

REJANE DE OLIVEIRA LUNA

**IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Aeromonas* spp. ISOLADAS
DE QUEIJOS DE COALHO TIPO A COMERCIALIZADOS NA CIDADE
DE RECIFE – PE**

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

REJANE DE OLIVEIRA LUNA

**IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Aeromonas* spp. ISOLADAS
DE QUEIJOS DE COALHO TIPO A COMERCIALIZADOS NA CIDADE
DE RECIFE – PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Prof^ª Dr^ª Emiko Shinozaki Mendes

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Aeromonas* spp. ISOLADAS
DE QUEIJOS DE COALHO TIPO A COMERCIALIZADOS NA CIDADE
DE RECIFE – PE**

Dissertação de Mestrado elaborada por

REJANE DE OLIVEIRA LUNA

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Emiko Shinozaki Mendes
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof Dr. José do Egito de Paiva
Departamento de Tecnologia Rural da UFRPE

Prof^a. Dr^a. Héliida Maria Gomes de Melo
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Pernambuco - Campus Barreiros

Dr^a. Juliana Chiappori Rocha Souza
Divisão de Vigilância Sanitária (Secretaria de Saúde do Recife)

Dedico este trabalho aos meus pais, pois sem o amor, dedicação e compreensão deles, nada disto faria sentido algum.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante na minha vida, por ter me dado forças para vencer os momentos difíceis e mais uma etapa da minha vida, mas principalmente por ter iluminado meu caminho, permitindo mais esta vitória em minha vida.

À Profª Drª Emiko Shinozaki Mendes pela oportunidade concedida, confiança, pelo incentivo e ensinamentos e disponibilidade durante todo este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do experimento, meu mais profundo agradecimento.

Ao Prof. Paulo Roberto de Souza e sua equipe do laboratório de Genética pela disponibilidade, ensinamentos e paciência. Aos professores Leonildo Galiza e Rinaldo Mota, bem como sua equipe, pela disponibilidade e ajuda nas horas necessárias.

Aos amigos que conquistei no período da minha permanência no laboratório Carolina Notaro, Andrea Barretto, Helida Gomes, Juliana Carvalho, Fabíola Carneiro, Sarah Galvão, Givanildo Silva, Fernanda Meirelles, não só pelos momentos animados, pelas palavras amigas e pela amizade que tornaram os nossos dias mais agradáveis e felizes, mas também pelo companheirismo e incentivo, principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus amados pais Arlindo e Solange que sempre me apoiaram, me deram carinho, amor, atenção e força para conquistar os meus objetivos. Sem dúvida foi a principal contribuição para que eu pudesse chegar nesse momento. Aos meus familiares e amigos de longa data que são especiais e me deram incentivos sempre.

Ao meu querido Celso Andrade por fazer parte da minha vida, do meu coração e por toda sua atenção, paciência e apoio em todos os momentos, inclusive nos muitos finais de semana no laboratório.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, através da bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	6
Resumo	7
Abstract	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Produção e consumo de leite e queijo de coalho	12
3.2 Caracterização do gênero aeromonas	16
3.3 Veiculação hídrica	17
3.4 Alimentos de origem animal envolvidos na veiculação de aeromonas	18
3.5 Fatores de patogenicidade de <i>Aeromonas</i> spp.	22
3.6 Riscos a saúde do consumidor: associação de <i>Aeromonas</i> spp. a patologias em humanos e animais	23
3.7 Resistência a antimicrobianos	25
4 REFERÊNCIAS	27
5 ARTIGO CIENTÍFICO: Identificação, perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de <i>Aeromonas</i> spp isoladas de queijo de coalho tipo A	33
6 ANEXO	48

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Classificação dos principais países produtores de leite no mundo em 2006	12
TABELA 2. Região Nordeste - Produção de leite / mil litros 1985-1995/1996-2007	13
ARTIGO	
TABELA 1. Frequência de isolamento de <i>Aeromonas</i> spp. em queijo de coalho tipo A nos períodos de verão e inverno de 2011	48
TABELA 2. Frequência e espécies de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de queijo de coalho tipo A no verão e inverno	49
TABELA 3. Perfil de resistência das cepas de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de queijos de coalho tipo A frente a antimicrobianos	49

RESUMO

O queijo de coalho é um produto tradicional da região Nordeste do Brasil, produzido desde a colonização do país. É classificado em queijo de coalho tipo A o elaborado com leite pasteurizado, integral ou desnatado, de massa crua prensada em queijo de coalho tipo B o produzido com leite cru. A contaminação do leite, inclusive por bactérias do gênero *Aeromonas* pode acontecer na obtenção ou durante o processamento, se não forem observados procedimentos de higiene e de segurança como a pasteurização adequada e utilização de água de qualidade na higienização de equipamentos. Objetivou-se avaliar o perfil higiênico-sanitário de queijos de coalho tipo A, no que concerne à presença de aeromonas, a partir do isolamento e identificação das espécies obtidas nos períodos de verão e inverno, bem como verificação do perfil de resistência dos isolados frente a antibióticos. Foi observada alta frequência de aeromonas em ambos os períodos. As espécies isoladas foram *A. hydrophila* (54,8%), *A. caviae* (24,7%) e *A. sobria* (17,8%), espécies frequentemente incriminadas como causadoras de diarreia aguda, e em menor frequência, a *A. veronii* (2,7%). Todas as espécies isoladas apresentaram múltipla resistência a antimicrobianos, sendo resistentes no mínimo a três dos oito antibióticos testados. Queijos de coalho tipo A podem representar risco à saúde pública devido a uma alta frequência de *Aeromonas* spp., apresentando múltipla resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: lácteo, psicotróficas, saúde pública, gastroenterite

ABSTRACT

The coalho cheese is a traditional product of the Northeast region of Brazil, produced since the colonization of the country. It is classified in coalho cheese type A made with the pasteurized milk, whole or skimmed, raw pressed mass, and coalho cheese type B that produced with raw milk. Contamination of milk by bacteria including *Aeromonas* can happen in obtaining or during processing, if procedures are not complied with health and safety as pasteurization and proper use of water quality in the cleaning of equipment. The objective was to evaluate the hygienic-sanitary profile of coalho cheese type A, with respect to quantification of *Aeromonas*, isolation and identification of species obtained in periods of summer and rainy, and check the resistance profile of isolates against antibiotics. We obtained mean *Aeromonas* counts ranging from 1.0×10^3 to 1.6×10^{10} , and the highest counts observed during the rainy season. The species isolated were *A. hydrophila* (54.8%), *A. caviae* (24.7%) and *A. sobria* (17.8%), species frequently incriminated as causes of acute diarrhea, and less frequently, *A. veronii* (2.7%). All isolated strains showed resistance to multiple antimicrobial drugs, is resistant to at least three of the eight antibiotics tested. The coalho cheese type A may pose a risk to public health due to a high population of *Aeromonas* spp., presenting resistance to multiple antibiotics.

Keywords: milk, psychrotrophic, public health, gastroenteritis

1. INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos considerados de alto valor biológico, o leite ocupa um lugar de destaque. Sua riqueza em constituintes nutritivos e energéticos torna-o recomendável na dieta para todas as faixas etárias, por ser o leite o alimento mais indicado no combate aos altos índices de mortalidade infantil relacionada à subnutrição de lactentes, principalmente nos países em desenvolvimento.

A produção e o consumo de leite e de seus derivados crescem em todo mundo, e tem cada dia mais impacto na economia mundial. De acordo com dados da Embrapa Gado de Leite, a produção mundial, em 2010 se aproximou de 600 milhões de toneladas. Neste cenário, o Brasil ocupa o 5º lugar no ranking dos principais países produtores de leite no mundo, com volume produzido de 31.667.600 toneladas no mesmo período.

Entretanto, no Brasil, o leite cru nem sempre é obtido em condições de higiene adequadas. Neste contexto, interfere bastante a qualidade da água utilizada na lavagem do úbere e limpeza dos equipamentos é fundamental, especialmente em termos microbiológicos, pois pode influenciar na qualidade final do leite e dos derivados. Este é um ponto importante na cadeia de produção de leite, pois a obtenção da matéria-prima é o ponto inicial da cadeia produtiva.

Um leite de qualidade deve atender uma série de características, incluindo o atendimento aos padrões microbiológicos estabelecidos na legislação brasileira. Esta qualidade está relacionada a fontes de contaminação como higiene do animal, microbiota exterior, contaminação dos equipamentos, qualidade da água e à taxa de multiplicação dos microrganismos infectantes, levando-se em consideração o tempo e a temperatura de estocagem do leite até o processamento.

Por se tratar de produtos geralmente elaborados de forma artesanal e, muitas vezes, comercializados de forma irregular em feiras livres ou mercados públicos, os queijos de coalho podem facilmente se tornar veículos de vários microrganismos patogênicos para o humano. O comércio informal desses produtos agrava este problema, por tratar-se de um produto que não foi inspecionado. Desta forma, podem estar frequentemente associados a casos de doenças veiculadas por alimentos.

Diversos são os agentes de toxinfecções veiculadas por alimentos e o leite pode proporcionar o desenvolvimento de dois grandes grupos: os mesófilos e os psicrotófcos. Por sua vez, grande parte das toxinfecções alimentares pode ser causada por espécies de bactérias que não são comumente pesquisadas durante as investigações de surtos, incluindo as

aeromonas móveis, que se enquadram no grupo das mesófilas, porém possuem características psicrotróficas devido à capacidade de sobreviver e multiplicar-se em baixas temperaturas. As principais características das infecções causadas por essas bactérias são: diarreia aguda, especialmente em crianças e idosos, alguns casos de celulite ou infecção de feridas em manipuladores de alimentos.

Em vários estudos sobre a qualidade microbiológica dos queijos é relatada a ocorrência de microrganismos patogênicos em números que excedem os limites estabelecidos pela legislação. A presença de aeromonas nestes produtos representa um risco 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.

As bactérias psicrotróficas produzem grandes quantidades de enzimas que resistem ao processo de pasteurização, até mesmo ao processo de UHT (ultra-high-temperature), em que o leite passa por uma temperatura de 140 a 145°C, por 2 a 4 segundos, e podem causar alterações sensoriais nos derivados lácteos. Entre os problemas causados pelas enzimas proteolíticas produzidas por estes microrganismos estão: redução do rendimento, textura anormal, geleificação do leite UHT, desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis. Todos estes defeitos provocam perdas econômicas e/ou rejeição do produto pelo consumidor.

