

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

Rejane de Oliveira Luna¹⁺, Suely Santos Bezerra^{1,2}, Juliana Nunes Carvalho¹, Fabíola Carneiro Pereira¹, Andréa Christianne Gomes Barretto¹, Sarah Michele Rodrigues Galvão³ e Emiko Shinozaki Mendes⁴

ABSTRACT. Luna R. de O., Bezerra S.S., Carvalho J.N., Pereira F.C., Barretto A.C.G., Galvão S.M.R. & Mendes E.S. [Identification and molecular profile of resistance to antimicrobial *Aeromonas* spp. isolated from coalho cheese type A]. Identificação molecular e perfil de resistência a antimicrobianos de *Aeromonas* spp. isoladas de queijo de coalho tipo A. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(3):205-211, 2013. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. E-mail: rejaneluna@gmail.com

The coalho cheese is a traditional product in Northeastern Brazil. The artisanal production favors microbial contamination. Contamination by bacteria *Aeromonas* may occur in obtaining milk or during processing, if not observed safety procedures such as pasteurization or proper use of good quality water in cleaning equipment. Aimed to detect *Aeromonas* in coalho cheese type A marketed in Recife city in northeastern Brazil, in the summer (summer period) and winter (rainy season), with identification of isolated species and resistance testing of isolates against antibiotics. 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 often incriminated as causing acute diarrhea and to a lesser extent, *A. veronii* (2.7%). All *Aeromonas* isolates showed multiple resistance to antibiotics and were resistant to at least three of the eight antibiotics tested. Coalho cheese type A may present a risk to consumers contain *Aeromonas* bacteria at high frequency, which are resistant to several antibiotics of choice in outbreaks of gastroenteritis.

KEY WORDS. Cheese, psychrotrophics, emerging bacteria, 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 antibi-

*Recebido em 17 de abril de 2012.

Aceito para publicação em 18 de julho de 2013.

¹ Médica-veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife, PE 52171-900, Brasil. ⁺ Autora para correspondência. E-mail: rejaneluna@gmail.com, E-mails: jucarvalho87@gmail.com, javasilva2@hotmail.com, andreabarretto9@hotmail.com

² Médica-veterinária. Instituto Federal de Ciência, Ensino e Tecnologia (IFPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900. E-mail: susbezerra@gmail.com

³ Curso Gastronomia e Segurança Alimentar, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900. E-mail: sarinha_smrg@yahoo.com.br

⁴ Médica-veterinária. DSc. Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900. E-mail: esmendes@yahoo.com.br

óticos. 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. 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, psicrotróficos, 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 cur-

tos, 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. 2001, 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 psicrotrófilo, 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. 2001). As espécies mais patogênicas, responsáveis pela grande maioria dos isolados clínicos são *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar. *sobria* (Ghenghesh et al. 2001).

É importante ressaltar o potencial zoonótico das aeromonas, tendo sido isoladas de peixes de cultivo 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 mun-

do (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 do 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 coletadas 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 (rôseas, 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. (1994): 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 Müller-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 conta-

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	38a	29,2a
Inverno	101	35a	34,7a
Total	231	73	31,6

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

minada 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 pode 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/Brasile 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 et al. 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 micror-

ganismos em mexilhões *in natura* coletados no Rio de Janeiro/Brasil entre agosto e outubro, época de verão nessa região.

Em São Bento do Uma, 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 (Hofer et al. 2006, Chopra et al. 2009, Ottaviani et al. 2011).

Por se tratar de espécies com características mesófilas, a não manutenção dos produtos armazenados

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

Espécie	Estação do ano		Total
	Verão	Inverno	
<i>A. hydrophila</i>	21a*	19a*	40
<i>A. caviae</i>	9a*	9a*	18
<i>A. sobria</i>	8a*	5a*	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.

dos 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 aco-

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.

metidos 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 multirresistência. 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 *Ae-*

romonas (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 C. Jr, Kaysner C.A., Wekell M.M., Stott R.F. Incidence of motile aeromonas from United States west coast shellfish growing estuaries. *J. Food Protect.*, 53:849-855, 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*. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, 101:557-558, 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 psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Cienc. Rur.*, 38:2250-2255, 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 Microbiol.*, 32:17-23, 2009.

Balbani A.P.S. & Butugan O. Contaminação biológica de alimentos. *Pediatria*, 23:320-328, 2001.

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. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1671-1674, 1997.

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

Bravo L., Morier L., Castañeda N., Ramirez M., Silva M. & Castro-Escarpulli G. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 55:208-209, 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 54:320-324, 2002.

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. *Arq. Inst. Biol.*, 73:271-276, 2006.

