por ter sido meu orientador e a quem tenho respeito. Agradeço pela orientação, ensinamentos e por toda a confiança em mim depositada;

Aos Professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelos ensinamentos e amizade;

Ao Professor Wanderley Dias da Silveira da Universidade Estadual de Campinas pelas orientações durante a execução do projeto;

À indústria onde foram colhidas as amostras, pois sem a permissão da mesma este estudo não teria sido realizado;

Aos funcionários do frigorífico pela participação e dedicação demonstradas;

Aos amigos de pós-graduação: Marita, Viviane, Natacha, Natália, Fernanda, Bruna, Poliana, Luciano, Bel, Roberta, Rachel, Adriana, Max, Fábio, Estevam, Sandrinha e Viviane Vieira;

À Martinha por toda atenção dispensada durante a elaboração inicial do projeto;

Aos colegas aqui não citados e também aos que já foram em busca dos seus ideais;

À Líliliana Biondi Naka e Waldemar Dibeli Júnior pela assistência técnica durante a realização dos experimentos e a amizade;

À Eliane Cristina da Cunha Alves do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária e João Carlos Campanharo do Departamento de Tecnologia pelas orientações relativas à biologia molecular;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal;

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio financeiro;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Assunto	Página
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Classificação e características microbiológicas das <i>Aeromonas</i> sp.....	3
2.2 Patogenia e fatores de virulência	4
2.3 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em produtos de origem animal	6
2.4 Resistência a antimicrobianos	9
2.5 Estudo epidemiológico das <i>Aeromonas</i> sp.	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Caracterização da indústria e das amostras estudadas	11
3.2 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras	14
3.3 Metodologia empregada no isolamento de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	16
3.3.1 Preparo das amostras e enriquecimento seletivo	16
3.3.2 Plaqueamento seletivo	17
3.3.3 Isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero <i>Aeromonas</i>	17
3.3.4 Caracterização das espécies	19
3.4 Semeadura direta em meio seletivo e contagem do gênero <i>Aeromonas</i>	19
3.5 Testes de sensibilidade a antimicrobianos	20

3.6 Caracterização molecular dos isolados	21
3.6.1 Isolamento bacteriano e extração do DNA	21
3.6.2 Reação de amplificação (REP e ERIC-PCR)	22
3.6.3 Análise eletroforética em gel de agarose dos fragmentos amplificados	23
3.6.4 Análise filogenética	23
3.7 Análise Estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS	66

Lista de Tabelas

Assunto	Página
Tabela 1 População de <i>Aeromonas</i> sp. em amostras colhidas em matadouro frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007, conforme o local de colheita e o número da amostra	25
Tabela 2 Número de cultivos de <i>Aeromonas</i> sp. obtidos após o enriquecimento seletivo em relação ao local de colheita das amostras obtidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.....	27
Tabela 3 Número e porcentagem de amostras resistentes e susceptíveis aos antimicrobianos testados, identificadas em cada cultivo selecionado das amostras colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007	31
Tabela 4 Perfil de resistência a antimicrobianos das <i>Aeromonas</i> sp. isoladas de amostras colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.....	33
Tabela 5 Distribuição dos isolados de <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>Aeromonas trota</i> e <i>Aeromonas schubertii</i> de diferentes pontos do fluxograma de abate bovino, segundo seu comportamento frente à ação de antimicrobianos	34

Tabela 6 Espécies de <i>Aeromonas</i> sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de superfície da pele úmida das regiões dianteira e traseira, superfície muscular das regiões dianteira e traseira durante a fase de toalete e superfície muscular das regiões dianteira e traseira da carcaça resfriada colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.....	36
Tabela 7 Espécies de <i>Aeromonas</i> sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007	37
Tabela 8 Espécies de <i>Aeromonas</i> sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de carne das carcaças resfriadas e conteúdo intestinal colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007	38
Tabela 9 Espécies de <i>Aeromonas</i> sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento, água sem tratamento, água residuária da lavagem das carcaças e ambiente da sala de matança colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.....	39

Tabela 10 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 1 a 6 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I	43
Tabela 11 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 1 a 6 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2	44
Tabela 12 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 7 a 9 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I	48
Tabela 13 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 7 a 9 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2	49
Tabela 14 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 10 a 12 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I	54

Tabela 15 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 10 a 12 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2	55
Tabela 16 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 13 a 15 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I	59
Tabela 17 Matriz de similaridade genética entre os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. das amostras de número 13 a 15 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2	60

Lista de Figuras

Assunto	Página
Figura 1 Esquema representativo do fluxograma de abate bovino, com apresentação dos locais de colheita de amostras na sala de matança.	14
Figura 2 Amplificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. pelo conjunto de primers REP 1R-I/REP 2-I	42
Figura 3 Amplificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. pelo conjunto de primers ERIC 1R/ERIC 2	42
Figura 4 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. de número 1 a 6, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes..	46
Figura 5 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de <i>Aeromonas</i> sp. de número 1 a 6, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes..	47
Figura 6 Amplificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. pelo conjunto de primers REP 1R-I/REP 2-I, mostrando 100% de similaridade entre os isolados Dd7e e Ed9c.....	50

- Figura 7 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 7 a 9, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.. 52
- Figura 8 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 7 a 9, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.. 53
- Figura 9 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 10 a 12, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.. 57
- Figura 10 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 10 a 12, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.. 58
- Figura 11 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 13 a 15, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.. 62
- Figura 12 Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 13 a 15, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.. 63

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO GÊNERO *Aeromonas*, POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES, EM DIVERSAS ETAPAS DO ABATE BOVINO

RESUMO - O gênero *Aeromonas* compreende espécies consideradas importantes patógenos para os seres humanos sendo as gastroenterites as infecções mais comumente atribuídas a estas bactérias. Tendo em vista sua importância como patógeno de origem alimentar, a ocorrência de *Aeromonas* sp. foi estudada em carcaças bovinas e ambiente do abatedouro em uma indústria do estado de São Paulo. Foram colhidas 285 amostras de 19 locais. Foi realizada a contagem direta por semeadura em meio seletivo, pesquisa e caracterização de espécies após enriquecimento seletivo, teste de susceptibilidade a antimicrobianos e caracterização molecular dos isolados pelas técnicas de REP e ERIC-PCR. A contagem direta permitiu a quantificação destas bactérias em apenas 12 amostras, variando de 0,5 a $9,2 \times 10^0$ UFC/cm², sendo cinco delas de ambiente, com populações que variaram de $1,0 \times 10^0$ a $3,0 \times 10^0$ UFC/placa. Entretanto, após o enriquecimento seletivo, aeromonas foram isoladas de 38 amostras. A caracterização bioquímica das espécies permitiu verificar a ocorrência de *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. trota* e *A. sobria*. Os testes com antimicrobianos revelaram resistência de todas as cepas a ampicilina e cefalotina, e para os demais antimicrobianos esta foi variável. A resistência da totalidade dos cultivos a determinados princípios indica que os antimicrobianos devem ser utilizados criteriosamente com a finalidade de evitar o surgimento precoce de cepas de *Aeromonas* sp. resistentes. As técnicas moleculares não possibilitaram a identificação precisa da origem das bactérias na indústria, mas possibilitaram identificar os manipuladores como disseminadores das mesmas. Ainda, a maior prevalência de *A. caviae* deve ser considerada relevante, pois trata-se de uma das espécies causadoras de gastroenterite em humanos.

Palavras-chave: *Aeromonas* sp., epidemiologia molecular, abate bovino.

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF THE GENUS *Aeromonas* BY USING MOLECULAR TECHNIQUES DURING BOVINE SLAUGHTER PROCESSES

ABSTRACT - The genus *Aeromonas* comprises important human pathogens and the gastroenteritis are the most common infections attributed to these microorganisms. Considering their importance as foodborne pathogens, the occurrence of *Aeromonas* sp. was studied on bovine carcasses and environment in an industry in São Paulo State. From 19 location were collected 285 samples. It was done the direct count by seeding on selective medium and biochemical characterization of the species after selective enrichment, antimicrobial susceptibility test and molecular characterization of the isolates by REP and ERIC-PCR. The direct count permitted bacteria quantification only in 12 samples ranging from 0.5 to 9.2×10^0 CFU/cm² and five of them were from environment, ranging from $1,0 \times 10^0$ a $3,0 \times 10^0$ CFU/plate. However after selective enrichment, aeromonas were isolated from 38 samples. Biochemical characterization permitted to verify the occurrence of 59 samples of *A. caviae*, one of *A. schubertii*, one of *A. trota* and one of *A. sobria*. Antimicrobial test revealed all isolates were resistant to ampicillin and cephalotin, while the results for the other antimicrobials were variable. Resistance of all isolates to some principles indicates that antimicrobials must be used critically to avoid early development of resistant *Aeromonas* sp. Molecular techniques did not identify precisely the origin of the contamination into the industry, but identified handlers as agent of spreading the bacteria. Also, the greatest prevalence of *A. caviae* must be considered relevant because it is one of the human gastrenteritis causative species.

Keywords: *Aeromonas* sp., molecular epidemiology, bovine slaughter.

1 INTRODUÇÃO

Os resultados da produção animal e o subsequente processamento da carne crua e seus produtos é um processo que, consistentemente produzirá derivados cárneos mais seguros sob o ponto de vista microbiológico, para o consumo público, contanto que os mesmos sejam produzidos e manipulados adequadamente antes de serem consumidos. No entanto, a história mostra que patógenos bacterianos têm apresentado a capacidade de sobreviver aos melhores esforços realizados pelas indústrias e consumidores para eliminá-los.

O aumento em número e severidade de casos relacionados às doenças de origem alimentar ao redor do mundo tem contribuído com o aumento da preocupação com a segurança do consumo da carne e seus derivados. A carne é um alimento altamente perecível que, se não for obtido, processado, embalado, armazenado e distribuído adequadamente pode deteriorar rapidamente pela ação microbiana e tornar-se um risco à saúde humana, além de atuar como um veículo na transmissão de patógenos.

Dentre os microrganismos responsáveis pela deterioração da carne incluem-se as bactérias do gênero *Aeromonas* que também são consideradas importantes microrganismos patogênicos para animais homeotermos e pecilotermos. Trabalhos recentes têm enfatizado seu surgimento como patógenos primários relacionados a uma grande variedade de infecções locais e sistêmicas, mesmo em indivíduos imunologicamente competentes.

Aeromonas sp. podem ser encontradas no solo, água doce e salgada, água clorada e fezes de animais. Conseqüentemente, existe a possibilidade dessas bactérias adentrarem o ambiente industrial e contaminarem os equipamentos e a carne.

Alguns trabalhos já demonstraram a presença de *Aeromonas* sp. em carne e produtos cárneos, mas com dificuldades em estabelecer a sua real origem ou fonte de contaminação dentre as diferentes fases do abate. Dúvidas, estas, que podem ser dirimidas com a utilização de estudos envolvendo epidemiologia molecular.

Tendo em vista o apresentado e:

- A importância da carne bovina e seus produtos na alimentação da população;
- O pequeno número de trabalhos científicos referentes ao gênero *Aeromonas* no Brasil, principalmente em relação à sua detecção e caracterização na indústria da carne bovina;
- A importância em se descobrir, de forma segura, a(s) fonte(s) de origem das bactérias do gênero *Aeromonas* para o ambiente industrial, no sentido de serem adotadas medidas profiláticas em relação a essas fontes de contaminação;

Idealizou-se o presente estudo, tendo por objetivos:

- Determinar, durante o processo de abate bovino, em estabelecimento exportador, as possíveis fontes de contaminação da carne por bactérias do gênero *Aeromonas* e as possíveis formas de disseminação destes microrganismos;
- Verificar, através de semeadura direta e contagem, a população de bactérias do gênero *Aeromonas* nas amostras estudadas e consequente potencial de risco que a carne possa apresentar;
- Realizar estudos para definir a possível origem comum das espécies isoladas nos ambientes do frigorífico pela utilização de técnicas de biologia molecular (REP e ERIC-PCR);
- Verificar o comportamento dos isolados frente à ação de antimicrobianos de uso comum;
- Fornecer subsídios às autoridades de saúde pública quanto às principais vias de transmissão das *Aeromonas* sp. no ambiente industrial, no sentido de serem adotadas medidas de caráter preventivo à sua presença na carne bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação e características microbiológicas das *Aeromonas* sp.

Bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão associadas aos ambientes aquáticos e são reconhecidas como patogênicas para peixes desde 1894 (KIRKAN et al., 2003). As aeromonas consistem em microrganismos oxidase e catalase positivos, anaeróbios facultativos, geralmente móveis devido à presença de flagelo polar, Gram negativas, fermentadoras de glicose. Apesar da maioria dos isolados de alimentos serem mesófilos, muitas podem se multiplicar sob temperatura de refrigeração (KIROV, 1997).

O gênero *Aeromonas* foi inicialmente incluído na família *Vibrionaceae* a qual também pertencem os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. Subsequentes investigações filogenéticas indicaram que as aeromonas não estão estreitamente relacionadas aos vibrios, mas ao contrário, formam uma unidade no subgrupo γ -3 da classe *Proteobacteria* (ABBOTT et al., 2003). Oficialmente, as aeromonas estão classificadas dentro da família *Aeromonadaceae* (JOSEPH & CARNAHAN, 2000).

A taxonomia do gênero *Aeromonas* tem sido alterada durante as últimas décadas. Inicialmente, a diferenciação era limitada às aeromonas psicrófilas não móveis e mesófilas móveis (JANDA & ABBOTT, 1998). Posteriormente, a nomenclatura foi desenvolvida para incluir distinções entre as espécies mesófilas *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e a espécie psicrófila *A. salmonicida*.

Numerosas metodologias têm sido desenvolvidas para uma rápida e acurada identificação das espécies de aeromonas. Os primeiros estudos com grupos de hibridização foram realizados por POPOFF et al. (1981) e, desde então, 17 grupos de hibridização (HG) foram descritos no gênero *Aeromonas*. Atualmente, a lista de espécies inclui: *A. hydrophila* (HG 1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3), *A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5), *A. eucrenophila* (HG6), *A. sobria* (HG7), *A. veronii* (HG8/10), *A. jandaei* (HG9), *Aeromonas* sp. (sem nomeação HG11 e HG13), *A.*

schubertii (HG12), *A. trota* (HG14), *A. allosaccharophila* (HG15), *A. encheleia* (HG16), *A. popoffii* (HG17) (TACÃO et al., 2005). Também foram descritas *A. culicola* (PIDIYAR et al., 2002), *A. simiae* (HARF-MONTEIL et al., 2004) e *A. molluscorum* (MIÑANA-GALBIS et al., 2004). Entretanto, a classificação para algumas espécies como *A. ichthiosmia* e *A. enteropelogenes* é controversa, sendo consideradas sinônimos de *A. veronii* e *A. trota*, respectivamente, pois são idênticas pelo sequenciamento gênico 16S rRNA (COLLINS et al., 1993).

2.2 Patogenia e fatores de virulência

O gênero *Aeromonas* compreende espécies consideradas importantes patógenos para os seres humanos causando septicemias primárias e secundárias em pessoas imunocomprometidas, sérias feridas em indivíduos saudáveis e um número de enfermidades pouco relatadas tais como peritonite, meningite e infecções nos olhos, articulações e ossos (ABBOTT et al., 2003). A principal ação patogênica das aeromonas corresponde às gastroenterites, podendo ocorrer diarreia nas seguintes formas: secretória (aquosa, geralmente com vômito), disentérica, crônica (persistente por mais de 10 dias), colérica e dos viajantes com diferentes características (JANDA & DUFFEY, 1988). A população mais frequentemente afetada por gastroenterite causada por aeromonas inclui crianças com idade inferior a dois anos, idosos e pessoas imunossuprimidas por medicamentos ou doenças (KIROV et al. 1993; KIROV, 1997).

Segundo KINGOMBE et al. (1999), estudos indicam que *Aeromonas* sp. podem atuar tanto como patógenos infecciosos como enterotoxigênicos. As três aeromonas mesofílicas consideradas mais importantes e causadoras de várias enfermidades em humanos são *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* e *A. caviae* que correspondem a 85% de todos os isolados clínicos envolvidos em infecções gastrointestinais e extraintestinais (JANDA, 1991; GAVÍN et al., 2002). Em 1984, a Food and Drug Administration, nos Estados Unidos, classificou *A. hydrophila* como patógeno de origem alimentar (TSAI & CHEN, 1996).

CHALLAPALLI et al. (1988), em um estudo prospectivo de 27 meses conduzido em Chicago, nos Estados Unidos, definiram *Aeromonas* sp. como os únicos enteropatógenos potenciais isolados de crianças (entre um e 27 meses de idade) com diarreia durante sua pesquisa.

Em Tóquio, entre 1985 e 1995, em uma investigação elaborada para pesquisar as causas da diarreia dos viajantes, *Aeromonas* sp. (*A. veronii* biovar *sobria* e *A. hydrophila*) foram isoladas de 5,5% dos viajantes que retornavam de países em desenvolvimento (YAMADA et al., 1997). Um trabalho semelhante realizado com turistas finlandeses provenientes de Marrocos isolou *Aeromonas* sp. em 8,7% daqueles que apresentaram diarreia e 1,4% daqueles que não apresentaram diarreia; espécies de aeromonas foram encontradas como único patógeno em 5,5% destes pacientes (HANNINEN et al., 1995).

A patogenicidade das aeromonas mesofílicas tem sido atribuída a um número de determinantes, incluindo toxinas, proteases, proteínas de membrana externa, lipopolissacarídeo, motilidade e presença de flagelo (THORNLEY et al., 1997) entre outros fatores (ISONHOOD & DRAKE, 2002).

Duas categorias de enterotoxinas (citotônica e citolítica) têm sido detectadas em filtrados de *Aeromonas*. A enterotoxina citotônica, como a toxina da cólera, não causa degeneração das criptas e vilos das células intestinais, enquanto que a enterotoxina citolítica promove um extenso dano ao epitélio. A enterotoxina citotóxica também tem sido referida, por outros pesquisadores, como β -hemolisina e/ou aerolisina. As moléculas dessas toxinas têm atividades hemolítica, citotóxica e enterotóxica (CHOPRA & HOUSTON, 1999).

No Brasil, em um estudo com a finalidade de isolar espécies de aeromonas produtoras de toxinas, foram analisadas 194 amostras (99 de alimentos: carne, leite e vegetais; 95 de fontes clínicas: 35 de fezes de casos de diarreia, 56 de feridas e quatro de septicemia). Das amostras clínicas, as porcentagens de cepas enterotoxigênicas, hemolíticas e citotoxigênicas encontradas foram, respectivamente, de 29,4%, 43,1% e 89,0%. Dentre as amostras de alimentos, 18,2% eram enterotoxigênicas, 17,1% eram hemolíticas e 72,7% eram citotoxigênicas, sendo que *A. sobria* e *A. veronii* produziram

mais enterotoxinas e citotoxinas do que as demais espécies isoladas (MARTINS et al., 2002).

Com o objetivo de verificar a capacidade enterotoxigênica de isolados de *Aeromonas* sp. de diferentes produtos e locais no fluxograma de abate bovino, ROSSI JÚNIOR et al. (2001) testaram 102 isolados (18 da espécie *A. hydrophila*, 65 da espécie *A. caviae* e 19 atípicas) ante os testes de inoculação intragástrica em camundongo lactente e em alça intestinal ligada de coelho. Revelaram-se como produtores de enterotoxinas três (16,7%) isolados de *A. hydrophila*, originárias das mãos do manipulador antes que ele iniciasse seus trabalhos e da carne desossada pronta para o consumo, e um (1,5%) da espécie *A. caviae*, também isolada das mãos dos manipuladores.