Por se tratar de uma bactéria distribuída universalmente e ser considerada um agente emergente em enfermidades de origem alimentar, a sua presença em alimentos pode ser considerada uma ameaça especialmente para indivíduos imunocomprometidos. No entanto, até o momento, não consta na legislação em vigor, a Resolução-RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, na qual são estabelecidos critérios e padrões microbiológicos para alimentos, referência ao gênero *Aeromonas*. Neste caso, a conformidade do produto analisado deve ser estabelecida baseando-se na presença ou a quantificação de microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor. Desta forma, torna-se importante as análises do leite e seus derivados de forma a estabelecer um monitoramento constante e um alerta para as autoridades fiscalizadoras quanto à qualidade do produto a ser colocado para consumo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o perfil higiênico-sanitário qualitativo de queijos de coalho tipo A, no tocante às *Aeromonas*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Isolar *Aeromonas* de queijos de coalho tipo A;

2.2.2 Identificar as espécies de *Aeromonas* isoladas de queijos de coalho tipo A;

2.2.3 Comparar a frequência de isolamento de *Aeromonas* nos períodos de estio e chuvoso;

2.2.4 Verificar o perfil de sensibilidade *in vitro* das espécies de *Aeromonas* isoladas frente a antibiótico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção e consumo de leite e queijo de coalho

O Brasil tem sido um dos países com maior aumento anual na produção de leite nos últimos anos. No panorama mundial, o Brasil tem aumentado sua importância, passando a exportar leite fluido e derivados em 2005 e mostrando representatividade na produção mundial (NOGUEIRA et al., 2006). A produção leiteira brasileira está em contínua expansão, sendo o Brasil o 6º país em produção mundial de leite (Tabela 1). Dados do International Farm Comparison Group (IFCN), utilizando informações oficiais dos diversos países, indicam que, no período entre 2006 e 2010, o Brasil foi o segundo país em aumento absoluto na produção de leite, ficando atrás apenas da Índia.

Tabela 1. Classificação dos principais países produtores de leite no mundo em 2010.

	Países	Volume produzido (toneladas)	% do total
1º	Estados Unidos da América	87.461.300	14,6
2º	Índia	50.300.000	8,4
3º	China	36.022.650	6,0
4º	Rússia	31.895.100	5,3
5º	Brasil	31.667.600	5,3
6º	Alemanha	29.628.900	4,9
7º	França	23.301.200	3,9
8º	Nova Zelândia	17.010.500	2,8
9º	Reino Unido	13.960.000	2,3
10º	Turquia	12.480.100	2,1

Fonte: Embrapa Gado de Leite (2012)
<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>

Apesar do forte crescimento da produção, o país não tem o mesmo vigor quando se analisa o desempenho da indústria. A produção de leite é alta no país, embora a produção por rebanho leiteiro seja baixa. Essa baixa produtividade está relacionada com os manejos nutricional, sanitário e reprodutivo inadequados. A indústria cresceu em termos absolutos, mas não quando se compara com o crescimento de outros países (CARVALHO, 2011).

A expansão da produção de leite no Nordeste foi motivada pelas alterações no uso da terra, caracterizada pelo expressivo número de estabelecimentos agrícolas minifundiários. Essa produção de leite é beneficiada por indústrias e informalmente pelas pequenas unidades artesanais. Contribuem ainda para o crescimento da região a implantação de programas oficiais de fomento à produção, investimentos para utilização de tecnologias capazes de melhorar a eficiência dos fatores de produção, como padrão genético do gado, alimentação e sanidade dos animais (ALMEIDA, 2001; MENEZES, 2011).

Em Pernambuco, a bacia leiteira abrange 32 municípios e fica localizada na região chamada de Agreste Seco. É responsável por mais de 85% da produção destinada às indústrias inspecionadas (SIF e SIE) e do comércio informal (VALENÇA, 2005). De acordo com as informações censitárias, observou-se nos últimos anos o crescimento da produção de leite em todos os estados da região (Tabela 2).

Tabela 2 - Região Nordeste - Produção de leite (mil litros) 1985-1995/1996-2007.

Estados	Anos		
	1985	1995/1996	2007
Bahia	666.718	633. 339	965.799
Sergipe	42.800	134. 392	251.624
Alagoas	102.815	188. 172	242.740
Pernambuco	239.118	406. 606	662.078
Paraíba	118.031	154. 923	170.396
Rio Grande do Norte	72.683	158. 815	214.044
Ceará	207.892	384. 836	416.453
Piauí	32.957	73. 459	76.409
Maranhão	91.989	139. 451	335.744
Total	1.575.003	2.273.993	3.335.286

Fonte: Menezes (2011)

As características do leite quanto a sua composição e seu valor nutritivo fazem do leite, assim como seus derivados, alimentos importantes para o ser humano em diversas fases da vida. Por ser considerada uma bebida saudável e ter seu consumo associado a uma dieta de qualidade, sempre foi um produto utilizado na alimentação humana. Possui papel importante

como fonte de proteínas, lactose e de gordura, além de serem fontes de microrganismos probióticos e de ingredientes prebióticos, por isso, importantes para o suporte de um bom funcionamento do organismo (RENHE, 2008).

Além do consumo do leite fluido, a grande variedade de produtos derivados possibilita o fornecimento de uma variedade de fonte de nutrientes. Entre estes produtos, encontra-se o queijo de coalho, típico do Nordeste do Brasil. Culturalmente apreciado e bastante consumido na região, participa consideravelmente na economia local, contribuindo significativamente na formação de renda dos produtores de leite, inclusive daqueles que não têm acesso às usinas de beneficiamento.

A produção de queijo existe desde 6000 anos a.C, na Mesopotâmia. Entretanto, acredita-se que seu surgimento aconteceu ao acaso, na Pré-história, quando o homem começou a domesticar os animais e observaram que o leite coalhava mais rapidamente no calor. Outra linha de pensamento admite que a descoberta tenha acontecido após um viajante árabe conduzir uma porção de leite em um recipiente feito com a pele seca do estômago de carneiro, fazendo o leite coagular, iniciando a utilização dos “coalhos” retirados de pequenos ruminantes. Apesar de seu surgimento ter acontecido em vários lugares ao mesmo tempo, os gregos desenvolveram a arte de degustar o queijo e produzir em quantidade. Eles consideravam o queijo “uma dádiva dos Deuses” (PERRY, 2004; VALENÇA, 2005).

O Brasil produziu, em 2005, o equivalente a 480 mil toneladas de queijo sob inspeção federal, ocupando o 3º lugar no ranking mundial da produção inspecionada, porém ficando muito abaixo do 2º colocado, os Estados Unidos, com 6,3 milhões de toneladas. Apesar desses números, no Brasil, a maior parte da produção é feita em pequenas queijarias, o que demonstram a importância econômica e social do setor (CONEJERO et al., 2006).

A produção de queijo de coalho no estado teve início no século XIX, mas como produção em pequenas quantidades, usando o coalho de carneiro e curado ao sol. Inicialmente, com uma produção de caráter secundário e de subsistência, o Brasil tem aumentado sua importância em relação à produção mundial, passando a exportador e mostrando representatividade (MARTINS; FARIA, 2006; NOGUEIRA et al., 2006).

A industrialização ocorreu em consequência do aumento do consumo e gerou a necessidade de estabelecer medidas, como a pasteurização, para garantir a segurança sanitária. A partir de 1946, a atividade começou a ser regulamentada e são estabelecidos critérios de processamento sanitário e distribuição do leite e dos derivados, garantindo um produto seguro (MARTINS; FARIA, 2006; MENEZES, 2011).

Assim como a pecuária é uma herança cultural que permeia a identidade nordestina e persiste como primordial atividade econômica em determinados territórios, o queijo de coalho é tido como um alimento identitário da região, produzido e consumido no espaço geográfico nordestino, ultrapassando fronteiras demandado pelos migrantes que buscam no consumo desse produto uma aproximação ao seu território (MENEZES, 2011).

O processo básico de produção de queijos é comum a quase todos os tipos, entretanto, a variedade conhecida está condicionada às técnicas do processamento e ao tempo de maturação. Estima-se que existam cerca de 1000 tipos de queijo, 400 destes com origem na França (PERRY, 2004). O queijo de coalho é fabricado com massa semi-cozida e tradicionalmente consumido fresco ou maturado. É produzido há mais de 150 anos, em vários estados da região Nordeste do Brasil a partir de leite de vaca cru ou leite pasteurizado. Trata-se de produto popular e que faz parte da cultura da região Nordeste, mas que apesar disso, não tem um processo de elaboração padronizado, sendo comum o emprego de leite cru, o que coloca em risco a saúde do consumidor (CAVALCANTE et al., 2007).

Entende-se por queijo coalho, artesanal ou não, o queijo fresco obtido de leite cru (tipo B), integral ou desnatado, de massa crua prensada ou não, ou produzido com leite pasteurizado (tipo A), integral ou desnatado, de massa crua prensada (PERNAMBUCO, 1999). Fica excluído da obrigação de ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico o leite higienizado que se destine a elaboração de queijos, desde que siga uma maturação por um tempo não inferior a 60 dias, após o qual o produto poderá ser comercializado (BRASIL, 1996).

O queijo de coalho é obtido por coagulação do leite com coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não por ação de bactérias lácticas selecionadas, sendo comercializado com até dez dias de fabricação. É classificado como queijo de média a alta umidade, com teor de gordura nos sólidos totais entre 35,0% e 60,0%. Sensorialmente deverá apresentar consistência semi-dura, elástica; textura macia, compacta ou aberta com olhaduras mecânicas pequenas; cor branca, amarelada e uniforme; sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado; odor ligeiramente ácido de coalhada fresca; casca fina, sem trinca, não bem definida; formato e peso variáveis (BRASIL, 2001).

Com o crescimento e a modernização do setor leiteiro no Brasil, foi necessária a padronização da qualidade da matéria-prima, bem como a unificação dos sistemas de controle. Com isso, foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), pelo Decreto nº30.691, em 29 de março de 1952, abrangendo estabelecimentos que recebem

leite e seus derivados para beneficiamento ou industrialização (BRASIL, 1952). No âmbito estadual, a fiscalização de estabelecimentos produtores de leite e derivados destinados a comercialização local fica a cargo da Agência de Defesa Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO), regida pelo Decreto 15.839 de 15 de junho de 1992 (PERNAMBUCO, 1992). Neste sentido, as indústrias são submetidas a inspeção periódica ou permanente com o objetivo de evitar ou diminuir a disseminação de doenças ou o aparecimentos de transtornos que venham afetar a saúde dos indivíduos ou dos consumidores, bem como a aplicação de medidas que possam reduzir ou eliminar os fatores determinantes de agravos.

