

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Aeromonas* NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS TIPOS
MINAS FRESCAL E COLONIAL DA REGIÃO NOROESTE
DO RIO GRANDE DO SUL**

**Natacha Deboni Cereser
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Aeromonas* NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS TIPOS
MINAS FRESCAL E COLONIAL DA REGIÃO NOROESTE
DO RIO GRANDE DO SUL**

Natacha Deboni Cereser

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior

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

**Jaboticabal-SP
Outubro de 2009**

Cereser, Natacha Deboni
C414a *Aeromonas* no processamento de queijos tipos Minas Frescal e Colonial na região Noroeste do Rio Grande do Sul/ Natacha Deboni Cereser. – – Jaboticabal, 2009
xiii, 60 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Prof. Oswaldo Durival Rossi Júnior

Banca examinadora: Prof. Germano Francisco Biondi, Dr. Luiz Francisco Zafalon, Profa. Angela Cleusa de Fátima Banzato de Carvalho, Prof. Antonio Nader Filho

Bibliografia

1. *Aeromonas*. 2. Qualidade Microbiológica. 3. Saúde Pública. 4. Queijos I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.31:637.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NATACHA DEBONI CERESER - nascida em Cruz Alta, Rio Grande do Sul, em 16 de janeiro de 1981, é Médica Veterinária, formada em dezembro de 2003, pela Universidade de Cruz Alta/UNICRUZ – Cruz Alta, RS. Durante toda a graduação realizou estágios na área de Medicina Veterinária Preventiva em diferentes instituições, foi bolsista de iniciação científica e monitora acadêmica, participou de projetos de extensão e grupos de pesquisa na mesma área. Em fevereiro de 2006 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, onde desenvolveu o projeto da dissertação, como bolsista do CNPq, além de outros trabalhos paralelos na mesma área, período em que também realizou trabalho voluntário ministrando aulas de Biologia no Cursinho Pré-vestibular Popular. Ainda em 2006 concluiu o curso de Especialização em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite e Ovos da Universidade Federal de Lavras/UFLA. Em novembro de 2005 foi selecionada para o Curso de Doutorado na mesma área e instituição em que realizou o Mestrado. Desde junho de 2006 é Médica Veterinária responsável pela Inspeção Veterinária e Zootécnica de Ibirubá-RS, da Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul, desenvolvendo atividades de inspeção higiênico-sanitária de produtos de origem animal e defesa sanitária animal. Atualmente também é docente das disciplinas de Inspeção e Indústria de Carnes e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta-RS, onde atua também na orientação de pesquisas de iniciação científica.

EPÍGRAFE

Sonho Alado

Se os meus sonhos voassem velozes como um raio
Os rumos do mundo inteiro me levariam a meu pago

Se os meus sonhos cantassem com a liberdade das aves
Os cantos da minha terra calariam a voz da guerra

Se dos meus sonhos alados nascesse a realidade
O verde cheiro do pampa perfumaria a cidade

E se sonhando acordasse cheirando a flor da saudade
Eu voaria de volta ao coração do meu Rio Grande

João Chagas Leite

DEDICO

Aos meus pais, Ozene Luiz e Sueli Deboni Cereser, ao meu irmão Rósber e aos meus avós José e Rachel Deboni, pelos exemplos de honestidade, caráter e fé e pela compreensão dos anos que estive longe.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade concedida;

Ao Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior, pela confiança, dedicação, compreensão e orientação durante os estágios, mestrado e doutorado;

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista, Universidade de Passo Fundo e Universidade do Estado do Rio Grande do Sul pela grande colaboração, sem a qual este trabalho não teria condições de ser realizado;

Ao meu noivo Eduardo e sua família, pelo amor e afeto que têm me dedicado e por se mostrarem grandes incentivadores apesar da minha ausência;

A toda minha família pelo apoio e incentivo mesmo estando distante;

Aos amigos de longa data e as amizades construídas durante o Doutorado pelo companheirismo e incentivo, especialmente nos momentos difíceis enfrentados neste período;

Aos supervisores e colegas da Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul e da Universidade de Cruz Alta, por tornarem possível conciliar as minhas atividades de pós-graduação com os compromissos do trabalho;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho;

SUMÁRIO

Assunto	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Caracterização do Gênero <i>Aeromonas</i>	3
2.1.1 Resistência a antimicrobianos.....	9
2.2 Veiculação da <i>Aeromonas</i> sp. pela água.....	13
2.3 Leite e derivados envolvidos na veiculação da <i>Aeromonas</i> sp.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Caracterização dos estabelecimentos.....	19
3.1.1 Usina de beneficiamento.....	19
3.1.2 Fazenda leiteira.....	20
3.2 Caracterização das amostras estudadas.....	21
3.3 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras.....	22
3.4 Metodologia empregada no isolamento de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	24
3.4.1 Preparo das amostras e enriquecimento seletivo.....	24
3.4.2 Plaqueamento seletivo.....	24
3.4.3 Isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero.....	25
3.4.4 Caracterização das espécies.....	26
3.5 Metodologia utilizada para contagem do gênero <i>Aeromonas</i>	28
3.5.1 Diluição das amostras.....	28
3.5.2 Inoculação em agar seletivo.....	29
3.5.3 Contagem e confirmação do gênero.....	29
3.6 Testes de sensibilidade a antimicrobianos.....	30
3.7 Análise estatística.....	30

Assunto	Página
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Comportamento frente a ação de antimicrobianos.....	42
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Espécies e populações de <i>Aeromonas</i> sp. obtidas em amostras colhidas durante o fluxograma de produção do queijo Minas Frescal, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.....	31
2. Espécies e populações de <i>Aeromonas</i> sp. obtidas em amostras colhidas durante o fluxograma de produção do queijo Colonial, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.....	37
3. Distribuição das culturas de <i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i> e <i>A. schubertii</i> isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do queijo Minas Frescal, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes.....	43
4. Distribuição das culturas de <i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. veroni</i> e <i>A. jandaei</i> isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do queijo Colonial, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Perfil de resistência dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. do fluxograma de processamento queijo Minas Frescal, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Rio Grande do Sul.....	45
2. Perfil de resistência dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. do fluxograma de produção do queijo Colonial, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Rio Grande do Sul.....	46

Aeromonas NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS TIPOS MINAS FRESCAL E COLONIAL DA REGIÃO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL

RESUMO- Com o objetivo de estabelecer, durante o processamento do queijo Minas Frescal e Colonial os possíveis pontos de contaminação e a forma de disseminação de bactérias do gênero *Aeromonas*, foram analisados, quanto à presença do microrganismo, diferentes produtos e pontos do fluxograma de produção. Para o Queijo Minas Frescal, aeromonas foram isoladas no leite cru, leite pasteurizado, ambiente e nas mãos dos manipuladores. *A. caviae* foi a espécie mais frequentemente identificada, sendo também isoladas *A. sobria* e *A. schubertii*. Durante o processamento do queijo Colonial, as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. jandaei* foram isoladas a partir da água, mãos dos manipuladores, utensílios, leite cru e após tratamento térmico e de massa coagulada. Os resultados demonstram que o gênero *Aeromonas* encontra-se disseminado nas diferentes etapas do processamento de queijos, destacando-se o leite cru como principal fonte de contaminação para o processamento industrial e artesanal. Ressalta-se o perfil de resistência dos isolados de *Aeromonas* sp. que revelaram resistência múltipla aos antimicrobianos de uso na medicina humana e animal, caracterizando assim, risco à saúde pública.

Palavras-chave: Aeromonas, Qualidade Microbiológica, Queijo, Saúde Pública.

***Aeromonas* IN PROCESSING LINE OF MINAS FRESCAL CHEESE AND COLONIAL CHEESE IN NORTHWEST OF RIO GRANDE DO SUL**

ABSTRACT – With the purpose to establish the possible points of contamination and the form of disseminating of *Aeromonas* bacteria genus during Minas Frescal cheese processing and Colonial cheese, different products and points of the production process were analyzed, as for the presence of the microorganism. In Minas Frescal cheese, *Aeromonas* were isolated in raw milk, pasteurized milk, in the ambient and in the manipulators' hands. *A. caviae* was the most frequently identified species, being also isolated *A. sobria* and *A. schubertii*. During the processing of Colonial cheese, the species *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* and *A. jandaei* were isolated from the water, the manipulators' hands, utensils, raw milk and after thermal treatment and coagulated mass. The results showed that the genus *Aeromonas* is disseminated in the different stages of cheeses processing, standing out the raw milk as main source of contamination for the industrial and handmade processing. The profile of resistance of the isolated of *Aeromonas* sp. is pointed out that they revealed multiple resistance to the antibiotics used in human and animal medicine, characterizing, therefore, risk for public health.

Key –Words: *Aeromonas*, Microbiology quality, Cheese, Public health.

1 INTRODUÇÃO

É reconhecido que a maioria dos casos de toxinfecção alimentar é atribuída ao *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. ou *Clostridium perfringens*. Porém, parte desses casos é provocada por microrganismos não rotineiramente avaliados nos alimentos ou durante os surtos. Nos últimos anos, com o avanço das técnicas de isolamento e identificação bacterianos, vem ocorrendo uma expansão da lista das bactérias caracterizadas como potenciais causadores de toxinfecções alimentares e entre elas estão as aeromonas.

O gênero *Aeromonas* está distribuído universalmente e pode ser isolado de amostras clínicas, ambientais e alimentares. Atualmente a *Aeromonas* sp., principalmente *A. hydrophila*, é considerada um agente emergente em enfermidades de origem alimentar, e tem recebido atenção especial pela capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, sendo também importante deteriorante.

Diferentes estudos têm demonstrado a presença deste gênero em alimentos de origem animal, vegetal e também nas águas cloradas e não cloradas. Muitos destes isolados apresentam produção de fatores de virulência como enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas e capacidade para se aderir e invadir células epiteliais. Assim, alimentos contaminados e a água são importantes veículos de transmissão do agente e estão constantemente associados a casos de gastroenterite ou mesmo de doenças mais graves.

Ressalta-se a natureza psicrófila das aeromonas, permitindo que grande número de microrganismos e/ou toxinas pré-formadas possam ser ingeridas junto com o alimento conservado sob refrigeração, tornando-o um potencial patógeno de origem alimentar. O leite e seus derivados representam importantes veículos de transmissão, já que são armazenados sob refrigeração e rotineiramente consumidos sem tratamento térmico.

Entretanto, apesar da sua importância como agente de doença de origem alimentar, muito pouco se conhece sobre o significado dessa bactéria em alimentos,

principalmente sobre as fontes de contaminação e sua disseminação durante a produção, especialmente para o leite e seus derivados. Desta forma, até que as questões relacionadas à patogenicidade e ao comportamento das aeromonas sejam totalmente esclarecidas, a sua presença em alimentos pode ser considerada uma ameaça para a saúde pública, especialmente para indivíduos imunocomprometidos.

Diante do exposto e levando em consideração a importância das *Aeromonas* sp. como microrganismos emergentes de doenças de origem alimentar; a escassez de informações quanto a sua presença em produtos de origem animal, particularmente em nosso meio; as dúvidas relativas à sua possível origem para os alimentos, especialmente para o leite e derivados; a sua capacidade de se multiplicar em alimentos refrigerados e o papel fundamental que o leite e seus derivados representam na alimentação humana, idealizou-se o presente estudo que tem por objetivos:

- Determinar, durante o processamento do Queijo Minas Frescal, em laticínio submetido a controle higiênico-sanitário permanente, pelo Serviço de Inspeção Federal, e do queijo Colonial, produzido de forma artesanal, portanto sem estar registrado em órgão oficial de inspeção, as possíveis fontes de contaminação e pontos de disseminação de bactérias móveis do gênero *Aeromonas*;
- Verificar a população de bactérias do gênero *Aeromonas* nas amostras estudadas e consequente potencial de risco que o Queijo Minas Frescal e o queijo Colonial podem representar ao consumidor;
- Verificar o comportamento dos isolados frente à ação *in vitro* de antimicrobianos de uso comum.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do gênero *Aeromonas*

Aeromonas sp. são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, na sua maioria móveis, que se encontram distribuídas no meio ambiente (MARTINS et al., 2002).

O gênero estava incluído na família *Vibrionaceae*, porém estudos realizados em 1986 por Colwell e colaboradores, demonstraram que o gênero *Aeromonas* apresenta uma evolução filogenética distinta das famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, e propuseram elevar o gênero a categoria de família *Aeromonadaceae*, e como tal aparece nas publicações mais recentes (GARRITY, BOONE & CASTENHOLZ, 2001, CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002).

Estudos moleculares sugerem a existência de 14 espécies: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. popoffii*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. encheleia*, *A. schubertii*, *A. trota* e *A. allosaccharophila* (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002, DASKALOV, 2006). Pela tipificação baseada em métodos bioquímicos, é possível dividir o gênero em sete espécies (GRANNUM et al., 1998, ISONHOOD & DRAKE, 2002).

Diferentes espécies encontram-se difundidas nos alimentos e algumas destas representam risco para a saúde pública (KIROV, 1993, TROWER et al., 2000). Entre as associadas a infecções humanas, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* são predominantes (GHENGHESCH et al. 2001, SZCZUKA & KAZNOWSKI, 2004).

Pesquisas têm mostrado que espécies *A. hydrophila* e *A. sobria*, são as de maior incidência nas toxinfecções alimentares. *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* constituem 85% de todos os isolamentos clínicos envolvidos com infecções gastrointestinais e extraintestinal (BIZANI & BRANDELLI, 2001).

Dentre as espécies *A. hydrophila* é a que mais preocupa em termos de patogenicidade e a mais frequentemente isolada, sendo potencialmente patogênica para o ser humano. Já foi isolada em diversos países, principalmente de ambientes aquáticos, e em diferentes tipos de alimentos, especialmente os de origem animal (PALUMBO, 1985, IBRAHIM & Mac RAE, 1991, DASKALOV, 2006).

Foi demonstrado que *A. hydrophila* adere e invade as células epiteliais da mucosa do intestino e inicia sua multiplicação. Mas sabe-se que esta situação somente ocorre com a expressão de certos fatores de virulência (BIZANI & BRANDELLI, 2001). Entretanto, não se deve esquecer a espécie *A. caviae* que, mesmo em menor grau, também produz fatores de virulência.

As aeromonas se dividem em dois grandes grupos de acordo com a temperatura ótima de multiplicação e motilidade. O primeiro grupo é amplo e heterogêneo geneticamente, está formado por espécies mesófilas e móveis, sendo 28°C a temperatura ótima de multiplicação. O segundo grupo é mais reduzido e homogêneo geneticamente, é designado como grupo psicrófilo, cuja temperatura ótima de multiplicação está entre 22-25°C, sendo constituído por duas espécies *A. salmonicida*, com quatro subespécies *salmonicida*, *masoucida*, *achromogenes* e *smithia* e *A. media* (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002).