As aeromonas também produzem uma grande variedade de proteases que causam danos aos tecidos e favorecem o estabelecimento da infecção por sobrepujar as defesas do hospedeiro. Pelo menos três tipos de proteases foram identificadas, inclusive algumas estáveis ao calor. Também podem produzir um glicerofosfolípido que atua como uma lipase ou fosfolipase e poderia causar lise de eritrócito por digestão de sua membrana plasmática (PEMBERTON et al., 1997).

Ainda, as aeromonas são capazes de produzir várias lecitinas e adesinas que permitem à bactéria aderência a glicoconjugados específicos nas superfícies epiteliais, nos eritrócitos ou na mucina da mucosa gástrica (CHOPRA & HOUSTON, 1999).

Em relação aos flagelos, cepas de aeromonas mesofílicas expressam um único flagelo polar em todas as condições de cultura e produzem flagelos laterais em meios de cultura sólidos. Tais células hiperflageladas têm demonstrado alta capacidade de aderência devido à presença destes flagelos laterais que também atribuem às aeromonas a capacidade de formar biofilmes (GAVÍN et al., 2002).

2.3 Ocorrência de *Aeromonas* sp. em produtos de origem animal

A água é uma fonte de contaminação potencial e um veículo de disseminação de aeromonas. As feridas ocasionadas por estas bactérias ocorrem devido ao contato

direto da pele lesionada com a água, enquanto que, as doenças entéricas resultam da ingestão de água tratada inadequadamente ou alimentos contaminados, particularmente vegetais e carne crua e/ou mal cozida (BAUAB et al., 2003).

SEN & ROGERS (2004), nos Estados Unidos, pesquisaram a presença de genes associados a fatores de virulência em aeromonas isoladas de água de abastecimento público tratada e os resultados mostraram que estas cepas apresentaram uma grande variedade destes genes. Segundo estes autores, apesar da maioria das estratégias de tratamento de água reduzir o número de aeromonas a baixos níveis, a capacidade das mesmas sobreviverem e se multiplicarem em água potável tem sido demonstrada em vários estudos. Ainda, a formação de biofilmes favorece a sobrevivência e multiplicação das aeromonas nos sistemas de abastecimento de água.

ROSSI JÚNIOR et al. (2000a), no Brasil, pesquisaram aeromonas na água (abastecimento/residuária) de abatedouro bovino. As bactérias do gênero *Aeromonas* foram isoladas em 10 (33,3%) amostras da água dos currais e em 10 (33,3%) amostras da água residuária da lavagem de carcaças. As espécies isoladas foram *A. hydrophila* em duas (2,2%) e *A. caviae* em 19 (21,1%) amostras. Os resultados evidenciaram que a água dos currais pode ser uma importante fonte de contaminação para a pele e, através dela, as aeromonas podem chegar à sala de matança.

ROSSI JÚNIOR et al. (2000b) também realizaram a pesquisa de aeromonas nas mãos de 60 manipuladores de carne bovina que trabalhavam na fase de toailete das carcaças. Os resultados obtidos evidenciaram que duas (6,7%) e sete (23,3%) amostras apresentaram-se contaminadas pelos referidos microrganismos, antes e durante a realização da jornada de trabalho, respectivamente. Foram isoladas as espécies *A. hydrophila* e *A. caviae*, nos dois tipos de amostras, sendo que um isolado de *A. hydrophila* e um de *A. sobria* se revelaram como produtores de enterotoxinas frente à prova da inoculação em alça intestinal ligada de coelho.

GRAY & STICKLER (1989) estudaram a presença de aeromonas nas fezes de suínos e bovinos durante o período de doze meses. Aeromonas foram encontradas em 8,8% das 520 amostras de suínos e 4,6% das 481 amostras de bovinos. *A. hydrophila* (62% dos isolados) foi a espécie predominante em bovinos, seguida por *A. caviae*

(32%) e *A. sobria* (15%). Em suínos, *A. caviae* (59%) foi a mais comum, seguida por *A. hydrophila* (41%). Os autores concluíram, ainda, que os bovinos adquiriram aeromonas pela ingestão de água contendo estes microrganismos.

Aeromonas sp. já foram isoladas de diversos produtos alimentícios como peixes e frutos do mar, vegetais, carnes e leite crus entre outros (MERINO et al., 1995), sendo de grande importância naqueles armazenados sob refrigeração, pois podem se multiplicar sob estas temperaturas (KIROV, 1997). No entanto, GILL & REICHEL (1989) demonstraram que *A. hydrophila* pode se multiplicar nos alimentos em temperaturas mais baixas (-2°C). *A. hydrophila* tem apresentado capacidade de se multiplicar em uma grande variedade de produtos embalados a vácuo e armazenados entre -2 e 10°C, tais como a carne bovina (GILL & REICHEL, 1989), carne assada (HUDSON et al., 1994), carne suína (LAACK et al., 1993) e carne ovina (DOHERTY et al., 1996). Segundo KIROV & BRODRIBB (1993), cepas de *Aeromonas* sp. podem produzir toxinas nos alimentos armazenados sob baixas temperaturas (7°C).

YADAV & KUMAR (2000) isolaram aeromonas de leite pasteurizado, sorvete e peixe, encontrando *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, sendo que dos 45 isolados, 26 apresentaram produção de toxina no teste de alça intestinal ligada de coelho.

MAJEED & Mac RAE (1991) comprovaram a produção de enterotoxina e hemolisina por cepas de *A. hydrophila* e *A. sobria* em extrato de carne sob baixas temperaturas. Estas toxinas foram detectadas após cinco dias de incubação a 12°C e após 8 dias a 5°C. Estes resultados são considerados importantes para a saúde pública, pois a refrigeração dos alimentos não pode prevenir a produção destes fatores de virulência pelas aeromonas.

Em um trabalho realizado com 520 amostras de alimentos provenientes do comércio, WALKER & BROOKS (1993) isolaram *Aeromonas* sp. de 57% de amostras de carne "in natura", 50% de produtos crus derivados de peixe e 14,4% de produtos a base de peixes prontos para consumo e frutos do mar. As espécies mais isoladas foram *A. hydrophila* (55%), enquanto que, *A. sobria* e *A. caviae* representaram 30 e 11%, respectivamente.

Pesquisando a ocorrência de *Aeromonas* sp. em 238 filés de peixe enlatados, nos Estados Unidos, WANG & SILVA (1999) encontraram 36,1% positivos para *A. hydrophila*, 35,7% para *A. sobria* e 10% para *A. caviae*, sendo que 86% das aeromonas isoladas apresentaram atividade hemolítica em placas de ágar sangue de carneiro a 5%.

KHURANA & KUMAR (1997) avaliaram a prevalência de aeromonas móveis em amostras de alimentos de origem ovina e avícola. Foram obtidos 125 isolados de aeromonas em 507 amostras, sendo a distribuição destes microrganismos em 37,5% da carne ovina, 32,6% em órgãos comestíveis de aves, 28,0% em carne de aves, 24,2% em órgãos comestíveis de ovinos e 0,9% em ovos. Os isolados foram identificados como *A. hydrophila* (77), *A. caviae* (43) e *A. sobria* (5).

SINGH (1997), no Canadá, pesquisou a ocorrência de *Aeromonas* sp. em amostras de carne moída durante o período de um ano. Aeromonas foram encontradas em 100% das amostras de carne suína e em 79% amostras de carne bovina moída. Em carne suína e bovina, respectivamente, 19% e 87% dos isolados foram de *A. hydrophila*.

2.4 Resistência a antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos de aeromonas provenientes de casos clínicos tem sido extensivamente estudada. No entanto, o conhecimento sobre as bactérias de origem ambiental (GOÑI-URRIZA et al., 2000) e de origem dos alimentos é pequeno.

KO et al. (1996), em Taiwan, avaliando a resistência das aeromonas isoladas de 234 amostras clínicas, constataram que mais de 90% das bactérias apresentaram susceptibilidade ao moxalactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, amicacina e fluoroquinolona, mas apresentaram resistência à tetraciclina, trimetropim associado à sulfametoxazole, algumas cefalosporinas de largo espectro e aminoglicosídeos.

Em filés de peixe enlatados, WANG & SILVA (1999), nos Estados Unidos, avaliaram a resposta das aeromonas frente aos antimicrobianos durante o período de oito meses entre 1994 e 1995. A maioria dos isolados de *A. hydrophila* e *A. sobria* isoladas eram resistentes à bacitracina e ampicilina, mas sensíveis ao cloranfenicol, neomicina, estreptomicina e associação trimetropim-sulfametoxazole.

A atividade de 19 antibióticos e quatro anti-sépticos e/ou desinfetantes foi estudada contra 138 amostras de *Aeromonas* sp. (104 *A. caviae*, 22 *A. sobria* e 12 *A. hydrophila*) isoladas de dois rios europeus. A frequência de resistência aos antibióticos foi: ácido nalidíxico, 59%; tetraciclina, 14%; fosfomicina, 8%; tobramicina e cotrimoxazole, 7%; cefotaxime, 4%; cloranfenicol, 2% e gentamicina, 1%, sendo que a maioria dos isolados resistentes ao ácido nalidíxico apresentaram-se susceptíveis às fluoroquinolonas (54 a 98%) (GOÑI-URRIZA et al., 2000).

No Brasil, PALÚ et al. (2006) avaliaram a resistência de 83 isolados de *Aeromonas* sp. de origem humana (28) e de alface fresca (55). Trinta e cinco foram identificadas como pertencentes ao grupo da *A. hydrophila* e, 48, da *A. caviae*. A resistência aos agentes antimicrobianos foi observada em isolados tanto de origem clínica quanto de alimento, sendo que as amostras de origem alimentar apresentaram resistência à ampicilina/sulbactam, cefxitina, sulfametoxazole/trimetropim, cloranfenicol e tetraciclina.

2.5 Estudo epidemiológico das *Aeromonas* sp.

Técnicas moleculares para tipificação de microrganismos são ferramentas eficientes que podem ser utilizadas para determinar a relação genotípica entre os isolados de diferentes pacientes ou meio ambiente. Estudos epidemiológicos de isolados bacterianos têm recebido popularidade nas últimas décadas (TENOVER et al., 1997; KANG & DUNNE, 2003; LUKINMAA et al., 2004).

Algumas das técnicas utilizadas incluem REA (Restriction Endonuclease Analysis), RFLP (Restriction Fragment-length Polymorphism), PFGE (Pulsed-field Eletroforesis), PCR (Polymerase Chain Reaction) (TENOVER et al., 1997). Dentre as técnicas

incluídas nesta última categoria, REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-PCR têm sido utilizadas com o intuito de estabelecer a relação genética entre isolados de vários gêneros de bactérias (WOODS et al., 1992; REBOLI et al., 1994; HARVEY et al., 2004).

DAVIN-REGLI et al. (1998), na França, utilizaram as técnicas de RAPD e ERIC no estudo de um surto por *A. hydrophila* envolvendo sete pacientes (dois casos de ferida e cinco de bacteremia). Os pesquisadores analisaram amostras clínicas e ambientais e, embora não tivessem determinado a origem dos isolados de *A. hydrophila*, concluíram a eficácia das técnicas.

Em uma coleção de 120 isolados de aeromonas provenientes de fezes de pacientes com gastroenterite e de ambiente foram analisadas por SZCZUKA & KAZNOWSKI (2004) através de RAPD, ERIC e REP-PCR e também comprovaram a eficácia destas técnicas para uma investigação epidemiológica. Mais recentemente, TACÃO et al. (2005) também comprovaram a utilização de REP e ERIC-PCR para tal finalidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da indústria e das amostras estudadas

A indústria onde o trabalho foi desenvolvido situa-se no interior do Estado de São Paulo, sendo caracterizada, por suas dependências e instalações, como um matadouro-frigorífico, segundo estabelece o artigo 21, parágrafo primeiro, do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) - Ministério da Agricultura, Brasil (BRASIL, 1997). Desta forma, é submetida a um controle higiênico-sanitário permanente, pelo do Serviço de Inspeção Federal (SIF), possuindo instalações para o abate, preparo e conservação da carne bovina. Seu volume de abate aproximado é

de 500 animais por dia e seus produtos são destinados ao comércio nacional e internacional.

Foram estudados pontos do fluxograma de abate bovino, que poderiam atuar como veículo de transmissão das aeromonas à carne ou pontos de disseminação do microrganismo na indústria, particularmente no processo de abate, conforme descrito a seguir e esquema apresentado na Figura 1.

- Água sem tratamento - Água obtida antes da mesma ser tratada para utilização na indústria;
- Água tratada - Água clorada colhida na sala de matança;
- Superfície da pele do animal ainda seca - Amostras representativas deste ponto de colheita foram obtidas da região lombar do animal, no momento de sua chegada à indústria;
- Superfície da pele das partes dianteira e traseira do animal, após a lavagem do animal por aspersão - Amostras destes pontos foram obtidas após a insensibilização do animal antes do mesmo ser içado na área de vômito;
- Superfície muscular das partes dianteira e traseira da carcaça durante a toailete - Amostras destes pontos foram obtidas durante a fase de toailete das meias carcaças, nas regiões laterais da paleta para a colheita do dianteiro, e do coxão para a do traseiro (BRASIL, 1988);
- Superfície muscular das partes dianteira e traseira da carcaça resfriada - Amostras destes pontos foram obtidas após 24 horas de permanência na câmara de resfriamento, nas regiões laterais da paleta para a colheita do dianteiro, e do coxão para a do traseiro (BRASIL, 1988);
- Água residuária da lavagem das carcaças - Água que escorre ao longo das faces interna e externa das meias carcaças, após sua lavagem na parte final do fluxograma de abate. A lavagem das carcaças é realizada com água a uma pressão aproximada de 3 atm, e 37°C de temperatura, com o objetivo de remover sangue e outros tipos de matéria orgânica que ficam aderidos tanto na face externa quanto interna das meias carcaças;

- Carne das carcaças resfriadas - Estas amostras foram compostas por fragmentos de carne colhidos durante o resfriamento das carcaças;
- Superfície das mãos dos manipuladores - Estas amostras foram colhidas no momento da chegada do funcionário à indústria (antes da jornada de trabalho, após a higienização das mãos) e durante os trabalhos de indivíduos que exercem atividades na fase de toalete das carcaças e na câmara de resfriamento;
- Ambiente da sala de matança - Amostras representativas desta sala foram tomadas através da exposição de placas de Petri contendo os meios específicos para o gênero em estudo (ágar dextrina-ampicilina e ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina), as quais permaneceram abertas por quinze minutos (APHA, 2001). As placas ficaram expostas nas áreas de evisceração, no final da linha de inspeção e final da fase de toalete;
- Superfície de facas utilizadas na sala de matança - Estas amostras foram colhidas das facas utilizadas na fase de toalete das carcaças;
- Superfície da parede, piso e ralos da câmara de resfriamento – Estas amostras foram obtidas enquanto as carcaças em estudo ainda estavam armazenadas na mesma;
- Conteúdo intestinal - Consistiu do conteúdo do intestino grosso, colhido na seção de bucharia e triparia, no momento da abertura do aparelho digestório para a lavagem e preparação do mesmo.

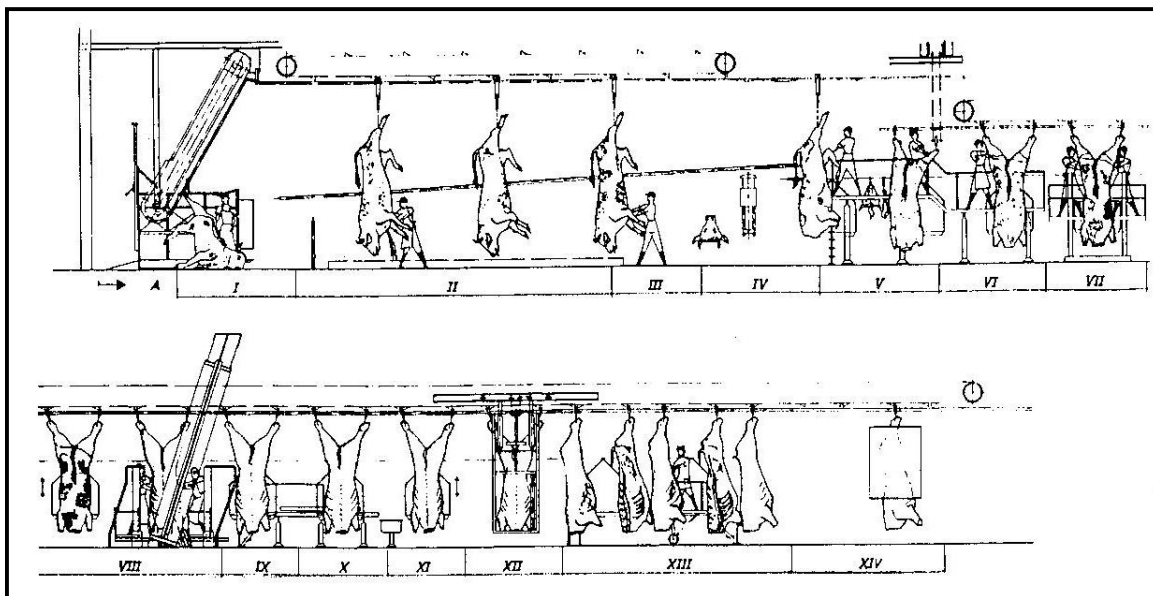


Figura 1. Esquema representativo do fluxograma de abate bovino, com apresentação dos locais de colheita de amostras na sala de matança.

Seção I – Local de colheita das amostras referentes à pele das partes dianteira e traseira da carcaça, após a lavagem do animal por aspersão.

Seção XIII - Local de colheita das amostras referentes à superfície muscular das partes dianteira e traseira da carcaça, superfície das mãos de manipuladores e de facas.

Seção XIV - Local de colheita da água residuária da lavagem de carcaça.

Foram colhidas 15 amostras por ponto, totalizando 285 unidades amostrais. As colheitas foram realizadas em dias normais de trabalho. As amostras referentes à pele úmida, superfície muscular em todas as etapas, carne e conteúdo intestinal foram obtidas do mesmo animal.

3.2 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras da água tratada e sem tratamento foram colhidas, com os devidos cuidados de assepsia, em frascos de vidro esterilizados, em quantidade aproximada de 400 mL. As amostras da água tratada foram colhidas em um ponto da sala de matança e, no sentido de neutralizar a ação do cloro, foi utilizado tiosulfato de sódio em solução a 10% na quantidade de 0,1 mL para cada 100 mL da amostra. Para determinar a concentração de cloro residual livre nas amostras de água medido no local de colheita foi utilizado o reagente NN Dietil Parafenileno Diamino (DPD) e colorímetro eletrônico

(HI93710C-HANNA INSTRUMENTS). O aparelho foi inicialmente zerado com 10 mL da amostra de água sem o reagente DPD e a leitura realizada após adição e homogeneização do reagente na cubeta com os 10 mL da amostra, sendo a mesma dada em mg.L^{-1} (HANNA, 1997).

As amostras da água residuária da lavagem das meias carcaças foram colhidas em seguida a lavagem das mesmas, durante a etapa em que o excesso dessa água escorre ao longo das faces externa e interna das meias carcaças. Essas amostras foram colhidas em frascos com tampa esterilizados e cada uma delas representou as duas meias carcaças de um mesmo animal.

As amostras representativas da superfície da pele do animal ainda seca, da pele após a lavagem por aspersão, de músculo, de utensílios, das mãos de manipuladores e superfície da parede, piso e ralos da câmara de resfriamento foram colhidas através de suabes esterilizados. Esses suabes foram adquiridos prontos - Ceconetes¹.