3.2. Caracterização do gênero *Aeromonas*

Antes incluídas na família *Vibrionaceae*, atualmente, as aeromonas estão denominadas em uma família separada, *Aeromonadaceae*, pois foram determinadas diferenças entre estas e os vibrios, por meio de técnicas moleculares. Inclui um grande número de diferentes grupos taxonômicos que contem ao menos 12 espécies legitimadas e 13 grupos de hibridização de DNA dentro do gênero. O gênero *Aeromonas* é composto por 10 espécies nominadas, agrupadas em duas subdivisões (KONEMAN et al., 2001).

Estes micro-organismos são bacilos gram-negativos curtos, podem aparecer isolados, aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de multiplicação entre 22°C e 28°C, porém algumas espécies podem desenvolver até 37°C. Geralmente são móveis por um flagelo polar, produtoras de catalase e oxidase, e como o próprio nome sugere, são produtoras de grande quantidade de gás a partir do açúcar que fermentam (HOLT et al., 1993; JAY, 2005; GHENGESH et al., 2008; SPICER, 2009).

De acordo com a temperatura ótima de multiplicação e motilidade, as aeromonas se dividem em dois grandes grupos. O primeiro grupo, da *A. hydrophila*, é amplo e heterogêneo geneticamente, está formado por espécies mesófilas e móveis, sendo 28°C a temperatura ótima de multiplicação, porém podem se multiplicar em temperaturas que variam de 1 a 42° C (ISONHOOD; DRAKE, 2002). O segundo grupo é mais reduzido e homogêneo geneticamente, é designado como grupo psicrotófilo, cuja temperatura ótima de multiplicação está entre 22-25°C, sendo constituído por duas espécies *A. media* e *A. salmonicida*, com quatro subespécies *salmonicida*, *masoucida*, *achromogenes* e *smithia* (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002).

As espécies móveis possuem um flagelo polar monotríquio, geralmente, o qual é responsável pela motilidade em ambientes aquáticos. Esta propriedade é importante tanto para a abordagem inicial, como para a fixação em superfícies (SANTOS et al., 2010).

Provas bioquímicas, como ornitina-lisina-arginina, podem ser realizadas para diferenciar isolados de *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, entre outros patógenos intestinais (SPICER, 2009).

3.3 . Veiculação hídrica

O processo de desenvolvimento mundial como um todo tem diminuído a disponibilidade da água potável e a intervenção do homem nos ambientes urbano e rural é outro fator que contribui para esta condição. Um grande número de agentes biológicos patogênicos para o homem, como bactérias, vírus, protozoários, parasitas e toxinas, podem ser veiculados pela água e alimentos, podendo provocar um quadro agudo de gastroenterocolite (BALBANI; BUTUGAN, 2001). É comum a utilização de água fora dos padrões microbiológicos e físico-químicos exigidos para ser considerada água potável em estabelecimentos que produzem alimentos de origem animal. Em geral, a água é de origem subterrânea, captada por poço artesiano, na qual a contaminação é facilitada devido a fatores como tipo, idade, altura, manutenção e localização do poço (MELO; PICININ, 2010).

A água é uma importante via de transmissão de agentes patogênicos para seres humanos e animais, pois cada vez mais as atividades humanas (como a deposição de resíduo orgânico animal no solo) têm contaminado os lençóis d'água utilizados para o abastecimento em geral (KAMIYAMA; OTENIO, 2011). Desta forma, o leite cru, que no Brasil nem sempre é obtido em situação de higiene adequada, pode representar sério risco à saúde pública por utilizar água não tratada na higienização do úbere e dos equipamentos.

Na cadeia de produção do leite, pode-se afirmar que a água utilizada na indústria deve ter dois importantes requisitos: quantidade e qualidade. A quantidade deve ser suficiente para o desempenho de todas as atividades na indústria. A qualidade refere-se à inocuidade, bem como características físico-químicas, que irão influenciar na qualidade higiênico-sanitária do produto final, pois esta água é utilizada em muitas etapas da produção, como processamento, higiene pessoal, limpeza e sanitização, preparo de formulações, cozimento, caldeiras, salmoura, entre outros (AMARAL et al., 2006; KAMIYAMA; OTENIO, 2011) e pode servir de veículo para o microrganismo.

Encontradas distribuídas no meio ambiente, o habitat natural das aeromonas é primariamente a água doce ou do mar, podendo causar doenças em animais aquáticos de sangue frio que vive neste ambiente, como sapos e peixes (HOLT, 1993; MARTINS, et al., 2002; GHENGHESH et al., 2008). Também podem ser isoladas de amostras de água corrente e até de depósitos de água destilada, que podem se tornar fontes de diversos micro-organismos envolvidos em infecções nosocomiais (KONEMAN et al., 2001).

A maioria dos estudos referentes às gastroenterites causadas por *Aeromonas* spp. estabelece a água como principal veículo de transmissão do agente (MESQUITA, 1995; MONTOTO MAYOR et al., 2004; PABLOS et al., 2009; COELHO et al., 2010), considerando-a como importante via de contaminação dos alimentos, entre eles o leite e seus derivados (MELAS et al., 1999; AMARAL et al., 2006; OTAVIANI et al., 2011; PABLOS et al., 2011). O isolamento de aeromonas enteropatogênica em águas não tratadas, incluindo aquelas usadas para beber, é comum em países em desenvolvimento. A grande maioria dos isolados clínicos são causados por *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* (GHENGHESH et al., 2008).

O alto teor de cloro residual é fator limitante à sobrevivência e multiplicação de *Aeromonas* na água, podendo a contaminação ocorrer por outras vias, que não a água (COSTA; ROSSI JUNIOR, 2002). A maioria dos sistemas de tratamento de água é capaz de reduzir a população de *Aeromonas* até 1 UFC/mL, porém algumas cepas apresentam resistência à cloração (MESQUITA, et al., 1995). Quando os níveis de matéria orgânica aumentam, o cloro é inativado e a bactéria pode então se multiplicar e inclusive colonizar os sistemas de tratamento formando biofilmes, chegando a concentrações de 10^3 UFC/mL (CASTRO-ESCAPULLI et al. 2002).

Por outro lado, a água pode ser caracterizada como de boa qualidade e, ainda assim, conter bactérias patogênicas, como as do gênero *Aeromonas*, tornando inadequada a sua utilização (ROSSI JÚNIOR et al., 2000).

3.4. Alimentos de origem animal envolvidos na veiculação de aeromonas

A contaminação biológica com potencial de causar agravos à saúde se intensifica na medida em que a demanda por alimento aumenta (BALBANI; BUTUGAN, 2001). A contaminação dos alimentos pode ter origem em diversas fontes como solo e água, plantas, utensílios, trato gastrintestinal, manipuladores de alimentos, rações e estoques de animais, ar e poeira (JAY, 2005).

Alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de serem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados, elaboração em condições impróprias e armazenamento e comercialização em temperaturas inadequadas, fatores que contribuem para aumentar o risco de causarem enfermidades (OLIVEIRA et al., 2010). Muitos estudos tem sido realizados para avaliar a qualidade do leite cru quantificando estes micro-organismos (BERSOT et al., 2009; MAZIERO et al., 2010; ARCURI, 2008, CARNEIRO; ROSSI JÚNIOR, 2006), indicando, no geral, que há uma deficiência nas práticas higiênicas durante a obtenção do leite nas propriedades, bem como tratamento térmico deficiente, comprometendo a qualidade do produto final.

O leite e seus derivados tem merecido especial atenção dos órgãos de fiscalização sanitária por serem produtos altamente perecíveis e consumidos por toda a população, desde criança a idosos, além de serem ótimos meios de cultura para micro-organismos, devido a sua constituição rica em nutrientes. A contaminação do leite pode acontecer durante a ordenha ou no processamento, seja enquanto leite fluido ou derivado como, por exemplo, o queijo. Muitas fazendas apresentam condições de higiene precária, realizam anti-sepsia deficiente do úbere e do ordenhador, pois em muitos casos a ordenha ainda é realizada de forma manual, e ainda há falha no sistema de refrigeração no transporte e no armazenamento da indústria (BALBANI; BUTUGAN, 2001).

Produtos derivados do leite, em especial o queijo de coalho, devem ser conservados em refrigeração. Na Instrução Normativa nº 51, publicada em 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, é relatada a exigência de refrigeração do leite na propriedade rural em refrigeração a uma temperatura máxima de 4°C em tanques de expansão ou 7°C em tanques de imersão, por um período de no máximo três horas após a ordenha (BRASIL, 2002). Com esta medida, objetiva-se impedir o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, causadores de defeitos tecnológicos ou de doenças pelo seu consumo acidental.

Entretanto, o ambiente a uma temperatura baixa pode favorecer o desenvolvimento de outro grupo de micro-organismos, os psicrotróficos, podendo provocar novos problemas de qualidade, defeitos indesejáveis no leite e nos derivados. No controle dos micro-organismos psicrotróficos, a refrigeração do leite cru em tanques de expansão mostra-se mais eficiente que quando realizado em tanques de imersão, entretanto, somente a refrigeração não é suficiente para controlar a multiplicação de psicrotróficos, pois a multiplicação microbiana deste grupo não cessa totalmente mesmo a temperaturas baixas (BERSOT et al., 2009).

Durante a ordenha, ou mesmo após ela, diversos microrganismos podem contaminar o leite. O processo de pasteurização é necessário e eficiente, e tem por finalidade reduzir o número de microrganismos presentes no leite e eliminar os agentes patogênicos (LEITE et al., 2002). Quando aplicada de forma correta, possibilita a destruição da maioria dos microrganismos presentes inicialmente. Entretanto, quando não é realizada de forma correta, é possível que haja sobrevivência de microrganismos ou de enzimas produzidas por estes. A recontaminação durante a o processamento na linha de produção é possível se houver falha na limpeza e/ou manutenção dos equipamentos, ou se não forem observados os requisitos básicos de boas práticas de produção.

A presença de micro-organismos e suas toxinas constituem causas mais frequentes de problemas sanitários relacionados aos produtos lácteos. Os microrganismos presentes no leite cru são os mesmos encontrados no úbere e na pele do animal ordenhado, nos utensílios utilizados ou nas tubulações dos equipamentos da coleta (JAY, 2005). A higiene do ordenhador ou dos equipamentos utilizados, antes e após a ordenha, tem como objetivo básico assegurar a inocuidade da matéria-prima, dos produtos derivados e, conseqüentemente, a saúde dos consumidores. A qualidade da água utilizada na lavagem do úbere e dos equipamentos é importante e pode influenciar na qualidade do produto final, seja ele leite fluido ou derivados (AMARAL et al., 2006).