A maioria das bactérias do gênero *Aeromonas* é caracterizada como mesófila (MAYKOT, 2002). Entretanto, boa parte dos isolados pode multiplicar-se e até produzir fatores de virulência (citotoxinas, hemolisinas e enterotoxinas) em temperatura de refrigeração (KNOCHEL & JEPPESEN, 1990, KIROV, 1993, MERINO et al. 1995, MELAS, PAPAGEORGIOU & MANTIS, 1999, MARTINS et al. 2002, DASKALOV, 2006). *A. hydrophila*, que apresenta temperatura ótima de multiplicação de 28°C, pode se multiplicar em temperaturas que variam de 1 a 42°C (ISONHOOD & DRAKE, 2002).

Ressaltando essa informação, PALUMBO (1985) relata à ocorrência de *A. hydrophila* em leite cru, isolada imediatamente após a aquisição do produto no comércio. O autor verificou também que o número de unidades formadoras de colônias (UFC) aumentou de $2,2 \times 10$ para $2,2 \times 10^2$ /mL após uma semana de estocagem a temperatura de 5°C, sugerindo que o microrganismo é capaz de se multiplicar,

competitivamente com psicrotróficos, em diferentes tipos de alimentos prontos para consumo durante o seu armazenamento sob refrigeração. Portanto, este método de conservação, isoladamente, não é capaz de impedir a multiplicação do agente nos alimentos, evidenciando risco para a população consumidora.

Por outro lado, as aeromonas são sensíveis ao processo de pasteurização. Dubey & Sanyal (1978), citados por COSTA & ROSSI JÚNIOR (2002), verificaram que 25,0% das aeromonas foram inativadas em temperatura de 56°C em dez minutos e 100% a temperatura de 60°C em 20 minutos.

Tem sido identificado um grande número de fatores de virulência que parecem ter um papel importante na patogenicidade das infecções intestinais e sistêmicas por *Aeromonas* sp. (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002). Estes incluem endotoxinas, enterotoxinas, adesinas, citotoxinas, hemolisinas (FREITAS, 1993, AGUILERA-ARREOLA et al., 2005), lipases e proteases (KIROV, 1993, MARTINS et al., 2002).

Algumas cepas apresentam também a capacidade de invadir células epiteliais (GRANUM et al., 1998), desencadeando uma série de afecções, revelando-se de grande importância para a saúde pública (MAYKOT, 2002, COSTA & ROSSI JÚNIOR, 2002), sendo a gastroenterite a mais comum infecção causada pelo gênero (PALÚ et al., 2006).

BURKE et al. (1984) isolaram aeromonas de pacientes com diarreia e de amostras de água clorada e não clorada, na Austrália. Os autores verificaram que 91,0% dos isolados de diarreia, 70,0% dos isolados de água de abastecimento e 64,0% dos de água não clorada eram enterotoxigênicos e hemolíticos. Ressalta-se que as enterotoxinas são estáveis em pH entre 4,5 e 10,0 durante uma hora.

HANDFIELD et al. (1996) investigaram a patogenicidade de isolados de *A. hydrophila* provenientes de alimentos e de água de abastecimento pelos efeitos de hemólise, hemoaglutinação e citotoxicidade. Atividade hemolítica foi mais frequentemente observada nos isolados provenientes da água (64%), hemoaglutinação em isolados de alimentos (92%), e citotoxicidade em isolados de alimentos (92%) e água (73%). Tratamento térmico a 56°C por 10 minutos inibiu a toxicidade de alguns isolados.

MARTINS et al. (2002) verificaram a ocorrência de *Aeromonas* sp. produtoras de toxinas dentre os isolados de diferentes alimentos (leite, carne e vegetais), bem como de infecções humanas no Estado de São Paulo. Dos isolados de alimentos, 18,2% eram enterotoxigênicos, 17,1% eram hemolíticos e 72,7% tinham efeito citotoxigênico. *A. sobria* foi a mais comumente isolada (35%) e *A. hydrophila* representou 27% dos isolados de alimentos.

As aeromonas, patógenos emergentes de origem alimentar, também podem ser isoladas como agente etiológico de diversos processos infecciosos (FALGÀS, 2003), e vêm recebendo maior atenção, apesar dos poucos surtos relatados na literatura. Para KROVACEK et al. (1995), o baixo número de relatos pode ser explicado pelo fato que boa parte dos casos de doenças de origem alimentar é provocada por agentes não pesquisados rotineiramente.

Para MERINO et al. (1995) dois fatores contribuem para que a *Aeromonas* sp. seja considerado um patógeno emergente. O primeiro está relacionado ao aumento do consumo de alimentos que são mantidos refrigerados, visto que o gênero pode se multiplicar em temperaturas de refrigeração e até mesmo produzir fatores de virulência nestas condições. O segundo ponto relaciona-se com o aumento do número de isolados da água durante as estações mais quentes, que em alguns casos estão associados ao aumento dos casos de gastroenterites.

Martinez-Silva e seus colaboradores, já em 1961, citado por MAYKOT (2002), verificaram as primeiras associações entre *Aeromonas* sp. e infecções intestinais. Em 1984 passou a ser considerada um novo agente de doença de origem alimentar pela FDA (Food and Drug Administration). Desde então a importância dada a esse microrganismo vem aumentando, baseada em fortes evidências epidemiológicas que relacionam as aeromonas como agentes de gastroenterites (KNOCHEL & JEPPESEN, 1990, ISONHOOD & DRAKE, 2002).

Do ponto de vista geográfico a frequência das aeromonas em fezes associada à sintomatologia diarreica oscila entre 80% no Canadá e 0,18% na Dinamarca. Outros países com alta frequência são Peru (52,4%), Japão (11,1%), Austrália (11%), Tailândia (18-31%) e Inglaterra (11%) (FALGÀS, 2003).

KO & CHUANG (1995) estudaram 59 episódios de bacteremia por *Aeromonas* sp. ocorridos em pacientes que apresentavam na sua maioria, cirrose hepática ou câncer, em Taiwan. Entre os 60 isolados do agente, 68% eram *A. hydrophila*, 17% *A. sobria* e 10% *A. caviae*. Os autores relacionam a elevada incidência de bacteremia observada com os altos níveis de contaminação de frutos do mar por aeromonas móveis, que foi de 88% naquela região.

As propriedades das espécies de aeromonas isoladas de alimentos sugerem que a doença de origem alimentar pode ser resultado não apenas da colonização e expressão dos fatores de virulência *in vivo*, mas também existe a possibilidade de intoxicação, pela ingestão de alimentos que estavam armazenados sob refrigeração (KIROV et al., 1993).

Ainda segundo KIROV (1993), para que haja o quadro de gastroenterite deve haver a combinação da presença de cepas produtoras de fatores de virulência com condições predisponentes, como a idade e o estado imunológico do hospedeiro. Assim, a população mais propensa é aquela composta de pessoas imunocomprometidas, crianças com menos de dois anos e adultos com mais de 50 anos (MERINO et al. 1995, MELAS, PAPAGEORGIOU & MANTIS, 1999).

A. hydrophila e *A. sobria* foram isoladas de casos clínicos de diarreia humana (IBRAHIM & Mac RAE, 1991, GHENGHESCH et al. 2001). Nos Estados Unidos estimativas apontam que 13% dos casos de gastroenterites são provocados pela *Aeromonas* sp., mostrando sua importância (ISONHOOD & DRAKE, 2002). MELAS, PAPAGEORGIOU & MANTIS (1999) citam a investigação de 881 casos de diarreia infantil ocorridos na Grécia entre 1991 e 1993; *A. hydrophila* foi o terceiro agente mais prevalente.

Rebollo & Escamilla (1984), citados por CASTRO-ESCARPULLI et al. (2002) investigando casos de diarreia ocorridos no México, isolaram *Aeromonas* sp. em 7,7% dos casos de diarreia aguda em crianças com menos de dois anos de idade e em 7% dos adultos.

Estudos comprovaram que as aeromonas podem atuar como organismos infecciosos ou enterotoxigênicos, bem como patógenos oportunistas ou primários, resultando em sérias conseqüências para o ser humano (ISONHOOD & DRAKE, 2002).

No caso de infecção gastrintestinal os sintomas se manifestam geralmente no período de 22 a 34 horas, caracterizados por náuseas, vômito, dor muscular e diarreia (SAAD, 1991).

A. hydrophila pode causar também doenças graves como osteomielite (KHURANA & KUMAR, 1997), septicemia (MERINO et al., 1995), meningite, endocardite (OAKLEY, ELLIS & GIBSON, 1996), infecções cutâneas (FREITAS, 1993), úlceras de córnea, peritonites e pneumonias (COSTA & ROSSI JÚNIOR, 2002, MAYKOT, 2002, SOLER et al., 2003, SZCZUKA & KAZNOWSKI, 2004). A presença desta bactéria pode ser fatal, especialmente em pacientes imunocomprometidos (MARTINS et al., 2002).

Aeromonas sp. também contribuem para a deterioração de diferentes alimentos (carne, leite, ovos, frutos do mar e alimentos cozidos mantidos sob refrigeração). Em leite UAT (Ultra Alta Temperatura), porém, *Aeromonas* sp. pode estar presente com elevada população (10^7 - 10^8 UFC/mL) e mesmo assim, não ser possível detectar alterações organolépticas ou físicas (KIROV, 1993).

O consumo de água e/ou alimentos contaminados, assim como o contato direto da água com feridas e lesões na pele são consideradas classicamente as vias de transmissão das infecções cutâneas e gastrintestinais por aeromonas (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002).

KIROV (1993) e KROVACEK et al. (1995) consideram que as aeromonas podem chegar até os alimentos pela água contaminada, fezes de animais que alberguem as bactérias, ou ainda por pessoas portadoras ou doentes que manipulem alimentos.

A bactéria está distribuída no ambiente, no solo, nas fezes dos animais (PALÚ et al., 2006) e especialmente na água (SZCZUKA & KAZNOWSKI, 2004). BRANDI et al. (1996) descrevem o solo como importante reservatório para este gênero, onde pode permanecer por longo período (140 dias), mantendo inclusive suas propriedades patogênicas.

É conhecido que as aeromonas podem ser isoladas, com variável frequência, de diferentes alimentos de origem animal, ocorrendo principalmente em peixes e frutos do mar como ostras, camarões, além de peixes defumados, de carne bovina, suína, ovina, aves, produtos cárneos como presunto, caracóis comestíveis, rãs, ovos, leite cru, pasteurizado e derivados como queijos, iogurtes, sorvetes e manteiga (BULHÕES & ROSSI JÚNIOR, 2002, COSTA & ROSSI JÚNIOR, 2002), bem como de vegetais como alface e outras saladas leves (PALÚ et al., 2006). Estando também aptas a multiplicação em alimentos crus, cozidos e processados, sob temperatura de refrigeração, sob atmosfera modificada e sob diferentes meios de crescimento (KINGOMBE et al., 2004).

As aeromonas são consideradas integrantes da microbiota do trato intestinal de animais aquáticos como peixes e mariscos, anfíbios e répteis (BULHÕES & ROSSI JÚNIOR, 2002). Também estão descritas diversas espécies do gênero associadas a numerosas patologias de peixes de interesse em aquicultura, provocando perdas econômicas significativas. Destacam-se as espécies *A. salmonicida* e *A. hydrophila* (CASTRO-ESCAPULLI et al. 2002).

2.1.1 Resistência a antimicrobianos

A resistência das aeromonas a múltiplas drogas de uso clínico é fato de grande importância, visto que pode dificultar a cura da doença provocada por estas bactérias, tanto em animais, especialmente peixes, quanto nos seres humanos (DASKALOV, 2006).

Cepas de aeromonas com múltipla resistência a antimicrobianos têm sido relatadas em todo mundo (VIVEKANANDHAN et al., 2002). Segundo diferentes autores, as aeromonas podem adaptar-se rapidamente às novas drogas empregadas como antimicrobianos na medicina e atividades agropecuárias (BIZANI & BRANDELLI, 2001).

A administração de antibióticos em seres humanos e em animais de produção carrega risco para a seleção de bactérias que se tornam resistentes aos mesmos. Diz-se que uma bactéria é resistente a um determinado tipo de antimicrobiano quando o microrganismo é capaz de se multiplicar *in vitro* em presença da concentração máxima

que esse antimicrobiano alcança no sangue e/ou nos tecidos (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002).

Nesse sentido, a resistência de microrganismos aos antimicrobianos usados em produção animal poderá afetar a saúde humana se as cepas de microrganismos resistentes presentes em animais de produção atingirem o ser humano, as infecções humanas causadas por agentes patogênicos terão opções limitadas de tratamento, especialmente quando da ocorrência de toxinfecções alimentares (GHENGHESCH et al., 2001).

O uso de antibióticos e outros quimioterápicos como aditivos alimentares na criação de bovinos, suínos, aves e peixes, para o tratamento de infecções bacterianas e doses sub-terapêuticas visando a prevenção de enfermidades, resultam em níveis cada vez maiores de resistência de bactérias patogênicas a antibióticos. Assim, em diversas partes do mundo, foram relatadas linhagens de aeromonas com resistência múltipla a antimicrobianos (VIVEKANANDHAN et al., 2002, COSTA, 2003).

GHENGHESCH et al. (2001) destacam que cepas de *Aeromonas* sp. resistentes a antibióticos foram isoladas de amostras ambientais, tratando-se principalmente de resistência mediada por plasmídios.

Bactérias do gênero *Aeromonas* são resistentes a ampicilina, com exceção da *A. trota* (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002) e apresentam, em certos casos, resistência constitutiva aos antibióticos Beta lactâmicos.

ROSSI JÚNIOR et al. (2000) verificaram o comportamento *in vitro*, frente à ação de antimicrobianos, de *A. hydrophila*, *A. caviae* e atípicas, isoladas em matadouro bovino no Estado de São Paulo. O princípio ativo com maior percentual de cepas resistentes foi a cefalotina (66,6%), seguido pela carbenicilina (51,0%) e tetraciclina (33,3%). As drogas a que as cepas mostraram-se mais sensíveis foram a gentamicina, a tobramicina, a amicacina, o sulfazotrim, o cloranfenicol e a netilmicina, todas com mais de 70% de sensibilidade.

Em trabalho realizado por BIZANI & BRANDELLI (2001), isolados de *A. hydrophila* e *A. sobria* oriundos da água de abastecimento e água da lavagem das carcaças utilizadas em um frigorífico no Rio Grande do Sul, mostraram-se

predominantemente resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. 100% das 15 amostras testadas foram sensíveis a amicacina, azitromicim, cefalexina, ceftriaxone, cefoperazona, espiramicina, gentamicina, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, tetraciclina e tobramicina. Nove isolados foram sensíveis a todos os 32 antimicrobianos testados.

