



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PATRÍCIA DE FREITAS OLIVEIRA

**PESQUISA DE *Aeromonas* spp. EM CORTES DE FRANGO  
PRODUZIDOS INDUSTRIALMENTE**

FORTALEZA

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PATRÍCIA DE FREITAS OLIVEIRA

**PESQUISA DE *Aeromonas* spp. EM CORTES DE FRANGO  
PRODUZIDOS INDUSTRIALMENTE**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau mestre em Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof(a) Dra. Evânia Altina T. de Figueiredo

Co-orientadora: Dra. Maria de Fátima Borges

FORTALEZA

2009

O49p Oliveira, Patrícia de Freitas  
Pesquisa de *Aeromonas* spp. em cortes de frango produzidos industrialmente / Patrícia de Freitas Oliveira, 2009.  
76 f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo  
Co-Orientadora: Dra. Maria de Fátima Borges  
Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2009.

1. Patógenos emergentes 2. Contaminação 3. Atividade hemolítica I. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira de (orient.) II. Borges, Maria de Fátima (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos IV. Título

CDD 664

PATRÍCIA DE FREITAS OLIVEIRA

**PESQUISA DE *Aeromonas spp.* EM CORTES DE FRANGO  
PRODUZIDOS INDUSTRIALMENTE**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos na Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 24 / 04 / 2009.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof(a) Dra. Evânia Altina T. de Figueiredo  
Orientadora

---

Dra. Maria de Fátima Borges  
Co-orientadora

---

Dra. Laura Maria Bruno  
Membro

---

Dra. Paula Forjaz Marques  
Membro

---

Prof(a) Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Membro

A Deus

Virtude alguma poderá enraizar-se em nossa  
alma se não tivermos fé e confiança.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste curso.

A todos os professores do mestrado pelos seus ensinamentos e contribuição para a minha formação.

Ao professor Dr. Jorge Fernando Fuentes Zapata por sua integridade, seus ensinamentos e por se dispor a ajudar no desenvolvimento da minha dissertação.

A professora Dra. Evânia Altina T. de Figueiredo em especial, pela orientação, incentivo, confiança e ensinamentos durante a realização desta pesquisa.

A Dra. Maria de Fátima Borges pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical/CE pela co-orientação, sugestões e contribuições na avaliação deste trabalho.

A Dra. Paula Forjaz Marques da Biocen do Brasil por ceder meios de cultura para o desenvolvimento da pesquisa, incentivar e apoiar a realização deste trabalho.

A professora Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho pelas correções e avaliações deste trabalho.

A minha família por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida e torcendo por mais uma conquista.

A minha irmã Daniele em especial, pelo apoio e incentivo, sem ela não seria possível a conclusão do mestrado.

As amigas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (UFC) que conquistei no decorrer da realização deste trabalho. Agradeço não somente pela amizade, mas pela força, paciência, incentivo e aprendizados compartilhados durante nosso convívio.

A Vivi pela amizade, colaboração, disponibilidade para ajudar, carinho e atenção, imprescindível na realização deste trabalho.

Agradeço imensamente as minhas amigas da turma do Curso de Mestrado pela receptividade, apoio e amizade a mim dispensada durante nosso período de convivência.

A todas as demais amigas que conquistei ao longo da vida e que mesmo de longe estavam na torcida e ansiosas para que hoje eu estivesse aqui, concluindo este trabalho e conquistando mais uma vitória em minha vida.

Ao secretário do mestrado, Paulo Mendes por seus esclarecimentos referentes ao curso, por estar sempre disponível para ajudar, pelo carinho e paciência.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para viabilização, desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

A Deus, embora citado por último foi imprescindível na minha vida, pela presença constante, por ter me dado saúde, força e permitir a conclusão de mais uma jornada.

*Aeromonas*

“Sou discreta, mas difícil.  
Gosto do frio e do calor  
Nos peixes posso morar  
e no homem dor eu causar.”