Os queijos são os derivados mais suscetíveis à contaminação, devido ao método de fabricação, com vários processos envolvidos. Por isso mesmo, o leite que será utilizado na fabricação de queijos deve ser de boa qualidade e, tanto quanto possível, livre de contaminação por bactéria ou por agentes químicos como antibióticos, por exemplo. No caso de queijos frescos, o leite tem, obrigatoriamente, que ser pasteurizado. Na Resolução nº 2 da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária do Estado de Pernambuco são relatados os requisitos mínimos de identidade e qualidade que deverá ser obedecido na produção do queijo de coalho, artesanal ou não, produzido no estado e destinado ao consumo humano, como a utilização de leite ordenhado em condições higiênico-sanitárias satisfatórias e de animais saudáveis, assim como requisitos mínimos de instalações e equipamentos do local onde se realiza o fabrico (PERNAMBUCO, 1999).

A pasteurização do leite na produção de queijos tem como objetivo destruir os patógenos e reduzir o número de micro-organismos presentes da origem, uma vez que a utilização das boas práticas desde a obtenção do leite não significa, necessariamente, ausência de bactérias. Entre os micro-organismos de maior importância na indústria de laticínios, encontram-se os psicrotróficos, capazes de sobreviver sob refrigeração, embora a maioria tenha seu

desenvolvimento ótimo em temperaturas acima de 20°C. É um grupo importante para aqueles produtos que são conservados sob refrigeração por longos períodos, pois o uso intensivo e prolongado de baixas temperaturas pode favorecer uma adaptação seletiva de espécies mesofílicas, tornando-se psicrotróficas (PERRY, 2004). A presença desses microrganismos indica a baixa qualidade da matéria-prima e condições sanitárias de processamento insatisfatórias.

Micro-organismos psicrotróficos são aqueles que se multiplicam bem sob temperaturas entre 0°C e 7°C e entre 20°C e 30°C e podem causar deterioração de vários tipos de alimentos como carnes, peixes, aves, ovos, leite e derivados, entre outros alimentos normalmente armazenados sob temperatura de refrigeração (JAY, 2005). Este grupo é importante, tanto na indústria como no comércio, principalmente para aqueles produtos que necessitam de conservação em temperatura de refrigeração e podem ser armazenados nestas condições por períodos relativamente longos (SILVEIRA et al., 1998).

Na indústria, a presença de micro-organismos psicrotróficos no leite pode provocar sérios problemas econômicos na produção de queijos, devido à atuação destas bactérias sobre a proteína do leite, diminuindo o rendimento final (SILVEIRA et al., 1998). Entretanto, já se sabe que mesmo que estes micro-organismos estejam presentes em baixas contagens e dentro dos padrões legais, ainda assim é possível ocorrer este tipo de defeito (RAVANIS; LEWIS, 1995).

A ação deterioradora das bactérias psicrotróficas deve-se principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases, que hidrolisam a proteína e a gordura do leite (ARCURI, et al., 2008), limitando a vida de prateleira dos produtos lácteos. Quando se realiza o processamento térmico adequado e suficiente para destruir os micro-organismos psicrotróficos, o resultado é um produto de boa qualidade microbiológica, sem atuação destas enzimas causando oxidação lipídica (MAZIERO et al., 2010).

Atualmente, vem sendo reportada uma importância a estes micro-organismos no tocante à sua capacidade de deterioração de alimentos, e formação de biofilmes, causando prejuízos para a indústria de alimentos. Os biofilmes ocorrem naturalmente em variados tipos de ambiente, bióticos ou abióticos e uma vez constituídos, agem como ponto de contaminação constante. As cepas que possuem maior habilidade de formar biofilmes são aquelas que possuem flagelos lateral e polar (SANTOS et al., 2010).

A formação de biofilmes inclui as seguintes etapas: adesão inicial, em seguida, os micro-organismos passam do estilo de vida planctônico ao sésil; na superfície, ocorre a formação de microcolônias, maturação e destacamento de células, culminando à volta ao

estilo de vida planctônico. Em seu estilo de vida sésil, são mais resistentes aos agentes comumente empregados em procedimentos de higienização e um dos responsáveis por esta proteção é a rede de EPS (exopolissacarídeos), que age como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação. Além disso, adsorvem cátions, metais e toxinas e conferem proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI et al., 2009)

A diversidade da microbiota de leites crus contribui para grandes diferenças nas características sensoriais dos queijos elaborados (LAFARGE et al., 2004). A qualidade de um produto está diretamente ligada à qualidade da matéria-prima utilizada (SILVEIRA et al., 1998), é importante observar a qualidade da obtenção, do tratamento térmico e da conservação do leite utilizado na produção de queijos.

Os surtos de gastroenterites podem ser causados pela ingestão de diversos agentes. Quando investigados, na maioria dos casos, a etiologia é atribuída aos coliformes, à salmonela ou aos estafilococos. Entretanto, cada vez mais, a busca por micro-organismos que não são rotineiramente pesquisados tem possibilitado uma expansão nos potenciais patógenos causadores de toxinfecções alimentares, alguns com patogenia e epidemiologia pouco conhecidas, como *Aeromonas* spp.

Em muitos estudos tem sido detectada a presença desta bactéria em diversos alimentos de origem animal, vegetal, em águas cloradas e não cloradas e em fezes de pacientes com diarreia aguda, levando a uma relação entre a presença do micro-organismo e o desenvolvimento da gastroenterite (OTAVIANI et al., 2011; PABLOS et al., 2011). Em países em desenvolvimento, *Aeromonas* spp. são espécies comuns em leite cru, e a presença deste microrganismo em leite pasteurizado e queijo indicam que o produto sofreu contaminação após o processamento, resultante de falha na higiene durante a produção (GHENGHESH et al., 2008).

Dois fatores contribuem para que a *Aeromonas* spp. seja considerada 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 (MERINO et al., 1995).

3.5. Fatores de patogenicidade de *Aeromonas* spp.

Dentre as espécies do gênero *Aeromonas* que apresentam motilidade, as espécies *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria* são as principais espécies consideradas patogênicas para o humano e mais frequentemente isoladas (MERINO et al., 1995). Já foi isolada em diversos países, principalmente de ambientes aquáticos e em diferentes tipos de alimentos, especialmente os de origem animal (KROVACEK et al., 1995; KANAN et al., 2001; BRAVO et al., 2003; PEREIRA et al., 2004; HATA et al., 2005; URAZ et al., 2008)

Apesar de ser isolado de fezes de pacientes com diarreia, os fatores de virulência produzidos pelas espécies de aeromonas e seu envolvimento como agente etiológico ainda não é totalmente claro (ALBERT et al., 2000).

Várias propriedades de virulência tem sido descritas, procurando explicar em especial a enteropatogênese, entre elas: enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas e adesinas. O principal fator de virulência em infecções intestinais de *A. hydrophila* e *A. sobria* é “aerolisina”, uma β -hemolisina com atividade enterotóxica. No entanto, ainda não se conhece o principal determinante de virulência da *A. caviae* (LOPES, 2009).

3.6. Riscos à saúde do consumidor: associação de *Aeromonas* spp com patologias em humanos e animais

A doença diarreica aguda é definida pela Organização Mundial de Gastroenterologia (WORLD GASTRONTEROLOGY ORGANIZATION – WGO) como o aumento no número de evacuações (de três vezes ou mais), com consistência diminuída, aquosas em um período de 24 horas, com a passagem de uma maior quantidade de fezes e duração menos que 14 dias (WGO, 2008). As doenças diarreicas estão entre as principais causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. Os agentes predominantes de doenças são as bactérias e parasitas entéricos, que habitualmente atingem o ponto máximo durante os meses de verão, e por último os vírus (GHENGHESH et al., 2008).

Diferentes espécies de *Aeromonas* se encontram difundidas nos alimentos e algumas destas representam risco para a saúde pública, principalmente para grupos considerados de risco (MESQUITA et al., 1995; AMARAL et al., 2006; CARNEIRO; ROSSI JUNIOR, 2006). Admite-se que o micro-organismo possa estar envolvido na síndrome da “diarreia dos viajantes”, com sintomas que podem durar até 10 dias (HOBBS; ROBERTS, 1999)

Em muitos estudos foi demonstrada a importância das aeromonas como fontes de diversas enfermidades para o ser humano, as quais podem variar de infecções intestinais leve a severas (MONTOTO MAYOR et al., 2004; PEREIRA et al., 2004; HOFER et al., 2006). Infecções extra-intestinais também são possíveis, como por exemplo infecção pulmonar e lesão de tecidos moles após exposição a água poluída (BRAVO et al., 2003; TENA, 2006), acometendo mais frequentemente pacientes imunocomprometidos. A real responsabilidade das aeromonas como agente etiológico de doenças veiculadas por alimentos ainda é bastante questionada, mesmo que esta bactéria seja isolada de fezes de indivíduos acometidos por diarreia aguda (GHENGHESH et al., 2008).

As enfermidades associadas pela ingestão de bactérias do gênero *Aeromonas* engloba uma variedade de síndromes e estas podem ser incriminadas como patógeno primário ou como agente oportunista. A maioria dos casos em indivíduos saudáveis e imunocompetentes possui evolução autolimitada, podendo apresentar-se na forma de uma diarreia aguda, ou seja, uma síndrome de má absorção e secreção intestinal ou como infecções cutâneas. Entretanto, indivíduos imunodeprimidos ou portadores de distúrbios hepatobiliares podem desenvolver um quadro severo, com septicemia, podendo levar a óbito (MESQUITA et al., 1995; PEREIRA et al., 2004).

A variação sazonal influencia o nível de prevalência em animais aquáticos (peixes e camarões), com aumento no período de chuva. Porém, em países em desenvolvimento, o isolamento de aeromonas de fezes de pacientes com diarreia é maior durante o verão e a associação entre estes dois eventos também costuma ser maior nos meses de verão (GHENGHESH et al., 2008). Na cidade de São Bento do Una-PE, foi diagnosticado um surto de diarreia aguda no ano de 2004, registrando-se 2.170 casos, no qual detectou-se *Aeromonas* como agente causador em 114 (19,5%) dos 582 casos investigados, enquanto que outros agentes clássicos tiveram incidência de 31 (5,1%) casos (HOFER et al. 2006). Segundo dados divulgados pela Secretaria de Saúde do Estado, o aumento de casos nos primeiros meses dos anos 2003 e 2004 foi atribuída ao excesso de chuva no período, demonstrando a importância da veiculação hídrica deste micro-organismo.