As áreas colhidas com suabe, excetuando-se mãos e facas, foram delimitadas utilizando-se um gabarito em aço inoxidável esterilizado para a demarcação de uma região de 20 cm^2 (APHA, 2001). Antes da colheita o suabe era mergulhado na água peptonada a 0,1% e escorrido o excesso na parede do tubo. Para a colheita de material das facas e mãos, foi utilizado um suabe para cada amostra, sendo colhido de toda a superfície da lâmina da faca e espaços interdigitais e palma das mãos. Após a colheita os suabes foram novamente mergulhados na água peptonada a 0,1%.

As amostras de carne foram colhidas na câmara de resfriamento, sendo compostas por fragmentos de várias partes da carcaça; os mesmos foram acondicionados em sacos de polietileno esterilizados.

As amostras de conteúdo intestinal foram colhidas na seção de bucharia e triparia, no momento da abertura do aparelho digestivo para a lavagem e preparação. Essas amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno esterilizados.

As amostras do ambiente da sala de matança foram tomadas através da exposição de placas de Petri contendo os meios seletivos específicos para o gênero em estudo (ágar

¹ Cecon - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. - São Paulo.

dextrina-ampicilina e ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina) que permaneceram abertas por quinze minutos (APHA, 2001).

O transporte das amostras de água, de carne, de conteúdo intestinal, bem como dos tubos com os suabes foi realizado em caixas de material isotérmico contendo gelo reciclável. As placas de Petri foram transportadas em caixa isotérmica à temperatura ambiente. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP.

3.3 Metodologia empregada no isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas*

3.3.1 Preparo das amostras e enriquecimento seletivo

As amostras da água tratada e sem tratamento, após homogeneização manual, foram filtradas em membranas de éster de celulose² de 47 milímetros de diâmetro e poros de 0,45 micrômetros. Essas membranas foram picadas em pedaços pequenos e os fragmentos colocados em Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de caldo tripticase-soja (TSB) adicionado de ampicilina³, na concentração de 30 mg por litro (ABEYTA JÚNIOR et al., 1990). A incubação do conjunto foi realizada a 28°C, em incubadora para BOD, por 24 horas.

O enriquecimento seletivo das amostras da água residuária da lavagem das meias carcaças foi realizado tomando-se, após homogeneização, 10 mL dessa água e adicionando-os a 100 mL de TSB adicionado de ampicilina e incubados a 28°C por 24 horas.

O enriquecimento seletivo das amostras de carne e de conteúdo intestinal também foi realizado em TSB adicionado de ampicilina, a 28°C por 24 horas após a

² Swinnex Disc Filter - Millipore

³ Sigma - A9393

homogeneização, em aparelho Stomacher⁴, de 25 gramas da amostra com 225 mL do referido caldo.

Os suabes, bem como a água peptonada utilizada no transporte, após a retirada da alíquota utilizada na prova de semeadura direta para contagem (item 3.4), foram vertidos em tubos de ensaio contendo 20 mL de TSB adicionado de ampicilina e incubados a 28°C por 24 horas.

3.3.2 Plaqueamento seletivo

A partir das culturas de enriquecimento seletivo foram semeadas, com auxílio de alça de níquel-cromo, placas contendo ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina (PALUMBO et al., 1985; MAJEED et al., 1990) e ágar dextrina-ampicilina, segundo HAVELAAR & VONK (1988). Nos dois casos a ampicilina foi adicionada após a esterilização, na concentração de 10 mg por litro. A incubação foi realizada em incubadora para BOD a 28°C por 24 horas.

3.3.3 Isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero *Aeromonas*

Para identificação das culturas, foram colhidas entre seis e oito colônias por placa de cada meio seletivo para cada amostra com características sugestivas do gênero *Aeromonas* que são:

- Ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina: colônias amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido;
- Ágar dextrina-ampicilina: colônias amareladas, circundadas por halo decorrente da hidrólise da dextrina;

Adotou-se o seguinte esquema para identificação das mesmas:

⁴ Stomacher, Marca Marconi, Modelo MA440

- A: pele seca;
- Bd: superfície da pele úmida da região dianteira;
- Bt: superfície da pele úmida da região traseira;
- Cd: superfície muscular da região dianteira durante a fase de toalete;
- Ct: superfície muscular da região traseira durante a fase de toalete;
- Dd: superfície muscular da região dianteira da carcaça resfriada;
- Dt: superfície muscular da região traseira da carcaça resfriada;
- Ea: superfície das mãos dos manipuladores antes do trabalho;
- Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho;
- F: superfície das mãos dos manipuladores da câmara de resfriamento;
- G: superfície das facas;
- H: superfície da parede da câmara de resfriamento;
- I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento;
- J: água sem tratamento;
- K: água tratada;
- L: água residuária da lavagem das carcaças;
- M: carne das carcaças resfriadas;
- N: conteúdo intestinal;
- O: ambiente da sala de matança.

As colônias com as características descritas foram semeadas em tubos com ágar tripticase-soja (TSA) inclinado e incubadas a 28°C por 24 horas. Após o período de incubação foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas que apresentaram forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995). Após incubação a 28°C por 24 horas, as culturas que apresentaram reação ácida tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em TSA e, em seguida, submetidas às provas da motilidade, oxidase, catalase e

resistência ao agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine⁵), seguindo esquema de caracterização adotado por POPOFF (1984), HAVELAAR et al. (1987), ARAUJO et al. (1989), KNOCHEL (1990), NEVES et al. (1990) e HUDSON & LACY (1991).

3.3.4 Caracterização das espécies

A caracterização das espécies foi realizada seguindo o esquema proposto por POPOFF (1984) acrescido de algumas outras provas recomendadas por BUCHANAN & PALUMBO (1985) e ABEYTA JUNIOR et al. (1990) com atualizações apresentadas por FURUWATARI et al. (1994), PIDIYAR et al. (2002), ABOTT et al. (2003), HARMONTEIL et al. (2004), MIÑANA-GALBIS et al. (2004) e TACÃO et al. (2005) que foram: produção do indol; hidrólise da esculina e da arginina; descarboxilação da lisina e da ornitina; fermentação do inositol, da salicina, da sacarose, do manitol e da arabinose; produção de acetoína a partir da glicose (VP); produção de gás a partir da glicose; crescimento em caldo nutriente a 37°C com 0%, 3% e 6% de cloreto de sódio e redução do nitrato.

As provas bioquímicas para a caracterização das espécies foram realizadas seguindo a metodologia de Mac FADDIN (1976).

3.4 Semeadura direta em meio seletivo e contagem do gênero *Aeromonas*

Para a realização da contagem do gênero *Aeromonas* foram utilizadas placas de ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina, preparadas conforme já descrito no item 3.3.2, sendo a semeadura realizada em superfície, em volumes de 0,1 mL de cada amostra ou diluição. Para uma distribuição homogênea do inóculo na superfície do meio foi utilizado um bastão de vidro em forma de “L”.

As amostras de água tratada, água sem tratamento e residuária da lavagem de carcaças foram inoculadas na sua condição original e diluídas a 1/10 em água peptonada

⁵ Sigma - D0181

a 0,1%. Nesses casos os resultados foram computados como unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

Para a contagem a partir das amostras representadas por suabe inoculou-se após perfeita homogeneização destes com os 4 mL de água peptonada que serviram de transporte (realizada em agitador de tubos⁶), 0,1 mL da própria água peptonada e também a sua diluição a 1/10. Os resultados foram expressos em UFC/cm², sendo considerado que cada mililitro da água peptonada era representativo da população microbiana encontrada em 5 cm² da superfície de dois animais ou carcaças.

Para a contagem da população do gênero *Aeromonas* a partir das amostras de carne e conteúdo intestinal foi utilizada diluição preparada para a fase de enriquecimento seletivo na qual 25 gramas de cada um dos tipos de amostra foram homogeneizados, em aparelho Stomacher, com 225 mL de TSB. Assim, nesse caso, foi inoculada somente essa diluição a 1/10. A incubação das placas foi realizada em incubadora para BOD a 28°C por 24 horas, a partir do que se identificou e realizou-se a contagem das colônias características. Os resultados foram expressos em UFC/g.

3.5 Testes de sensibilidade a antimicrobianos (BAUER et al., 1966; NCCLS, 2003)

Para a realização dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos foi utilizado somente um dos cultivos provenientes de um mesmo local de amostragem, escolhido dentre aqueles que apresentaram resultados iguais entre si em todas as provas bioquímicas. Também foram analisados os cultivos de uma mesma amostra que, embora apresentassem a mesma classificação fenotípica, apresentaram resultado diferente dos demais em, pelo menos, uma prova bioquímica.

As cepas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de TSB e incubadas a 37°C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica em tubos contendo 4 mL de solução salina esterilizada, até a obtenção de turvação idêntica à da solução padrão de cloreto de bário, preparada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário e 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v/v). A

⁶ Marca Phoenix - Modelo AP56

seguir, as culturas diluídas foram semeadas, com auxílio de suabes esterilizados, em placas com ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário à secagem da superfície do meio, foram colocados os multidiscos⁷ contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetro foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

Os multidiscos de antimicrobianos continham os seguintes princípios ativos: Amicacina (10 µg), Amoxicilina+Clavulanato (20x10 µg), Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepime (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Gentamicina (10 µg), Imipenem (10 µg) e Sulfazotrim (20 µg).

3.6 Caracterização molecular dos isolados

Para a realização das técnicas de REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), foram adquiridas as seguintes cepas padrão de aeromonas fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): *A. hydrophila* (*Proteus ichthyosmii*) (ATCC 7966), *A. sobria* (ATCC 43979) e *A. caviae* (*A. punctata* subsp. *caviae*) (ATCC 15468).

Os cultivos analisados pelas técnicas de REP e ERIC-PCR consistiram nos mesmos utilizados no teste de sensibilidade a antimicrobianos.

3.6.1 Isolamento bacteriano e extração do DNA

A partir das culturas em tubos de TSA inclinado, foram retiradas alíquotas com auxílio de uma alça de níquel-cromo e semeadas em tubos contendo 3 mL de caldo TSB, sendo incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por 24 horas. Após esse período de incubação foram retiradas alíquotas com auxílio de uma alça de níquel-cromo e semeadas em microtubos contendo 1,5 mL de caldo TSB e, novamente incubadas a 28°C por 18 a 20 horas. Após este período de incubação, procedeu-se a

⁷ Laborclin – Produtos para Laboratórios – Ltda. – Polidiscos LB-6.

extração do DNA genômico por meio da utilização do kit GE Healthcare illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin.

Em seguida à extração do DNA, foi realizada sua dosagem de acordo com a metodologia descrita por SAMBROOK et al. (1989), na qual a concentração e a pureza do DNA foram determinadas a partir da leitura em espectrofotômetro a 260 e 280 nm. O DNA extraído e dosado foi conservado a temperatura de -80°C.

3.6.2 Reação de amplificação (REP e ERIC-PCR)

As análises REP e ERIC-PCR foram desenvolvidas de acordo com prévia descrição por VERSALOVIC et al. (1991) e SZCZUKA & KAZNOWSKI (2004).

Foi realizada uma reação de 20 µL consistindo de: 13,4 µL de água Milli Q, 2 µL de tampão 10x [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 0,5 µL de MgCl₂ (1,25 mM), 0,4 µL de dNTP (1 mM), 1 µL de primer Rep1R-I, 1 µL de primer Rep2-I, 0,5 µL de *Taq* polimerase (2,5 U), 1,2 µL de DNA (30 ng/µL). Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen, USA.

A reação de amplificação foi realizada em um aparelho termociclador Eppendorf num total de 30 ciclos para REP e ERIC.

As condições para amplificação do REP foram as seguintes: desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 45°C e extensão por 2 minutos a 72°C. As amostras foram mantidas a 4°C até a realização da eletroforese dos produtos de PCR.

A amplificação para os primers ERIC foi realizada sob condições idênticas aos REP substituindo-se apenas os primers e as condições de anelamento que ocorreram por 1 minuto a 50°C.

Os primers⁸ utilizados para REP-PCR (VERSALOVIC et al., 1991) foram:

REP 1R-I (5' – III ICG ICG ICA TCI GGC – 3')

REP 2-I (5' – ICG ICT TAT CIG GCC TAC – 3')

Os primers utilizados para ERIC-PCR (VERSALOVIC et al., 1991) foram:

ERIC 1R (5' – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3')

ERIC 2 (5' – AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3')

⁸ Invitrogen, USA.

3.6.3 Análise eletroforética em gel de agarose dos fragmentos amplificados

Foram utilizados 10 µL de produto amplificado de cada amostra adicionados de 2 µL de uma solução de azul de bromofenol e glicerol. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2% (acrescido de 5 µL de brometo de etídio), sendo submetidas à corrida em cuba horizontal com tampão TEB 1X (Tris-Borato-EDTA). A corrida foi realizada utilizando-se uma corrente elétrica de 68V por aproximadamente 90 minutos. Como referência, foi utilizado um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, USA).

Após a eletroforese, o gel foi analisado em um transiluminador de luz ultravioleta e os produtos oriundos da amplificação foram visualizados e documentados em um fotodocumentador modelo Gel Doc (BIO RAD).

3.6.4 Análise filogenética

Por meio da análise do bandejamento produzido com o uso de cada oligonucleotídeo iniciador foi conferido o parâmetro 1 para a presença de banda e 0 para a ausência de banda, permitindo a elaboração de uma matriz binária. Essa matriz foi utilizada para a construção de um filograma pelo “software” Free Tree Win 95/98/NT (HAMPL et al., 2001). A similaridade genética entre os isolados foi estimada pelo coeficiente de distância descrito por NEI (1986). Para o agrupamento dos dados da matriz filogenética foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA - Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages) (SNEATH & SOKAL, 1973), sendo que, o filograma foi obtido com o auxílio do “software” Tree View (PAGE, 1996).

Os padrões de amplificação das bandas de DNA dos isolados foram comparados por similaridade através de observação visual. Os padrões foram considerados altamente similares quando todas as bandas visíveis representadas em cada isolado apresentavam a mesma distância de migração. Heterogeneidade na intensidade e formato das bandas não foi considerada diferença. Dois isolados eram considerados pertencentes ao mesmo grupo quando seus padrões de banda diferiam em relação à

distância de migração de até duas bandas (WOODS et al., 1992; REBOLI et al., 1994; DAVIN-REGLI et al., 1998). Os isolados eram considerados pertencentes à mesma espécie quando apresentavam similaridade $\geq 99\%$ (HARVEY et al., 2004).

3.7 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva dos dados envolvendo cálculos de porcentagens e representações tabuladas e o teste não paramétrico do Qui-quadrado com correção de Yates (CAMPOS, 1983) para a verificação da significância entre os possíveis pontos de contaminação e de disseminação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes à contagem das colônias caracterizadas e confirmadas como do gênero *Aeromonas* no ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina. Verifica-se que foi possível a quantificação direta em apenas 12 amostras, sendo o menor valor populacional de $0,5 \times 10^0$ UFC/cm² para a amostra número cinco da superfície da pele úmida da região dianteira, para a amostra número um da superfície muscular da região traseira da carcaça resfriada e para a amostra número sete da superfície muscular da região traseira durante a fase de toalete; o maior valor populacional foi de $9,2 \times 10^0$ UFC/cm² para a amostra número 14 da superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento.

Tabela 1. População de *Aeromonas* sp. em amostras colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007, conforme o local de colheita e o número da amostra.

Local de colheita	Número da amostra														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Pele seca ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pele úmida/ dianteiro ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pele úmida/ traseiro ^a	-	-	-	-	0,5 x 10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sup. musc. dianteira/toalete ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sup. musc. traseira/toalete ^a	-	-	-	-	-	-	0,5 x 10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-
Sup. musc. dianteira/carc.resfr. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sup. musc. traseira/carc.resfr. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mãos manipul./ antes trabalho ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mãos manipul./ durante trabalho ^b	-	-	-	-	-	-	-	7,0 x 10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-
Mãos manipul./ câmara resfriamento ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Facas ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parede câm. resfriamento ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piso e ralo câmara resfriamento ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2 x 10 ⁰	9,2 x 10 ⁰	-
Água sem tratamento ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Água tratada ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Água resid./ lavagem carcaças ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carne ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conteúdo intestinal ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ambiente ^f	3,0 x 10 ⁰	-	-	2,0 x 10 ⁰	-	-	1,0 x 10 ⁰	2,0 x 10 ⁰	-	-	-	-	1,0 x 10 ⁰	-	-

Unidade: a - UFC/cm²; b - UFC/mão; c - UFC/faca; d - UFC/mL; e - UFC/g; f - UFC/placa.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados relativos ao isolamento de aeromonas após o enriquecimento seletivo a partir de cada ponto de colheita, mostrando o número de cultivos obtidos após esta etapa e revelando a importância da realização do enriquecimento seletivo para recuperar esses microrganismos. Verifica-se que do total de amostras analisadas, 38 foram positivas e, destas, foram isolados 253 cultivos (colônias) para a caracterização das espécies. Salienta-se a não inclusão dos dados referentes às amostras de ambiente da sala de matança devido ao fato das mesmas não terem sido submetidas ao enriquecimento seletivo.

Observa-se ainda, na Tabela 2, que ocorreu diferença estatística significativa entre os resultados das amostras de mão dos funcionários durante a jornada de trabalho com os resultados das amostras de pele seca, pele úmida da região dianteira, mãos dos manipuladores antes do trabalho e câmara de resfriamento, facas, parede da câmara de resfriamento, água tratada, superfície muscular dianteira e traseira durante a toalete, superfície muscular dianteira e traseira da carcaça resfriada e água sem tratamento. Também ocorreu diferença estatística significativa entre os resultados das amostras de pele úmida da região traseira, piso e ralo da câmara de resfriamento, água residuária da lavagem das carcaças, carne e conteúdo intestinal com os resultados da pele seca.

Tabela 2. Número de cultivos de *Aeromonas* sp. obtidos após o enriquecimento seletivo em relação ao local de colheita das amostras obtidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Local de colheita	Número de amostras		Número de cultivos isolados	
	Analisadas	Positivas		
		Nº		%
Pele seca	15	0 ^a	0,00	-
Pele úmida/ dianteiro	15	2 ^{a,b}	13,33	12
Pele úmida/ traseiro	15	3 ^{b,c}	20,00	18
Sup. musc. dianteira/ toailete	15	2 ^{a,b}	13,33	15
Sup. musc. traseira/ toailete	15	1 ^{a,b}	6,66	7
Sup. musc. dianteira/ carc.resfr.	15	2 ^{a,b}	13,33	14
Sup. musc. traseira/ carc.resfr.	15	1 ^{a,b}	6,66	8
Mãos manipul./ antes trabalho	15	0 ^a	0,00	-
Mãos manipul./ durante trabalho	15	8 ^c	53,33	54
Mãos manipul./ câm. resfriamento	15	0 ^a	0,00	-
Facas	15	0 ^a	0,00	-
Parede câmara resfriamento	15	0 ^a	0,00	-
Piso e ralo câmara resfriamento	15	4 ^{b,c}	26,66	25
Água sem tratamento	15	2 ^{a,b}	13,33	13
Água tratada	15	0 ^a	0,00	-
Água residuária/ lavagem carcaças	15	4 ^{b,c}	26,66	24
Carne carcaça resfriada	15	4 ^{b,c}	26,66	26
Conteúdo intestinal	15	5 ^{b,c}	33,33	37
Total	270	38	14,07	253

Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

No que se refere às populações de *Aeromonas* sp. encontradas nas amostras analisadas constata-se, pela Tabela 1, que foi possível realizar a contagem destas bactérias a partir da semeadura direta em meio para contagem em um número reduzido de amostras. Embora a população das aeromonas detectada na semeadura direta tenha ocorrido em um número pequeno de amostras, pela Tabela 2 pode-se observar que o enriquecimento seletivo favoreceu o isolamento das mesmas.