GHENGHESCH et al. (2001) avaliaram o perfil de resistência da *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, isoladas de amostras de água não tratada proveniente de poços rasos. 100% das amostras foram resistentes à ampicilina, 95% à cefaloridina e 5% à tetraciclina; os isolados foram sensíveis à gentamicina, à kanamicina, ao ceftriaxone, ao cloranfenicol, ao ciprofloxacim e ao ácido nalidíxico.

Em trabalho realizado por VIVEKANANDHAN et al. (2002) a resistência múltipla foi avaliada a partir de isolados de *Aeromonas* sp. de amostras de peixe e camarão. Um total de 319 cepas foram testadas para 15 antibióticos. Mais de 95% das amostras foram resistentes à bacitracina, eritromicina, neomicina, novobiocina, polimixina-B e à rifampicina. Menor perfil de resistência foi observado para cloranfenicol (3,7%), gentamicina (7,5%), estreptomicina (8,7%) e ácido nalidíxico (16,9%). Cerca de 51% dos isolados foi resistente à tetraciclina.

Kämpfer et al. (1999), citado por FALGÀS (2003) determinaram a sensibilidade de 217 cepas, que representavam 14 espécies de aeromonas, a 69 agentes antimicrobianos. Os autores constataram que não existiam diferenças significativas entre as espécies. A maioria das cepas era sensível à tetraciclina, quinolonas, cloranfenicol, nitrofurantoína, trimetoprim, e também à maioria dos aminoglicosídeos, cefalosporinas, azlocilina e piperacilina.

A sensibilidade a diferentes agentes antimicrobianos também foi estudada por FALGÀS (2003) em 77 cepas de *Aeromonas* sp. isoladas de pescado destinado à alimentação humana no México. Como já era previsto, todas as cepas, com exceção da *A. trota*, foram resistentes à ampicilina, sendo esta uma característica específica do gênero e 44,1% das cepas foram resistentes à tetraciclina. As cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas apresentaram uma boa atividade frente aos isolados. Quanto às cefalosporinas cabe destacar que todas as espécies mostraram

resistência (60% para *A. hydrophila*, 54% *A. popoffii*, 47% *A. caviae* e 21% *A. veronii*). Todas as cepas foram sensíveis a ofloxacina e ciprofloxacina. Porém, 26% dos isolados de *A. caviae*, 20% das *A. hydrophila* e 88% das *A. veronii* foram resistentes ao ácido nalidíxico e ao ácido pipemídico.

Ainda segundo FALGÀS (2003) deve-se levar em consideração quando se estuda a resistência a antimicrobianos a zona geográfica originária das espécies. Atualmente a constatação de novos padrões de resistência em isolados de aeromonas de origem ambiental está associada a zonas com um elevado impacto humano, estando claramente influenciada por fatores geográficos e sócio econômicos.

Em estudo realizado por COSTA (2003), isolados de *A. hydrophila* provenientes de infecções em peixes nativos brasileiros de água doce, mostraram-se resistentes à ampicilina, amoxicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, penicilina, rifampicina, trimetopim+sulfametoxazol, gentamicina, tetraciclina e oxitetraciclina, além de pouca sensibilidade à eritromicina e kanamicina.

SHARMA, DUBEY & SHARAN (2005) destacaram o risco para saúde pública associado à resistência da *Aeromonas* sp. a diversos antimicrobianos de uso humano e na aquicultura. Isolados de diferentes espécies, obtidos a partir de amostras de água do Rio Narmada, na Índia, utilizada para abastecimento público e atividades de recreação, mostraram-se resistentes à ampicilina e sensíveis à gentamicina.

Ao analisar o perfil de resistência de *Aeromonas* sp. isoladas de amostras clínicas e de salada de alface, PALÚ et al. (2006) observaram resistência a apenas um dos sete antimicrobianos testados em 65,5% dos isolados de vegetal; 20% foram resistentes a pelo menos duas drogas. Dentre as amostras clínicas, 28,6% dos isolados apresentou perfil de resistência simples, 35,8% mostraram dupla resistência e 25,1% apresentaram resistência múltipla para três a cinco antimicrobianos.

Para isolados de *Aeromonas* sp. obtidos durante o beneficiamento do leite Tipo A, CARNEIRO & ROSSI JÚNIOR (2006) encontraram 100% das amostras resistentes à ampicilina, 75,6% à cefalotina, 64,8% à cefoxitina e 48,6% ao aztreonam. As drogas as quais as cepas mostraram-se menos resistentes foram cloranfenicol, netilmicina, amicacina, gentamicina, tetraciclina e tobramicina.

ARAÚJO JÚNIOR, ECHEVERRIGARAY & DELAMARE (2007) avaliaram 62 amostras de *Aeromonas* sp. obtidas de fezes de humanos, raspagem cutânea de suínos, entre outras, utilizando o meio ágar Mueller-Hinton para a análise da atividade antimicrobiana. As amostras foram avaliadas quanto à resistência a β -lactâmicos e a outros antibióticos. Cerca de 63% das estirpes estudadas apresentaram resistência múltipla a mais de 2 β -lactâmicos avaliados, 5% foram resistentes à amicacina, 3% resistentes à tobramicina e gentamicina, 16% resistentes à tetraciclina, 6% resistentes à cefprofroxacina, 15% resistentes à sulfa e 18% resistentes ao cloranfenicol.

Pesquisas realizadas com isolados de aeromonas de fontes ambientais, alimentos e espécimes clínicas, mostraram que estas bactérias podem apresentar resistência a múltiplas drogas como à ampicilina, penicilina G, carbenicilina, tetraciclina, cefalotina, rifampicina, meticilina, novobiocina, vancomicina, eritromicina (BORREGO et al. 1991, MAYKOT, 2002, VIVEKANANDHAN et al., 2002). Sendo mais frequentemente sensíveis ao cloranfenicol, colistina, canamicina, aminoglicosídeos, ácido nalidíxico, neomicina, estreptomicina e gentamicina (NOCITI, 1997, MAYKOT, 2002, COSTA & ROSSI JÚNIOR, 2002, VIVEKANANDHAN et al., 2002).

2.2 Veiculação da *Aeromonas* sp. pela água

Segundo KNOCHEL & JEPPESEN (1990), HÄNNINEN & SITTONEN (1995), SOLER et al. (2003), AGUILERA-ARREOLA et al. (2005) e AMARAL et al. (2006) a água é considerada o habitat natural do gênero e exerce um papel de extrema importância como fonte de contaminação para os alimentos de origem animal.

Para CASTRO-ESCAPULLI et al. (2002) a maioria dos sistemas de tratamento de água potável são capazes de reduzir a população de aeromonas até 1 UFC/100mL, entretanto quando os níveis de matéria orgânica aumentam, o cloro é inativado, a bactéria pode então se multiplicar e inclusive colonizar os sistemas de tratamento formando biofilmes, chegando a concentrações de 10^3 UFC/100mL.

Diversos estudos têm demonstrado que a água não tratada é a forma mais comum para se adquirir este patógeno. FUZIHARA et al. (1995) encontraram *Aeromonas* sp. em 4,6% das amostras de água clorada e 42,4% das não cloradas, em pesquisa realizada no interior do estado de São Paulo.

Na Dinamarca KNOCH & JEPPESEN (1990) isolaram *Aeromonas* sp. em 28% das amostras de água para consumo, com predomínio da *A. hydrophila*. Já BURKE et al. (1984), relataram o isolamento de aeromonas enterotoxigênicas e hemolíticas a partir de amostras de água clorada e não clorada na Austrália, relacionando estes achados com casos de diarreia ocorridos naquele país.

GHENGESCH et al. (2001) analisaram água não tratada proveniente de 481 poços na Líbia e isolaram *Aeromonas* sp. em 48,7% das amostras. Do total, 59% eram *A. hydrophila*, 27% *A. caviae*, 11% *A. sobria* e 3% foram consideradas atípicas.

Na Itália, em estudo realizado por MASSA, ALTIERI e D'ANGELA (2001), cinco das 20 amostras de água de poço não clorada, foram positivas para o gênero. *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* foram isoladas mesmo em amostras negativas para coliformes totais e termotolerantes; com isso os autores sugerem que os indicadores de contaminação fecal e os indicadores de eficiência sanitária não apresentam correlação com a presença de *Aeromonas* sp.

MENDES et al. (2003), avaliando águas minerais acondicionadas em embalagens plásticas de 20 Litros, comercializadas na região metropolitana do Recife/PE, verificaram a presença de bactérias do gênero *Aeromonas* em 14,3% das amostras, concluindo que algumas amostras de todas as marcas analisadas se encontravam impróprias para o consumo, por não atenderem aos parâmetros estabelecidos pela legislação, representando potencial risco à saúde do consumidor.

Trinta de 168 amostras de água do Rio Narmada, na Índia, analisadas por SHARMA, DUBEY & SHARAN (2005) foram positivas para *Aeromonas* sp. *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. sobria* destacaram-se entre as espécies mais freqüentes e potencialmente patogênicas pela produção de diferentes fatores de virulência como protease, amilase, lipase, DNase, além de enzimas extracelulares.

ROSSI JÚNIOR et al. (1996) verificaram a presença de bactérias do gênero *Aeromonas* em um estabelecimento de abate e industrialização de carne bovina em 40% das amostras de água residual da lavagem de carcaças e em 25% das amostras de carne, não tendo sido isoladas na água de abastecimento do estabelecimento.

No estudo realizado por BIZANI & BRANDELLI (2001), por meio da análise de 70 amostras da água de escoamento da lavagem final das carcaças bovinas e de amostras da água de abastecimento do abatedouro colhidas em diversos pontos da linha de abate, foram isoladas aeromonas em 17,1% das amostras de água de abastecimento e 25,7% das amostras de lavagem das carcaças. As espécies encontradas foram *A. hydrophila* e *A. sobria*, o que demonstra que diferentes espécies são capazes de multiplicação em sistemas de distribuição de água tratada, podendo atingir o alimento.

COSTA & ROSSI JÚNIOR (2002) analisaram 200 amostras de diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frangos para identificar os pontos de contaminação da carne por aeromonas. Entre os pontos estavam a água de abastecimento, de escaldagem e pré-resfriamento. *Aeromonas* sp. foi isolada em 20 (80%) das amostras da água do pré-resfriamento. Isso indica que as carcaças de frango podem se contaminar já a partir de sua obtenção, determinando o aparecimento da bactéria em carcaças resfriadas e prontas para a comercialização.

Segundo AMARAL et al. (2006), pode-se afirmar que na cadeia de produção de leite, a qualidade da água utilizada na lavagem dos tetos e dos equipamentos é importante, especialmente em termos microbiológicos, que podem influenciar na qualidade final do leite produzido. Dentre os microrganismos presentes na água, destacam-se os de natureza exógena como os oriundos de matéria fecal, que incluem os coliformes totais, coliformes fecais e os enterococos, e os autóctones, que compreendem diversas espécies e fazem parte da microbiota natural da água. Entre elas, as bactérias móveis do gênero *Aeromonas* são consideradas as mais importantes.

Os mesmos autores citados no parágrafo anterior avaliaram a água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo como veículo de bactérias do gênero *Aeromonas*. Foram coletadas amostras nos períodos de chuva e estiagem de água das fontes de abastecimento, da saída dos reservatórios de água utilizada para consumo

humano, água utilizada nos estábulos e também do leite. *Aeromonas* foram isoladas nos quatro diferentes pontos do sistema de distribuição de água das propriedades e do leite. As espécies com maiores percentagens de isolamento nos diferentes pontos de amostragem foram *A. hydrophila* e *A. veronii*, seguidas de *A. caviae*. Os achados sugerem que a água utilizada nas propriedades leiteiras pode constituir um fator de risco para a saúde dos seres humanos que utilizam essa água para consumo ou na produção do leite

2.3 Leite e derivados envolvidos na veiculação da *Aeromonas* sp.

A contaminação dos alimentos pelas *Aeromonas* sp. constitui-se em grave problema, visto a capacidade de se multiplicarem mesmo quando submetidas a temperaturas de refrigeração, em pH que varia de 4,5 a 10, na presença de elevadas concentrações de sal, bem como em ambientes de atmosfera modificada, utilizados para prevenir a multiplicação microbiana em alimentos (GRANUM et al., 1998).

Para KHALIL (1997) o leite pode ser facilmente contaminado, especialmente por microrganismos que apresentam distribuição ubíqua, como as aeromonas. Segundo o autor estes microrganismos podem colonizar a glândula mamária, onde se multiplicam e consequentemente são descarregados juntamente com o leite. Além disso, as elevadas populações do gênero *Aeromonas* observadas no leite e seus derivados refletem as condições higiênicas insatisfatórias em que o mesmo foi obtido e processado.

As aeromonas são sensíveis ao processo de pasteurização, porém já foram isoladas de leite pasteurizado e de queijo produzido com leite pasteurizado (FREITAS 1993). Segundo ENEROTH et al. (1998) sua presença indica que houve contaminação após o tratamento térmico.

Para os derivados lácteos a contaminação decorre da presença do agente na matéria prima utilizada para produção ou devido condições higiênicas insatisfatórias durante o processamento. A conservação pelo frio também permite o aumento da

população, visto a sua capacidade de multiplicação sob refrigeração (SAAD, 1991, FREITAS, 1993).

IBRAHIM & Mac RAE (1991), em estudo realizado na Austrália, relataram elevada ocorrência deste gênero em leite cru. Das 150 amostras analisadas 27% foram positivas para *Aeromonas* sp. *A. hydrophila* representou 60% dos isolados.

KIROV et al. (1993) afirmaram que a ocorrência deste gênero é comum em leite cru, ao encontrarem 60,0% (43/72) de amostras positivas na Austrália. Porém, o processo de pasteurização é efetivo para remover esta contaminação. Assim, os autores atribuíram os 4% de amostras positivas em leite pasteurizado à recontaminação após o tratamento térmico e concluíram que o leite é um possível veículo de transmissão da *Aeromonas* sp.

ENEROTH et al. (1998) verificaram os pontos críticos de contaminação do leite pasteurizado por microrganismos psicrótrófos. Em 48% das amostras de leite cru foi possível isolar *Aeromonas* sp; antes da pasteurização esse percentual chegou a 50% e diminuiu para zero depois da pasteurização, porém, no alimento pronto para consumo, 3% das amostras estavam contaminadas com o gênero.