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

## RESUMO

*Aeromonas* spp. são bactérias onipresentes de ambientes aquáticos e atualmente consideradas como patógenos emergentes. O gênero inclui espécies que podem provocar infecções extraintestinais e gastrointestinais em seres humanos, devido à produção de inúmeros fatores de virulência (enzimas extracelulares, hemolisinas, enterotoxinas, etc.). Têm sido isoladas de uma ampla variedade de amostras ambientais, clínicas e alimentos de origem animal e vegetal. Em alimentos refrigerados ressalva-se a capacidade de crescimento nesta temperatura de estocagem. O presente estudo teve como objetivo investigar a incidência de *Aeromonas* spp. em cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente, bem como avaliar a eficiência de meios de cultura no isolamento destas bactérias e verificar a capacidade de produção de  $\beta$ -hemolisina. Foram utilizados para o isolamento de *Aeromonas* spp. os meios ágar amido ampicilina (SA) e o meio cromogênico Cromocen AGN, testes bioquímicos para a identificação fenotípica das espécies e ágar sangue de carneiro a 7 % para avaliar atividade hemolítica das cepas identificadas. Os resultados demonstraram a presença de *Aeromonas* spp. em 24 (96 %) e 7 (28 %) de um total de 50 cortes de frango resfriados (25) e congelados avaliados (25). Todos os cinco tipos de cortes de frango resfriados analisados estavam contaminados, enquanto que dos quatro tipos de cortes de frango congelados apenas três estavam contaminados. Foram identificadas cinco espécies: *A.caviae*, *A.hydrophila*, *A.eucrenophila*, *A.veronii* biovar *veronii* e *A.sobria*. Em ambos os cortes *A.caviae* foi a espécie predominante, o que pode ser indicativo de uma maior resistência e sobrevivência sob condições de resfriamento e congelamento. A utilização dos dois meios de cultura para isolamento de *Aeromonas* spp. nos cortes de frango resfriados evidenciou que das 123 cepas isoladas no ágar amido ampicilina (SA), 66 espécies foram identificadas, enquanto que das 125 isoladas no meio cromogênico Cromocen AGN, 69 espécies foram identificadas. Nos cortes de frango congelados das 55 cepas isoladas no ágar amido ampicilina (SA), 12 espécies foram identificadas, enquanto que das 55 isoladas no meio cromogênico Cromocen AGN, 17 espécies foram identificadas. Ambos os meios mostraram-se eficientes e com semelhantes resultados. Na investigação da atividade hemolítica das espécies identificadas 70 % e 66,6 % produziram  $\beta$ -hemolisina nos cortes de frango resfriados e congelados, respectivamente. A confirmação de espécies pertencentes ao gênero *Aeromonas* nos cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente evidencia que este alimento pode agir como um veículo a outros alimentos, ao homem e possivelmente trazer prejuízos a saúde.

Palavras-chave: *Aeromonas* spp. Cortes de frango. Contaminação.

## ABSTRACT

*Aeromonas* spp. are omnipresent bacteria of aquatic environment and currently considered as emergent pathogens. The genus includes species that can cause extraintestinal and gastrointestinal infections in the human being, due to the production of countless factors of virulence (extracellular enzymes, hemolysins, enterotoxines, etc.). The bacteria have been isolated from a wide variety of environmental and clinical samples and foods of animal and vegetable origin. In cool foods It is pointed out the capacity of rising in this temperature of stockage. The purpose of this work was to investigate the incidence of *Aeromonas* spp. in cool and frozen chicken cuts produced industrially, as well as to evaluate the efficiency of culture media in the isolation of those bacteria and check the capacity of production of  $\beta$ -hemolysin. For the isolation of *Aeromonas* spp. it was used agar amide ampiciline (SA) and Cromocen AGN, biochemical tests for the fenotypic identification of the species and 7 % sheep blood agar to evaluate hemolytic activity of the strain identified. The results showed the presence of *Aeromonas* spp. in 24 (96 %) and 7 (28 %) out of 50 chicken cuts evaluated, 25 cool ones and 25 frozen ones. All of five types of cool chicken cuts analyzed were contaminated, while only 03 out of 04 frozen chicken cuts were contaminated. It was identified five species: *A.caviae*, *A.hydrophila*, *A.eucrenophila*, *A. veronii* biovar *veronii* and *A.sobria*. In both cuts *A.caviae* was a predominant species, what might be indicative of a bigger resistance and survival under conditions of cooling and freezing. The use of both culture media for isolation of *Aeromonas* spp. in the cool chicken cuts showed that 66 species out of 123 strains isolated in agar amide ampiciline (SA) were identified, while 69 species out of 125 isolated in Cromocen AGN were identified. In the frozen chicken cuts showed that 12 species out of 55 strains isolated in agar amide ampiciline (SA) were identified, while 17 species out of 55 isolated in Cromocen AGN were identified. Both media showed efficient and with similar results. In the investigation of the hemolytic activity of the identified species 70 % and 66.6 % produced  $\beta$ -hemolysin in the cool and frozen chicken cuts, respectively. The confirmation of species that belong to genus *Aeromonas* in the cool and frozen chicken cuts produced industrially shows that this food can act as a transmitter to other foods, to the human being and possibly be harmful to health.