Na Tabela 2 observa-se, ainda, que apesar do enriquecimento seletivo, não foi possível isolar a bactéria das amostras de pele seca, superfície das mãos dos manipuladores antes do trabalho, superfície das mãos dos manipuladores da câmara de resfriamento, superfície das facas, superfície da parede da câmara de resfriamento e água tratada.

ROSSI JUNIOR et al. (2006) determinaram a população de aeromonas em abatedouro bovino e também encontraram um número reduzido de amostras em que foi possível realizar a contagem populacional dessas bactérias. No entanto, enquanto no trabalho destes autores foi possível realizar a contagem em amostras de pele úmida, conteúdo intestinal, superfície muscular do dianteiro e carne desossada, o presente estudo realizou esta etapa em amostras de superfície da pele úmida da região traseira, superfície muscular da região traseira durante a fase de toailete, superfície muscular da região traseira da carcaça resfriada, superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho e superfície do piso da câmara de resfriamento.

Nas amostras de pele úmida da região traseira, aqueles autores encontraram população variando entre $0,2 \times 10$ e $1,5 \times 10^2$ UFC/cm², sendo estes valores superiores ao encontrado na mesma região para o atual trabalho, que foi de $0,5 \times 10^0$ UFC/cm². Em relação à contagem de aeromonas na superfície muscular durante a fase de toailete das carcaças, o presente estudo encontrou uma população de $0,5 \times 10^0$ UFC/cm² na região traseira de apenas uma carcaça. ROSSI JUNIOR et al. (2006) encontraram população maior, entre $0,2 \times 10^2$ e $3,0 \times 10^2$ UFC/cm² na superfície muscular da região dianteira de duas carcaças.

Dentre as amostras de superfície muscular da carcaça resfriada, foi possível realizar a contagem populacional a partir de apenas uma amostra da região traseira, com população também de $0,5 \times 10^0$ UFC/cm². Apesar de ser um valor muito pequeno, é importante ressaltar a característica psicrotrófica das aeromonas, o que permite que esta população possa se elevar durante o armazenamento até o momento do consumo da carne.

Em relação à amostragem das mãos, nenhuma permitiu o isolamento de aeromonas antes do início da jornada de trabalho, provavelmente porque os suabes foram realizados após a higienização das mãos com sabão, água e álcool em gel. Dentre as amostras durante a jornada de trabalho, oito (53,3%) permitiram o isolamento da bactéria e somente uma possibilitou a contagem prévia ao enriquecimento com um valor de $7,0 \times 10^0$ UFC/mão. Diferentemente, o trabalho de ROSSI JUNIOR et al. (2000a) encontrou aeromonas em duas (6,7%) das mãos antes do início das atividades

no abatedouro e em sete (23,3%) das amostras durante as atividades, sendo este um valor inferior ao encontrado no presente estudo.

Conforme a Tabela 2, observa-se que as mãos dos manipuladores constituíram-se na principal via de disseminação das aeromonas na indústria. Consequentemente, as medidas de boas práticas de fabricação devem ser sempre seguidas a rigor, visando evitar o contato de forma direta dos funcionários com as carcaças sempre que possível.

A contagem de aeromonas a partir da superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento foi possível somente em três (20%) amostras, apresentando valores de $1,2 \times 10^0$, $3,2 \times 10^0$ e $9,2 \times 10^0$ UFC/cm². Após o enriquecimento, uma amostra adicional permitiu o isolamento destas bactérias. Muito embora nenhuma amostra de superfície de parede estava contaminada por aeromonas, a presença destas bactérias na superfície de piso e ralo adquire importância no momento da higienização da câmara, pois é realizada utilizando-se água sob alta pressão. Este fator é importante porque pode ocasionar a transferência da bactéria do piso para as paredes da câmara onde, dependendo da localização, consiste em um ponto de contato da carcaça no momento em que são encaminhadas para esta sala.

Nas amostras de água residuária da lavagem das carcaças, quatro (26,6%) destas permitiram o isolamento das aeromonas após o enriquecimento, entretanto, somente uma pertencendo à mesma carcaça cuja amostra permitiu o isolamento em pele úmida e superfície muscular durante a toailete. São escassos os trabalhos na literatura científica que tenham analisado estes tipos de amostras. ROSSI JUNIOR et al. (2000b) avaliaram 30 amostras de água residuária das carcaças e conseguiram isolar aeromonas em 33,3% das mesmas. Em um abatedouro de Porto Alegre (RS), BIZANI & BRANDELLI (2001) pesquisaram a ocorrência de aeromonas em 35 amostras de água residuária de carcaça após a lavagem final das mesmas, isolando aeromonas de nove (25,7%), sendo este, um resultado semelhante ao encontrado no presente estudo.

Quanto à presença de aeromonas nas amostras de água, embora a mesma seja considerada habitat natural dessas bactérias, somente duas amostras de água sem tratamento apresentaram tais microrganismos. Esse fato evidencia um provável número muito reduzido desses microrganismos nesta água, que é proveniente de um poço

artesiano. Tal resultado pode ser corroborado pelo trabalho de MASSA et al. (2001), na Itália, que pesquisaram a ocorrência de *Aeromonas* sp. em água de poços e a isolaram em cinco dentre os 20 poços testados.

CAHILL & Mac RAE (1992), na Austrália, encontraram população superior de *Aeromonas* sp. em água não tratada, com média de $3,0 \times 10^2$ UFC/mL, enquanto que GRAY & STICKLER (1989) determinaram população acima de $6,4 \times 10^4$ UFC/mL nos meses de verão. Uma contradição é o trabalho de BIZANI & BRANDELLI (2001) que encontraram aeromonas em seis (17,1%) amostras das 35 de água clorada colhidas na linha de abate.

Segundo ROSSI JUNIOR et al. (2000b), a água dos currais pode ser uma importante fonte de contaminação, principalmente para a pele, e pela mesma, as aeromonas podem chegar à sala de matança. No abatedouro onde as amostras analisadas no presente estudo foram colhidas, a água ainda não deve ser considerada um motivo de preocupação como veículo de contaminação das carcaças por aeromonas, podendo-se enfatizar a importância da utilização do cloro para o tratamento da água utilizada na indústria.

Nas amostras de carne também não foi possível determinar a população de aeromonas, contudo, após a etapa de enriquecimento, quatro (26,66%) amostras apresentaram multiplicação bacteriana. No trabalho de ROSSI JUNIOR et al. (2006) foi possível realizar a contagem em apenas uma amostra de carne desossada que apresentou uma população de $2,0 \times 10$ UFC/g, contudo, de 30 amostras analisadas, seis (20%) possibilitaram o isolamento. Esse fato torna-se importante durante a vida de prateleira daquelas amostras de carne, pois um período prolongado favorece a multiplicação da bactéria pelo fato da carne constituir-se em um meio rico em nutrientes, ressaltando-se o comportamento psicrotrófico das aeromonas.

Em relação à presença de *Aeromonas* sp. no conteúdo intestinal, assim como citado por outros autores, constatou-se a dificuldade no isolamento destas bactérias no meio utilizando sementeira direta, sendo possível somente após o enriquecimento seletivo. Após esta etapa, no presente estudo, foi possível isolar a bactéria em cinco (33,33%) amostras, fornecendo 37 cultivos. GRAY & STICKLER (1989) pesquisaram a

ocorrência destes microrganismos em 481 amostras de suabes retais de vacas e encontraram aeromonas em 4,6% dos animais. Esses autores constataram ainda que a maioria (98,5%) das amostras fecais revelou a existência da bactéria apenas após o enriquecimento.

Embora as amostras de ambiente não tenham sido incluídas na Tabela 2, ocorreu o isolamento de aeromonas a partir de cinco delas, fornecendo nove cultivos. ROSSI JUNIOR et al. (2006) pesquisaram a presença de aeromonas no ambiente da sala de matança e de 30 amostras somente uma foi positiva, demonstrando que o ambiente pode atuar como possível fonte de contaminação para a carcaça. Apesar de alguns autores, como NEWTON et al. (1978) e PRENDERGAST et al. (2004), não concordarem que a via aérea seja uma importante rota de contaminação das carcaças durante o abate, a pesquisa desta possível via de contaminação pelas aeromonas deve ser realizada com o intuito de se obter mais informações sobre este assunto para essa categoria de microrganismo, uma vez que estes dados são escassos.

Os padrões de resistência e sensibilidade dos isolados de *Aeromonas* sp. são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Número e porcentagem de amostras resistentes e susceptíveis aos antimicrobianos testados, identificadas em cada cultivo selecionado das amostras colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Antimicrobiano (µg/disco)	Amostras			
	Resistentes		Sensíveis	
	Nº	%	Nº	%
Amicacina (10)	3	4,8	59	95,2
Amoxicilina+Clavulanato (20x10)	61	98,4	1	1,6
Ampicilina (10)	62	100,0	0	0,0
Cefalotina (30)	62	100,0	0	0,0
Cefepime (30)	0	0,0	62	100,0
Cefoxitina (30)	33	53,2	29	46,8
Ceftazidima (30)	3	4,8	59	95,2
Cefuroxima (30)	10	16,0	52	84,0
Ciprofloxacina (5)	7	11,3	55	88,7
Gentamicina (10)	7	11,3	55	88,7
Imipenem (10)	0	0,0	0	100,0
Sulfazotrim (20)	14	22,6	48	77,4

Todos os cultivos isolados apresentaram resistência à cefalotina e ampicilina e, 98,4%, à associação de amoxicilina com clavulanato. Enquanto que a totalidade dos isolados mostrou-se sensível somente em relação ao cefepime e imipenem. O resultado em relação à ampicilina já era esperado, pois outros trabalhos encontraram resistência em 100% de suas amostras (SHARMA et al., 2005; RADU et al., 2003; JOSEPH et al., 1979) além do fato de a ampicilina ser usada como agente seletivo durante o isolamento.

BIZANI & BRANDELLI (2001) avaliaram o comportamento das aeromonas colhidas de água de abatedouro bovino e encontraram resistência de todas as amostras frente à ampicilina, amoxicilina e cefalotina; a sensibilidade de todas as amostras foi determinada em relação à amicacina e gentamicina. No presente estudo, a sensibilidade para amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina e cefuroxima ocorreu, respectivamente, em 95,2%, 95,2%, 88,7%, 88,7% e 84% das amostras. Ainda, 77,4% e 46,8% apresentaram uma sensibilidade menor, respectivamente, ao sulfazotrim e cefoxitina.

A sensibilidade das aeromonas a antimicrobianos foi testada por PALÚ et al. (2006), no Rio de Janeiro, em 83 amostras de *Aeromonas* sp. (28 isolados de fezes humanas e 55 de alface fresca). Similarmente ao presente estudo, todas suas amostras mostraram sensibilidade ao imipenem. Esses autores também obtiveram sensibilidade à amicacina, ciprofloxacina e gentamicina em todas suas amostras, enquanto que, o presente estudo mostrou uma sensibilidade parcial a essas drogas. Nos demais antibióticos testados por esses autores, ocorreu grande variabilidade nos perfis de resistência e sensibilidade dentre os diferentes tipos de amostragem.

No Rio Grande do Sul, um estudo realizado em dois hospitais, aeromonas foram isoladas em 27 (6,6%) das 408 amostras de fezes provenientes de pacientes com diarreia; os isolados foram classificados como *A. hydrophila* (51,8%), *A. caviae* (40,8%) e *A. veronii* biovar *sobria* (7,4%) (GUERRA et al., 2007). Assim, como no presente estudo, todos os isolados foram resistentes à ampicilina e cefalotina. Ainda, acima de 70% de seus isolados foram resistentes ao imipenem, sendo este um resultado contrário ao do presente estudo.

A Tabela 4 mostra o número e a porcentagem dos isolados em relação à quantidade de antimicrobianos aos quais foram resistentes. Pode-se observar que os isolados apresentaram resistência a pelo menos três princípios ativos, revelando, assim, um caráter de multirresistência. Observa-se que 18 (29,0%) isolados mostraram-se resistentes a três princípios ativos, 25 (40,3%) a quatro e 11 (17,8%) a cinco princípios. Uma menor porcentagem (8% e 3,2%) mostrou-se resistente a, respectivamente, seis e sete antimicrobianos, enquanto que um isolado desenvolveu resistência a oito.

Tabela 4. Perfil de resistência a antimicrobianos das *Aeromonas* sp. isoladas de amostras colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Antimicrobianos	Isolados Resistentes	
	Nº	%
≤2	0	0,0
3	18	29,0
4	25	40,3
5	11	17,8
6	5	8,0
7	2	3,2
8	1	1,7

Na Tabela 5, que mostra o perfil de susceptibilidade conforme a espécie de aeromonas, observa-se que o isolado de *A. sobria* consistiu no único cultivo com resistência a oito antimicrobianos. O isolado de *A. schubertii* foi resistente a cinco princípios e, *A. trota*, a três. Os isolados de *A. caviae* apresentaram perfis de susceptibilidade variáveis.

Tabela 5. Distribuição dos isolados de *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas trota* e *Aeromonas schubertii* de diferentes pontos do fluxograma de abate bovino, segundo seu comportamento frente à ação de antimicrobianos.

Ant. 1	<i>A. caviae</i>		<i>A. sobria</i>		<i>A. trota</i>		<i>A. schubertii</i>	
	R	S	R	S	R	S	R	S
AMI	2 (3,4)	57 (96,6)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
AMC	58 (98,3)	1 (1,7)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
AMP	59 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
CFL	58 (98,3)	1 (1,7)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
CPM	0 (0,0)	59 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
CFO	32 (54,2)	27 (45,8)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
CAZ	3 (5,0)	56 (95,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
CRX	8 (13,6)	51 (86,4)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
CIP	6 (10,2)	53 (89,8)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
GEN	7 (11,9)	52 (88,1)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
IPM	0 (0,0)	59 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
SUT	12 (20,3)	47 (79,7)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)

¹Antimicrobianos: AMI - amicacina; AMC – amoxicilina+clavulanato; AMP - ampicilina; CFL - cefalotina; CPM - cefepime; CFO - cefoxitina; CAZ - ceftazidima; CRX - cefuroxima; CIP - ciprofloxacina; GEN – gentamicina; IPM - imipenem; SUT - sulfazotrim. R: resistente; S: sensível.

BIZANI & BRANDELLI (2001) isolaram dois cultivos de *A. sobria* dentre 35 de água de lavagem de carcaças. Assim como no presente estudo, ambos isolados mostraram-se resistentes à ampicilina e cefalotina, além da amoxicilina; também apresentaram sensibilidade à gentamicina. Entretanto, mostraram-se sensíveis à amicacina. Esses autores não isolaram *A. caviae*, *A. trota* e *A. schubertii* de suas amostras.

No estudo de PALÚ et al. (2006), 27,6% isolados de alface e 42,1% isolados de amostras clínicas de *A. caviae* foram resistentes à cefoxitina, enquanto que no presente estudo, 54,2% dos isolados desta espécie apresentaram este perfil.

A resistência a antimicrobianos entre os enteropatógenos consiste em um sério problema nos países em desenvolvimento onde há uma alta frequência de enfermidades gastroentéricas, sendo muitos antimicrobianos rotineiramente utilizados e de forma inadequada. A resistência é particularmente relevante nas espécies patogênicas de aeromonas nas quais a multirresistência tem sido frequentemente identificada (GUERRA, 2007).

Para aqueles compostos cuja sensibilidade não ocorreu na totalidade das amostras, recomenda-se a realização de testes que possam indicar o melhor princípio

ativo para uma terapia clínica, pois, com exceção de poucos compostos que apresentaram resultados similares com outros estudos, a resistência e a sensibilidade das *Aeromonas* sp. aos diferentes antimicrobianos pode variar conforme as regiões, países e origem dos isolados (TAVARES, 2000).

As Tabelas de 6 a 9 mostram os resultados da caracterização bioquímica das espécies de aeromonas encontradas nos cultivos das amostras de superfície da pele úmida das regiões dianteira e traseira, superfície muscular das regiões dianteira e traseira durante a fase de toalete, superfície muscular das regiões dianteira e traseira da carcaça resfriada, superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho, superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento, água sem tratamento, água residuária da lavagem das carcaças, carne das carcaças resfriadas, conteúdo intestinal e ambiente da sala de matança.

Tabela 6. Espécies de *Aeromonas* sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de superfície da pele úmida das regiões dianteira e traseira, superfície muscular das regiões dianteira e traseira durante a fase de toalete e superfície muscular das regiões dianteira e traseira da carcaça resfriada colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Amostras/ cultivos	Espécies identificadas
Bt5a	<i>A. caviae</i>
Bt12a	<i>A. caviae</i>
Bd13a	<i>A. caviae</i>
Bd15a Bd15d	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
Bt15a	<i>A. caviae</i>
Ct7a Ct7b	<i>A. caviae</i> <i>A. sobria</i>
Cd13a Cd13b	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
Cd15a Cd15b	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
Dt1a	<i>A. caviae</i>
Dd7e	<i>A. caviae</i>
Dd14a	<i>A. caviae</i>

Bd: superfície da pele úmida da região dianteira; Bt: superfície da pele úmida da região traseira; Cd: superfície muscular da região dianteira durante a fase de toalete; Ct: superfície muscular da região traseira durante a fase de toalete; Dd: superfície muscular da região dianteira da carcaça resfriada; Dt: superfície muscular da região traseira da carcaça resfriada. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 7. Espécies de *Aeromonas* sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Amostras/ cultivos	Espécies identificadas
Ed1a	<i>A. caviae</i>
Ed2e	<i>A. caviae</i>
Ed3a	<i>A. caviae</i>
Ed9a	<i>A. caviae</i>
Ed9c	<i>A. caviae</i>
Ed10a	<i>A. caviae</i>
Ed10b	<i>A. caviae</i>
Ed11a	<i>A. caviae</i>
Ed12a	<i>A. caviae</i>
Ed12b	<i>A. caviae</i>
Ed15d	<i>A. caviae</i>
Ed15e	<i>A. caviae</i>

Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 8. Espécies de *Aeromonas* sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de carne das carcaças resfriadas e conteúdo intestinal colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Amostras/ cultivos	Espécies identificadas
M3a	<i>A. caviae</i>
M5a	<i>A. caviae</i>
M12a	<i>A. caviae</i>
M13a	<i>A. caviae</i>
N4a	<i>A. caviae</i>
N4c	<i>A. caviae</i>
N5a	<i>A. caviae</i>
N7a	<i>A. caviae</i>
N8a	<i>A. caviae</i>
N8c	<i>A. caviae</i>
N12a	<i>A. caviae</i>
N12b	<i>A. caviae</i>

M: carne das carcaças resfriadas; N: conteúdo intestinal. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 9. Espécies de *Aeromonas* sp. identificadas em cada cultivo selecionado das amostras de superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento, água sem tratamento, água residuária da lavagem das carcaças e ambiente da sala de matança colhidas em matadouro-frigorífico no estado de São Paulo, no período de fevereiro a novembro de 2007.

Amostras/ cultivos	Espécies identificadas
L3a	<i>A. caviae</i>
L3b	<i>A. caviae</i>
L4a	<i>A. caviae</i>
L8a	<i>A. caviae</i>
L13a	<i>A. caviae</i>
L13e	<i>A. schubertii</i>
O1a	<i>A. caviae</i>
O1b	<i>A. caviae</i>
O4a	<i>A. caviae</i>
O4b	<i>A. caviae</i>
O7a	<i>A. caviae</i>
O8a	<i>A. caviae</i>
O8c	<i>A. caviae</i>
O13a	<i>A. caviae</i>
I7a	<i>A. caviae</i>
I7b	<i>A. caviae</i>
I10a	<i>A. caviae</i>
I13b	<i>A. caviae</i>
I14b	<i>A. caviae</i>
I14d	<i>A. caviae</i>
J14a	<i>A. caviae</i>
J14f	<i>A. trota</i>
J15a	<i>A. caviae</i>

L: água residuária da lavagem das carcaças; O: ambiente da sala de matança; I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento; J: água sem tratamento. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

No presente estudo, foi possível identificar 59 cultivos como sendo *A. caviae*, um de *A. sobria*, um de *A. trota* e um de *A. schubertii*.