FREITAS (1993) isolaram *Aeromonas* sp. em 28,5% de 35 amostras de leite pasteurizado e em 32% das amostras de queijo branco fresco, coletadas em supermercados no Rio de Janeiro. Dos isolados de *A. hydrophila*, 100% eram produtores de hemolisinas e 83,3% de citotoxinas. Tayar e Sem (1993), citados por COSTA & ROSSI JÚNIOR (2002) as isolaram de iogurte.

Confirmando a presença da *Aeromonas* sp. em leite e derivados, KHALIL (1997) obteve 66,7%, 51,1% e 40,0% de amostras positivas para leite cru, queijo e sorvete, respectivamente.

BORRELL et al. (1998) obtiveram 983 isolados de *Aeromonas* sp. a partir de 1.015 amostras de diferentes tipos de alimentos, água e amostras clínicas. De 179 amostras de produtos lácteos analisadas, 3,9% estavam contaminados com aeromonas. *A. caviae* foi a espécie mais frequentemente isolada (35,5%).

MELAS, PAPAGEORGIOU & MANTIS (1999) analisaram leite bovino, ovino e diferentes tipos de queijos obtidos na Grécia. 40,5% das 138 amostras de leite de vaca,

35% das 57 amostras de leite de ovelha e 9,3% dos queijos estavam contaminados com aeromonas. Em leite pasteurizado o agente não foi isolado. *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* com populações de até $5,0 \times 10^3$ UFC/mL foram predominantes entre os isolados.

BULHÕES & ROSSI JÚNIOR (2002) analisaram um total de 160 amostras de queijo Minas Frescal colhidas em Jaboticabal-SP e Poços de Caldas-MG. *Aeromonas* sp. foi isolada em 67,5% das amostras, com populações médias variando entre $3,1 \times 10^4$ e $2,0 \times 10^5$ UFC/g. Os autores concluíram que esse alimento representa risco à saúde da população consumidora.

CARNEIRO & ROSSI JÚNIOR (2006) verificaram os possíveis pontos de contaminação e disseminação da *Aeromonas* sp. no fluxograma de beneficiamento em uma granja de Leite Tipo A. 90% das amostras de leite cru, 30% das de leite da saída do pasteurizador, 40% das de leite do tanque de abastecimento da máquina de empacotar e 25% das amostras do leite pronto para consumo foram positivas para o gênero. Dentre as espécies foram identificadas *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. schubertii*. Os autores salientam o risco que a presença do agente nos lácteos representa para saúde do consumidor, especialmente por sua capacidade de sobreviver e se multiplicar em alimentos mantidos sob refrigeração, além da capacidade, apresentada por algumas cepas, de produzir toxinas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos estabelecimentos

3.1.1 Usina de beneficiamento

As amostras de Queijo Minas Frescal foram obtidas em uma usina de beneficiamento, localizada no Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, submetida a controle higiênico-sanitário permanente, pelo Serviço de Inspeção Federal. A indústria tem leite UAT (Ultra Alta Temperatura) como seu principal produto, mas, além dele, produz leite condensado, leite em pó, bebida láctea e diferentes tipos de queijos maturados e frescais.

Trata-se de um estabelecimento de grande porte, onde diariamente são processados cerca de 1 milhão de litros de leite. Destes, aproximadamente 80.000 litros destinam-se à fabricação de diferentes tipos de queijo, entre eles o Minas Frescal. A matéria prima é obtida de diversos municípios dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Esta indústria iniciou suas atividades como queijaria em 1993. Atualmente suas instalações e equipamentos apresentam-se em regular estado de conservação. Possui laboratório para análises e demais anexos exigidos pela legislação. As dependências da queijaria situam-se isoladas das demais salas de produção as quais foram construídas posteriormente.

A indústria é abastecida com água de poço artesiano, a qual possui controle permanente de potabilidade (análises físico-químicas e microbiológicas). No tocante a higienização das instalações e equipamentos são acatadas com rigor os procedimentos padrões de higiene operacional (PPHO).

A produção de queijo Minas Frescal é realizada diariamente em dois turnos de trabalho, contando com o envolvimento direto de seis funcionários para produção e embalagem do produto.

No momento do recebimento o leite utilizado para fabricação do queijo é submetido aos testes de plataforma, que incluem as provas de acidez, pH, densidade, crioscopia e percentual de gordura. Após o descarregamento o leite é mantido em tanques de 15.000 Litros, sob refrigeração até o processamento.

Por tubulação, a matéria prima segue para o pasteurizador de placas e após a pasteurização, é diretamente transferido para o tanque de coagulação de parede dupla, com capacidade para 500 Litros, utilizado exclusivamente para produção de queijo Minas Frescal.

Com o leite depositado no tanque, realiza-se a adição do coalho (coagulação enzimática), agitação, e aguarda-se em média uma hora e vinte minutos para coagulação da massa, que se mantém com temperatura média de 32°C. Segue-se a quebra do coalho, retirada do soro e enformagem em cilindro de aço inoxidável previamente higienizado. Decorrido um período de 8 a 10 horas a massa é mergulhada em salmoura, onde permanece, sob refrigeração, por 12 horas. Após a salga, o queijo é fracionado, embalado a vácuo, e mantido em câmara fria até a expedição.

3.1.2 Fazenda leiteira

As amostras de queijo Colonial foram colhidas diretamente em uma fazenda leiteira, que destina parte de sua produção diária de leite para elaboração de queijo, sendo a venda de leite refrigerado para industrialização a atividade principal da pequena propriedade localizada na Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Apesar de estar localizada em uma importante bacia leiteira do país, especialmente pela produção tecnificada e pelo número significativo de laticínios de grande porte estabelecidos na região, a produção de produtos lácteos de forma artesanal, sem registro em órgão Oficial de Inspeção, ainda é uma realidade na região. Existe elevado consumo destes produtos e a fabricação está fortemente ligada a questões culturais e sociais, servindo como alternativa de renda para pequenas propriedades.

O estabelecimento em análise realiza ordenha mecânica com balde ao pé, duas vezes por dia, no próprio estábulo, não possuindo sala de ordenha, sendo o leite mantido em refrigerador a granel com capacidade para 1000 Litros. A produção média diária é de

500 Litros. Conta com precária estrutura física e condições de higiene, tanto no local de ordenha quanto na sala de produção dos queijos. A propriedade faz uso de água não clorada, oriunda de um poço raso localizado no próprio estabelecimento.

A produção do derivado ocorre imediatamente após a ordenha da manha. O leite é levado até a sala de produção em baldes, sendo depositado em recipiente para aquecimento médio de 34,6°C por 15 minutos e adição imediata do coalho, não havendo, portanto, nenhum tratamento térmico. Decorrido o período da coagulação enzimática, que é em média de 60 minutos, realiza-se a retirada do soro, salga direta e enformagem em forma de aço inoxidável, onde a massa permanece em temperatura ambiente por 24 horas. Depois de desenformado, o queijo é lavado e comercializado num período de 24 a 48 horas, sempre em temperatura ambiente.

3.2 Caracterização das amostras estudadas

Foram estudados produtos e pontos do fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal e Colonial, que poderiam veicular as aeromonas e permitir sua ocorrência no produto final, ou atuar como disseminadores dos microrganismos nas diferentes etapas do processamento. As amostras foram colhidas em dias normais de trabalho durante o acompanhamento da produção dos queijos no período entre outubro de 2006 e maio de 2008.

Para o Queijo Minas Frescal, em um total de 12 visitas à indústria, distribuídas nas quatro estações do ano, foram colhidas 25 amostras em cada um dos dez pontos, totalizando 250 amostras como descrito a seguir:

- Água de abastecimento;
- Superfície das mãos dos manipuladores antes e durante a jornada de trabalho;
- Ambiente da indústria;
- Superfícies de equipamentos e utensílios que entraram em contato direto com o queijo;
- Leite cru;

- Leite pasteurizado;
- Coalhada;
- Queijo após enformagem;
- Queijo pronto para consumo;

Para queijo Colonial, foram realizadas cinco visitas para acompanhamento da produção. Considerando o pequeno volume processado e por tratar-se de um produto obtido em condições similares, cinco amostras foram colhidas para cada um dos nove pontos considerados importantes para disseminação da *Aeromonas* sp. Os pontos escolhidos para a produção colonial foram os mesmos do queijo industrializado, excluindo-se o queijo após a enformagem, totalizando 45 amostras. As colheitas foram realizadas em meses quentes e frios, com temperaturas ambiente que variaram entre 7 a 27° C.

3.3 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras de água foram colhidas com os devidos cuidados de assepsia, diretamente nas torneiras no interior do estabelecimento, utilizadas para as diferentes atividades de produção e higienização. O material foi depositado em frascos de vidro esterilizado, em quantidade aproximada de 400 mL. Na indústria, para a neutralização do cloro foi utilizado tiosulfato de sódio, em solução a 10%, na quantidade de 0,1 mL para cada 100 mL da amostra colhidas (APHA, 2001).

As amostras representativas das mãos dos manipuladores e dos equipamentos e utensílios foram colhidas por meio de suabes esterilizados. Estes suabes foram adquiridos prontos - Ceconetes¹. Foi utilizado um suabe para cada ponto de colheita, sendo representado por superfícies que entravam em contato com os produtos (equipamentos e utensílios), tendo sido delimitada uma área de colheita de 20 cm², utilizando-se para a demarcação um gabarito em aço inoxidável (APHA, 2001), e pelos espaços interdigitais e

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

palma das mãos, no caso dos manipuladores. Após a colheita os suabes eram mergulhados em quatro mililitros de água peptonada a 0,1%.

As amostras do ambiente foram tomadas pela exposição de duas placas de Petri contendo os meios seletivos específicos para o gênero em estudo (ágar dextrina-ampicilina e ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina), que permaneceram abertas por 15 minutos, em locais próximos ao tanque de coagulação dos queijos (APHA, 2001).

As amostras de leite cru foram colhidas, de forma asséptica, diretamente do tanque de recepção da indústria e nos “tarros” utilizados pela fazenda leiteira.

O leite pasteurizado foi colhido logo após ser submetido ao tratamento térmico na saída da tubulação do pasteurizador. Na propriedade rural as amostras foram colhidas imediatamente antes da adição do coalho, sendo denominado leite aquecido, sempre de forma asséptica.

Massa coagulada e enformada foram depositadas em frascos tipo Erlenmeyer, tomando os devidos cuidados de assepsia. Já as amostras de Queijo Minas Frescal e queijo Colonial foram tomadas em suas embalagens originais como são expostos ao consumo.

O transporte das amostras de água, leite cru, leite pasteurizado, queijo e os tubos com os suabes foi realizado em caixa isotérmica contendo gelo reciclável. As placas de Petri foram transportadas em temperatura ambiente.

As amostras referentes à produção de queijo Minas Frescal foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo-RS, onde foram processadas. Já as amostras referentes ao queijo artesanal foram analisadas no Laboratório de Análises de Alimentos da Universidade do Estado do Rio Grande do Sul, Unidade de Ibirubá-RS.

A fim de avaliar a qualidade da matéria prima utilizada na fabricação dos dois queijos, amostras de leite cru foram encaminhadas ao Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) do CEPA, da Universidade de Passo Fundo-RS para realização de contagem de células somáticas e contagem total de bactérias por Citometria de Fluxo.

Amostras dos queijos prontos para consumo também foram submetidas à verificação de pH e atividade de água junto ao Laboratório de Físico-química do CEPA, da Universidade de Passo Fundo-RS.

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

3.4.1 Preparo das amostras e enriquecimento seletivo

Para isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas* foi realizado inicialmente enriquecimento seletivo em caldo tripticase-soja (TSB) adicionado de ampicilina² na concentração de 30 mg por litro (ABEYTA JUNIOR et al., 1990).

As amostras de água foram filtradas em membrana de éster de celulose³ de 47 milímetros de diâmetro e poros 0,45 micrômetros. Essas membranas, após serem picadas, foram depositadas em frascos tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de TSB adicionado de ampicilina.

Os suabes, bem como a água peptonada utilizada no transporte, após a retirada da alíquota utilizada na prova de semeadura direta para contagem, foram vertidos em tubo de ensaio contendo 20 mL do caldo de enriquecimento seletivo.

As amostras de leite cru, pasteurizado ou aquecido e de queijo das diferentes fases do processo, nas quantidades de 10 mL ou 10 g, respectivamente, foram enriquecidas com 90 mL do TSB acrescido de ampicilina. A homogeneização das amostras de queijo com o TSB foi realizada em aparelho tipo Stomacher⁴.

3.4.2 Plaqueamento seletivo

Após incubação do caldo de enriquecimento seletivo a 28°C por 24 horas em incubadora para BOD, foi realizado, nas mesmas condições de incubação, o

² Sigma - A9393

³ Swinnex Disc Filter - Millipore

⁴ Stomacher, Marca Marconi, Modelo MA440

plaqueamento seletivo em ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina (PALUMBO, 1985) e ágar dextrina-ampicilina (HAVELAAR & VONK, 1988). Nos dois casos a ampicilina foi adicionada, após a esterilização, na concentração de 10 mg por litro.

3.4.3 Isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, para cada um dos meios utilizados, até cinco colônias com características sugestivas do gênero, 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.

Estas foram semeadas em tubos com ágar tripticase-soja (TSA) inclinado. Após o período de incubação foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram. Culturas que se apresentavam na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar triplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD, 1991). 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 e catalase, seguindo esquema de caracterização adotado por POPOFF (1984), HAVELAAR & VONK (1988), ARAUJO et al. (1989), KNOCHEL (1990), NEVES et al. (1990) e HUDSON & LACY (1991). Essas provas foram realizadas conforme metodologia descrita a seguir.

Prova da motilidade (Mac FADDIN, 1976) - Para tal, as culturas foram inoculadas, por picada profunda, em tubos contendo ágar semi-sólido para teste de motilidade. Esses foram incubados a 28°C por 24 horas e considerava-se móveis as culturas que apresentavam crescimento em toda a extensão do tubo.

Prova da oxidase (Mac FADDIN, 1976) - Para a realização desta prova, foram realizados esfregaços das culturas, através da utilização de alça de platina, em fitas para

determinação de oxidase⁵, adquiridas prontas para uso. Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços tornavam-se de coloração rósea em alguns segundos.

Prova da catalase (Mac FADDIN, 1976) - Com auxílio de alça de níquel-cromo, foram realizados esfregaços das culturas em estudo na superfície de lâminas de vidro. Em seguida foi adicionada uma gota de água oxigenada a 3% e o imediato desprendimento de gás indicava teste positivo.

Os cultivos que apresentavam as características de motilidade, oxidase e catalase positivas, foram considerados como de *Aeromonas* sp.