A diarreia devido a aeromonas apresenta manifestações clínicas variadas. São comuns diarreia líquida e auto-limitada. Alguns pacientes podem desenvolver febre, dor abdominal e diarreia sanguinolenta. Em casos severos pode acompanhar desidratação. A infecção em imunocomprometidos é frequentemente mais severa, podendo apresentar a forma crônica, desenvolver infecção pulmonar ou bacteremia, resultando em produção e disseminação intravascular de gás (GHENGHESH et al., 2008).

A incidência da doença diarréica aguda causada por *Aeromonas* pode ser subestimada por não haver uma legislação que defina métodos de pesquisa e limites estabelecidos para a presença deste micro-organismo. Além disso, testes laboratoriais podem facilmente levar a resultados divergentes e as colônias serem confundidas com *Pseudomonas* ou coliformes (HOBBS; ROBERTS, 1999). Desta forma, como são patógenos potenciais nas gastroenterites humanas, devem ser consideradas nas suspeitas de toxinfecções de origem alimentar.

Para controlar os casos de diarréia aguda, devem-se tomar medidas preventivas como ações da Vigilância Epidemiológica, como investigação e notificação, educação em saúde com orientação da população e capacitação de profissionais, assistência à saúde para tratamento dos novos casos diagnosticados, além de ações das Vigilâncias Sanitária e Ambiental quanto à recuperação e limpeza dos reservatórios, bem como monitoramento do cloro da água de distribuição.

3.7. Resistência a antimicrobianos

O uso indiscriminado de antibióticos, seja como tratamento de humanos e animais, seja como agente profilático ou até mesmo como adjuvantes do crescimento e melhor rendimento dos animais de produção tem gerado como consequência indesejável o desenvolvimento de resistência das cepas às drogas mais utilizadas. Este fato é indesejável e tem gerado preocupação na comunidade científica e aos órgãos e saúde pública, causando gastos em pesquisas e no desenvolvimento de novas drogas.

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 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 humanos (DASKALOV, 2006).

As aeromonas possuem resistência inerente à penicilina (HATA et al., 2005) e, na aquicultura, já tem sido observada uma crescente resistência aos beta-lactâmicos (SANTANA et al., 2008). Essa resistência a antibióticos é caracterizada pela existência da β -lactamase e plasmídeos conjugados, além dos fatores ambientais e clínicos terem a capacidade de aumentar mais a resistência dos microrganismos ao antibiótico. Os antibióticos atualmente

mais ativos contra as aeromonas são as cefalosporinas de 2^a (cefuroxime) e 3^a (cefotaxime) geração (BRAVO et al., 2003).

O National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) reconhece três categorias de sensibilidade a antibióticos. Sensível indica que o microrganismo deve responder às doses habituais do agente antimicrobiano administradas por via adequada, inclusive via oral. Sensibilidade intermediária significa que o desenvolvimento pode ser inibido quando são administradas doses máximas do antibiótico por via parenteral, sendo possível sua utilização terapêutica, porém devendo ser consideradas outras opções que possam otimizar o tratamento. Resistente indica que a bactéria não é inibida por concentrações alcançáveis do antimicrobiano, logo este não deve ser eleito para tratamento (KONEMAM et al, 2001).

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 humano, as infecções causadas por agentes patogênicos terão opções limitadas de tratamento, especialmente quando da ocorrência de toxinfecções alimentares (GHENGESCH et al., 2001).

4. REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, E. F. L. Aspectos sociais da produção de leite no Brasil. *In: Produção de leite e sociedade: uma análise da cadeia do leite no Brasil*. FEPMVZ. p 117 – 124. Belo Horizonte, 2011, 538p.

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.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotólicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**. v. 38, nº8, p. 2250-2255, Nov, 2008.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**. 23(4):320 – 328, São Paulo, 2001.

BERSOT, L. S. et al. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nov/dez, nº 371, 64: 35-39, 2009.

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.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilmes em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29 (4), p 886-895, out-dez, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691, de 29/03/52. **RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146. 07/03/1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51 de 18/09/2002. **Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2002.

BRAVO, L. et al. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. Sep-Dec;55(3):208-9. 2003.

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

CARVALHO, M. P. Brasil é destaque em produção, mas laticínios brasileiros não figuram no ranking dos maiores do mundo. Milkpoint.

Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/mercado/editorial/brasil-e-destaque-em-producao-mas-laticinios-brasileiros-nao-figuram-no-ranking-dos-maiores-do-mundo-76141n.aspx>

Acesso em: 03/12/2011

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.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(1): 205-214, jan.-mar. 2007

COELHO, M. I. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum, Health Sciences**. v 32, n 1, p 1-8, Maringá, 2010.

CONEJERO, M. A.; CÔNSOLI, M. A.; NEVES, M. F. O setor agroindustrial de leite no Brasil. In: CÔNSOLI, M. A.; NEVES, M. F. **Estratégias para o leite no Brasil**. Ed Atlas, São Paulo, 2006, 303p.

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

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

GHENGHESCH, 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

GHENGHESCH, K. S. et al. *Aeromonas* - Associated infections in developing countries. **Journal Infect Developing Counties**. 2(2): 81-98, 2008.

HATA, M.; VIVEKANADHAN, A. A.; JOICE, G. J.; Antibiotic resistance pattern of mobile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**. v.98, p. 131-134, 2005.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. Ecologia dos microrganismos nos alimentos. *In: Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos*. São Paulo: Varela. 1999, 376p.

HOFER, E. et al. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(2):217-220, mar-abr, 2006.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9ª ed, 1993.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

KANAN, S. et al. Isolation and identification of *Aeromonas* from patients with acute diarrhea in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**. 19(4), p 190-192, 2001.

KAMIYAMA, C. M.; OTENIO, M. H. Qualidade da água na produção láctea. **Revista Panorama do leite on line**. Ano 5, n. 58, set, 2011.
Disponível em www.cileite.com.br/content/qualidade-da
Acesso em: 20/11/2011.

KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. São Paulo: Medsi, 2001. 1465p.

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.

LAFARGE, V. et al. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004

LEITE, C. C. et al. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador-BA. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, n.3, v.1, p.21-25, 2002.

LOPES, A. C. A. Enterotoxina citotóxica termo estável produzida por *Aeromonas caviae* isoladas de surto de diarreia aguda em crianças na cidade de São Bento do Una – PE. Dissertação (Mestrado), Campinas, SP Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2009. 72p.

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.

MARTINS, P. C.; FARIA, V. P. Histórico do leite no Brasil. *In: CÔNSOLI, M. A.; NEVES, M. F. Estratégias para o leite no Brasil*. Ed Atlas, São Paulo, 2006, 303p.

MAZIERO, M. T.; VIANA, C.; BERSOT, L. S., Microrganismos psicrotróficos em produtos lácteos durante o prazo comercial. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, jan/fev, nº 372, 65: 30-35, 2010.

MELAS, D. S.; PAPAGEORGIOUS, D. K.; MANTIS, S. I. Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece. **J Food Prot.** May, 62(5): 463-466, 1999.

MELO, C.P.de PICININ, L.C.A. Qualidade da água utilizada em indústrias alimentícias, na região de Braço do Norte, em Santa Catarina. **Higiene Alimentar.** v. 24(183) p. 109-115, 2010

MENEZES, S. S. M., Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)** V. 28, n. 1, 2011.

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

MESQUITA, A. J. et al. *Aeromonas* spp. em produtos de origem animal e em água de consumo de Goiana-GO. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, 25(2): 61-66, 1995.

MONTOTO MAYOR V. et al. Incidência de *Aeromonas* spp. em La província de Sntiago de Cuba. **Medisan.** 81(1). 2004.

Disponível em: [HTTP://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_1_04/san06104.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_1_04/san06104.htm)

NOGUEIRA, M. P. et al. Produção leiteira. In: CÔNSOLI, M. A.; NEVES, M. F. **Estratégias para o leite no Brasil.** Ed Atlas, São Paulo, 2006, 303p.

OLIVEIRA, K. A. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.435-440, jul./set., 2010

OTAVIANI, D. et al. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. **Int J Food Microbiol.** Jan, 5;144(3): 538 – 545. 2011.

PABLOS, M. et al. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. **Int J Food Microbiol.** Jun 30; 147(3): 203-210. 2011.

PABLOS, M. et al. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **Int J Food Microbiol.** Oct, 31; 135(2): 158 – 164, 2009.

PEREIRA, C. S. et al. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24(4): 562-566, out-dez, Campinas, 2004.

PERNAMBUCO. Secretaria de Agricultura. Decreto nº 15.839 de 15 de junho de 1992. **Aprova o Regulamento de Inspeção e Fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco.** Diário Oficial do Estado de Pernambuco, Recife, 16 de junho de 1992.

PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária. Resolução n. 0002 de 19 de abril de 1999. **Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que**

deverá cumprir o Queijo Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano. Diário Oficial do Estado de Pernambuco, Recife, 20 de abril de 1999.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. Vol. 27, n. 2, 293-300, 2004.

RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.20, n.3, p.164-167, Mar. 1995.

RENHE, I. R.T. O papel do leite na nutrição. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**. jul/ago, n. 363, 63:36 – 43, 2008.

ROSSI Jr., O. D.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A. Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 52, n. 5, Belo Horizonte, out., 2000.

SANTANA, S. R. A. et al. Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de peixes no município de Petrolina-PE. **Associação Brasileira de Zootecnia – Anais Zoo-EC**. 2008.

SANTOS, P. G. et al. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. **Letters in Applied Microbiology**. 52, p 49-55, 2010.

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrotrofos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.55, p.21-27, 1998

SPICER, W. J. **Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto e atlas em color**. Segunda edición. Elsevier Churchill livingstone, 251 p. 2009.

TENA, D. et al. Mionecrosis rápidamente progresiva por *Aeromonas veronii* biotipo *sóbria*. **An. Med. Interna**. Madrid. Vol. 23, N.º 11, pp. 540-542, 2006.

URAZ, G.; COSKUN, S.; OZER, B. Microflora and pathogen bacteria (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) in Urfa Cheese (A traditional white brined Turkish cheese). **Pakistan Journal of Nutrition**. 7(5): 630 – 635, 2008.

VALENÇA, P. J. S. **História da pecuária leiteira em Pernambuco**. Recife: Ed Coqueiro. 1ª Ed, 2005, 140p.

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.

WGO – WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. Diarréia Aguda. In: Practice Guidelines: Acute Diarrhea. 31 p, março, 2008.