O cultivo considerado *A. sobria* pertence a um dos cultivos da amostra de superfície muscular durante a fase de toalete das carcaças (Ct7b); o cultivo considerado *A. schubertii* pertence a um dos cultivos provenientes de uma amostra de água residuária da lavagem das carcaças (L13e) e o cultivo de *A. trota* é proveniente de um dos cultivos de uma amostra de água sem tratamento (J14f). Os cultivos de *A. caviae* pertencem aos demais tipos de amostras.

Apesar de *A. sobria* ter sido isolada de uma única amostra, sua presença no frigorífico não deve ser ignorada, pois consiste em uma das espécies produtoras de enterotoxinas (MAJEED et al., 1989; YADAV & KUMAR, 2000; MARTINS et al., 2002).

ROSSI JUNIOR et al. (2006), em um frigorífico bovino, estudaram a ocorrência das aeromonas em diversos locais como os do presente estudo e, a maioria de seus isolados também foi de *A. caviae*, inclusive no conteúdo intestinal.

A presença do microrganismo no ambiente pode contaminar a carcaça diretamente pela via aerógena ou através de respingos de água que tocam o piso, paredes ou equipamentos contaminados, uma vez que jatos de água sob alta pressão são constantemente utilizados na higienização, principalmente na sala de abate. Está bem documentado que *Aeromonas* sp. e outros gêneros de bactérias patogênicas podem ser detectados no ambiente do frigorífico, de locais como piso e paredes, piso da sala de resfriamento, pia, serras e superfícies para manipulação das carnes. Consequentemente, a possibilidade de ocorrer contaminação cruzada é substancial (GILL & JONES, 1995; BORCH & ARINDER, 2002; ROSSI JUNIOR et al., 2006).

Ainda, as mãos dos funcionários, quando contaminadas dentro da indústria, também podem contribuir para a disseminação das aeromonas. Pesquisando a ocorrência de aeromonas nas mãos de funcionários de frigorífico bovino, ROSSI JUNIOR et al. (2000a) encontraram *A. hydrophila* e *A. caviae*, com predominância desta última.

Deve-se considerar também, o isolamento de aeromonas no conteúdo intestinal, pois, apesar de alguns autores (STERN et al., 1987; GRAY & STICKLER, 1989)

relatarem a baixa ocorrência de aeromonas nas fezes dos animais, como pode ser comprovado no presente estudo, pode-se afirmar que, mesmo sendo de baixa ocorrência, este veículo é importante, principalmente quando se trata de cepas patogênicas como *A. caviae*. Conseqüentemente, existe risco destas bactérias chegarem à mesa do consumidor.

A prevenção da entrada e disseminação dessas bactérias provenientes de conteúdo intestinal nas dependências de abate e de manipulação da carne, por sua vez, está relacionada aos cuidados durante a evisceração das carcaças e às medidas adotadas com a finalidade de evitar contato da pele do animal, facas e equipamentos com a superfície muscular após a esfolagem.

Os resultados obtidos com as técnicas de REP e ERIC revelaram uma grande diversidade genética entre as bactérias encontradas. Assim, para aumentar a probabilidade de se encontrar a provável origem e/ou disseminação da contaminação das carcaças dentro da indústria, realizou-se a comparação entre os isolados de um mesmo dia de abate. Ainda, a heterogeneidade molecular dos isolados permite inferir a ocorrência de outras espécies de aeromonas que não foram detectadas pela classificação bioquímica. Conseqüentemente, para a análise molecular, os isolados serão referidos como *Aeromonas* sp. e não pela espécie identificada fenotipicamente.

ORMEN et al. (2005) compararam resultados de análise bioquímica e molecular pela técnica de RFLP para a identificação de espécies do gênero *Aeromonas* em isolados clínicos e ambientais. Esses autores comprovaram uma divergência de resultados entre as duas técnicas em 96% das amostras ambientais e uma discrepância de 46% entre os dois métodos para os isolados clínicos. Segundo os autores, 57% (34/60) dos isolados clínicos, fenotipicamente identificados como *A. caviae* e *A. hydrophila*, diferiram na identificação genotípica por RFLP, e apenas 4% (3/72) dos isolados ambientais concordaram com a identificação bioquímica. No presente estudo não foi possível realizar tal estudo uma vez que o material genético extraído das cepas padrão (ATCCs) não permitiu a identificação suficientemente satisfatória de suas bandas para que se pudesse utilizá-las na comparação com as bactérias isoladas.

A amplificação com os oligonucleotídeos REP 1R-I/REP 2-I (Figura 2) possibilitou a amplificação de até dez bandas de DNA, dependendo do isolado, com tamanho de aproximadamente 100 a 5000 pb e a de ERIC 1R/ERIC 2 (Figura 3) permitiu a

visualização de até 13 bandas também com o mesmo tamanho. Entretanto, apesar do maior número de bandas gerado pelo ERIC em algumas amostras, o REP possibilitou a visualização das bandas em um maior número de amostras.

SZCZUKA & KAZNOWSKI (2004) trabalharam com cepas de *Aeromonas* sp. de amostras ambientais e colhidas de fezes humanas com gastroenterite. Seus isolados apresentaram amostras de bandas com tamanho entre 100 e 3500 pb, contudo, ambas técnicas detectaram um número um pouco inferior de bandas, principalmente com o REP.

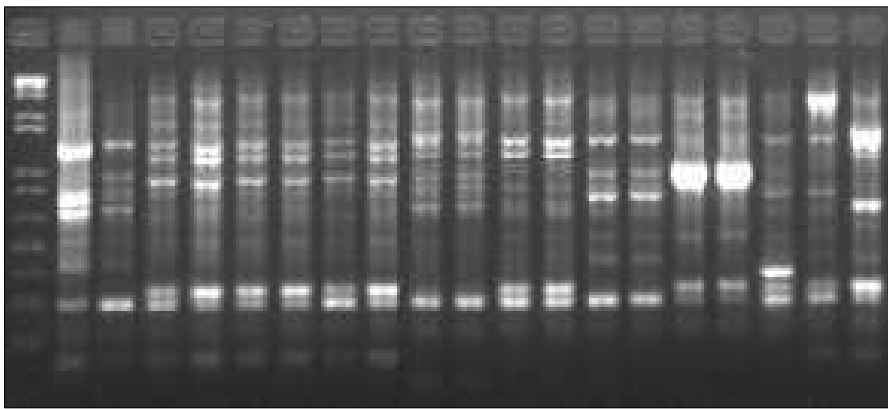


Figura 2. Amplificação dos isolados de *Aeromonas* sp. pelo conjunto de primers REP 1R-I/REP 2-I.

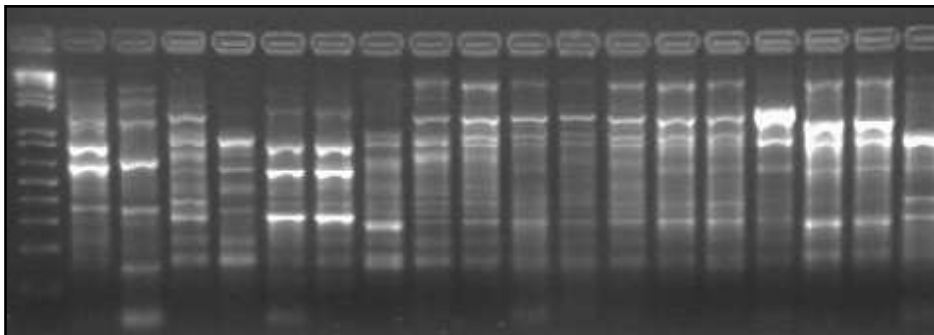


Figura 3. Amplificação dos isolados de *Aeromonas* sp. pelo conjunto de primers ERIC 1R/ERIC 2.

Os resultados de similaridade entre os isolados do dia de colheita referente às amostras de número 1 a 6 determinados pelo REP podem ser visualizados na Tabela 10 e pelo ERIC na Tabela 11.

Tabela 10. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 1 a 6 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I.

	Dt1a	L3a	L3b	M3a	L4a	N4a	N4c	Bt5a	M5a	N5a	Ed1a	Ed2e	Ed3a	O1a	O1b	O4a	O4b
Dt1a	1,00																
L3a	0,60	1,00															
L3b	0,60	1,00	1,00														
M3a	0,20	0,28	0,28	1,00													
L4a	0,55	0,90	0,90	0,33	1,00												
N4a	0,58	0,76	0,76	0,18	0,63	1,00											
N4c	0,44	0,81	0,81	0,16	0,80	0,73	1,00										
Bt5a	0,60	0,91	0,91	0,28	0,81	0,76	0,90	1,00									
M5a	0,66	0,50	0,50	0,00	0,57	0,61	0,57	0,50	1,00								
N5a	0,63	0,78	0,78	0,15	0,66	0,90	0,76	0,78	0,53	1,00							
Ed1a	0,40	0,63	0,63	0,22	0,70	0,62	0,82	0,73	0,54	0,66	1,00						
Ed2e	0,42	0,44	0,44	0,25	0,50	0,40	0,50	0,44	0,40	0,35	0,61	1,00					
Ed3a	0,57	0,64	0,64	0,13	0,60	0,63	0,69	0,72	0,35	0,75	0,70	0,52	1,00				
O1a	0,50	0,50	0,50	0,66	0,57	0,46	0,42	0,50	0,50	0,40	0,36	0,40	0,23	1,00			
O1b	0,61	0,58	0,58	0,28	0,66	0,71	0,66	0,58	0,88	0,62	0,66	0,54	0,44	0,66	1,00		
O4a	0,50	0,25	0,25	0,00	0,28	0,30	0,28	0,25	0,50	0,40	0,18	0,20	0,23	0,50	0,44	1,00	
O4b	0,30	0,47	0,47	0,28	0,53	0,42	0,53	0,47	0,44	0,37	0,33	0,36	0,33	0,44	0,60	0,44	1,00

Dt: superfície muscular da região traseira da carcaça resfriada; L: água residuária da lavagem das carcaças; Mi: carne das carcaças resfriadas; N: conteúdo intestinal; Bt: superfície da pele úmida da região traseira; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; O: ambiente da sala de matança. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 11. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 1 a 6 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2.

	Dt1a	L3a	L3b	M3a	L4a	N4a	N4c	Bt5a	M5a	N5a	Ed1a	Ed2e	Ed3a	O1a	O1b	O4a	O4b
Dt1a	1,00																
L3a	0,36	1,00															
L3b	0,38	0,96	1,00														
M3a	0,30	0,85	0,88	1,00													
L4a	0,33	0,84	0,88	0,83	1,00												
N4a	0,40	0,69	0,72	0,66	0,84	1,00											
N4c	0,40	0,60	0,63	0,57	0,73	0,62	1,00										
Bt5a	0,37	0,58	0,60	0,54	0,60	0,70	0,47	1,00									
M5a	0,44	0,69	0,72	0,83	0,63	0,63	0,52	0,50	1,00								
N5a	0,50	0,85	0,81	0,69	0,66	0,66	0,66	0,54	0,75	1,00							
Ed1a	0,40	0,69	0,72	0,76	0,73	0,75	0,50	0,58	0,63	0,66	1,00						
Ed2a	0,53	0,60	0,63	0,66	0,73	0,75	0,75	0,47	0,73	0,76	0,75	1,00					
Ed3a	0,53	0,43	0,45	0,47	0,52	0,50	0,62	0,58	0,52	0,57	0,50	0,75	1,00				
O1a	0,58	0,56	0,58	0,60	0,57	0,66	0,55	0,52	0,76	0,69	0,66	0,66	0,55	1,00			
O1b	0,58	0,56	0,58	0,60	0,57	0,66	0,55	0,52	0,76	0,69	0,66	0,66	0,55	1,00	1,00		
O4a	0,35	0,72	0,75	0,69	0,66	0,44	0,44	0,52	0,47	0,52	0,55	0,33	0,22	0,40	0,40	1,00	
O4b	0,33	0,40	0,42	0,33	0,37	0,46	0,30	0,42	0,37	0,44	0,46	0,30	0,15	0,53	0,53	0,53	1,00

Dt: superfície muscular da região traseira da carcaça resfriada; L: água residual da lavagem das carcaças; Mi: carne das carcaças resfriadas; Ni: conteúdo intestinal; Bt: superfície da pele úmida da região traseira; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; O: ambiente da sala de matança. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Na Tabela 10 observa-se que ocorreu percentual de similaridade 100% entre os isolados de água de lavagem da carcaça L3a e L3b, mostrando que ambos pertencem à mesma espécie. Estes isolados diferem entre si bioquimicamente apenas na prova de multiplicação em 3% de cloreto de sódio que não ocorreu com L3a. Conforme TENOVER et al. (1997), métodos fenotípicos são aqueles que caracterizam produtos de expressão gênica para diferenciar isolados. Testes bioquímicos e susceptibilidade a antimicrobianos são exemplos de provas fenotípicas. Pelo fato dessas técnicas envolverem expressão gênica, essas propriedades tendem a variar baseadas nas condições de multiplicação, fase de multiplicação e mutação espontânea das bactérias.

Os isolados de água (L3a, L3b) apresentaram uma maior similaridade, 91% e 90%, respectivamente, com os de pele úmida (Bt5a) e o cultivo de água de lavagem de outra carcaça (L4a), e este apresentou 80 e 81% de similaridade, respectivamente, com os isolados de conteúdo intestinal da mesma carcaça (N4c) e o da pele úmida (Bt5a). Ainda, o conteúdo intestinal (N4a) apresentou 90% de similaridade com N5a, e o isolado de carne (M5a) é 88% similar aos isolados de ambiente (O1b).

Na Tabela 11 onde visualizam-se os resultados para ERIC, observa-se uma menor porcentagem de similaridade entre as mesmas amostras em relação ao REP, excetuando-se a similaridade entre os isolados de água de lavagem da carcaça (L3a e L3b) com o de conteúdo intestinal (N5a) que foi maior, respectivamente, de 85 e 81% e, também, entre os isolados de água de lavagem da carcaça (L4a) com o de conteúdo intestinal pertencente à mesma carcaça (N4a) que foi de 84%. Ainda, o ERIC não identificou 100% de similaridade entre L3a e L3b, atribuindo-lhes semelhança de 96%.

Nas Figuras 4 e 5 observa-se a quantidade de grupos e subgrupos formados devido à diversidade genética das bactérias, respectivamente, para o REP e ERIC.

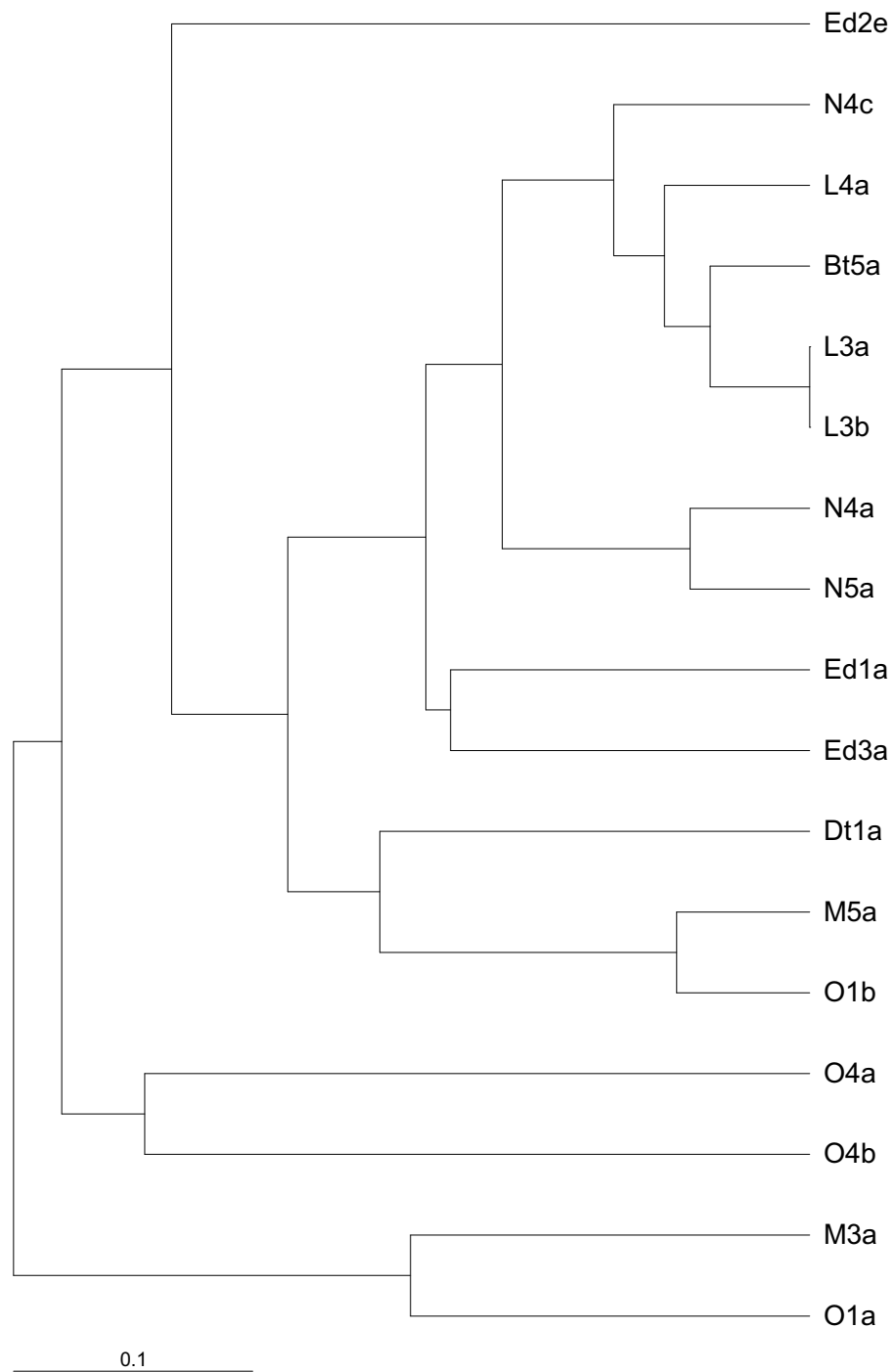


Figura 4. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 1 a 6, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

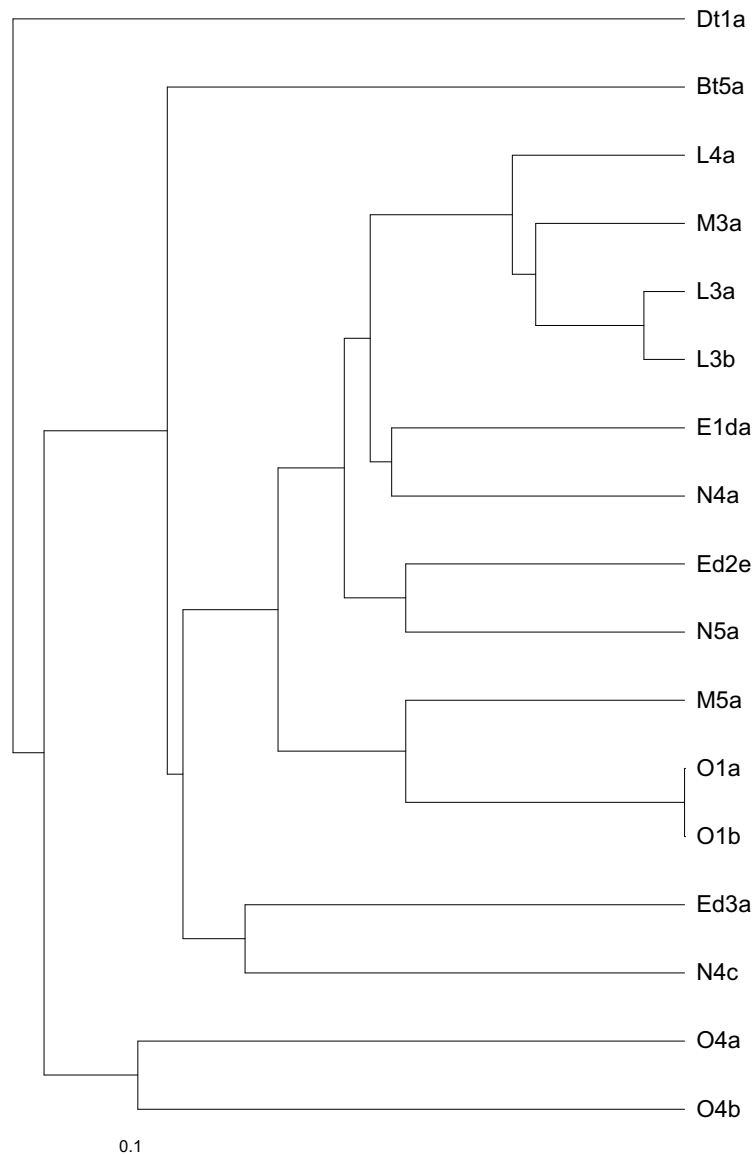


Figura 5. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 1 a 6, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

Os resultados de similaridade entre os isolados do dia de colheita referente às amostras de número 7 a 9 determinados pelo REP podem ser visualizados na Tabela 12 e pelo ERIC na Tabela 13.