3.4.4 Caracterização das espécies

As culturas isoladas foram submetidas às provas bioquímicas para identificação das espécies, seguindo o esquema de caracterização adotado por (POPOFF, 1984), acrescido de algumas provas recomendadas por BUCHANAN & PALUMBO (1985) e ABEYTA JUNIOR et al. (1990), com atualizações apresentadas por PIDIYAR et al. (2002), HARF-MONTEIL et al. (2004), MIÑANA-GALBIS et al. (2004) e TACÃO et al. (2005), que são: 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 metodologia de Mac FADDIN (1976).

Prova da produção de indol - Para a realização dessa prova as cepas foram inoculadas em tubos contendo água peptonada a 1% e estes incubados a 28°C por 24 horas. Na leitura foi utilizado de 0,2 a 0,3 ml do reativo de Kovac's e considerado resultado positivo quando ocorria a formação de um anel vermelho na superfície do meio.

⁵ Probac do Brasil - Produtos Bacteriológicos Ltda.

Prova da hidrólise da esculina - As cepas em estudo foram inoculadas em tubos contendo caldo vermelho de fenol, adicionado de esculina na proporção de um grama por litro. Após incubação a 28°C por 24-48 horas considerava-se como positivas as culturas em que havia mudança da coloração do caldo de vermelho para amarelo. A coloração amarela decorre da mudança de cor do indicador de pH, em função da acidificação do meio, demonstrando a utilização da glicose, originária da hidrólise da esculina.

Prova da hidrólise da arginina e descarboxilação da lisina e ornitina - Na realização dessas provas, utilizou-se o meio base de Moller, adicionado do aminoácido em estudo na proporção de 1%. As cepas em estudo foram inoculadas nos tubos com o caldo, que tinha sua superfície vedada com uma camada de óleo mineral. Para cada uma das cepas testadas foi inoculado um tubo controle contendo somente o meio base. A incubação foi realizada a 28°C por até 4 dias, com leituras a cada 24 horas. O resultado foi considerado positivo (utilização dos aminoácidos) quando havia mudança da coloração do meio para púrpura, indicando alcalinização e negativo quando este tornava-se amarelo e permanecia com essa tonalidade até o final do período de incubação.

Prova da fermentação da arabinose, inositol, manitol, sacarose e salicina - As cepas em estudo foram inoculadas em uma bateria de tubos contendo caldo vermelho de fenol base, acrescentados do carboidrato a ser testado. A incubação foi realizada a 28°C por 24-48 horas e consideradas positivas as provas em que ocorria acidificação do meio, revelada pela mudança de cor do indicador de pH de vermelho para amarelo.

Prova da produção de acetoina (VP) a partir da glicose - Na realização da prova as cepas foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MR-VP e incubadas a 28°C por 48 horas. Após esse período foram adicionados 0,6 ml de uma solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 ml de uma solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barritt) em cada tubo. Após agitação foi realizada a leitura e a prova considerada positiva quando ocorria a formação de coloração vermelha em até 15 minutos.

Prova da produção de gás a partir da glicose - As culturas foram inoculadas em tubos contendo caldo vermelho de fenol base adicionado de glicose e tubos de Durham invertidos. Após incubação a 28°C por 24-48 horas foi realizada a leitura, considerando-se como positivo o teste em que havia a produção de gás, revelada pela presença do mesmo, no interior do tubo de Durham.

Prova do crescimento em caldo nutriente a 37°C com 0%, 3% e 6% de cloreto de sódio - Para a realização da prova cada cepa foi inoculada em caldo nutriente sem cloreto de sódio e com a presença do sal nas concentrações de 3% e 6%. A incubação foi realizada a 37°C por 24 horas e o teste considerado positivo quando havia turvação do meio, denotando crescimento microbiano.

Prova da redução do nitrato - As culturas foram inoculadas em tubos contendo caldo nitrato e estes incubados a 28°C por 48 horas. Após esse período foram adicionados os reativos de alfa-naftilamina a 0,5% e de ácido sulfanílico a 0,8%. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração avermelhada em até 30 segundos. Nos tubos com resultado negativo foi adicionado zinco em pó, que promove a redução do nitrato a nitrito e conseqüente mudança de cor. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de comprovar a eficiência da técnica.

3.5 Metodologia utilizada para contagem do gênero *Aeromonas*

3.5.1 Diluição das amostras

As amostras de água de abastecimento foram inoculadas na sua condição original, sendo os resultados computados como unidades formadoras de colônias (UFC)/mililitro.

Para a contagem a partir das amostras representadas por suabes inoculava-se, após perfeita homogeneização destes com os quatro mililitros de água peptonada que

serviam de transporte (realizada em agitador de tubos⁶), a própria água peptonada e também a sua diluição a 1/10 em água peptonada a 0,1%. Os resultados foram expressos em UFC/cm², sendo considerado que cada mililitro da água peptonada era representativo da população microbiana encontrada em cinco cm² da superfície de equipamentos e utensílios.

Quanto à contagem da população do gênero *Aeromonas* a partir das amostras de leite cru, leite pasteurizado ou aquecido, massa e queijo utilizaram-se da diluição preparada para a fase de enriquecimento seletivo, onde 10 mL ou gramas respectivamente, de cada um dos tipos de amostra foram homogeneizados, em aparelho Stomacher, com 90 mL de caldo TSB. Também foram preparadas diluições até 1/10000 em água peptonada 0,1%.

3.5.2 Inoculação em agar seletivo

Para a realização da contagem do gênero *Aeromonas* foram utilizadas placas de ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina, 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, utilizava-se um bastão de vidro em forma de “L”.

A incubação das placas foi realizada em incubadora para BOD a 28°C por 24 horas, a partir do que se identificava e realizava-se a contagem das colônias com características do gênero *Aeromonas*.

3.5.3 Contagem e confirmação do gênero

Para a confirmação do gênero isolavam-se até cinco colônias com as características acima descritas, as quais foram submetidas às provas de identificação, conforme apresentado no item 3.4.

⁶ Marca Phoenix - Modelo AP56

3.6 Testes de sensibilidade a antimicrobianos

Foram realizados de acordo com a metodologia descrita por BAUER et al. (1966) e NCCLS (1986). Para a realização desses testes as cepas foram repicadas em tubos contendo cinco mL de caldo 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 quatro mL de solução de 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 a 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v/v) (escala de Mac Farland). A seguir, as culturas diluídas foram semeadas, com auxílio de suabes esterilizados, em placas com ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente três minutos, tempo necessário à secagem da superfície do meio, foram colocados os polidiscos⁷ contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37°C, através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

Foram testados 15 princípios ativos de uso rotineiro na medicina humana e animal, sendo eles: Amicacina (30 µg), Amoxicilina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Aztreonam (30 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepime (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Ciprofloxacina (05 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Piperacilina/T (110 µg), Sulfazotrim (25 µg) e Tetraciclina (30 µg).

3.7 Análise estatística

Foi realizado o teste não paramétrico do Qui-quadrado para comparação da frequência de isolamentos e da frequência dos perfis de resistência a antimicrobianos de bactérias do gênero *Aeromonas* entre as amostras de produção industrial e colonial (STEEL & TORRIE, 1960).

⁶ DME – Diagnóstico Microbiológico Especializado. – Poli Sensidisc 15.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2, verifica-se que o gênero *Aeromonas* foi isolado em 49 (16,6%) das 295 amostras processadas. Na Tabela 1 estão identificadas as populações e espécies de *Aeromonas* isoladas em cada um dos pontos de coleta para o queijo Minas Frescal.

Tabela 1- Espécies e populações de *Aeromonas* sp. obtidas em amostras colhidas durante o fluxograma de produção do queijo Minas Frescal, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Amostras				
Origem	Analisadas	Positivas(%)	População Média	Espécies
Água	25	0 (0,0)	<1,0x10UFC/mL	-
Mão Manipulador Início	25	0 (0,0)	<1,0x10UFC/mão	-
Mão Manipulador Final	25	02 (8,0)	1,0x10UFC/mão	<i>A. caviae</i>
Utensílios	25	0 (0,0)	<1,0x10UFC/cm ²	-
Ambiente	25	05 (20,0)	2,1x10 ¹ UFC/placa	<i>A. caviae</i>
Leite Cru	25	24 (96,0)	1,0x10 ⁷ UFC/mL	<i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. schubertii</i>
Leite Após Pasteurização	25	01 (4,0)	1,0x10 UFC/mL	<i>A. sobria</i>
Massa Coagulada	25	0 (0,0)	<1,0x10 UFC/g	-
Massa Enformada	25	0 (0,0)	<1,0x10 UFC/g	-
Queijo Pronto	25	0 (0,0)	<1,0x10 UFC/g	-
TOTAL	250	32 (12,8)		

As análises dos diferentes produtos e pontos envolvidos durante a produção do queijo Minas Frescal, revelaram a presença do gênero *Aeromonas* em 32 (12,8%) das 250 amostras.

Para o leite cru, 24 (96,0%) amostras foram positivas para o gênero. *A. caviae* foi isolada em 87,5% das amostras positivas, *A. sobria* em 16,7% e *A. schubertii* em 4,2%. Em contrapartida, apenas uma amostra de leite pasteurizado foi positiva, nesta foi isolada a espécie *A. sobria*.

Em relação às amostras ambientais, 20,0% foram positivas, sendo a espécie *A. caviae* a única isolada. Quanto à avaliação das mãos dos manipuladores como possível fonte de contaminação e disseminação da bactéria para o queijo industrializado, foram realizados suabes antes do início das atividades e durante a produção do queijo. No primeiro momento de coleta, 100,0% dos suabes realizados na indústria foram negativos para *Aeromonas* sp., porém no decorrer das atividades de produção, ocorreu a contaminação, visto o agente ter sido isolado em 8,0% dos suabes realizados durante a jornada de trabalho. Somente a *A. caviae* foi isolada com população média de $1,0 \times 10^4$ UFC/mão.

Com estes resultados destaca-se o elevado nível de contaminação do leite cru. Três espécies do gênero *Aeromonas* foram isoladas em 24 das 25 amostras analisadas.

Diversos autores já relataram a presença do gênero no leite cru e em seus derivados. CARNEIRO & ROSSI JÚNIOR (2006) verificaram os possíveis pontos de contaminação e disseminação da *Aeromonas* sp. no fluxograma de beneficiamento em uma granja de Leite Tipo A no Estado de São Paulo, e encontraram 90,0% de amostras positivas para o gênero no leite cru. No mesmo estado, AMARAL et al. (2006) obtiveram 85,0% e 55,0% de amostras positivas em períodos de chuva e estiagem, respectivamente.

Em estudo realizado por IBRAHIM & Mac RAE (1991) na Austrália, 27,0% das amostras de leite cru analisadas foram positivas para *Aeromonas* sp. com predomínio da *A. hydrophila*. Para MELAS, PAPAGEORGIOU & MANTIS (1999) 40,5% das amostras foram positivas para o gênero. ENEROTH et al. (1998) relataram percentual

de 48,0%. Valor ainda maior foi observado por KIROV et al. (1993), que obtiveram 60,0% de amostras positivas.

A revisão de literatura revelou valores menores, quando comparados com 96,0% de amostras positivas obtidos na presente pesquisa, demonstrando assim, o risco potencial que o leite cru representa como o maior disseminador das aeromonas na indústria de lácteos.

As aeromonas estão amplamente distribuídas no meio ambiente, especialmente na água, no solo e nas fezes dos animais (PALÚ et al., 2006). Desta forma podem atingir facilmente o úbere das fêmeas em lactação e os utensílios empregados na obtenção do leite, e então ser carregada para o mesmo.

Destaca-se ainda, a possibilidade do agente formar biofilmes, tanto na tubulação da água da propriedade, quanto nos equipamentos de ordenha, locais que se tornam fontes de contaminação. Neste caso, os aspectos higiênico-sanitários são determinantes da qualidade da matéria prima e por consequência dos produtos finais.

Para se ter uma idéia dos aspectos higiênico-sanitários e das características do leite empregado pela indústria para elaboração do queijo Minas Frescal, amostras de leite foram coletas diretamente dos tanques de recepção do laticínio, minutos antes do seu processamento e encaminhadas para análise. A contagem total de bactérias revelou uma população média de $7,7 \times 10^6$ UFC/mL, com valores que variaram de $1,6 \times 10^6$ UFC/mL a $1,4 \times 10^7$ UFC/mL. Para contagem de células somáticas a média observada por mL foi de $4,3 \times 10^5$. O valor médio de pH do leite foi 6,5. Demonstra-se com estes resultados a qualidade microbiológica insatisfatória da matéria prima utilizada para produção do derivado lácteo, sendo as aeromonas parte desta contaminação inicial.

A contaminação da matéria prima pode estar relacionada ao papel fundamental que a água apresenta como fonte de origem das aeromonas para o leite durante a sua obtenção nas propriedades rurais. Especialmente nos estabelecimentos leiteiros da região em estudo, que na grande maioria, empregam a água obtida de poços profundos ou rasos, sem cloração ou avaliação de potabilidade.

O fato de 96,0% das amostras de leite cru analisadas apresentarem o agente, também pode estar relacionado com as grandes distâncias percorridas entre as propriedades rurais e o laticínio. Já que, o tempo de armazenamento do leite até o seu processamento, mesmo sob refrigeração, pode ser favorável à multiplicação das aeromonas.

Apesar de tratar-se de uma bactéria mesófila, estudos têm demonstrado que o agente é capaz de se multiplicar em baixas temperaturas, competir com a microbiota psicrotrófica, e até produzir fatores de virulência nestas condições (DASKALOV, 2006).

Segundo KIROV et al. (1993) as bactérias do gênero *Aeromonas* mantidas a 5°C são capazes de quadruplicar sua população em curto espaço de tempo, indicando crescimento psicrotrófico competitivo em grande variedade de alimentos.

Nesse sentido, destaca-se que a refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas causadoras de acidificação. Entretanto, isso favorecerá a microbiota psicrotrófica presente na matéria prima, o que poderá provocar diversas alterações no leite e seus derivados (PALÚ et al., 2006). É extremamente importante que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para diminuir a contaminação inicial e, desta forma, a redução da temperatura pode manter a contagem microbiana em níveis baixos. Salientou-se que, quanto maior o tempo de estocagem sob baixas temperaturas (7 a 10°C) de um leite apresentando alta contagem inicial de microrganismos, maiores serão as possibilidades de alterações no produto final pela ação de microrganismos psicrotróficos (PALÚ et al., 2006).

Associado a isso, destaca-se o fato das aeromonas produzirem diferentes enzimas e fatores de virulência que poderão permanecer no alimento, mesmo quando não é possível isolar células vegetativas. Diferentes autores revelaram preocupação quanto a veiculação de cepas enterotoxigênicas através de alimentos de origem animal, destacando o perigo à saúde pública (FREITAS, 1993, ROSSI JÚNIOR, 2001).