Key-words: *Aeromonas* spp. Chicken cuts. Contamination.

## LISTA DE FIGURAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Esquema representativo dos tipos de cortes de frango produzidos em uma indústria avícola .....         | 19 |
| FIGURA 2 | Características morfológicas de <i>Aeromonas</i> spp. (coloração de Gram) .....                        | 22 |
| FIGURA 3 | Dimensões de <i>Aeromonas</i> spp. ....  | 22 |
| FIGURA 4 | Características das colônias de <i>Aeromonas</i> spp. em ágar amido ampicilina (SA) .....              | 43 |
| FIGURA 5 | Características das colônias de <i>Aeromonas</i> spp. em meio Cromocen AGN .....                       | 43 |
| FIGURA 6 | Esquema do procedimento analítico para isolamento das colônias suspeitas de <i>Aeromonas</i> spp. .... | 44 |
| FIGURA 7 | Reação em tira de oxidase .....  | 46 |
| FIGURA 8 | Características das colônias de <i>Aeromonas</i> spp. em ágar DNase .....                              | 47 |
| FIGURA 9 | Produção de $\beta$ -hemolisina por cepas de <i>Aeromonas</i> spp. ....                                | 50 |

## LISTA DE QUADROS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| QUADRO 1 | Número de amostras dos diferentes tipos de cortes de frango resfriados avaliados .....     | 41 |
| QUADRO 2 | Número de amostras dos diferentes tipos de cortes de frango resfriados avaliados .....     | 41 |
| QUADRO 3 | Características bioquímicas para as espécies pertencentes ao gênero <i>Aeromonas</i> ..... | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Grupos de hibridização, genoespécies e fenoespécies do gênero <i>Aeromonas</i> .....  | 26 |
| TABELA 2 | Comparação da eficiência de dois meios de cultura no isolamento de <i>Aeromonas</i> spp. a partir de cortes de frango resfriados .....        | 52 |
| TABELA 3 | Comparação da eficiência de dois meios de cultura no isolamento de <i>Aeromonas</i> spp. a partir de cortes de frango congelados .....        | 52 |
| TABELA 4 | Incidência de contaminação por <i>Aeromonas</i> spp. nos diferentes cortes de frango resfriados produzidos industrialmente .....              | 55 |
| TABELA 5 | Incidência de contaminação por <i>Aeromonas</i> spp. nos diferentes cortes de frango congelados produzidos industrialmente .....              | 57 |
| TABELA 6 | Prevalência de espécies de <i>Aeromonas</i> spp. contaminantes para os diferentes cortes de frango resfriados produzidos industrialmente .... | 59 |
| TABELA 7 | Prevalência de espécies de <i>Aeromonas</i> spp. contaminantes para os diferentes cortes de frango congelados produzidos industrialmente ..   | 61 |
| TABELA 8 | Produção de $\beta$ -hemolisina por espécies de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de cortes de frango resfriados .....                           | 63 |
| TABELA 9 | Produção de $\beta$ -hemolisina por espécies de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de cortes de frango resfriados .....                           | 63 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS  |    |
| LISTA DE QUADROS  |    |
| LISTA DE TABELAS  |    |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 16 |
| <b>2.1. Objetivo geral</b> .....  | 16 |
| <b>2.2. Objetivos específicos</b> .....   | 16 |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 17 |
| <b>3.1. Industrialização, produção e consumo de carne de frango</b> .....   | 17 |
| <b>3.2. Contaminação microbiológica da carne de frango</b> .....  | 20 |
| <b>3.3. Características do gênero <i>Aeromonas</i></b> .....  | 22 |