Disponível em: www.omge.org/globalguidelines. Acesso em 10/10//2011

ZOCAL, R. Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados. Minas Gerais. 2006.

Disponível em: [HTTP://www.cnpqgl.embrapa.br](http://www.cnpqgl.embrapa.br). Acesso em 10/11/2011

5. ARTIGO

“Identificação, perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Aeromonas* spp isoladas de Queijo de Coalho tipo A” será submetido para publicação na Revista Brasileira de Medicina Veterinária.

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *Aeromonas* spp ISOLADAS DE QUEIJO DE
COALHO TIPO A**

IDENTIFICATION AND MOLECULAR PROFILE OF RESISTANCE TO
ANTIMICROBIAL *Aeromonas* spp ISOLATED FROM COALHO CHEESE TYPE A
**Rejane de Oliveira Luna¹, Suely Santos Bezerra^{1,2}, Juliana Nunes Carvalho¹,
Fabiola Carneiro Pereira¹, Andréa Christianne Gomes Barretto¹, Sarah Michele
Rodrigues Galvão³, Emiko Shinozaki Mendes⁴**

ABSTRACT

The coalho cheese is a traditional product of the Northeast region of Brazil. Its production culturally handmade favors microbial contamination. Contamination by *Aeromonas* bacteria can occur in getting the milk during processing or, if no observed safety procedures such as pasteurization and proper use of good quality water in the cleaning of equipment. The objective was to detect *Aeromonas* in coalho cheese type A sold in Recife, a city in northeastern Brazil in the summer (summer period) and winter (rainy season), with identification of isolated species and resistance testing of isolates against antimicrobial. There was no difference between the frequency of isolation of *Aeromonas* in both periods. Were isolated *A. hydrophila* (54.8%), *A. caviae* (24.7%) and *A. sobria* (17.8%), species frequently incriminated as causes of acute diarrhea and less frequently, *A. veronii* (2.7%). All *Aeromonas* strains were resistant to multiple antibiotics and were resistant to at least three of the eight antibiotics tested. The coalho cheese type A may present a risk to consumers because it contains the genus *Aeromonas*

¹ Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife/PE. Brasil - CEP: 52171-900. rejaneluna@gmail.com, jucarvalho87@gmail.com, jvasilva2@hotmail.com, andreabarretto9@hotmail.com

² Professora do Instituto Federal de Ciência, Ensino e Tecnologia – IFPE. Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. Brasil. CEP52171-900. susbezerra@gmail.com

³ Discente do curso Gastronomia e Segurança Alimentar – UFRPE.

⁴ Professora Associada do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. Brasil. CEP52171-900.

in high frequency, which are resistant to several antibiotics of choice in outbreaks of gastroenteritis.

Keywords: cheese, psychrotrophic bacteria emerging, public health

RESUMO

O queijo de coalho é um produto tradicional da região Nordeste do Brasil. Sua produção culturalmente artesanal favorece a contaminação microbiana. A contaminação por bactérias do gênero *Aeromonas* pode acontecer na obtenção do leite ou durante o processamento, se não forem observados procedimentos de segurança, como pasteurização adequada ou utilização de água de boa qualidade na higienização de equipamentos. Objetivou-se detectar *Aeromonas* em queijos de coalho tipo A comercializados em Recife, cidade da região Nordeste do Brasil, no verão (período de estio) e inverno (período chuvoso), com identificação das espécies isoladas e testes de resistência dos isolados frente aos antibióticos. Não houve diferença entre a frequência de isolamento de *Aeromonas* nos dois períodos. Foram isoladas *A. hydrophila* (54,8%), *A. caviae* (24,7%) e *A. sobria* (17,8%), espécies frequentemente incriminadas como causadoras de diarreia aguda e em menor frequência, a *A. veronii* (2,7%). Todas as aeromonas isoladas apresentaram múltipla resistência aos antimicrobianos, sendo resistentes no mínimo a três dos oito antibióticos testados. Queijos de coalho tipo A podem apresentar risco aos consumidores por conter bactérias do gênero *Aeromonas* em alta frequência, as quais apresentam resistência a vários antibióticos de escolha em surtos de gastroenterites.

Palavras-chave: queijo, psicrotóxicos, bactéria emergente, saúde pública

INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento rico e complexo fornecedor de vitaminas, minerais e proteínas de fácil digestão, podendo ser consumido na sua forma fluida ou como derivado. A produção e o consumo de leite e de seus derivados crescem em todo mundo e tem cada dia mais impacto na economia mundial. O Brasil é um dos maiores produtores de leite, ocupando o sexto lugar no ranking mundial (Zocal 2007), mas a obtenção deste produto nem sempre ocorre em condições de higiene adequadas, o que pode comprometer toda a cadeia produtiva.

Entre os derivados do leite mais consumidos encontra-se o queijo e dentre os mais variados tipos, o queijo de coalho é um produto tradicional da região Nordeste do Brasil, obtido por coagulação do leite com coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não por ação de bactérias lácticas selecionadas, sendo comercializado com até 10 dias de fabricação (Brasil 2001). É classificado em tipo A quando produzido com leite pasteurizado, integral ou desnatado, e tipo B o queijo fresco obtido de leite cru, integral ou desnatado (Pernambuco 1999).

A água utilizada nas propriedades leiteiras e nas indústrias pode se constituir num veículo para vários microrganismos, inclusive as aeromonas, as quais podem interferir na qualidade do produto final. Por se tratar de um microrganismo ubíquo, a contaminação pode ocorrer na higienização do úbere, das mãos do ordenhador e na limpeza dos equipamentos, quando não realizada adequadamente, inclusive através de biofilmes que as aeromonas podem formar (Amaral et al. 2006, Santos et al. 2010).

As aeromonas são bacilos Gram-negativos curtos, anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de multiplicação entre 22°C e 28°C, podendo algumas espécies se desenvolver a 37°C, geralmente móveis por um flagelo polar, produtoras de catalase, oxidase e de grande quantidade de gás a partir do açúcar que fermentam (Holt et al. 1993, Jay 2005, Ghenghesh et al. 2008, Spicer 2009). De acordo com a temperatura ótima de multiplicação, se dividem no grupo da *A. hydrophila*, formado por espécies mesófilas e móveis, podendo se multiplicar em temperaturas que variam de 1 a 42° C e temperatura ótima de multiplicação de 28°C, e em um segundo grupo, mais reduzido e homogêneo geneticamente, designado como grupo psicrotrófico, constituído pelas espécies *A. media* e *A. salmonicida*, com temperatura ótima de multiplicação entre 22-25°C (Castro-Escarpulli et al. 2002, Isonhood & Drake 2002).

As aeromonas já foram incriminadas como agente etiológico de diversas infecções intestinais, seja pela ingestão direta da água ou de alimentos contaminados (Longa et al. 1998, Montoto Mayor et al 2004, Hofer et al. 2006.) e infecções extra-intestinais como, por exemplo, lesão de tecidos moles, acometendo pacientes imunodeprimidos ou não (Bravo et al 2003, Tena et al. 2006, Ghenghesh et al. 2008). As espécies mais patogênicas, responsáveis pela grande maioria dos isolados clínicos são *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* (Ghenghesh et al. 2008).

É importante ressaltar o potencial zoonótico das aeromonas, tendo sido isoladas de peixes de cultivo (Meirelles 2010, Barretto 2011) e de abatedouro de frango e bovino, podendo contaminar trabalhadores que lidam diretamente com estes produtos (Abeyeta Junior et al. 1990, Rossi júnior et al. 2000, Costa & Rossi júnior 2002). A presença do microrganismo foi verificada em água tratada e não tratada, em leite e derivados (Melas et al. 1999, Amaral et al. 2006, Carneiro & Rossi júnior 2006, Otaviani et al. 2011, Pablos et al. 2011).

Atualmente, vem sendo reportada uma importância aos psicrotróficos no tocante a sua capacidade de deterioração de alimentos e formação de biofilmes, causando prejuízos para a indústria de alimentos, mesmo que estejam presentes em baixas contagens (Ravanis & Lewis 1995). Esta ação deterioradora deve-se principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases, que hidrolisam a proteína e a gordura do leite (Arcuri, et al. 2008), limitando a vida de prateleira dos produtos lácteos.

Cepas de aeromonas com múltipla resistência a antimicrobianos têm sido relatadas em todo mundo (Vivekanandhan et al. 2002), sendo um fato de grande importância visto que pode dificultar a cura da doença provocada por estas bactérias, tanto em animais, especialmente peixes, quanto nos humanos (Daskalov 2006). Nesse sentido, a resistência aos antibióticos usados em produção animal poderá afetar a saúde humana, limitando as opções de tratamento, especialmente quando da ocorrência de toxinfecções alimentares (Ghenghesch et al. 2001).

Levando em consideração que o queijo de coalho é um produto culturalmente presente na alimentação do nordestino e os problemas potenciais que bactérias *Aeromonas* representam para a indústria de laticínios e para o consumidor, objetivou-se investigar a participação do queijo de coalho tipo A como importante veiculador de aeromonas.

MATERIAL E MÉTODOS

A cidade de Recife, capital do estado de Pernambuco, situa-se no litoral nordestino do Brasil. Possui clima quente e úmido, com temperatura média de 25,5°C, sendo os meses de março a agosto considerado inverno e de setembro a fevereiro correspondente ao verão, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (2011).

Por se tratar de um país de grande extensão territorial, o Brasil possui regimes de precipitação e temperatura diferenciados, de acordo com cada região. No país, o verão engloba os meses de janeiro a março, época do ano em que ocorrem mudanças rápidas nas condições diárias do tempo, levando à ocorrência de chuvas de curta duração e forte intensidade.

Foram coletas 130 amostras no verão (janeiro, fevereiro e março) e 101 amostras no inverno (junho, julho e agosto) de 2011 em supermercados situados na cidade do Recife. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade, com a embalagem a vácuo intacta e a escolha das marcas foi ao acaso.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram realizadas as análises.

Inicialmente, foi realizado o enriquecimento seletivo de 25 g do queijo em 225 mL de caldo tripticase-soja (TSB) adicionado de 30 mg por litro de ampicilina (Abeyta Júnior et al. 1990), seguindo de incubação a 28°C por 24 horas. A partir dos tubos positivos, foi semeado em ágar seletivo vermelho de fenol-amido adicionado 10 mg por litro de ampicilina incubação a 28°C por 24 horas (Palumbo 1985).