O gênero é sensível à pasteurização, inclusive, segundo COSTA & ROSSI JÚNIOR (2002), 75,0% das aeromonas resistem ao aquecimento a 56°C durante dez minutos e serão eliminadas se mantidas por 20 minutos a esta temperatura. Assim,

acredita-se que o fato de uma das 25 amostras de leite pasteurizado ter sido positiva para o gênero, esteja relacionada com a recontaminação após o processamento térmico. Essa hipótese também foi levantada por KIROV et al. (1993). Estes autores encontraram 60,0% (43/72) de amostras positivas para *Aeromonas* sp. no leite cru e apenas 4,0% no leite pasteurizado.

Por outro lado, 100,0% das amostras de massa coagulada, massa enformada e queijo pronto para consumo, foram negativas para *Aeromonas* sp. Justifica-se este achado pela eliminação do agente na matéria prima pela pasteurização, já que apenas uma amostra de leite pasteurizado foi positiva e com pequena população, e pelo baixo nível de contaminação observado nas demais possíveis fontes do microrganismo, como ambiente e mãos do manipulador.

Os resultados podem estar associados também com a viabilidade e estabilidade da bactéria em alimentos que é favorecida pelo pH neutro, umidade e manutenção da temperatura ótima de 28°C, apesar de contar com uma larga faixa de tolerância. É possível então, que o pH desfavorável no queijo pronto para consumo, que foi em média de 5,8, tenha contribuído para o não isolamento do agente. Durante a coagulação e enformagem o pH variou entre 6,5 e 6,6, com temperaturas médias 31°C e 41°C, respectivamente na massa após a coagulação e durante o processo de enformagem.

Ainda em relação ao pH, MERINO et al. (1995) afirmam que pH 4,6 parece ser o menor valor testado para multiplicação das aeromonas. Este, quando associado às demais características ideais de temperatura e umidade, permitiu a multiplicação lenta do microrganismo. Parece haver também, uma diferença de tolerância ao ácido entre as espécies, estando a *A. caviae* ausente em meios ácidos. Diante desta informação, e sabendo que esta espécie foi a mais isolada nas amostras, o pH pode ter sido um fator inibidor do agente no queijo pronto para consumo.

Pode ter contribuído para o não isolamento do agente o fato de o queijo enformado ter sido mantido imerso em salmoura e sob refrigeração durante 12 horas, para só então ser embalado. Em relação à presença de NaCl (cloreto de sódio) a *Aeromonas* sp. não toleram concentrações superiores a 5%, desde que em condições

ideais de temperatura. Se mantidas a 3,8°C, a concentração de NaCl não deve ser superior a 3,5% para permitir a multiplicação do agente (MERINO et al., 1995).

Já, considerando os parâmetros de atividade de água (a_w), em trabalho realizado por MERINO et al. (1995), em condições de laboratório, o microrganismo foi capaz de se multiplicar com taxa de a_w superior a 0,94. Com temperatura de 3,8°C a multiplicação só foi observada com taxa de a_w superior a 0,98 e associada à baixa concentração de sal. Para as amostras de queijo em estudo a a_w média foi de 0,98, indicando a possibilidade da multiplicação das aeromonas neste alimento, desde que os demais fatores fossem favoráveis.

Para o queijo Colonial os resultados estão expressos na Tabela 2. O gênero foi isolado em sete dos nove pontos de coleta distribuídos durante o fluxograma de produção. Dezesete (37,7%) do total de 45 amostras processadas foram positivas para o gênero.

Diferentemente do observado no processamento do queijo Minas Frescal, a água utilizada na propriedade rural foi positiva para o gênero. Das cinco amostras de água, três (60,0%) estavam contaminadas. Em uma das amostras foram isoladas as espécies *A. hydrophila* e *A. caviae* concomitantemente. Isolou-se somente a *A. hydrophila* em uma segunda amostra e na terceira amostra positiva foi isolada a *A. caviae*.

Das amostras positivas, 100,0% foram oriundas da água utilizada pela propriedade rural para fabricação do queijo Colonial e proveniente de poço raso, utilizada sem nenhum tipo de tratamento ou realização de análises para avaliar sua qualidade microbiológica e físico-química. Confirma-se com este resultado, que diferentes espécies de aeromonas são capazes de se multiplicar em sistemas de distribuição de água.

Comparando com os resultados da indústria de queijo Minas Frescal, 100,0% das amostras foram negativas para o gênero. A água era proveniente de poço profundo, que sofre tratamento adequado (cloração) e é supervisionado pelo Serviço de Inspeção Federal através de análises mensais de potabilidade. Estas, durante todo experimento, mostraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

Assim, para fabricação de queijos, confirmou-se que a água não tratada pode representar uma importante fonte de contaminação e disseminação do gênero *Aeromonas*.

Tabela 2 - Espécies e populações de *Aeromonas* sp. obtidas em amostras colhidas durante o fluxograma de produção do queijo Colonial, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Amostras				
Origem	Analisadas	Positivas(%)	População Média	Espécies
Água	05	3 (60,0)	7,3x10UFC/mL	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i>
Mão Manipulador Início	05	3 (60,0)	4,0x10UFC/mão	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i>
Mão Manipulador Final	05	2 (40,0)	1,0x10UFC/mão	<i>A. veronii</i> , <i>A. jandaei</i>
Utensílios	05	1 (20,0)	1,0x10UFC/cm ²	<i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i>
Ambiente	05	0 (0,0)	<1,0x10UFC/placa	-
Leite Cru	05	3 (60,0)	2,2x10 ⁴ UFC/mL	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i>
Leite Após Aquecimento	05	2 (40,0)	1,0x10 ⁵ UFC/mL	<i>A. hydrophila</i>
Massa Coagulada	05	3 (60,0)	6,7x10 ³ UFC/g	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i>
Queijo Pronto	05	0 (0,0)	<1,0x10UFC/g	-
TOTAL	45	17 (37,8%)		

Espécies de aeromonas consideradas móveis são membros importantes da microbiota normal da água, com relatos de isolamento a partir de águas doce, salgada

ou salobra, poluídas ou não, contaminadas por fezes ou potáveis, não cloradas bem como de águas cloradas (ROCHA, 2004).

A maioria dos autores considera que a água é a principal fonte de contaminação para os alimentos de uma forma geral (MASSA, ALTIERI & D'ANGELA 2001, SZCZUKA & KAZNOWSKI, 2004, SOLER et al. 2003 e AGUILERA-ARREOLA et al. 2005), atuando também como veículo de transmissão do agente ao ser humano, predominantemente durante os períodos quentes (ROSSI JÚNIOR, AMARAL & NADER FILHO, 2000).

AMARAL et al. (2006) destacam a água como importante veículo de transmissão do gênero *Aeromonas* para o leite. Os autores isolaram o agente em 70,0% e 30,0% de amostras de água não clorada utilizada em propriedades leiteira, nos períodos de chuva e estiagem respectivamente.

Há na literatura relato de isolamento de *Aeromonas* sp. a partir de águas em diferentes condições, inclusive cloradas (MENDES et al., 2003). Entretanto, o cloro residual, empregado no tratamento da água pela indústria submetida ao Serviço Oficial de Inspeção, pode ter sido o fator limitante à sobrevivência e multiplicação do gênero *Aeromonas*, sugerindo que essa água não atuou como fonte de contaminação nas diferentes etapas do processamento.

No sentido de corroborar com os resultados obtidos no presente estudo, pesquisas apontam a água não tratada como a forma mais comum para se adquirir este patógeno. Para FUZIHARA et al. (1995), 4,6% das amostras de água clorada foram positivas para o gênero contra 42,4% das não cloradas.

Quase 50,0% das amostras de água não tratada analisadas por GHENGHESCH et al. (2001) foram positivas para o gênero *Aeromonas*, sendo 59,0% *A. hydrophila*, 27,0% *A. caviae*, 11,0% *A. sobria* e 3,0% foram consideradas atípicas.

Da mesma forma para MASSA, ALTIERI & D'ANGELA (2001), cinco das 20 amostras de água de poço não clorada, foram positivas para *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*.

Para água de abastecimento utilizada por indústrias de produtos de origem animal, ROSSI JÚNIOR et al. (1996) não isolaram o gênero da água utilizada em um

estabelecimento que abatia e industrializava carne bovina e atribuíram tal resultado ao cloro residual. Resultado semelhante foi obtido por COSTA & ROSSI JÚNIOR (2002) ao analisar água de abastecimento empregada durante o fluxograma de abate de frangos.

Ressalta-se ainda o risco à saúde pública representada pela água de abastecimento utilizada pela propriedade avaliada, considerando as aeromonas como importantes agentes de gastroenterites e demais enfermidades e destacando seu potencial enterotoxigênico e hemolítico. Nesse sentido, BURKE et al. (1984), isolaram aeromonas de pacientes com diarreia e de amostras de água clorada e não clorada, na Austrália. Os autores verificaram que 91,0% dos isolados de diarreia, 70,0% dos isolados de água de abastecimento e 64,0% dos de água não clorada eram enterotoxigênicos e hemolíticos.

Com base nos resultados obtidos, associados aos dados da literatura pesquisada, sugere-se que no caso do queijo Colonial a água pode ter sido uma das fontes de contaminação e disseminação da *Aeromonas* sp. durante a sua produção. Representando também, um risco para saúde das pessoas que consomem esta água diariamente na propriedade. Na indústria, porém, esta fonte foi totalmente eliminada, já que o gênero não foi isolado em nenhuma das 25 amostras de água analisadas.

As mãos dos manipuladores também foram avaliadas como uma possível fonte de contaminação e disseminação para o queijo. Para o queijo Colonial, foi possível isolar *A. hydrophila* e *A. sobria* em 60,0% dos suabes realizados antes do início das atividades, com população média de $4,0 \times 10$ UFC/mão, demonstrando que o manipulador pode chegar ao local de trabalho portando na pele os referidos microrganismos. Reforça-se, com este resultado, a importância da correta desinfecção das mãos, especialmente durante a produção artesanal de alimentos.

Durante a jornada de trabalho, 40,0% dos suabes foram positivos para *A. veronii* e *A. jandaei*, com população média de $1,0 \times 10$ UFC/mão. Diante destes resultados, as mãos dos manipuladores podem representar também importante via de disseminação do patógeno para o queijo Colonial, tanto no início quanto durante a jornada de trabalho. Destaca-se, nesse caso, a necessidade de correta desinfecção das mãos dos manipuladores.

O isolamento de espécies diferentes, antes e durante a jornada de trabalho, pode estar associado ao fato do manipulador ter contato com diversos equipamentos e utensílios da propriedade e não somente os utilizados para produção do queijo Colonial.

Outros autores também revelaram a presença do gênero em manipuladores, evidenciando inclusive o seu potencial enterotoxigênico. De acordo com o estudo realizado por ROSSI JÚNIOR et al. (2001), foram isoladas 102 cepas de *Aeromonas* sp. (18 de *A. hydrophila*, 65 de *A. caviae* e 19 atípicas) de diferentes produtos e locais em um matadouro frigorífico de bovinos, envolvendo dentre outros tipos de amostras, suabes das superfícies das mãos de manipuladores antes e durante a jornada de trabalho. Revelaram-se como produtoras de enterotoxinas três (16,7%) cepas da espécie *A. hydrophila* originárias das mãos dos manipuladores antes que eles iniciassem seus trabalhos e uma (1,5%) da espécie *A. caviae*, também isolada das mãos.

Para os utensílios empregados na fabricação do queijo Colonial uma amostra foi positiva. As espécies *A. sobria* e *A. caviae* foram isoladas com população média de $1,0 \times 10^1$ UFC/cm². Evidencia-se assim, a importância das superfícies como fontes de contaminação para o produto final e a necessidade de correta limpeza e higienização das mesmas, visto que estas podem ser facilmente contaminadas a partir de outras fontes de contaminação, como a água, passando a se constituir veículo de contaminação cruzada.

Em relação ao leite empregado para fabricação do queijo Colonial, das cinco amostras de leite cru analisadas, três (60,0%) foram positivas para *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*. Como já citado anteriormente o leite cru parece estar frequentemente contaminado com microrganismos do gênero *Aeromonas*. Fato que pode ser explicado por diferentes fatores, entre eles pela distribuição ambiental do agente, além de o mesmo fazer parte da microbiota da água. Dessa maneira pode atingir facilmente o leite, durante sua obtenção ou armazenamento.

Em relação às características higiênico-sanitárias do leite produzido na propriedade, a contagem total de bactérias foi de $3,5 \times 10^6$ UFC/mL, para contagem de células somáticas o valor foi de $3,7 \times 10^6$ /mL e o pH médio das amostras foi 7,0. Estes

resultados indicam condições higiênico-sanitárias de obtenção da matéria prima deficientes, visto serem muito superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) que determina o limite para contagem de células somáticas e contagem total bacteriana em, no máximo $7,5 \times 10^5/\text{mL}$.

Apesar das condições insatisfatórias, durante o processo de fabricação do queijo Colonial o leite utilizado como matéria prima não sofria pasteurização, somente um aquecimento em temperatura média de $34,6^\circ\text{C}$ por 15 minutos, para posterior adição do coalho enzimático. Nessas condições, tanto no leite após o período de aquecimento, quanto na massa já coagulada, foi possível isolar diferentes espécies do gênero *Aeromonas*. No leite, foram isoladas *A. hydrophila*, em duas das cinco amostras coletadas. Para massa coagulada três amostras foram consideradas positivas. *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* foram isoladas.

Nenhuma das amostras de queijo pronto para consumo analisadas revelou a presença do agente. O queijo Colonial no momento de sua comercialização apresentava um pH médio de 5,7, fato que pode ter contribuído para o não isolamento da *Aeromonas* sp., especialmente se associado às condições não ideais de concentração de sal e a_w . A manutenção do queijo em temperatura ambiente pode ter favorecido a multiplicação de diferentes gêneros de microrganismos, e nesse caso, a competição pode ter dificultado o isolamento das aeromonas durante o cultivo.

Os resultados, porém, divergem de outros trabalhos consultados, especialmente dentre aqueles realizados no Brasil. FREITAS (1993) relata o isolamento da *Aeromonas* sp. em 32,0% das amostras de queijo branco coletadas em supermercados do Rio de Janeiro, sendo 28,0% das culturas produtoras de enterotoxinas.

BULHÕES & ROSSI JÚNIOR (2002) analisaram 160 amostras de queijo Minas Frescal artesanal adquiridas no comércio varejista dos municípios de Poços de Caldas/MG e Jaboticabal/SP, objetivando verificar a ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* no produto. Do total de amostras analisadas, 82 (51,2%) apresentaram *Aeromonas*, encontrando as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. schubertii* e cepas consideradas atípicas. Alguns estudos consideram as espécies *A. hydrophila*, *A. sobria*

e *A. caviae* predominantes dentre as espécies isoladas de leite e subprodutos (KIROV et al., 1993).