Castro-Escarpulli G., Aguilera-Arreola M.G., Giono Cerezo S., Hernández-Rodríguez C.H., Rodríguez Chacón M., Soler Falgás L., Aparicio Ozores G. & Figueras Salvat M.J. El género *Aeromonas*. Um patógeno importante em México? *Enfermed. Infec. Microbiol.*, 22:206-215, 2002.

Cereser N.D. *Aeromonas* no processamento de queijos tipos minas frescal e colonial da região nordeste do Rio Grande do Sul. Tese (Medicina Veterinária Preventiva), Unesp, Jaboticabal, 2009. 73p. (Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/mvp/d/2702.pdf>).

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(Supl. 1): 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 Sci.: Health Sci.*, 32:1-8, 2010.

Costa F.N. & Rossi Junior O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 54(5), Belo Horizonte, Oct. 2002. (Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352002000500013&lng=en&nrm=iso).

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

Ghenghesch K.S., El-Ghodban A., Dkakni R., Abeid S., Altomi A., Tarhuni A. & Marialigeti K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* in untreated well water. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96:169-173, 2001.

Hofér 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. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39:217-220, 2006.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. & Williams S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1994. 787p. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://>

- www.inmet.gov.br/html/estacoesAno.html >. Acesso em: 10 nov. 2011.
- Isonhood J.H. & Drake M. *Aeromonas* species in foods. *J. Food Protect.*, 65:575-582, 2002.
- Jay J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2005. 711p.
- Krumperman P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environment. Microbiol.*, 46:165-170, 1983.
- Longa A., Vizcaya L., Nieves B., Hernández J. & Pérez I. Especies de aeromonas asociadas a diarrea: características microbiológicas y clínicas. *Bol. Soc. Venez. Microbiol.*, 16:13-18, 1998.
- Martin-Carnahan A. & Joseph S.W. Aeromonadaceae, p.556-578. 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 Ed. Springer-Verlag, New York, 2005.
- 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.*, 62:463-466, 1999.
- 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 Esc. Agron. Vet. UFG*, 25:61-66, 1995.
- Montoto Mayor V., Galano Ferer C.M., Carrió Valdez C.R. & Lobaina Delfino P. Incidência de *Aeromonas* spp. em la provincia de Sntiago de Cuba. *Medisan*, 81:1, 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. *Appl. Environment. Microbiol.*, 72(10):6461-6466, 2006.
- NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. National Committee on Clinical Laboratory Standards Approved Standard. 6th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pensilvania, 2003. 81p.
- Ørmen Ø., Granum P., Lassen J. & Figueras M.J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS*, 113: 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.*, 144:538-545, 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.*, 147:203-210, 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 encoding virulence factors. *Int. J. Food Microbiol.*, 135:158-164, 2009.
- Palumbo S.A. Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Sci.*, 50:1417-1421, 1985.
- Pereira C.S., Possas C.A., Viana C.M. & Rodrigues D.P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Cienc. Tecnol. Alim.*, 24:562-566, 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* Kluyver and Van Niel, p.545-548. In: Noel R.D. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984.
- Quadro M.F.L., Machado L.H.R., Calbete S., Batista N.N. M. & O.G. Sampaio Climatologia de precipitação e temperatura. In: Boletim de monitoramento e análise climática. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC/INPE, Vol. 26, n.2, 2011. Disponível em: <http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/boletim/cliesp10a/chuesp.html>. Acesso em: 14 mar.2012
- Ravanis S. & Lewis M.J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. *Letters Appl. Microbiol.*, 20:164-167, 1995.
- Rossi Júnior O.D., Amaral L.A. & Nader Filho A. Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 52:549-553, 2000.
- Santos P.G., Santos P.A., Bello A.R. & Freitas-Almeida A.C. Association os *Aeromonas caviae* polar ans lateral flagella with biofilm formation. *Letters Appl. Microbiol.*, 52:49-55, 2010.
- Silveira I.A., Carvalho E.P. & Teixeira D. Influência de Microrganismos Psicrotóxicos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. *Hig. Alim.*, 12:21-27, 1998.
- Spicer W.J. *Microbiologia clinica y enfermedades infecciosas. Texto y atlas en color*. 2ª ed. Elsevier, Churchill Livingstone, 2009. 251p.
- Tena D., González-Praetorius A., Pérez-Pomata M.T. & Bisquert J. Mionecrosis rápidamente progresiva por *Aeromonas veronii* biotipo sobria. *An. Med. Interna*, 23:540-542, 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 J. Nutr.*, 7:630-635, 2008.
- Vivekanandhan K., Savithamani K. & Hatha A.A. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *Int. J. Food Microbiol.*, 76:165-1168, 2002.
- Zocal R. Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados. Minas Gerais, 2007. Disponível em: < HTTP://www.cnpqgl.embrapa.br >. Acesso em: 10 nov. 2011.