Tabela 12. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 7 a 9 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I.

	Ct7a	Ct7b	Dd7e	N7a	L8a	N8a	N8c	Ed9a	Ed9c	I7a	I7b	O7a	O8a	O8c
Ct7a	1,00													
Ct7b	1,00	1,00												
Dd7e	0,72	0,72	1,00											
N7a	0,63	0,63	0,75	1,00										
L8a	0,85	0,85	0,86	0,78	1,00									
N8a	0,60	0,60	0,80	0,72	0,75	1,00								
N8c	0,60	0,60	0,80	0,72	0,75	1,00	1,00							
Ed9a	0,52	0,52	0,72	0,72	0,66	0,69	0,69	1,00						
Ed9c	0,72	0,72	1,00	0,75	0,86	0,80	0,80	0,72	1,00					
I7a	0,70	0,70	0,63	0,52	0,77	0,50	0,50	0,60	0,63	1,00				
I7b	0,70	0,70	0,63	0,52	0,77	0,50	0,50	0,60	0,63	1,00	1,00			
O7a	0,42	0,42	0,50	0,50	0,53	0,35	0,35	0,47	0,50	0,72	0,72	1,00		
O8a	0,50	0,50	0,55	0,44	0,58	0,52	0,52	0,63	0,55	0,46	0,46	0,40	1,00	
O8c	0,18	0,18	0,15	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,15	0,25	0,25	0,40	0,28	1,00

Ct: superfície muscular da região traseira durante a fase de toalete; Dd: superfície muscular da região dianteira da carcaça resfriada; N: conteúdo intestinal; L: água residual da lavagem das carcaças; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento; O: ambiente da sala de matança. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 13. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 7 a 9 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2.

	Ct7a	Ct7b	Dd7e	N7a	L8a	N8a	N8c	Ed9a	Ed9c	I7a	I7b	O7a	O8a	O8c
Ct7a	1,00													
Ct7b	1,00	1,00												
Dd7e	0,66	0,66	1,00											
N7a	0,70	0,70	0,70	1,00										
L8a	0,66	0,66	0,66	0,70	1,00									
N8a	0,73	0,73	0,52	0,77	0,72	1,00								
N8c	0,66	0,66	0,66	0,80	0,83	0,81	1,00							
Ed9a	0,42	0,42	0,42	0,46	0,47	0,40	0,35	1,00						
Ed9c	0,57	0,57	0,57	0,61	0,58	0,53	0,47	0,60	1,00					
I7a	0,66	0,66	0,66	0,71	0,55	0,62	0,55	0,54	0,54	1,00				
I7b	0,66	0,66	0,66	0,71	0,55	0,62	0,55	0,54	0,54	1,00	1,00			
O7a	0,40	0,40	0,53	0,57	0,66	0,50	0,66	0,36	0,36	0,33	0,33	1,00		
O8a	0,37	0,37	0,25	0,26	0,63	0,35	0,42	0,50	0,33	0,30	0,30	0,46	1,00	
O8c	0,42	0,42	0,42	0,61	0,58	0,53	0,47	0,80	0,60	0,72	0,72	0,54	0,50	1,00

Ct: superfície muscular da região traseira durante a fase de toalete; Dd: superfície muscular da região dianteira da carcaça resfriada; N: conteúdo intestinal; L: água residual da lavagem das carcaças; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento; O: ambiente da sala de matança. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Na Tabela 12, os resultados mostram que os isolados de superfície muscular na toaleta (Ct7a e Ct7b) pertencem à mesma espécie. Estes isolados diferem entre si bioquimicamente apenas em relação à produção de indol que não ocorreu em Ct7b. Ambos isolados apresentaram semelhança de 85% com o de água de lavagem da carcaça (L8a) e esta é 86% similar ao isolado de superfície muscular de carcaça refrigerada (Dd7e). O maior valor de similaridade entre os isolados ocorreu entre Dd7e e um isolado de mão (Ed9c) que foi de 100%, indicando que ambos pertencem à mesma espécie e que pode ser visualizado na Figura 6.

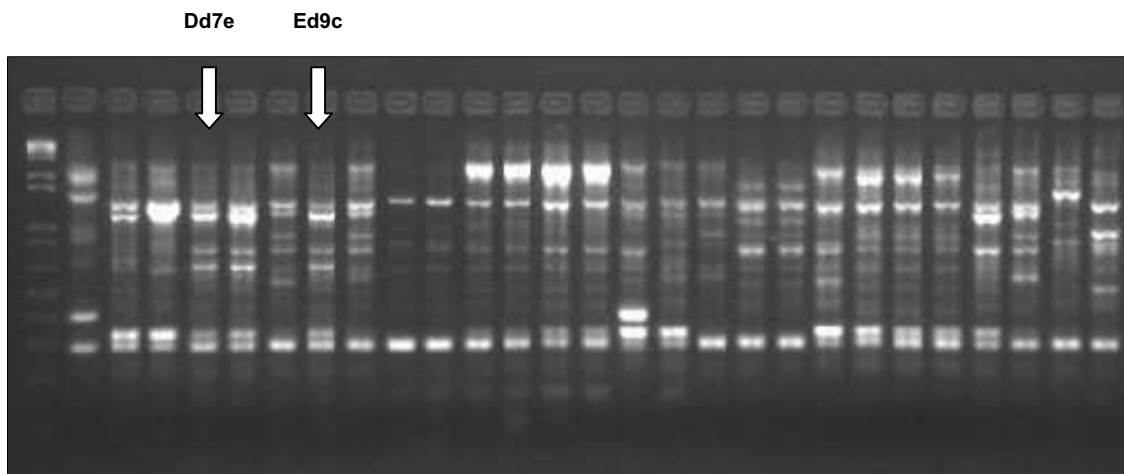


Figura 6. Amplificação dos isolados de *Aeromonas* sp. pelo conjunto de primers REP 1R-I/REP 2-I, mostrando 100% de similaridade entre os isolados Dd7e e Ed9c.

Ainda, o isolado de mão (Ed9c) apresentou semelhança de 86% e 80%, respectivamente, com isolado de água de lavagem de carcaça (L8a) e de conteúdo intestinal (N8a, N8c). Estes dois isolados de conteúdo intestinal também apresentaram similaridade de 100% entre si, mas mostrando resultado diferente nas provas bioquímicas da esculina e salicina para as quais N8c foi negativo.

Para a técnica de ERIC, visualizada na Tabela 13, houve uma concordância com o REP para a similaridade entre os isolados de superfície muscular na toaleta Ct7a e Ct7b, mas não com os isolados de conteúdo intestinal N8a e N8c que compartilharam

81% de semelhança. ERIC determinou maior similaridade em relação ao REP entre os isolados de conteúdo intestinal N7a e N8c que foi de 80% para a primeira e 72% para a segunda técnica. Entretanto, a similaridade entre Ed9c com Dd7e, L8a, N8a e N8c foi substancialmente inferior, sendo, respectivamente de 57%, 58%, 53% e 47%.

Nas Figuras 7 e 8 observa-se a quantidade de grupos e subgrupos formados devido à diversidade genética das bactérias, respectivamente, para o REP e ERIC.

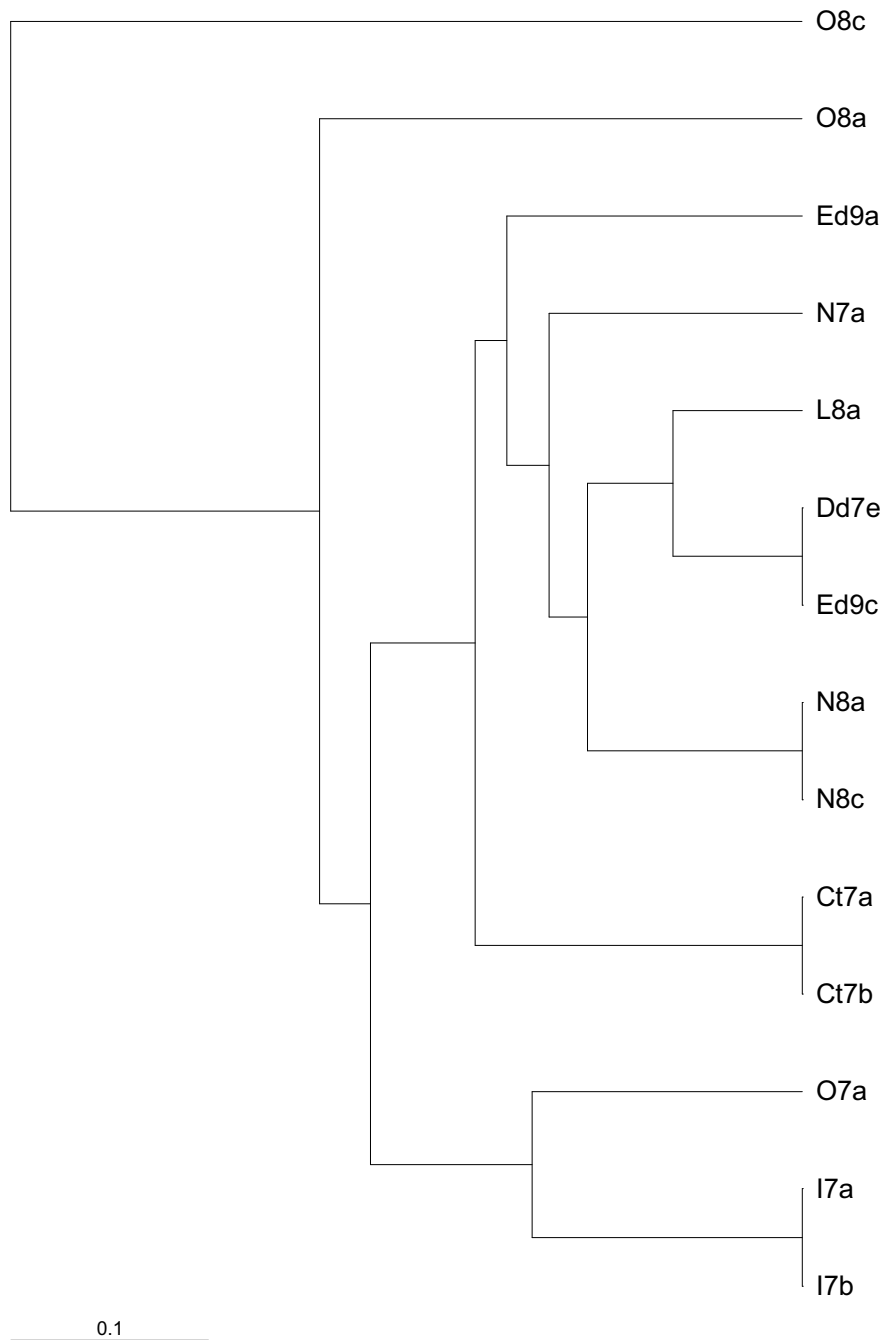


Figura 7. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 7 a 9, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

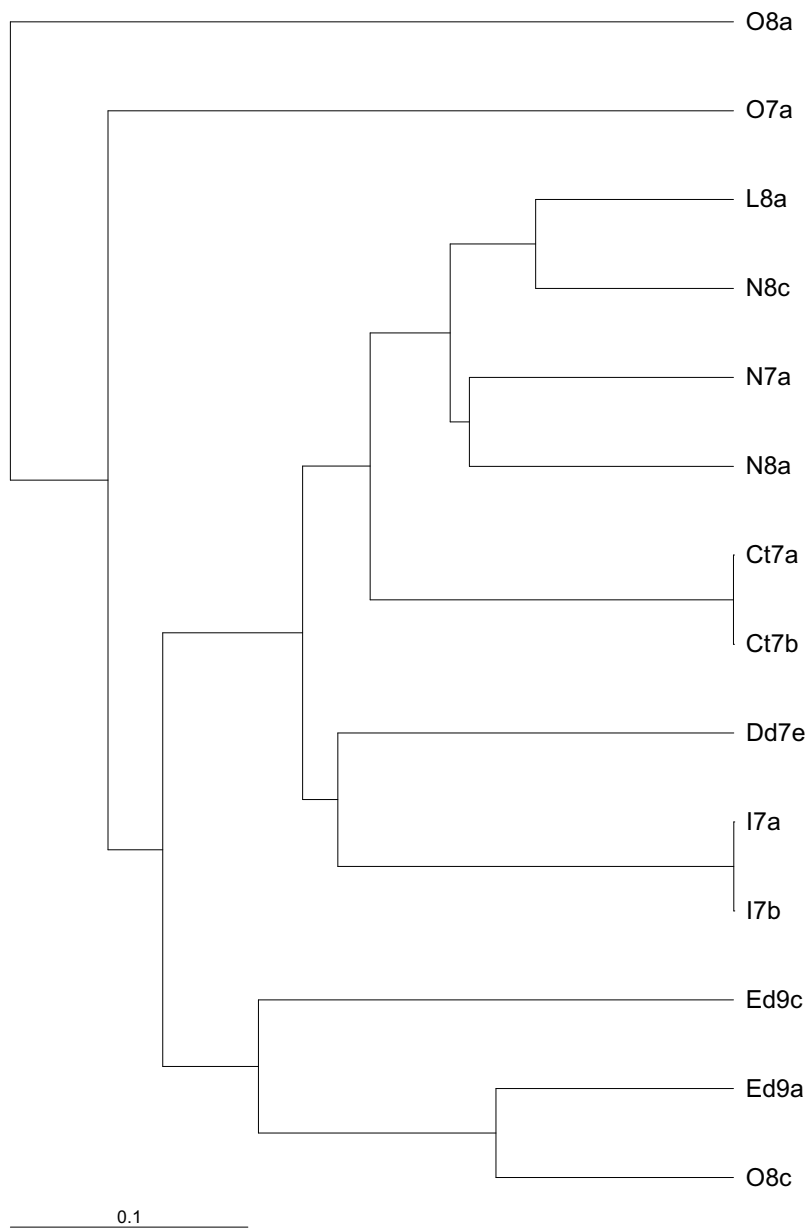


Figura 8. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 7 a 9, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes

Os resultados de similaridade entre os isolados do dia de colheita referente às amostras de número 10 a 12 determinados pelo REP podem ser visualizados na Tabela 14 e pelo ERIC na Tabela 15.

Tabela 14. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 10 a 12 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I.

	Bt12a	M12a	N12a	N12b	Ed10a	Ed10b	Ed11a	Ed12a	Ed12b	I10a
Bt12a	1,00									
M12a	0,62	1,00								
N12a	0,66	0,73	1,00							
N12b	0,28	0,55	0,58	1,00						
Ed10a	0,50	0,37	0,26	0,28	1,00					
Ed10b	0,47	0,76	0,70	0,42	0,23	1,00				
Ed11a	0,50	0,80	0,63	0,44	0,25	0,85	1,00			
Ed12a	0,62	0,70	0,63	0,44	0,50	0,66	0,80	1,00		
Ed12b	0,66	0,73	0,55	0,35	0,40	0,80	0,73	0,73	1,00	
I10a	0,46	0,47	0,62	0,53	0,61	0,55	0,47	0,58	0,37	1,00

Bt: superfície da pele úmida da região traseira; M: carne das carcaças resfriadas; N: conteúdo intestinal; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 15. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 10 a 12 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2.

	Bt12a	M12a	N12a	N12b	Ed10a	Ed10b	Ed11a	Ed12a	Ed12b	I10a
Bt12a	1,00									
M12a	0,88	1,00								
N12a	0,70	0,70	1,00							
N12b	0,70	0,70	1,00	1,00						
Ed10a	0,53	0,53	0,28	0,28	1,00					
Ed10b	0,75	0,75	0,53	0,53	0,46	1,00				
Ed11a	0,73	0,73	0,55	0,55	0,62	0,82	1,00			
Ed12a	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00		
Ed12b	0,33	0,33	0,18	0,18	0,22	0,60	0,46	0,00	1,00	
I10a	0,75	0,75	0,53	0,53	0,61	0,57	0,70	0,00	0,40	1,00

Bt: superfície da pele úmida da região traseira; M: carne das carcaças resfriadas; N: conteúdo intestinal; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; i: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Na Tabela 14, observa-se que os maiores valores de similaridade foram inferiores a 85%. O isolado de mão (Ed11a) apresenta semelhança de 80%, 85% e 80%, respectivamente, com um isolado de carne (M12a) e com isolado de mão de outros dois funcionários (Ed10b e Ed12a). Ainda, a similaridade entre os isolados de conteúdo intestinal N12a e N12b apresentaram semelhança de apenas 58%. Na Tabela 15, observa-se que o ERIC possibilitou a identificação destes dois isolados como pertencentes a mesma espécie; tais isolados diferiram entre si bioquimicamente quanto à produção de indol, descarboxilação da lisina e ornitina e produção de gás a partir da glicose para as quais N12b foi negativo. A amplificação produzida pelos primers ERIC também definiu um padrão de similaridade maior entre alguns isolados em relação ao REP: a similaridade entre os isolados de carne (M12a) e de superfície de pele úmida (Bt2a) foi de 88%; similaridade de 75% do isolado de mão (Ed10b) com isolados de pele úmida (Bt12a) e de carne (M12a). Contudo, em ERIC não ocorreu amplificação de nenhuma banda para um isolado de mão (Ed12a).

Nas Figuras 9 e 10 observa-se a quantidade de grupos e subgrupos formados devido à diversidade genética das bactérias, respectivamente, para o REP e ERIC.