| 3.3.1. Aspectos taxonômicos .....   | 24 |
| 3.3.2. Fatores que interferem no crescimento de <i>Aeromonas</i> spp. ....  | 27 |
| <b>3.4. Fatores de virulência</b> .....   | 28 |
| <b>3.5. Envolvimento de <i>Aeromonas</i> spp. em doenças extra e gastrointestinais</b> .....  | 31 |
| 3.5.1. Doenças extraintestinais .....   | 31 |
| 3.5.2. Doenças gastrointestinais .....  | 32 |
| <b>3.6. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp. em alimentos de origem animal</b> .....   | 34 |
| <b>3.7. Meios de cultura para o isolamento de <i>Aeromonas</i> spp.</b> .....   | 37 |
| <b>3.8. Meios cromogênicos</b> .....  | 39 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 41 |
| <b>4.1. Aquisição das amostras</b> .....  | 41 |
| <b>4.2. Análise das amostras</b> .....  | 42 |
| 4.2.1. Enriquecimento seletivo .....  | 42 |
| 4.2.2. Plaqueamento seletivo e isolamento das colônias suspeitas .....  | 42 |
| <b>4.3. Caracterização e identificação das cepas suspeitas de <i>Aeromonas</i> spp.</b> .....   | 43 |
| 4.3.1. Provas bioquímicas para caracterização do gênero e identificação das espécies .....  | 46 |
| <b>4.4. Verificação da atividade hemolítica (produção de <math>\beta</math>-hemolisina) das espécies de <i>Aeromonas</i> spp. identificadas</b> ..... | 50 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>5.1. Avaliação dos meios de cultura utilizados para o isolamento de <i>Aeromonas</i> spp. ....</b>  | <b>51</b> |
| <b>5.2. Perfil de contaminação das amostras de frango com <i>Aeromonas</i> spp. ....</b>   | <b>54</b> |
| <b>5.3. Avaliação da atividade hemolítica (produção de <math>\beta</math>-hemolisina) das cepas identificadas nos cortes de frango resfriados e congelados .....</b> | <b>62</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>66</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A carne de frango é definida como a parte muscular comestível e declarada apta à alimentação humana por inspeção veterinária oficial antes e depois do abate (BRASIL, 1998). Os consumidores brasileiros têm maior preferência pela carne de frango dentre as carnes brancas produzidas industrialmente. No mercado consumidor interno, o brasileiro tem mudado o hábito de consumo de carnes, passando de um país consumidor preponderadamente de carne bovina para consumidor da carne de frango, como são relatados em dados recentes. A grande aceitação deste tipo de carne como fonte protéica se deve à qualidade e aos preços acessíveis, tendo assim uma importância econômica e social.

A produção da carne de frango tem destaque no mercado alimentício global, o qual está se tornando cada vez mais exigente. No Brasil, a produção está concentrada nas regiões Sul e Sudeste, no entanto, o Ceará tem aumentado sua participação na produção desse tipo de carne. No mercado varejista, estão disponíveis para o consumidor, na forma refrigerada ou congelada, carcaças inteiras e vários tipos de cortes. A disponibilidade da carne de frango já cortado tem destaque e grande receptividade pelos consumidores, devido a seu fácil manuseio e maior rapidez no preparo.

A carne de frango, assim como muitos alimentos, pode atuar como importante veículo de micro-organismos responsáveis por doenças no homem. Esses podem chegar à carne de frango ainda durante o manejo das aves vivas, pela ausência de procedimentos adequados nas etapas de produção, comercialização e até mesmo na fase de preparo do produto final, na residência do consumidor.