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram escolhidas cinco colônias típicas (amareladas, com formação de halo transparente devido à hidrólise do amido) e cinco atípicas (róseas, pequenas, com ou sem halo), semeadas em tubos com ágar tripticase-soja (TSA) inclinado e após incubação de 24 horas a 28° C foram submetidas aos testes preliminares: coloração de Gram, reação em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI), produção de oxidase e catalase, seguindo esquema de caracterização adotado em Popoff (1984), para confirmação de colônias sugestivas do gênero *Aeromonas*.

A determinação das espécies foi feita seguindo testes bioquímicos recomendados por Holt et al. (1993): motilidade, indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), uréia, citrato, lisina, arginina e ornitina e crescimento em diferentes concentrações de NaCl (0, 1%, 3% e 6%).

Análises moleculares foram realizadas para confirmação final do gênero, por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a partir do ácido desoxirribonucléico (DNA) extraído dos isolados identificados nos testes bioquímicos,

segundo o protocolo do fabricante do Wizard Genomic DNA Purification. Após a extração estes foram armazenados a -20° C para posterior análise.

A amplificação do DNA extraído foi realizada mediante a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em termociclador seguindo protocolo recomendado por Borrel et al. (1997), utilizando os primers AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' (forward) e 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (reverse). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% acrescido do tampão 1x TAE (tris-acetato-EDTA) por 30 minutos a 70V, para verificação da amplificação para bactérias do gênero *Aeromonas*.

A susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos Tetraciclina, Amoxicilina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Cloranfenicol, Penicilina, Ampicilina, Eritromicina e Gentamicina foi avaliada pelo método de difusão de discos em ágar, utilizando-se o Agar Müeller-Hinton e discos impregnados com antibióticos (NCCLS 2003). As zonas de inibição foram medidas em milímetros e o isolado classificado como resistente, intermediário (sensibilidade parcial) ou sensível ao antimicrobiano testado, conforme tabela fornecida pelo laboratório fabricante dos discos.

Os dados referentes à quantificação de *Aeromonas* foram analisados de forma descritiva, comparando-se o percentual de amostras positivas por estação do ano (verão e inverno), bem como a frequência das espécies. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Qui-quadrado, ao nível de significância de 5%, para avaliar a associação existente entre as variáveis qualitativas. Foi utilizado o programa SysEAPRO - versão 2.0 para análise dos dados.

O índice de Múltipla Resistência a Antibióticos (MAR) foi calculado como o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total testado, sendo o valor final multiplicado por 100 para obtenção dos resultados em percentuais. Índice MAR acima de 0,2 (20%) indica múltipla resistência (Krumperman 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 231 amostras de queijo de coalho tipo A analisadas, 73 (31,6%) amostras foram positivas para presença de aeromonas, sendo 38 (29,2%) amostras analisadas no verão e 35 (34,7%) no inverno. Os resultados da frequência de amostras positivas por

estação do ano podem ser visualizados na Tabela 1, bem como a igualdade estatística entre as estações.

Obteve-se alta frequência de queijos positivos quanto às aeromonas. A presença deste microrganismo é sugestiva de contaminação durante e/ou após o processamento devido ao uso de água contaminada ou superfícies mal higienizadas, o que pode favorecer a formação de biofilmes. Este resultado é preocupante uma vez que estas bactérias podem provocar casos severos de diarreia aguda, principalmente nos imunocomprometidos. Cereser (2009) destacou que a grande maioria das propriedades rurais emprega a água de poços profundos ou rasos, sem cloração ou avaliação de potabilidade.

Por se tratar de um produto elaborado com leite pasteurizado, espera-se que o queijo de coalho tipo A esteja livre de aeromonas, entre outras bactérias. Entretanto, apesar do tratamento térmico e de serem sensíveis à pasteurização, já foram isoladas de leite pasteurizado (Carneiro & Rossi Júnior 2006, Cereser, 2009). A alta frequência deste microrganismo nos queijos analisados poder ser indicativo de falha no tratamento térmico empregado na matéria-prima.

Melas et al. (1999) encontraram altas contagens de aeromonas em leite cru de vaca e de ovelha e em queijos tradicionais da Grécia. Em Minas Gerais/ Brasil em São Paulo/ Brasil, foram analisadas 160 amostras de queijo de minas frescal artesanal, tendo sido encontradas 51,2% contaminadas por aeromonas (Bulhões & Rossi Júnior 2002). Em ambos os estudos os resultados levaram os autores a indicar o risco da contaminação pela aeromonas durante o processamento, na produção do queijo, já que as análises foram realizadas com queijos elaborados com leite cru.

Atenção especial aos produtos lácteos deve ser dada pelos órgãos de fiscalização sanitária, por serem alimentos altamente perecíveis e consumidos por pessoas imunologicamente mais vulneráveis, além de serem ótimos meios de cultura devido a sua constituição rica em nutrientes (Balbani & Butugan 2001). Na Holanda, Itália e no Canadá, foi estabelecido o valor máximo de aeromonas em águas para consumo de 200 UFC/100 mL pelas autoridades de saúde pública (Martin-Carnahan & Joseph 2005).

No Brasil, a incidência da doença diarreica aguda causada por *Aeromonas* pode ser subestimada por não haver uma legislação com definição de métodos de pesquisa e limites estabelecidos para a presença deste microrganismo. Todavia, está determinado na resolução RDC de n.12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária -

ANVISA que os produtos, “cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor” são produtos em condições sanitárias insatisfatórias ao consumo.

Por se tratar de um importante veículo de microrganismos do gênero *Aeromonas*, a água contaminada pode comprometer a produção de queijos, provocando defeitos e perdas econômicas devido à atuação deteriorante destas bactérias sobre a proteína do leite, diminuindo o rendimento final (Silveira et al. 1998). Além disso, em muitos estudos referentes às gastroenterites causadas por *Aeromonas* spp., a água é estabelecida como principal fonte de transmissão do agente (Mesquita 1995, Montoto Mayor et al. 2004, Pablos et al. 2009, Coelho et al. 2010). Desta forma, como são patógenos potenciais, devem ser consideradas nas suspeitas de toxinfecções de origem alimentar. Nas amostras analisadas, a utilização de água de qualidade microbiológica deficiente pode ter originado a contaminação dos queijos.

Diversos autores relacionaram o nível de contaminação por aeromonas com o aumento da precipitação pluviométrica, por serem microrganismos amplamente distribuídos no ambiente aquático. Entretanto, quando comparada a presença de aeromonas nos queijos de coalho analisados em relação às estações do ano através do teste não paramétrico do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$), não se observou diferença estatística entre os períodos. Em grande parte da região Nordeste, as chuvas estiveram acima da média no verão de 2011 no norte e leste do Nordeste, especialmente durante o mês de fevereiro, o que pode ter influenciado no resultado quanto à influência da estação do ano na presença do microrganismo (Quadro et al. 2011).

A influência da sazonalidade também não foi observada por Coelho et al. (2010), quando analisaram microbiologicamente águas minerais, tendo encontrado contaminação por *A. caviae* e *A. hydrophila*. Amaral et al. (2006) analisaram água do sistema de distribuição nas propriedades rurais do estado de São Paulo/Brasil, no inverno e verão, obtendo maiores resultados de isolamento de *Aeromonas* no primeiro período. Ao contrário, Pereira et al. (2004) observaram um pico de isolamento destes microrganismos em mexilhões *in natura* coletados no Rio de Janeiro/Brasil entre agosto e outubro, época de verão nessa região.

Em São Bento do Una – PE/Brasil, ao serem analisadas fezes de pacientes com diarreia aguda, foi confirmado o envolvimento de *Aeromonas* spp. em 114 (19,5%) dos 582 casos investigados (Hofer et al. 2006). Neste caso, também houve um excesso de

chuvas nos primeiros meses do ano de 2004 que, aliado às condições de saneamento precárias, provocaram um aumento do número de pacientes com diarreia aguda no período, demonstrando a importância da veiculação hídrica deste microrganismo.

As espécies isoladas foram *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *A. veronii*, como pode ser observado na Tabela 2. A espécie mais isolada foi *A. hydrophila* (54,8%), seguida de *A. caviae* (24,7%), *A. sobria* (17,8%) e, em menor frequência, *A. veronii* (2,7%). Não houve diferença estatística entre a frequência de espécies de aeromonas isoladas e a estação do ano ($P \geq 0,05$). Os resultados do presente estudo são semelhantes com os das pesquisas realizadas em água, leite e produtos lácteos na Grécia, Turquia e Espanha (Melas et al. 1999, Uraz et al. 2008, Pablos et al. 2011), que também encontraram as espécies citadas, mais incriminadas como causadoras de doença diarreica em humanos (Chopra et al. 2009, Hofer et al. 2006, Ottaviani et al. 2011).

Por se tratar de espécies com características mesófilas, a não manutenção dos produtos armazenados sob baixas temperaturas, bem como falhas nos equipamentos utilizados para este fim podem ter favorecido o desenvolvimento destas espécies.

Os 73 isolados obtidos foram analisados quanto ao perfil de resistência a oito antimicrobianos, cujos resultados são apresentados na Tabela 3. Verifica-se que todas as espécies foram resistentes à amoxicilina, ampicilina e penicilina. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Bravo et al. (2003), que isolaram aeromonas de fezes de pacientes acometidos de diarreia aguda e as cepas apresentaram resistência à ampicilina, penicilina, cabernicilina e colistina. É comum encontrar um alto percentual de resistência a estes antimicrobianos devido à resistência natural aos beta-lactâmicos que as aeromonas possuem, apesar de algumas cepas de *A. caviae* e *A. trota* poderem apresentar sensibilidade às penicilinas, segundo Awan et al. (2009).

Os antibióticos que apresentaram melhor atividade contra aeromonas foram a gentamicina, em que 91,8% dos isolados foram sensíveis e o cloranfenicol, ao qual 100% dos isolados apresentaram sensibilidade. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Carneiro & Rossi Júnior (2006), que ao testarem diversos antimicrobianos às aeromonas isoladas de diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento de leite tipo A, verificaram maior sensibilidade ao cloranfenicol e à gentamicina. Este resultado é importante para estabelecer um protocolo de antibioticoterapia eficiente para o paciente acometido de gastroenterite causada pela ingestão de alimentos contaminados com bactérias do gênero *Aeromonas*.

Krumperman (1983) determinou que índice de Múltipla Resistência a Antibióticos (MAR) maior que 0,2 caracteriza multirresistência. Todos os isolados submetidos ao antibiograma apresentaram índice MAR entre 0,37 e 0,87, demonstrando alto índice de multirresistencia. Este resultado demonstra que estes isolados podem determinar a difusão de genes de resistência a outros microrganismos, o que pode limitar as opções de tratamento de um paciente acometido por infecção intra ou extra-intestinal, uma vez que se trata de antibióticos administrados com frequência.