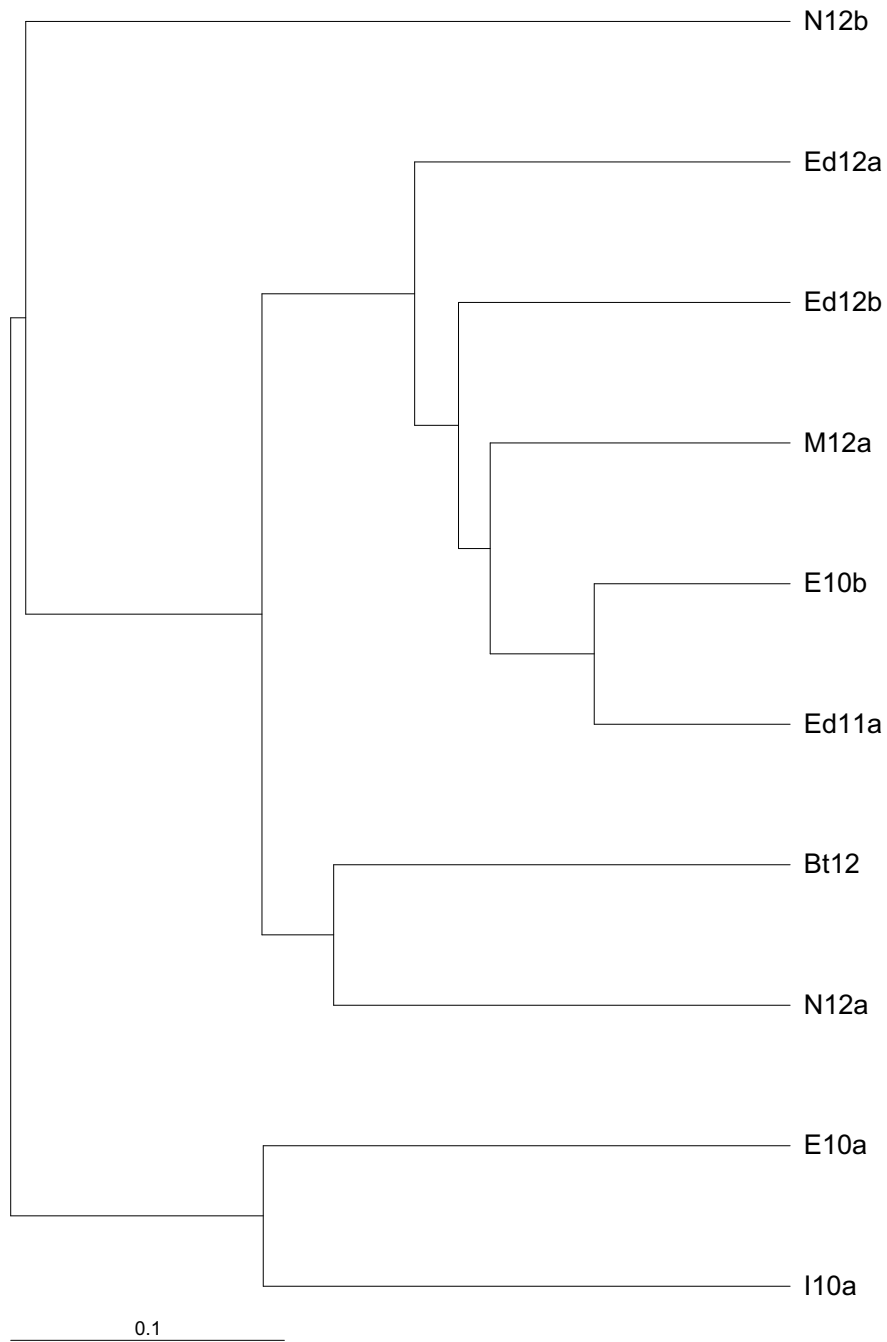


Figura 9. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 10 a 12, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

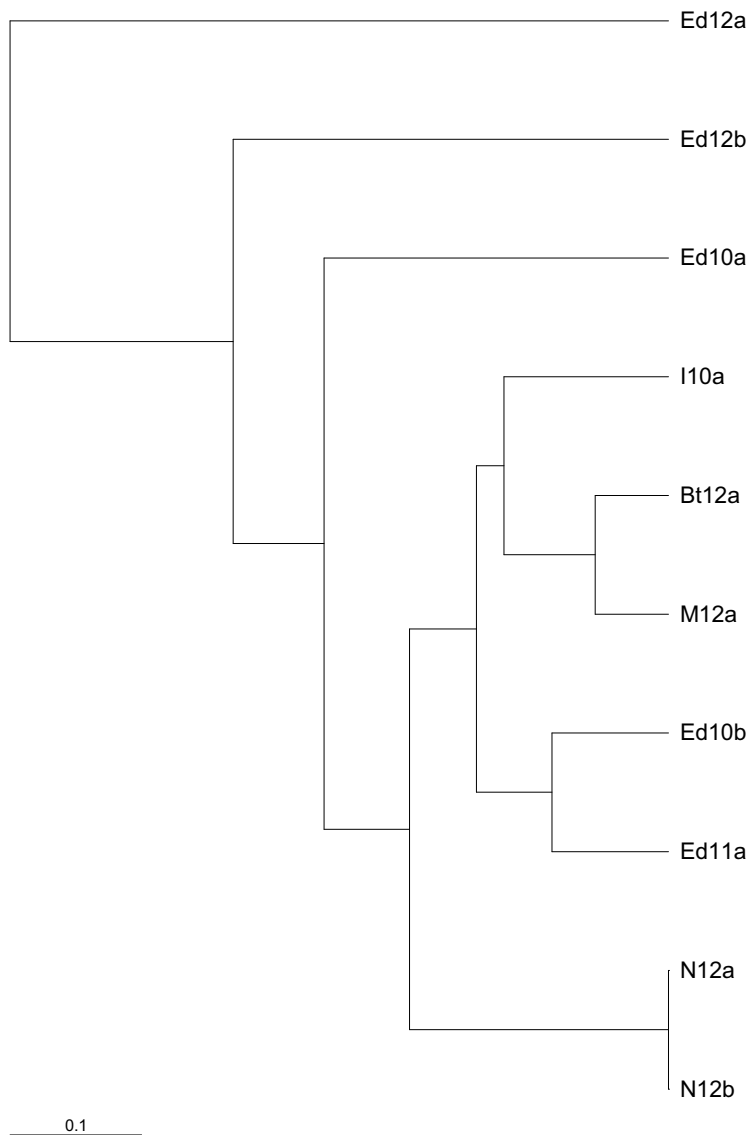


Figura 10. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 10 a 12, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

Os resultados de similaridade entre os isolados do dia de colheita referente às amostras de número 13 a 15 determinados pelo REP podem ser visualizados na Tabela 16 e pelo ERIC na Tabela 17.

Tabela 16. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 13 a 15 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I.

	Bd13a	Cd13a	Cd13b	L13a	L13e	M13a	Dd14a	Bd15a	Bd15d	Bt15a	Cd15a	Cd15b	Ed15d	Ed15e	I13b	I14b	I14d	J14a	J14f	J15a	O13	
Bd13a	1,00																					
Cd13a	0,86	1,00																				
Cd13b	0,86	1,00	1,00																			
L13a	0,81	0,76	0,76	1,00																		
L13e	0,55	0,58	0,58	0,75	1,00																	
M13a	0,81	0,76	0,76	1,00	0,75	1,00																
Dd14a	0,72	0,76	0,76	0,70	0,75	0,70	1,00															
Bd15a	1,00	0,86	0,86	0,81	0,55	0,81	0,72	1,00														
Bd15d	1,00	0,86	0,86	0,81	0,55	0,81	0,72	1,00	1,00													
Bt15a	0,86	0,81	0,81	0,85	0,58	0,85	0,57	0,86	0,86	1,00												
Cd15a	0,86	0,81	0,81	0,85	0,58	0,85	0,57	0,86	0,86	1,00	1,00											
Cd15b	0,86	0,81	0,81	0,85	0,58	0,85	0,57	0,86	0,86	1,00	1,00	1,00										
Ed15d	0,76	0,60	0,60	0,73	0,53	0,73	0,73	0,76	0,76	0,76	0,60	0,60	1,00									
Ed15e	0,76	0,60	0,60	0,73	0,53	0,73	0,73	0,76	0,76	0,76	0,60	0,60	1,00	1,00								
I13b	0,63	0,55	0,55	0,58	0,30	0,58	0,58	0,63	0,63	0,63	0,55	0,55	0,75	0,75	1,00							
I14b	0,76	0,70	0,70	0,84	0,53	0,84	0,52	0,76	0,76	0,76	0,80	0,80	0,55	0,55	0,62	1,00						
I14d	0,76	0,80	0,80	0,73	0,66	0,73	0,73	0,76	0,76	0,76	0,80	0,80	0,55	0,55	0,62	0,66	1,00					
J14a	0,63	0,57	0,57	0,60	0,37	0,60	0,60	0,63	0,63	0,63	0,66	0,66	0,52	0,52	0,70	0,63	0,63	1,00				
J14f	0,63	0,66	0,66	0,58	0,46	0,58	0,58	0,63	0,63	0,63	0,66	0,66	0,62	0,62	0,57	0,62	0,50	0,58	1,00			
J15a	0,63	0,57	0,57	0,60	0,37	0,60	0,60	0,63	0,63	0,63	0,66	0,66	0,52	0,52	0,70	0,63	0,63	1,00	0,58	1,00		
O13	0,55	0,58	0,58	0,62	0,33	0,62	0,37	0,55	0,55	0,55	0,58	0,58	0,53	0,53	0,61	0,66	0,40	0,50	0,61	0,50	1,00	

Bd: superfície da pele úmida da região dianteira; Bt: superfície da pele úmida da região traseira; Cd: superfície muscular da região dianteira durante a fase de toalete; L: água residuária da lavagem das carcaças; M: carne das carcaças resfriadas; Dd: superfície muscular da região dianteira da carcaça resfriada; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento; J: água sem tratamento; O: ambiente da sala de matança. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Tabela 17. Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Aeromonas* sp. das amostras de número 13 a 15 obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986) baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2.

	Bd13a	Cd13a	Cd13b	L13a	L13e	M13a	Dd14a	Bd15a	Bd15d	Bt15a	Cd15a	Cd15b	Ed15d	Ed15e	I13b	I14b	I14d	J14a	J14f	J15a	O13	
Bd13a	1,00																					
Cd13a	0,70	1,00																				
Cd13b	0,70	1,00	1,00																			
L13a	0,70	0,84	0,84	1,00																		
L13e	0,53	0,47	0,47	1,00	1,00																	
M13a	0,70	0,84	0,84	1,00	0,28	1,00																
Dd14a	0,53	0,58	0,58	0,71	0,33	0,71	1,00															
Bd15a	1,00	0,70	0,70	0,70	0,53	0,70	0,53	1,00														
Bd15d	1,00	0,70	0,70	0,70	0,53	0,70	0,53	1,00	1,00													
Bt15a	0,61	0,53	0,53	0,66	0,20	0,66	0,80	0,61	0,61	1,00												
Cd15a	0,61	0,53	0,53	0,66	0,20	0,66	0,80	0,61	0,61	1,00	1,00											
Cd15b	0,62	0,66	0,66	0,66	0,15	0,66	0,61	0,62	0,62	0,62	0,54	1,00										
Ed15d	0,62	0,66	0,66	0,66	0,15	0,66	0,61	0,62	0,62	0,62	0,54	1,00	1,00									
Ed15e	0,66	0,58	0,58	0,71	0,00	0,71	0,50	0,66	0,66	0,66	0,60	0,60	1,00	1,00								
I13b	0,61	0,40	0,40	0,50	0,00	0,50	0,40	0,61	0,61	0,61	0,50	0,50	0,60	0,61	1,00							
I14b	0,66	0,58	0,58	0,42	0,50	0,42	0,33	0,66	0,66	0,66	0,40	0,40	0,40	0,61	1,00	1,00						
I14d	0,50	0,42	0,42	0,54	0,44	0,54	0,44	0,50	0,50	0,50	0,57	0,57	0,20	0,20	0,22	0,28	1,00					
J14a	0,61	0,53	0,53	0,50	0,60	0,50	0,40	0,61	0,61	0,61	0,50	0,50	0,36	0,36	0,20	0,25	0,40	1,00				
J14f	0,71	0,62	0,62	0,61	0,36	0,61	0,54	0,71	0,71	0,71	0,66	0,66	0,66	0,66	0,54	0,44	0,54	0,50	1,00			
J15a	0,71	0,62	0,62	0,61	0,36	0,61	0,54	0,71	0,71	0,71	0,66	0,66	0,66	0,66	0,54	0,44	0,54	0,50	0,66	1,00		
O13	0,71	0,50	0,50	0,46	0,36	0,46	0,18	0,71	0,71	0,71	0,22	0,22	0,50	0,50	0,54	0,66	0,54	0,50	0,66	0,60	1,00	

Bd: superfície da pele úmida da região dianteira; Bt: superfície da pele úmida da região traseira; Cd: superfície muscular da região dianteira durante a fase de toalete; L: água residual da lavagem das carcaças; M: carne das carcaças resfriadas; Dd: superfície muscular da região dianteira da carcaça resfriada; Ed: superfície das mãos dos manipuladores durante o trabalho; I: superfície do piso e ralo da câmara de resfriamento; J: água sem tratamento; O: ambiente da sala de matança. Os números arábicos representam o número da amostra. As letras minúsculas localizadas após o número da amostra representam a identificação do(s) cultivo(s) da mesma.

Na Tabela 16, as ampliações produzidas pelo REP identificaram como pertencentes à mesma espécie vários pares de isolados de uma mesma amostra: superfície muscular da carcaça na toalete (Cd13a e Cd13b; Cd15a e Cd15b), pele úmida (Bd15a, Bd15d e Bt15a), mão (Ed15d e Ed15e), de piso da câmara de resfriamento (I14b e I14d) e água sem tratamento (J14a e J15a). Também ocorreu 100% de similaridade entre os isolados de água de lavagem da carcaça (L13a) e carne (M13a). Percentuais de similaridade superiores ou iguais a 84% foram: 84% entre isolado de piso da câmara de resfriamento (I 14b) com o de água de lavagem de carcaça (L13a) e de carne (M13a); 85% de superfície muscular da carcaça na toalete (Cd15a e Cd15b) com L13a e M13a; 86% de Cd15a e Cd15b com os da pele úmida (Bd15a, Bd15d e Bt15a); 86% de superfície muscular da carcaça na toalete (Cd13a e Cd13b) com os da pele úmida (Bd15a, Bd15d e Bt15a).

Em ERIC ocorreu a confirmação de 100% de similaridade para os mesmos isolados de REP (Cd13a e Cd13b; Cd15a e Cd15b; Bd15a, Bd15d e Bt15a; Ed15d e Ed15e; L13a e M13a), com exceção de I14b com I14d e J14a com J15a que apresentaram, respectivamente, 60% e 50% de semelhança. Em relação à similaridade dos demais isolados, ERIC obteve um valor inferior quando comparado com os valores de REP, com exceção da semelhança entre superfície muscular da carcaça na toalete (Cd13a e Cd13b) e água de lavagem de carcaça (L13a) que foi de 84%.

Nas Figuras 11 e 12 observa-se a quantidade de grupos e subgrupos formados devido à diversidade genética das bactérias, respectivamente, para o REP e ERIC.

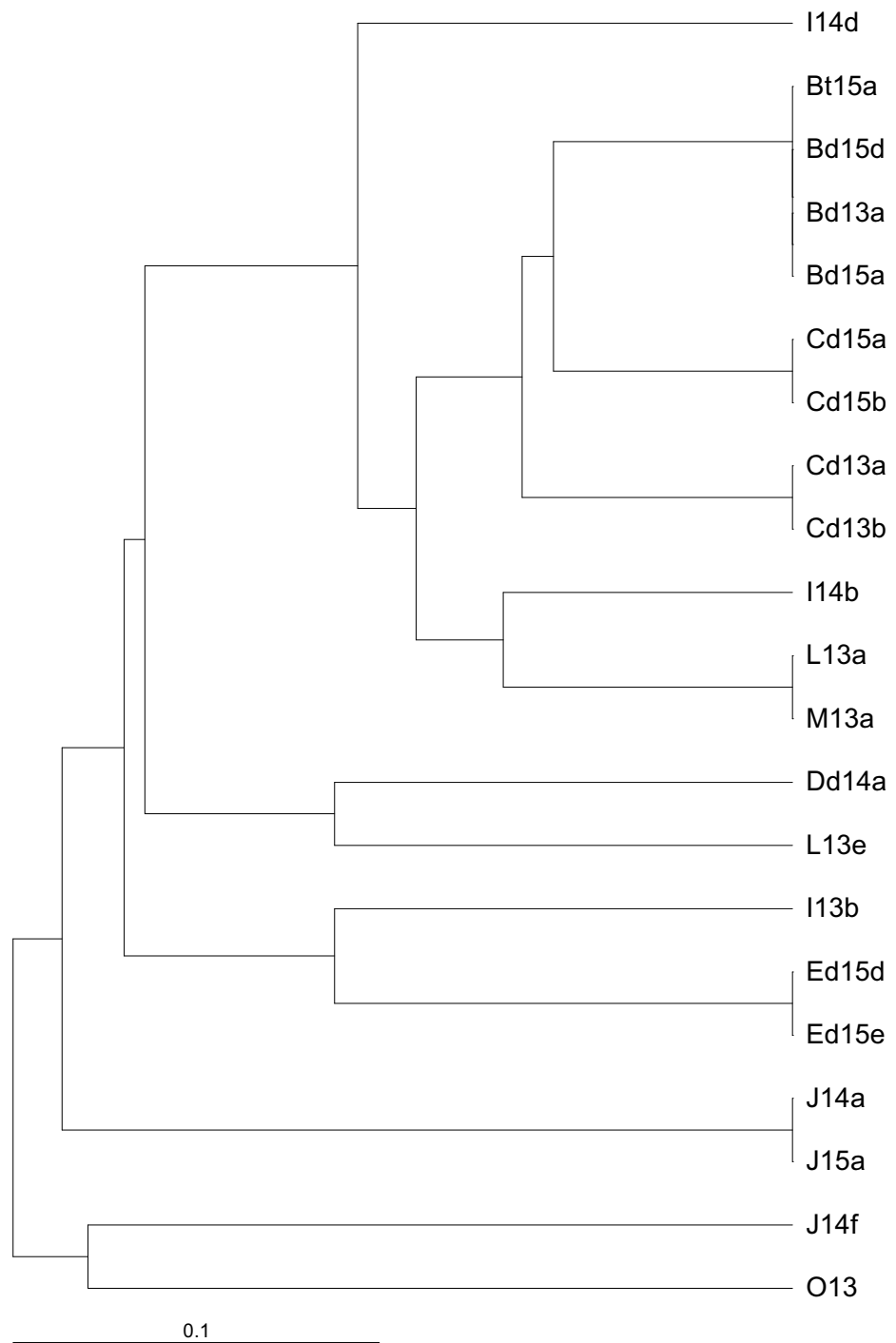


Figura 11. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 13 a 15, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers REP 1R-I e REP2-I, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