As doenças transmitidas por alimentos representam uma contínua ameaça para todos os seguimentos da sociedade, independente de idade, sexo, estilo de vida, etnia e nível sócio econômico (CDC, 2008). Todas as pessoas correm riscos de adquirir doenças de origem alimentar, sendo crianças, idosos e imunodeprimidos os mais suscetíveis.

Nos últimos anos, a análise de riscos biológicos em alimentos tem se ocupado com novos tipos de perigos, dentre eles, os patógenos emergentes. As bactérias definidas como emergentes são aquelas que, por alguma razão metodológica, não podiam ser identificadas ou que, simplesmente, não eram investigadas por desconhecimento de sua presença nas amostras biológicas (PORRAZ, 2003).

A este grupo de patógenos emergentes pertencem bactérias do gênero *Aeromonas*, consideradas de grande importância, visto que é possível isolá-las de lugares

onde não se suspeitava que pudessem ser encontradas. São bactérias que chamam a atenção por sua capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, o que leva a uma preocupação, visto que é crescente o uso de alimentos refrigerados (ADAMS; MOSS, 1995).

O gênero *Aeromonas* inclui importantes espécies móveis patogênicas ao homem, dentre elas, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. eucrenophila*, *A. jandaei* e *A. schubertii*, que têm sido associadas à gastroenterites e graves infecções extraintestinais (ADAMS; MOSS, 1995; PORRAZ, 2003). Têm sido isoladas de uma ampla variedade de amostras ambientais (diferentes fontes de água e moluscos bivalves), clínicas (sangue, fezes humanas) e de alimentos, incluindo vegetais, carne bovina, aves, peixes, camarões, etc. (GALBIS *et al.*, 2002; NEYTS *et al.*, 2000).

No que se refere à contaminação da carne de frango por *Aeromonas* spp., estudos têm demonstrado a sua presença e evidenciado seu potencial risco como veiculador de patologias ao homem (SARIMEHMETOGLU; KUPLULU, 2001).

A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Anvisa preconiza os padrões microbiológicos para alimentos no Brasil, especificando para carnes de aves *in natura* (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes), resfriadas ou congeladas somente a análise de coliformes termotolerantes (BRASIL, 2001). A investigação de *Aeromonas* spp. não é um parâmetro de qualidade microbiológica exigido pela legislação brasileira; no entanto, estudos têm demonstrado espécies patogênicas relacionadas a alimentos, evidenciando o perigo desse microrganismo para a saúde pública.

No Brasil, são escassas as publicações sobre a ocorrência de espécies de *Aeromonas* em cortes de frango resfriados, não tendo sido evidenciadas, até o presente, pesquisas sobre a incidência de *Aeromonas* spp. em cortes de frango congelados. Fazem-se então necessárias a investigação e a identificação desse grupo de bactérias potencialmente patogênicas, para que se possam ter dados referentes à sua incidência em cortes de frango, o que pode servir de alerta a órgãos de saúde pública.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Investigar a presença de *Aeromonas* spp. em cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente.

### 2.2. Objetivos Específicos

Comparar a eficiência dos meios de cultura ágar amido ampicilina (SA) e cromocin AGN no isolamento de *Aeromonas* spp.

Identificar espécies móveis de *Aeromonas* spp., potencialmente patogênicas ao homem, em diferentes tipos de cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente.

Caracterizar e identificar, por meio de testes bioquímicos, espécies de *Aeromonas* spp. presentes nas amostras de cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente.

Avaliar a atividade hemolítica (produção de  $\beta$ -hemolisina) de cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas* identificadas, a partir de cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Industrialização, produção e consumo da carne de frango

A indústria avícola comercial surgiu no início de 1940 em várias partes do mundo. Os avanços tecnológicos resultantes de pesquisas científicas permitiram a expansão industrial. De 1940 a 1960, houve um rápido melhoramento na eficiência de produção do frango de corte, passando o consumidor a optar pelo consumo de frango de corte em substituição a outros tipos de alimentos com custo de produção elevado (MORENG; AVENS, 1990).