Segundo DASKALOV (2006) as medidas de controle adotadas para *A. hydrophila* seriam o uso de água tratada, cozinhar bem os alimentos, higiene no manuseio, processamento, preparação e estocagem dos alimentos e devido à natureza psicrotrófica das aeromonas, alimentos principalmente de origem animal com longa vida de prateleira em refrigeração necessitam ser manipulados e estocados corretamente.

No presente estudo foi verificado uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os estabelecimentos produtores quanto ao percentual de amostras positivas para *Aeromonas* sp. No estabelecimento submetido ao serviço de inspeção permanente, foram identificadas quatro fontes de contaminação e disseminação do agente durante o fluxograma de produção do queijo Minas Frescal, dos dez pesquisados, sendo que das 250 amostras analisadas, 12,8% foram positivas. Em comparação, durante o processamento do queijo Colonial, produzido sem nenhum acompanhamento oficial e sem seguir as determinações legais de instalações, higiene e controle de qualidade, 37,7% das 45 amostras foram positivas. Foi possível isolar o agente em sete dos nove pontos analisados. Cabe enfatizar então, o maior risco que a produção informal de alimentos representa para população consumidora.

4.1 Comportamento frente a ação de antimicrobianos

O aparecimento de estirpes com múltipla resistência a agentes antibacterianos constitui um problema na atualidade de grande importância para a saúde pública. Isolados de aeromonas com múltipla resistência a antimicrobianos têm sido relatadas em diversas partes do mundo (VIVEKANANDHAN et al., 2002). Segundo diferentes autores, as aeromonas podem adaptar-se rapidamente às novas drogas empregadas na medicina (BIZANI & BRANDELLI, 2001).

A múltipla resistência foi relatada por ROSSI JÚNIOR et al. (2000) que detectaram 84,3% de cepas resistentes a dois ou mais antimicrobianos, porém,

conforme está demonstrado nas Tabelas 3 e 4, esta realidade mostrou-se ainda mais preocupante no presente estudo, que revelou culturas de aeromonas resistentes a múltiplas drogas, especialmente dos isolados obtidos na linha de produção do queijo Minas Frescal. Neste caso, 98,3% dos isolados apresentaram resistência a dez ou mais princípios. 51,8% dos isolados foram resistentes a todos os princípios testados. Para *A. caviae*, *A. sobria* e *A. schubertii* 100,0% das culturas apresentaram resistência a seis ou mais princípios.

Tabela 3 - Distribuição das culturas de *A. caviae*, *A. sobria* e *A. schubertii* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do queijo Minas Frescal, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes.

RESISTÊNCIA (nº de princípios) ¹	<i>A. caviae</i> (nº de culturas)	<i>A. sobria</i> (nº de culturas)	<i>A. schubertii</i> (nº de culturas)	TOTAL GERAL
1				
2				
3				
4				
5				
6	01(2,0) ²			01(1,7) ³
7				
8				
9				
10	02(4,0)	01(16,7)		03(5,2)
11	03(6,0)			03(5,2)
12	03(6,0)	02(33,3)		05(8,6)
13	06(12,0)			06(10,3)
14	09(18,0)	01(16,7)		10(17,2)
15	26(52,0)	02(33,3)	02(100,0)	30(51,8)
TOTAL	50(100,0)	06(100,0)	02(100,0)	58(100,0)

¹ Antimicrobianos: tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, amicacina, ampicilina, cefalotina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina e piperacilina.

² Percentagem de isolados resistentes em relação ao total de isolados da espécie.

³ Percentagem de isolados resistentes em relação ao total de isolados testados.

Tabela 4 - Distribuição das culturas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veroni* e *A. jandaei* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do queijo Colonial, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes.

RESISTÊNCIA (nº de princípios) ¹	<i>A. hydrophila</i> (nº de culturas)	<i>A. caviae</i> (nº de culturas)	<i>A. sobria</i> (nº de culturas)	<i>A. veroni</i> (nº de culturas)	<i>A. jandaei</i> (nº de culturas)	TOTAL GERAL
1						
2						
3	01(5,9) ²	01(10,0)				02(5,0) ³
4		01(10,0)				01(2,5)
5		02(20,0)				02(5,0)
6	01(5,9)	01(10,0)				02(5,0)
7			02(28,5)			02(5,0)
8			01(14,3)			01(2,5)
9						
10		02(20,0)				02(5,0)
11	01(5,9)		02(28,5)			03(7,5)
12	06(35,3)	01(10,0)			02(66,7)	09(22,5)
13	03(17,6)	01(10,0)				04(10,0)
14	05(29,4)	01(10,0)	01(14,3)	01(33,3)	01(33,3)	09(22,5)
15			01(14,3)	02(66,7)		03(7,5)
TOTAL	17(100,0)	10(100,0)	07(100,0)	03(100,0)	03(100,0)	40(100,0)

¹ Antimicrobianos: tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, amicacina, ampicilina, cefalotina, cefoxitina, sulfazotrim, amoxicilina, aztreonam, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina e piperacilina.

² Percentagem de isolados resistentes em relação ao total de isolados da espécie.

³ Percentagem de isolados resistentes em relação ao total de isolados testados.

Para os isolados obtidos durante o fluxograma de produção do queijo Colonial, 75% foram resistentes a pelo menos dez antimicrobianos. Verifica-se que das 17 culturas de *A. hydrophila* submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, 15 (88,2%) apresentaram resistência a, no mínimo, onze princípios.

O perfil de resistência observado para essa espécie é superior ao citado na literatura consultada. COSTA & ROSSI JÚNIOR (2002), obtiveram 50,0% dos isolados resistentes a quatro princípios e 14,3% a até sete princípios em diferentes combinações. ROSSI JÚNIOR et al. (2000) evidenciaram 22,2% das culturas de *A. hydrophila* resistentes a dois princípios e 38,9% a até seis.

A múltipla resistência também foi identificada para as demais espécies isoladas. *A. caviae* mostrou-se resistente a, pelo menos, três antimicrobianos. Para *A. sobria* todos os isolados foram resistentes a sete princípios ou mais. Já, para *A. veroni*, todos os isolados foram resistentes a quatorze ou quinze antimicrobianos. *A. jandaei* apresentou resistência a pelo menos doze princípios antimicrobianos.

Para todas as espécies de aeromonas identificadas, o perfil de resistência às drogas de uso comum na medicina humana e animal, observado no presente estudo, foi superior ao relatado na bibliografia consultada. Esses achados são preocupantes, uma vez que as culturas dessas espécies foram obtidas na linha de processamento de dois diferentes tipos de queijos amplamente consumidos no Rio Grande do Sul, revelando risco à saúde pública.

Na Figura 1 estão especificados o número de isolados do gênero a partir do fluxograma de produção do queijo Minas Frescal, resistentes, sensíveis e intermediários aos 15 antimicrobianos testados.

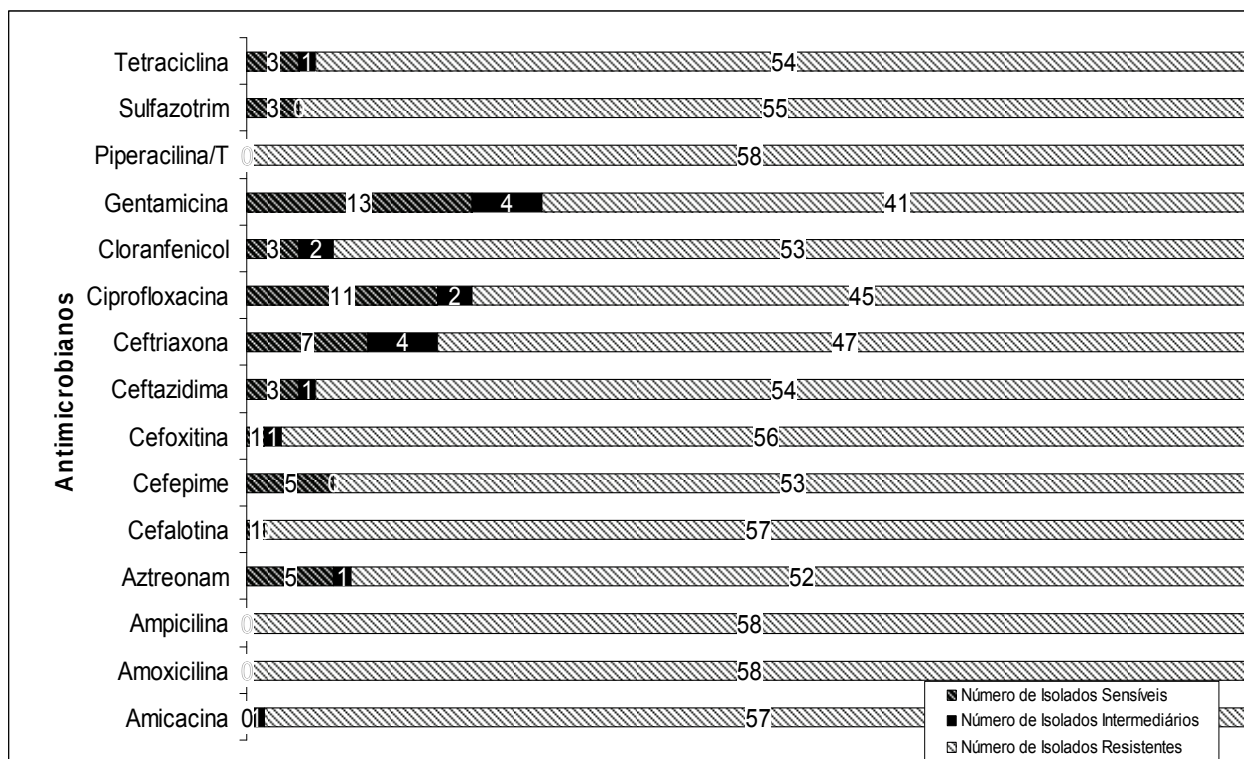


Figura 1- Perfis de resistência dos isolados de *Aeromonas* sp. do fluxograma de processamento queijo Minas Frescal, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Rio Grande do Sul.

Para a ampicilina, amoxicilina e piperacilina/tazobactam, 100% dos isolados foram resistentes, para amicacina e cefalotina apenas um isolado foi sensível. Para cefoxitina uma cepa foi sensível e uma apresentou perfil intermediário. Sulfazotrim revelou 94,8% de isolados resistentes, para tetraciclina e ceftazidima o percentual foi de 93,1% e 91,3% para cloranfenicol e cefepime. Em relação ao aztreonam, 52 (89,6%) isolados foram resistentes. Os antimicrobianos aos quais os microrganismos apresentaram os menores perfis de resistência foram gentamicina, ciprofloxacina e ceftriaxona, com 70,6%, 77,5% e 81,0%, respectivamente.

Na Figura 2 está demonstrado os perfis de resistência dos isolados do fluxograma de preparação do queijo Colonial. Dentre os 40 isolados também foram observadas culturas com resistência a múltiplos antimicrobianos, porém revelou-se um número maior de isolados sensíveis em comparação aos obtidos no queijo Minas Frescal.

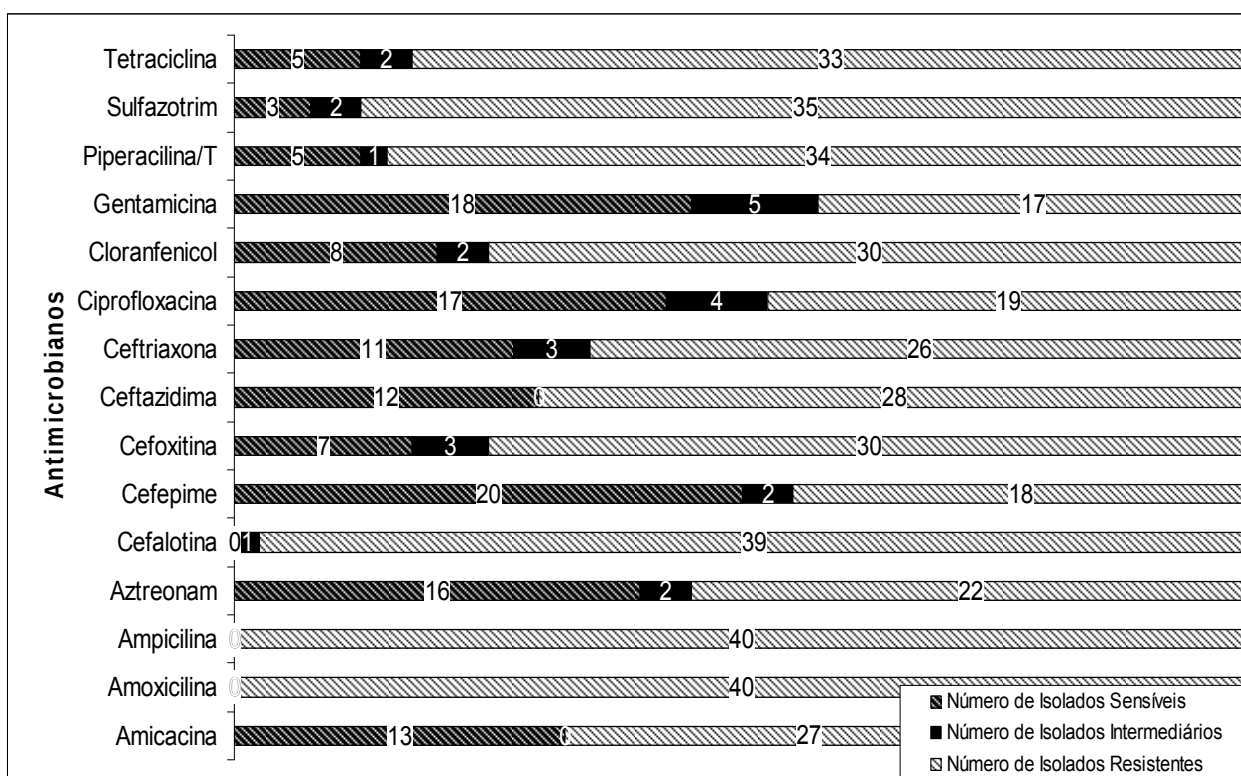


Figura 2- Perfis de resistência dos isolados de *Aeromonas* sp. do fluxograma de produção do queijo Colonial, no período de 2006 a 2008, na região Noroeste do Rio Grande do Sul.