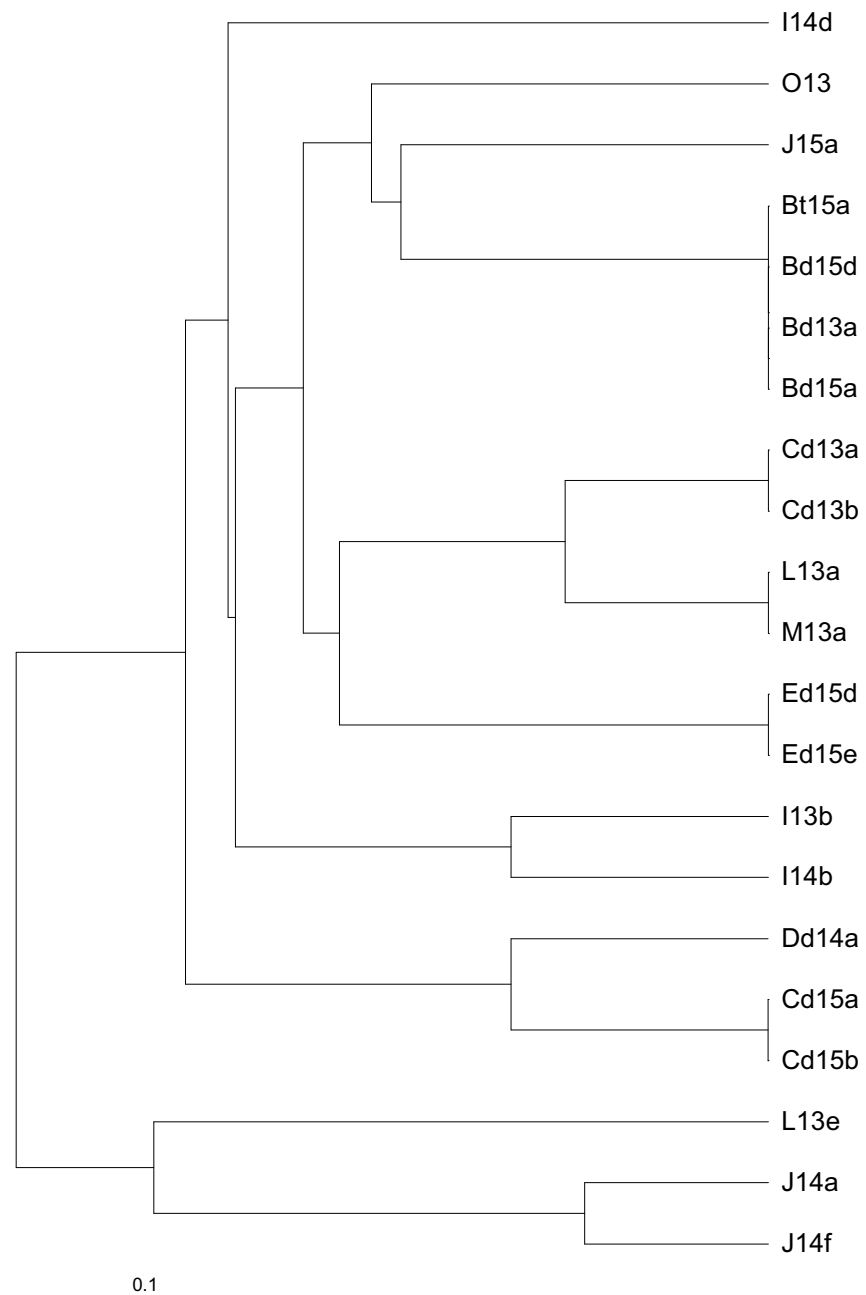


Figura 12. Filograma revelando o agrupamento obtido com os isolados de *Aeromonas* sp. de número 13 a 15, baseado na amplificação das bandas de DNA pelos primers ERIC 1R e ERIC 2, pelo método UPGMA com bootstrap de 1000 vezes.

Foi possível observar a ocorrência de 100% de similaridade entre alguns isolados para ambas técnicas utilizadas, contudo, nenhuma delas possibilitou a

identificação precisa da origem da aeromonas dentro da indústria, pois tal semelhança ocorreu com os isolados de uma mesma amostra com semelhança entre si ou de pontos na mesma carcaça e, mesmo, com outras carcaças, como os isolados obtidos das amostras de carne, água de lavagem da carcaça, pele úmida ou superfície muscular.

Dentre os isolados que poderiam atuar como fonte de contaminação e/ou disseminação (pele, mãos dos funcionários, água, conteúdo intestinal, piso e parede da câmara de resfriamento e ambiente da sala de abate), somente o isolado de mão (Ed9c) compartilhou 100% de similaridade com superfície muscular da carcaça resfriada (Dd7e). Tal dado possibilita inferir que muito embora os manipuladores não estejam atuando como fonte primária de contaminação das carcaças, podem atuar como disseminadores da bactéria, uma vez que Dd7e refere-se à região dianteira da carcaça. Por sua vez, esta região consiste em um local onde os manipuladores podem tocar a carcaça no momento de movê-la em locais que não possuem nória automática como a câmara de refrigeração.

Ocorreram semelhanças acima de 85% entre alguns isolados. Dentre estes, destacam-se para a técnica de REP: 88% de semelhança entre um isolado de ambiente (O1b) e carne (M5a); 90% entre conteúdo intestinal (N4c) e pele úmida (Bt5a) e 91% entre este e água de lavagem da carcaça (L3a, L3b). Para a técnica de ERIC, destacam-se: 85% de semelhança entre um isolado de conteúdo intestinal (N5a) e água de lavagem de carcaça (L3a); 88% entre pele úmida (Bt12a) e carne (M12a).

Apesar da real fonte de contaminação não ter sido determinada precisamente pode-se inferir que o possível ponto que estaria atuando como fonte de contaminação seria o conteúdo intestinal, pois SZCZUKA & KAZNOWSKI (2004) consideram que existe relação genética entre os isolados quando os mesmos compartilham acima de 90% de similaridade. Ainda, apesar dos métodos genotípicos estarem menos sujeitos à variação natural em relação às provas fenotípicas, os mesmos podem ser afetados por inserções ou deleções de DNA no cromossomo – ganho ou perda de DNA extracromossômico ou mutações ao acaso (TENOVER, et al., 1997).

Muito embora a técnica de ERIC tenha produzido maior número de bandas para algumas amostras em relação ao REP, esta técnica possibilitou a detecção de um valor de similaridade mais alto entre os isolados. Diferentemente, outros autores (SOLER et al., 2003; SZCZUKA & KAZNOWSKI, 2004) que testaram a associação de REP e ERIC com outras técnicas classificaram REP como de menor eficiência para diferenciação dos isolados de *Aeromonas* sp. e sugerem a associação de outros métodos como RFLP, RAPD, BOX e ERIC. Segundo DAVIN-REGLI et al. (1998) a utilização de uma combinação de mais de um método molecular é importante, pois aumenta o potencial discriminatório por detectar um número mais alto de polimorfismos, aumentando, assim, a confiança no resultado.

5 CONCLUSÕES

As *Aeromonas* sp. podem estar presentes no ambiente de abate, havendo risco de contaminação das carcaças em qualquer etapa do fluxograma de abate;

Os resultados permitiram inferir que os funcionários podem atuar como disseminadores do microrganismo. Apesar da real fonte de contaminação não ter sido determinada precisamente, pode-se inferir que o conteúdo intestinal seria uma importante fonte de contaminação.

A quantificação direta das aeromonas só foi conseguida em 12 amostras cujas populações variaram de $0,5 \times 10^0$ UFC/cm² a $9,2 \times 10^0$ UFC/cm². Embora seja uma população reduzida, salienta-se o caráter psicrotrófico do agente e consequente possibilidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração.

O teste de susceptibilidade antimicrobiana revelou perfil de multirresistência dos isolados;

As cepas de maior relevância isoladas corresponderam à *A. sobria* e *A. caviae*, que são considerados microrganismos patogênicos, sendo esta última a de maior prevalência;

A presença de aeromonas não só na indústria, mas principalmente na carne, indica a necessidade da melhoria das boas práticas de fabricação, pois existe a possibilidade desses microrganismos causarem enfermidade de origem alimentar nos consumidores.

6 REFERÊNCIAS⁹

ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.6, p.2348-2357, 2003.

ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C.A.; WEKELL, M.M.; STOFF, R.F. Incidence of motile aeromonads from United States west coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.10, p.849-855, 1990.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

ARAÚJO, R.M.; ARRIBAS, R.M.; LUCENA, F.; PARES, R. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.213-217, 1989.

⁹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NRB-6023, Agosto/2002

BAUAB, T.M.; LEVY, C.E.; RODRIGUES, J.; FALCÃO, D.P. Niche-specific association of *Aeromonas* ribotypes from human and environmental origin. **Microbiology Immunology**, Tokyo, v.47, n.1, p.1-16, 2003.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.334-339, 2001

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in read meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, Barking, v.62, p.381-390, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 5 de 8 de novembro de 1988. Aprova a padronização de cortes de carne bovina. **Diário Oficial [da] União**, Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 1988. seção 1. pt. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952: alterado pelos Decretos nº 1255 de 25 junho de 1962, nº 1236 de 02 setembro de 1994, nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996, nº 2244 de 04 junho de 1997. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 1997. 241 p.

BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **Journal of Food Safety**, Westport, v.17, p.15-29, 1985.

CAHILL, M.M.; Mac RAE, I.C. Characteristics of O/129 sensitive motile *Aeromonas* strains isolated from fresh water on starch-ampicillin agar. **Microbial Ecology**, New York, v.24, p.215-226, 1992.

CAMPOS, H. **Estatística experimental não paramétrica**. 4^a ed. São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1983. 332p. [Apostila]

CHALLAPALLI, M.; TESS, B.R.; CUNNINGHAM, D.G.; CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. *Aeromonas* associated diarrhea in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.7, p.693-698, 1988.

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

COLLINS, M.D.; MARTINEZ-MURCIA, A.; CAI, J. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, n.4, p.855-856, 1993.

DAVIN-REGLI, A.; BOLLET, C.; CHAMOREY, E.; COLONNA D'ISTRIA, V.; CREMIEUX, A. A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 47, p. 499-504, 1998.

DOHERTY, A.; SHERIDAN, J.J.; ALLEN, P.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S.; HARRINGTON, D. Survival and growth of *Aeromonas hydrophila* on modified atmosphere packaged normal and high pH lamb. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, p.379-392, 1996.

FURUWATARI, C.; KAWAKAMI, Y.; AKAHANE, T.; HIDAKA, E.; OKIMURA, Y.; NAKAYAMA, J.; FURIHATA, K.; KATSUYAMA, T. Proposal for an Aeroschem (modified Aerokey II) for the identification of clinical *Aeromonas* species. **Medical Science Research**, Hagerstown, v. 22, p. 617-619, 1994.

GAVÍN, R.; RABAAN, A.A.; MERINO, S.; TOMÁS, J.M.; GRYLLOS, I.; SHAW, J.G. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Salem, v.43, n.2, p.383-397, 2002.

GILL, C.O.; JONES, T. Occurrence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two slaughtering plants. **Food Microbiology**, London, v.12, n.2, p.135-141, 1995.

GILL, C.O.; REICHEL, M.P. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. **Food Microbiology**, London, v.6, p.223-230, 1989.

GOÑI-URRIZA, M.; PINEAU, L.; CAPDEPUY, M.; ROQUES, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.46, p.297-301, 2000.

GRAY, S.J.; STICKLER, D. J. Some observations in the faecal carriage of mesophilic *Aeromonas* species in cows and pigs. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.103, p.523-537, 1989.

GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S. *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.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, Berkshire, v.51, p.731-735, 2001.

HANNA INSTRUMENTS. Ion specific meters. 1997.

HANNINEN, M.L.; SALMI, S.; MATTILA, L.; TAIPALINEN, R.; SIITONEN, A. Association of *Aeromonas* spp. with travellers' diarrhoea in Finland. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.42, p.26-31, 1995.

HARF-MONTEIL, C.; LeFLÈCHE, A.; RIEGEL, P.; PRÉVOST, G.; BERMOND, D.; GRIMONT, P.A.D.; MONTEIL, H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.481-485, 2004.

HARVEY, J.; NORWOOD, D.E.; GLIMOUR, A. Comparison of repetitive element sequence-based PCR with multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field gel electrophoresis for typing *Listeria monocytogenes* food isolates. **Food Microbiology**, London, v.21, p.305-312, 2004.

HAVELAAR, A.H.; DURING, M.; VERSTEEGH, J.F.M. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.62, p.279-287, 1987.

HAVELAAR, A.H.; VONK, M. The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.7, p.169-171, 1988.

HUDSON, J.A.; LACY, K.M. Incidence of motile Aeromonads in New Zealand retail foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.9, p.696-699, 1991.

HUDSON, J.A.; MOTT, S.J.; PENNEY, N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.204-208, 1994.

ISONHOOD, J.H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, n.3, p.575-582, 2002.

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, n.4, p.397-410, 1991.

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

JANDA, J.M.; DUFFEY, P.S. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. **Review of Infectious Diseases**, Washington, v.10, p.980-997, 1988.

JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.M. Update on the genus *Aeromonas*: despite progress, many questions about this pathogen remain unanswered. **ASM News**, Ann Arbor, v.66, p.218-223, 2000.

JOSEPH, S.W.; DAILY, O.P.; HUNT, W.S.; SEIDLER, R.J.; ALLEN, D.A; COLWELL, R.R. *Aeromonas* primary wound infection of a diver in polluted waters. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.10, n.1, p.46-49, 1979.

KANG, H.P.; DUNNE, W.M. Stability of repetitive-sequence PCR patterns with respect to culture age and subculture frequency. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.6, p.2694-2696, 2003.

KINGOMBE, C.I.B.; HUYS, G.; TONOLLA, M.; ALBERT, J.M.; SWINGS, J.; PEDUZZI, R.; JEMMI, T. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.5293-5302, 1999.

KIRKAN, S.; GÖKSOY, E.Ö.; KAYA, O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.B50, p.339-342, 2003.

KIROV, S. M. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers: Doyle, M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. (Eds.). ***Aeromonas and Plesiomonas species***. Washington D. C.: ASM Press,1997. pp 265-287.

KIROV, S.M.; BRODRIBB, F. Exotoxin production by *Aeromonas* spp. in foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.17, p.208-211, 1993.

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

KNOCHEL, S. Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp isolated from different environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, n.3/4, p.235-244, 1990.

KO, W.C.; YU, K.W.; LIU, C.Y.; HUANG, C.T.; LEU, H.S.; CHUANG, Y.C. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.40, n.5, p.1260-1262, 1996.

KHURANA, R.; KUMAR, A. Prevalence of motile aeromonads in foods of animal origin. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.34, n.3, p.228-229, 1997.

LAACK, R.L.J.M. van; JOHNSON, J.L.; PALEN, C.J.N.M.; van der S, SMULDERS, F.J.M.; SNIJDERS, J.M. A. Survival of pathogenic bacteria on pork lions as influenced by hot processing and packaging. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, p.847-851, 1993.

LUKINMAA, S.; NAKARI, U-M.; EKLUND, M.; SIITONEN, A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. **APMIS**, Kobenhavn, v.112, p.908-929, 2004.

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

MAJEED, K.N.; EGAN, A.F.; Mac RAE, I.C. Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.165-170, 1989.

MAJEED, K.N.; EGAN, A.F.; Mac RAE, I.C. Production of exotoxins by *Aeromonas* spp at 5°C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.69, p.332-337, 1990.

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.

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.237-242, 2002.

MASSA, S.; ALTIERI, C.; D' ANGELA, A. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural water and well water. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.63, p.169-173, 2001.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; THOMAS, J. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, p.157-168, 1995.

MIÑANA-GALBIS, D.; FARFÁN, M.; FUSTÉ, M.C.; LORÉN, J.G. *Aeromonas molluscorum* sp. nov. isolated from bivalve molluscs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.2073-2078, 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5.ed. Wayne, 2003 (Approved Standards, M7-A5, v.20, n.2)

NEI, M. Definition and estimation of fixation indices. **Evolution**, Laurence, v.40, n.3, p.643-645, 1986.

NEVES, M.S.; NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.D. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.1, p.78-80, 1990.

NEWTON, K.G.; HARRISON, J.C.I.; WAUTERS, A.M. Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.45, p.75-82, 1978.

ORMEN, O.; GRANUM, P.E.; LASSEN, J.; FIGUERAS, M.J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v.113, p.03-207, 2005.

PAGE, R.D.M. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational Applied Bioscience**, Oxford, v.12, p.357-358, 1996.

PALÚ, A.P.; GOMES, L.M.; MIGUEL, M.A.L.; BALASSIANO, I.T.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; OLIVEIRA, S.S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**, London, v.23, p.504-509, 2006.

PALUMBO, S.A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A.C.; BUCHANAN, R.L.; THAYER, D.W. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.1027-1030, 1985.

PEMBERTON, J.M.; KIDD, S.P.; SCHMIDT R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.152, p.1-10, 1997.

PIDIYAR, V.; KAZNOWSKY, A.; BADRI NARAYAN, N.; PATOLE, N.; SHOUCHE, Y. S. *Aeromonas culicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.52, p.1723-1728, 2002.

POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluver and Van Niel. In: DRIEG, N.R. (Ed.). **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. p.545-548.

POPOFF, M.; COYNAULT, C.; KIREDJIAN, M.; LEMELIN, M. Polinucleotide sequence relatedness among *Aeromonas* species. **Current Microbiology**, New York, v.5, p.109-114, 1981.

PRENDERGAST, D.M.; DALY, D.J.; SHERIDAN, J.J.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S. The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. **Food Microbiology**, London, v.21, p.589-596, 2004.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F.H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, p.261-266, 2003.

REBOLI, A.C.; HOUSTON, E.D.; MONFORTE, J.S.; WOOD, C.A.; HAMILL, R. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated dna fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.11, 1994.

ROSSI JÚNIOR, O.D.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A. Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.5, p.549-553, 2000a.

ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas* da superfície das mãos de manipuladores de carne bovina, em matadouro-frigorífico do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.78/79, p.90-94, 2000b.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Enterotoxigenicidade de cepas de *Aeromonas* sp. isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.5, p.589-594, 2001.

ROSSI JUNIOR, O.D.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Bacteria of the genus *Aeromonas* in different locations throughout the process line of beef slaughtering. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.101, n.557-558, p.125-129, 2006.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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**, Oxford, v.97, p.1077-1086, 2004.

SHARMA, A.; DUBEY, N.; SHARAN, B. Characterization of aeromonads isolated from the river Narmada, India. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v.208, p.425-433, 2005.

SINGH, U. Isolation and identification of *Aeromonas* spp from ground meats in Eastern Canada. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.2, p.125-130, 1997.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

SOLER, L.; FIGUERAS, M.J.; CHACON, M.R.; GUARRO, J.; MARTINEZ-MURCIA, A.J. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.00, p.341-349, 2003.

STERN, N.J.; DRAZED, E.S.; JOSEPH, S.W. Low incidence of *Aeromonas* spp. in livestock feces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, p.66-69, 1987.

SZCZUKA, E.; KAZNOWSKI, A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.1, p.220-228, 2004.

TACÃO, M.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.88, p.173-179, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection and Control Hospital Epidemiology**, Chicago, v.18, n.6, p.426-439, 1997.

THORNLEY, J.P.; GRYLLOS, I.; ELEY, A. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species. **Review Medical Microbiology**, v.8, p.61-72, 1997.

TSAI, G.J.; CHEN, T.H. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, p.121-131, 1996.

VERSALOVIC, J.T.; KOEUTH, T; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.6823-6831, 1991.

WANG, C.; SILVA, J.L. Prevalence and characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, n.1, p.30-34, 1999.

WALKER, S.T.; BROOKS, J. Survey of the incidence of *Aeromonas* and *Yersinia* species in retail foods. **Food Control**, Guilford, v.4, n.1, p.34-40, 1993.

WOODS, C.R.; VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using dna fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.11, 1992.

YADAV, A.S.; KUMAR, A. Prevalence of enterotoxigenic motile aeromonads in children, fish, milk and ice-cream and their public health significance. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.31, suppl.1, p.153-156, 2000.

YAMADA, S.; MATSUSHITA, S.; DEJSIRILET, S.; KUDOH, Y. Incidence and clinical symptoms of *Aeromonas*-associated traveller's diarrhoea in Tokyo. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.119, p.121-126, 1997.