O início da avicultura industrial no Brasil ocorreu entre 1960 e 1970. Em meados 1970, estavam disponíveis no mercado frangos inteiro e cortes de frango. Com o passar dos anos, os cortes de frango passaram a apresentar uma maior quantidade de tipos de cortes especiais e melhores em termos de qualidade (OLIVO, 2005).

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango (12,6 %), perdendo apenas para os Estados Unidos (22,9 %) e a China (13,9 %). Em relação à avicultura brasileira, os maiores produtores estão concentrados nas regiões Sul e Sudeste do país (OLIVO, 2005).

O consumo de carne de frango como fonte protéica tem aumentado ao longo dos anos. De acordo com o relatório da União Brasileira de Avicultura (UBA), o consumo *per capita* de carne de frango alcançou o consumo de carne bovina no ano 2006 no Brasil (UBA, 2008).

A produção brasileira de carne de frango destinada ao mercado interno foi de 6.622.587 toneladas no ano de 2006, sendo o consumo *per capita* de 35,68 Kg/habitante (ABEF, 2008). No Nordeste, o Ceará ocupa a segunda posição como produtor de carne de frango. A produção registrada no ano de 2006, no estado do Ceará, foi de 580.700 toneladas (matrizes de corte) e o consumo per capita de 36,97 Kg/habitante (ACEAV, 2008).

O consumidor cada vez mais exige qualidade e segurança na aquisição da carne de frango no momento da compra. As exigências se devem às mudanças de hábito, tais como aumento da procura por cortes e carnes já desossadas, crescimento do consumo de produtos diferenciados de preparo rápido, bem como às mudanças sociais, como a participação da mulher no mercado de trabalho (AZEVEDO *et al.*, 2006).

O frigorífico na cadeia produtiva de frangos é uma unidade industrial de grande importância onde serão originados vários tipos de produtos: o frango resfriado, congelado, inteiro e em cortes/pedaços, miúdos, dentre outros. Durante as etapas de processamento dos

cortes, há manipulação e contato com a água, fontes que podem promover contaminação microbiana, sendo então fundamental o cumprimento das normas higiênico-sanitárias (Bueno *et al.*, 2006). Portanto, um aviário industrial especializado na criação de frangos de corte deve ter a higiene e a profilaxia como partes integrantes do manejo, a fim de garantir o adequado estado sanitário das aves, bem como a produtividade (INCEA, 1991).

O processo de obtenção de cortes de frango deve estar de acordo com as normas técnicas de inspeção tecnológica e higiênico-sanitária para carne de aves. Os cortes de frango são definidos como a parte ou fração da carcaça, com limites previamente especificados pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), com osso ou sem osso, com pele ou sem pele, temperados ou não, sem mutilações e/ou dilacerações. Esses podem ser mantidos sob temperaturas de resfriamento e congelamento. O esquema representativo dos tipos de cortes obtidos na indústria avícola é apresentado na Figura 1 (BRASIL, 1998).

De acordo com a Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998, resfriamento é o processo de refrigeração e manutenção da temperatura entre 0 °C a 4 °C dos produtos de aves (carcaças, cortes ou recortes, miúdos e/ou derivados), com tolerância de 1°C medido na intimidade dos mesmos. Congelamento é o processo de refrigeração e manutenção a uma temperatura não maior que -12 °C, tolerando-se uma variação de até 2°C medidos na intimidade dos mesmos.