Gentamicina, cefepime e ciprofloxacina apresentaram os menores níveis de resistência (42,5%, 45,0% e 47,5%, respectivamente). Para o aztreonam 22 (55,0%) isolados foram resistentes, para ceftriaxona foram 26 (65,0%), 27 (67,5%) para a amicacina, 28 (70,0%) para ceftazidima e 30 (75,0%) para cloranfenicol e cefoxitina. Para tetraciclina, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim e cefalotina os índices de resistência foram respectivamente 82,5%, 85,0%, 87,5% e 97,5%. Para amoxicilina e ampicilina 100% dos isolados foram resistentes.

Para alguns grupos de antimicrobianos, houve diferença significativa quanto ao perfil de resistência de isolados obtidos durante o fluxograma de produção dos diferentes tipos de queijos. Para os Beta-lactâmicos e aminoglicosídeos ($p < 0,01$) e para quinolonas e cloranfenicol ($p < 0,05$), a resistência foi maior nos isolados *Aeromonas* sp. identificados durante a produção do queijo Minas Frescal. Para tetraciclina e sulfamídicos não existiu diferença entre os grupos. É possível que a maior resistência observada nos isolados a partir da produção industrial, esteja associada ao uso de diferentes antimicrobianos, representando diversas propriedades rurais e não apenas uma como ocorre na produção colonial.

A comparação, com resultados obtidos por outros autores, quanto ao perfil de resistência, revela-se preocupante, especialmente em aspectos ligados à saúde pública. Para BIZANI & BRANDELLI (2001), isolados de *A. hydrophila* e *A. sobria* oriundos da água de abastecimento e água da lavagem das carcaças bovinas mostraram-se predominantemente resistentes aos antibióticos Beta-lactâmicos, porém, 100% das 15 amostras testadas foram sensíveis a amicacina, azitromicim, cefalexina, ceftriaxone, cefoperazone, espiramicina, gentamicina, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, tetraciclina e tobramicina. Nove isolados foram sensíveis a todos os 32 antimicrobianos testados.

GHENGHESCH et al. (2001) também demonstraram isolados de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* resistentes a ampicilina (100% dos isolados); 95% foram resistentes a cefaloridina e 5% a tetraciclina, porém foram sensíveis a gentamicina, a kanamicina, ao ceftriaxone, ao cloranfenicol, ao ciprofloxacim e ao ácido nalidíxico.

A resistência múltipla do agente também é destacada por VIVEKANANDHAN et al. (2002). Estes autores obtiveram mais de 95% das amostras resistentes a bacitracina, eritromicina, neomicina, novobiocina, polimixina-B e a rifampicina. Menor perfil de resistência foi observado para cloranfenicol (3,7%), gentamicina (7,5%), estreptomicina (8,7%) e ácido nalidíxico (16,9%). Cerca de 51% dos isolados foi resistente a tetraciclina.

Kämpfer et al. (1999), citados por FALGÂS (2003), determinaram a sensibilidade de 217 culturas, que representavam 14 espécies de aeromonas, a 69 agentes antimicrobianos. Estes autores constataram que não existiam diferenças significativas entre as espécies. A maioria das cepas foi sensível às tetraciclina, quinolonas, cloranfenicol, nitrofurantoina, trimetropim, a maioria dos aminoglicosídeos, cefalosporinas, azlocilina e piperacilina.

Para FALGÂS (2003) todas os isolados, com exceção da *A. trota*, foram resistentes à ampicilina e 44,1% deles cepas foram resistentes a tetraciclina. Quanto às cefalosporinas cabe destacar que todas as espécies mostraram certa resistência (60% para *A. hydrophila*, 54% *A. popoffii*, 47% *A. caviae* e 21% *A. veronii*). Os aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas apresentaram uma boa atividade frente aos isolados. Todas as cepas foram sensíveis ao ofloxacina e a ciprofloxacina. Porém 26% dos isolados de *A. caviae*, 20% das *A. hydrophila* e 88% das *A. veronii* eram resistentes ao ácido nalidíxico e ao ácido pipemidico.

Em estudo realizado por COSTA (2003) isolados de *A. hydrophila* mostraram-se resistentes à ampicilina, amoxicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, penicilina, rifampicina, ao trimetropim+sulfametoxazol, gentamicina, tetraciclina e oxitetraciclina, além de pouca sensibilidade a eritromicina e kanamicina.

SHARMA, DUBEY & SHARAN (2005) destacaram o risco para saúde pública associado à resistência das aeromonas a diversos antimicrobianos de uso humano e na aquicultura. Isolados de diferentes espécies, obtidos a partir de amostras de água do rio Narmada, na Índia, utilizada para abastecimento público e atividades de recreação, mostraram-se resistentes a ampicilina e sensível a gentamicina.

ARAÚJO JÚNIOR, ECHEVERRIGARAY & DELAMARE (2007) avaliaram 62 amostras de *Aeromonas* sp. obtidas de fezes de humanos, raspagem cutânea de suínos, entre outras. Cerca de 63% dos exemplares estudados apresentaram resistência múltipla a mais de dois β -lactâmicos avaliados, 5% foram resistentes à amicacina, 3% à tobramicina e gentamicina, 16% à tetraciclina, 6% à ciprofloxacin, 15% ao sulfazotrim e 18% ao cloranfenicol.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem destacar as aeromonas como importantes contaminantes na indústria de lácteos. Apesar do controle desempenhado pelo serviço de inspeção, foi possível identificar amostras positivas em pontos importantes de disseminação, como as mãos dos manipuladores e o ambiente. Neste caso, destaca-se a importância das condições das instalações e corretas medidas de higiene a fim de evitar maiores riscos. Destaca-se ainda a importância da pasteurização da matéria prima, e o controle de todas as etapas de produção.

Atribui-se à produção informal os maiores riscos relacionados à saúde do consumidor. Durante o processamento artesanal, diferentes fontes de contaminação e disseminação do microrganismo foram identificadas. Salienta-se o uso de água não tratada pela propriedade rural, a inexistência de tratamento térmico da matéria prima e a falta de higiene.

Apesar da legislação brasileira estabelecer, desde 1950, a obrigatoriedade da inspeção sanitária para todos os produtos de origem animal (BRASIL, 1950), o que constata-se é a produção e consumo ainda baseados em aspectos culturais. Os produtos coloniais, de um modo geral, não oferecem melhores preços, mas trazem para alguns consumidores a falsa impressão de se tratar de um produto saudável, que não oferece riscos.

Fica evidenciado, porém, que na produção informal não existe nenhum controle do processamento, nem mesmo com aspectos básicos como a qualidade da água, determinante da qualidade do produto final. Diante do exposto alerta-se para o risco potencial que o consumo destes alimentos pode representar para saúde pública.

Medidas preventivas baseiam-se na adequação das pequenas propriedades produtoras às normas higiênico-sanitárias e de controle de qualidade estabelecidas pela

legislação. Esta conquista depende, porém, não apenas da fiscalização pelos órgãos competentes e do apoio político, mas principalmente da conscientização do consumidor, muitas vezes desinformado sobre as reais condições em que os alimentos informais são produzidos.

5 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos é possível afirmar que:

- Nos fluxogramas de produção de queijos Minas Frescal e Colonial, existem diferentes pontos que podem funcionar como fontes de contaminação e disseminação da *Aeromonas* sp. para os queijos, evidenciando o risco para a saúde pública, mesmo com a ausência do agente no produto acabado.

- Na produção industrial do queijo Minas Frescal, o leite cru, o leite pasteurizado, os manipuladores e o ambiente atuaram como fontes de contaminação e disseminação de *Aeromonas* sp.

- A água de abastecimento, leite cru e após aquecimento, os manipuladores, os utensílios e a massa após coagulação representaram os maiores riscos como fontes de contaminação e disseminação de *Aeromonas* sp. durante a produção do queijo Colonial.

- Na produção industrial as maiores populações de *Aeromonas* sp. foram observadas no leite cru; baixas contagens foram encontradas nas mãos dos manipuladores, ambiente e leite após a pasteurização.

- Durante o processamento do queijo Colonial, altas contagens de *Aeromonas* sp. foram identificadas no leite cru, após aquecimento, e massa coagulada. Água de abastecimento, mãos de manipuladores e utensílios apresentaram as menores contagens. Na semeadura direta para contagem nos queijos prontos para consumo, o gênero não foi isolado.

- Os perfis de resistência dos isolados de *Aeromonas* sp. revelaram resistência múltipla aos antimicrobianos de uso na medicina humana e animal, caracterizando assim risco à saúde pública, especialmente nos isolados durante o fluxograma de produção industrial.

REFERÊNCIAS

ABEYTA JÚNIOR, C. et al. Incidence of motile aeromonas from United States west coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 10, p. 849-855, 1990.

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

AMARAL, L. A. et al. Água utilizada em propriedades rurais para o consumo humano e na produção de leite como veículo de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, n. 557-558, p. 103-107, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. 1219p.

ARAÚJO JÚNIOR, J. R., ECHEVERRIGARAY, S., DELAMARE, P. L. Análise dos perfis de resistência a antibióticos em aeromonas e avaliação das β -lactamases de efeito expandido. In: ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES DA UCS, 15, 2007, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: UCS, 2007.

ARAÚJO, R. M. et al. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 65, p. 213-217, 1989.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, 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.

BORREGO, J. J. Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 35, p. 264-269, 1991.

BORRELL, N. et al. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 44, p. 103-108, 1998.

BRANDI, G. et al. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. **Journal of Applied Microbiology**, Bendford, v. 81, p. 439-444, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1950.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n.12, 2 de janeiro de 2001. Brasília: Ministério da Saúde, Diário Oficial da União, 2001. Art. 4^a, p. 1-48.

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

BULHÕES, C. C. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo Tipo Minas Frescal produzido sem controle higiênico-sanitário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3, p. 320-324, 2002

BURKE, V. et al. Isolation of *Aeromonas spp.* from an unchlorinated domestic water supply. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, p.367-370, 1984.

CARNEIRO, M. S.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite Tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.3, p. 271-276, 2006.

CASTRO-ESCCARPULLI, G. et al. El género *Aeromonas*. Um patógeno importante em México? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, Ciudad do México, v. 22, n. 4, p. 206-215, 2002.

COSTA, A. B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixe de água doce e sua atividade patogênica.** 2003. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

COSTA, F. N.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.5, 2002.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, Wageningen, v. 17, p. 474-483, 2006.

ENEROTH, A. et al. Critical contamination sites in the production line of pasteurized milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 8, p. 829-834, 1998.

FALGÀS, L. S. **Importancia biosanitaria de *aeromonas*: taxonomía y epidemiología.** 2003. 326 f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Zarragosa, 2003.

FREITAS, A. C. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n. 1, p. 62-65, 1993.

FUZHARA, T. O. et al. *Aeromonas hydrophila*: ocorrência em águas de consumo humano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. **Resumos...**p. 28.

GARRITY, G. M.; BOONE, D. R. CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's of manual systematic bacteriology**. The Archea and the Deeply Branching Photoprophic Bacteria. 2. ed. New York: Springer, 2001.

GHENGESCH, K. S. et al. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* in untreated well water. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 169-173, 2001

GRANUM, P. E. et al. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp from foods and water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Baltimore, v. 21, p. 131-137, 1998.

HANDFIELD, M. et al. *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3459-3461, 1996.

HÄNNINEN, M. L.; SITTONEN, A. Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or human clinical samples. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 115, p. 39-50, 1995.

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

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

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

IBRAHIM, A.; Mac RAE, I. C. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* sp. in read meat and milk samples in Brisbane. Australia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 263-269, 1991.

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

KHALIL, N. Incidence of *Aeromonas hydrophila* group in raw milk and some dairy products in Assiut city. **Assiut Veterinarian Medicine Journal**, Assuit, v. 37, p. 100-107, 1997.

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

KINGOMBE, C.I.B. et al. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 113-121, 2004.

KIROV, S. M. et al. Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, p. 306-312, 1993.

KIROV, S. M. The public health significance of *Aeromonas* sp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 179-198, 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. 235-2244, 1990.

KNOCHEL, S.; JEPPESEN, C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 317-322, 1990.

KO, W. C.; CHUANG, Y. C. *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. **Clinical Infections Diseases**, Chicago, v. 20, p. 1298-1304, 1995.

KROVACEK, K. et al. Isolation, and virulence profiles of *Aeromonas hydrophila* implicated in an outbreak of food poisoning in Sweden. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, n. 9, p. 655-661, 1995.

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

MARTINS, L. et al. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Baltimore, v. 32, p. 237-242, 2002.

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

MAYKOT, L. G. **Quantificação de *Aeromonas* sp em amostras de ostras e relação com coliformes fecais e estreptococos fecais. Produção de enterotoxina e sensibilidade a antibióticos a partir das cepas isoladas**. 2002. 129 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MELAS, D. S.; PAPAGEORGIOU, D. K.; MANTIS, A. I. Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* isolated from ra milk and other products in Northen Greece. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 62, n. 5, p. 463-466, 1999.

MENDES, E. S. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas na região metropolitana do Recife-PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.104/105, p.117, 2003.

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

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

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Fifth Edition. NCCLS document M7-45. Definition estimation of fixation indices. **Evolution**, Laurence, v. 40, p. 643-645, 1986.

NEVES, M. S. et al. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p. 78-80, 1990.

NOCITI, D. L. P. **Bactérias do gênero *Aeromonas* em carcaças e cortes comerciais de frangos e seu comportamento frente a antimicrobianos**. 1997. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

OAKEY, H. J.; ELLIS, J. T.; GIBSON, L. F. Differentiation of *Aeromonas* genomospecies using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 80, p. 402-410, 1996.

PALÚ, A. P. et al. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**, Illinois, v. 23, p. 504-509, 2006.

PALUMBO, S. A. Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 1417-1421, 1985.

PIDIYAR, V. et al. *Aeromonas culicola* 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* Kluyver and Van Niel. In: NOEL R. DRIEG (Ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 545-548.

ROCHA, S. M. **Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização no Município de Lins-SP**. 2004. 153f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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, 2000.

ROSSI JÚNIOR, O.D. et al. Bacteria of the genus *Aeromonas* in water and beef obtained at the industrial level. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 75-78, 1996.

ROSSI JÚNIOR, O.D. et al. Comportamento frente à ação de antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* sp. isoladas em matadouro bovino localizado no Estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 33-38, 2000.

ROSSI JÚNIOR, O.D. et al. 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.

SAAD, N. Ocorence of *Aeromonas hydrophila* in raw milk. **Assiut Veterinarian Medicine Journal**, Assiut, v. 25, n. 50, p. 98-102, 1991.

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

SOLER, L. et al. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 00, p. 341-349, 2003.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. New York: Mc Graw, 1960, 481p.

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. et al. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.88, p. 173-179, 2005.

TROWER, C. J. et al. Production of an enterotoxina by a gastro-enteritis-associated *Aeromonas* strain. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v.49, p. 121-1126, 2000.

VIVEKANANDHAN, K. et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 165-1168, 2002.