As espécies isoladas foram submetidas à identificação molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroferese em gel de agarose para confirmação do gênero. Dos 73 isolados testados, 68 foram confirmados pertencendo ao gênero *Aeromonas* (93,1%). Os cinco isolados que foram negativos na PCR tiveram origem de colônias com características morfológicas e bioquímicas típicas de aeromonas. Segundo Nawaz et al (2006) pode ocorrer erroneamente a identificação de membros de *Vibrionaceae* como sendo aeromonas devido a reações bioquímicas semelhantes, o que demonstra necessidade de atualizar e melhorar os métodos bioquímicos para diferenciação de *Aeromonas* spp. (ØRMEN et al. 2005).

Os resultados obtidos são importantes do ponto de vista da saúde pública, uma vez que o queijo de coalho tipo A, por se tratar de um produto elaborado com leite pasteurizado, leva o consumidor a acreditar que está adquirindo um produto microbiologicamente seguro. Apesar de ser atualmente referido como microrganismo emergente devido ao potencial patogênico, as aeromonas ainda não são referidos como agentes etiológicos de surtos de diarreia com frequência, seja por falha no processo de notificação destes eventos, seja pela falta da pesquisa dos mesmos.

CONCLUSÃO

Queijos de coalho tipo A representam risco à saúde pública devido a elevada frequência de *Aeromonas* spp., com múltipla resistência a diversos antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeyta Júnior, C. et al. Incidence of motile aeromonas from United States west coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, Ames, 53(10), 849-855, 1990.

Amaral, L. A., Rossi Jr, O. D., Nader Filho, A., Barros, L. S. S. & Silveiras, P. M. R. 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.

Arcuri, E. F., Silva, P. D. L., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R., Lange, C. C. & MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**. v. 38, nov. nº8, p. 2250-2255, 2008.

Awan, M. B., Maqbool, A., Bari, A. & Krovacek, K. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. **New microbiologica**, 32, p. 17-23, 2009.

Balbani, A. P. S. & Butugan, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**. 23(4), São Paulo, p. 320 – 328, 2001.

Barretto, A. C. G. Status sanitário de tilápias cultivadas em viveiros e tanques-rede. Tese (Doutorado), Recife, PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 60 pág, 2011.

Bersot, L. S., Barcellos, V. C., Fujisawa, F. M., Pereira, J. G. & Maziero, M. T. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nov/dez, nº 371, v. 64, p. 35-39, 2009.

Borrel, N., Silva, G. A., Figueiras, M. J. & Martinez-Mucia, A. J. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**. 1671-1674p, 1997.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146. 07/03/1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001.

Bravo, L., Morier, L., Castañeda, N., Ramirez, M., Silva, M. & Castro-Escarpulli, G. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. Sep-Dec; v. 55, n.3, p. 208-209, 2003.

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.

CARNAHAN, A. M.; JOSEPH, S. W. Aeromonadaceae. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G.M. (Eds): The proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, v.2, Springer-Verlag, New York, NY, 2005.

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 antibióticos. **Arquivo do Instituto Biológico**, jul/set, v. 73, n. 3, p. 271-276, São Paulo, 2006.

Castro-Escarpulli, 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.

Cereser, N. D. ***Aeromonas* no processamento de queijos tipos minas frescal e colonial da região nordeste do Rio Grande do Sul**. Tese de doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP. 73 p, 2009.

Chopra, A. K., Graf, J., Horneman, A. J. & Johnson, J. A. Virulence factor-activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species (spp.). **J. Water Health**. 7 suppl 1, p. 29-54, 2009.

Coelho, M. I. S., Mendes, E. S., Cruz, M. C. S., Bezerra, S. S. & Silva, R. P. P. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum, Health Sciences**. Maringá, v 32, n 1, p 1-8, 2010.

Costa, F. N. & Rossi Júnior, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, out, vol. 54, n.5, Belo Horizonte, 2002.

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

Ghenghesch, 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.

Hofer, E., Reis, C.M.F.R, Theophilo, G. N. D., Cavalcanti, V. O., Lima, N. V. & Henriques, M. F. C. M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, mar-abr, v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9ª Ed, 1993.

Instituto Nacional de Meteorologia

Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/html/estacoesAno.html>

Acesso em 10/11/2011

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

Jay, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005.

Krumperman, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.

LongA, A., Vizcaya, L., Nieves, B., Hernández, J. & Pérez, I. Espécies de aeromonas associadas a diarreia: características microbiológicas y clínicas. **Bol. Soc. Venez. Microbiol.** v. 16, n. 2, p. 13-18, 1998.

Melas, D. S., Papageorgious, D. K. & Mantis, S. I. Enumeration and confirmation os *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece. **J Food Prot.** May, v. 62, n. 5, p. 463-466, 1999.

Meirelles, F. S. Frequência de doenças bacterianas em tilápias (*Oerochromis nilotica*) cultivadas em Pernambuco. Tese (Doutorado), Recife, PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

Mesquita, A. J., Nunes, I. A., Oliveira, A. N., Lage, M. E. & Souza, E. M.. B. *Aeromonas* spp. em produtos de origem animal e em água de consumo de Goiana-GO. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 61-66, 1995.

Montoto Mayor, V., Galano Ferer, C. M., Carrió Valdez, C. R. & Lobaina, Delfino P. Incidência de *Aeromonas* spp. em La província de Sntiago de Cuba. **Medisan.** v. 81, n. 1, 2004.

Disponível em: HTTP://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_1_04/san06104.htm

Nawaz, M., Sung, K., Khan, S. A., Khan A. A. & Steele, R. Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonas veronii* Isolates from Catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, Oct. 2006, p. 6461-6466, 2006.

NCCLS - National Committee on Clinical Laboratory Standards **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition, 81p, 2003.

Ørmen Ø., Granum P., Lassen J. & Figueras, M. J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **APMIS** , 113, p. 203-207, 2005.

Otaviani, D., Parlani, C., Citterio, B., Masini, L., LeonI, F., Sabatini, L., Bruscolini, F. & Pianetti, A. Putative virulence properties os *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. **Int J Food Microbiol.** Jan, 5, v. 144, n 3, p. 538 – 545, 2011.

Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodriguez-Calleja, J. M., Otero, A., Santos, J. A. & Garcia-Lopez, M. L. Identification and epidemiological relationtips os *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. **Int J Food Microbiol.** Jun 30, v. 147, n. 3, p. 203-210, 2011.

Pablos, M., Rodriguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A. & GarciA- Lopez, M. L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encodding virulence factors. **Int J Food Microbiol.** Oct, 31, v. 135,n. 2, p. 158 – 164, 2009.

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.

Pereira, C. S., Possas, C. A., Viana, C. M. & Rodrigues, D. P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isolados a partir de mexilões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, Campinas, p. 562-566, 2004.

PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária. Resolução n. 0002 de 19 de abril de 1999. **Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o Queijo Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano.** Diário Oficial do Estado de Pernambuco, Recife, 20 de abril de 1999.

Popoff, M. Genus III. *Aeromonas* Kluwyver and Van Niel. In: NOEL R. DRIEG (Ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1, p. 545-548, 1984.

Quadro, M. F. L. et al. Climatologia de precipitação e temperatura. In: **Boletim de monitoramento e análise climática.** Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC/INPE, Volume 26 - N°02 – Fevereiro, 2011. Disponível em: <http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/boletim/cliessp10a/chuesp.html>
Visualizado em 14/03/2012

Ravanis, S. & Lewis, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.20, n.3, mar, p.164-167, 1995.

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, out, n. 5, p. 549-553, 2000.

Santos, P. G., Santos, P. A., Bello, A. R. & Freitas-Almeida, A. C. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. **Letters in Applied Microbiology**. 52, p 49-55, 2010.

Silveira, I.A., Carvalho, E.P. & Teixeira, D. Influência de Microrganismos Psicrotrofos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.55, p.21-27, 1998.

Spicer, W. J. **Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto e atlas em color**. Segunda edición. Elsevier Churchill livingstone, 251 p, 2009.

Tena, D., González-Praetorius A., Pérez-Pomata M. T., Bisquert J. Mionecrosis rápidamente progresiva por *Aeromonas veronii* biotipo sobria. **An. Med. Interna (Madrid)**, Nov, vol.23, no.11, p.540-542, 2006.

Uraz, G., Coskun, S. & Ozer, B. Microflora and pathogen bacteria (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) in Urfa Cheese (A traditional white brined Turkish cheese). **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 7, n. 5, 630 – 635, 2008.

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.

Zocal, R. Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados. Minas Gerais, 2007.

Disponível em: [HTTP://www.cnpqgl.embrapa.br](http://www.cnpqgl.embrapa.br)

Acesso em 10/11/2011

Tabela 1. Frequência de isolamento de *Aeromonas* spp. em queijo de coalho tipo A nos períodos de verão e inverno de 2011.

Período do ano	n	Positivas	%
Verão	130	38 ^a	29,2 ^a
Inverno	101	35 ^a	34,7 ^a
Total	231	73	31,6

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Frequência e espécies de *Aeromonas* spp. isoladas de queijo de coalho tipo A no verão e inverno.

Espécie/ Estação do ano	verão	inverno	Total
<i>A. hydrophila</i>	21 ^{a*}	19 ^{a*}	40
<i>A. caviae</i>	9 ^{a*}	9 ^{a*}	18
<i>A. sóbria</i>	8 ^{a*}	5 ^{a*}	13
<i>A. veronii</i> **	0	2	2

*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade.

**Não utilizada no teste, em virtude dos dados não atenderem as especificações do Qui-quadrado.

Tabela 3. Perfil de resistência das cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de queijos de coalho tipo A frente a antimicrobianos.

Espécie/Antibiótico	AMO	AMP	CLO	ERI	GEN	PEN	SULT	TET
<i>A. hydrophila</i>	40	40	0	36	1	40	14	17
<i>A. caviae</i>	18	18	0	17	1	18	8	9
<i>A. sobria</i>	13	13	0	13	4	13	7	9
<i>A. veronii</i>	2	2	0	0	0	2	0	0
Total / %	73 / 100	73 / 100	0	66 / 90,4	6 / 8,2	73 / 100	29 / 39,7	35 / 47,9

AMO – Amoxicilina; AMP – Ampicilina; CLO – Cloranfenicol; ERI – Eritromicina; GEN – Gentamicina; PEN – Penicilina; SULT – Sulfametoxazol-trimetoprim; TET – Tetraciclina.