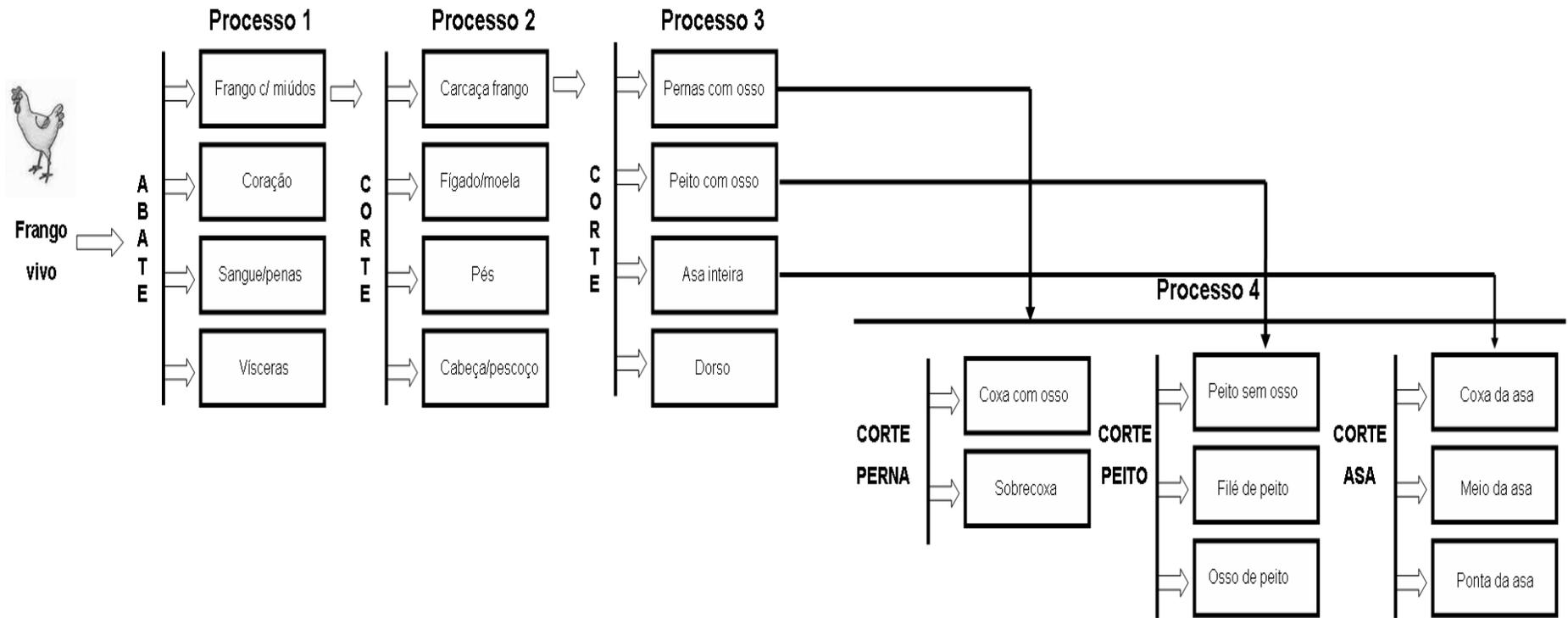


Figura 1 - Esquema representativo dos tipos de cortes de frango produzidos em uma indústria avícola

### 3.2. Contaminação microbiológica da carne de frango

A carne apresenta propriedades nutricionais favoráveis para o desenvolvimento microbiano, por sua composição incluir 75% de água e a presença de muitos metabólitos como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e açúcares (LAWRIE, 2005).

O alto teor de nutrientes, a elevada atividade de água e o pH próximo à neutralidade podem favorecer o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes, originários do próprio animal (microbiota natural) ou de fontes externas presentes na água e no solo, que podem vir a contaminar a carne de frango.

A qualidade microbiológica da carne de frango pode ser determinada pela condição sanitária das aves antes do abate, pela contaminação durante o processamento, pelas condições de estocagem, pela distribuição e comercialização do produto, sendo que a maior taxa de contaminação ocorre nas primeiras operações do abate e no tanque de escaldagem (UPTON, 1995; ALMEIDA; SILVA, 1992). Desse modo, o controle da matéria prima, da sanidade animal e das condições ambientais no processo assumem papel relevante e incontestável na qualidade do processo de obtenção das carcaças abatidas (DELAZARI, 1992).

As aves chegam ao abatedouro com bactérias firmemente aderidas ou incrustadas na pele. Essas bactérias se encontram essencialmente na superfície externa, no espaço interdigital, nos tegumentos cutâneos, no trato digestivo e, em menor grau, no aparelho respiratório, não podendo ser removidas apenas pela lavagem. Nas operações de abate, depenação é uma das operações que podem contribuir fortemente para a contaminação das carcaças de frango (DIKSON; ANDERSON, 1992; SILVA, 1998).

A contaminação por bactérias deterioradoras tem como fonte primária o conteúdo intestinal. Na indústria avícola é relevante ressaltar que é elevada a possibilidade de contaminação das carcaças de frango pelo conteúdo gastrintestinal no momento da evisceração (FRANCO; LANDGRAF, 2005; HÄNNINEN; SIITONEN, 1995).

A microbiota inicial da carne é muito variada. A maioria dos micro-organismos que alteram a carne fresca refrigerada são bactérias psicrotóficas dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, estando também presentes espécies anaeróbias facultativas como enterobactérias psicrotóficas, *Aeromonas* spp., *Shewanella putrefacins* e micro-organismos Gram positivos como *Lactobacillus* sp. e *Brochothrix thermosphacta* (SILVA, 1998).

A contaminação da carne de frango tem sido relatada em diferentes estudos. Hoffmann *et al.* (2002) avaliaram a qualidade microbiológica de carcaças e carnes de frango

mecanicamente separadas e observaram que 57,1% das amostras estavam contaminadas por bactérias patogênicas como *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, e *Listeria monocytogenes*. Em outro estudo, Cardoso *et al.* (2005) constataram a presença de coliformes fecais em 20,7 % (6/29) das amostras de carcaças de frango provenientes de um abatedouro avícola localizado no Estado de São Paulo. Essas carcaças foram classificadas como insatisfatórias ou impróprias para o consumo, com base nos padrões microbiológicos estabelecidos na legislação vigente (BRASIL, 2001).

Rodrigues *et al.* (2008) avaliaram o nível de contaminação microbiológica superficial em carcaças de frango nas seguintes fases de abate: antes do primeiro chuveiro de higienização, após o primeiro chuveiro, após a evisceração manual, após o chuveiro de lavagem final e na saída do pré-resfriamento. Os resultados observados indicaram que a fase de pré-resfriamento foi considerada um importante ponto crítico de controle, uma vez que foi capaz de reduzir a contaminação microbiológica de forma significativa para todos os micro-organismos, quando comparados os resultados aos das demais fases. A redução significativa foi devido ao efeito do processo de pré-resfriamento, que inclui imersão em água clorada (3 a 4mg/L de cloro residual livre) e refrigerada.

A legislação brasileira vigente estabelece limites apenas para coliformes termotolerantes para carnes de aves *in natura* resfriadas ou congeladas (carcaças inteiras ou fracionadas) (BRASIL, 2001). No entanto, esses produtos também podem apresentar contaminação por micro-organismos patogênicos. Costa e Rossi Júnior (2002) verificaram a contaminação da carne de frango por bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, em diferentes pontos da linha de processamento, em um abatedouro industrial. A presença de *Aeromonas* foi constatada em 36,0 % (9/25) das penas das aves, em 56,0 % (14/25) das fezes, em 72,0 % (18/25) das carcaças não evisceradas, em 72,0 % (18/25) das carcaças evisceradas, em 80,0 % (20/25) da água do pré-resfriamento e em 72,0 % (18/25) das carcaças resfriadas. Os resultados demonstram que, mesmo com o controle higiênico sanitário adotado no abatedouro industrial, as carcaças de frango podem contaminar-se com bactérias desse gênero e que as penas e as fezes podem desempenhar papel significativo na disseminação do agente, inclusive nas carcaças resfriadas.

### 3.3. Características do gênero *Aeromonas*

Os representantes do gênero *Aeromonas* têm este nome oriundo do grego (aer-aire = ar ou gás e monas = unidade), significando unidade produtora de gás. São bastonetes geralmente móveis por um flagelo polar, Gram negativos, oxidase e catalase positivos, não formadores de esporos, produtores de exoenzimas (amilase, DNase, lipase, etc.) e resistentes ao agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridine (O/129) nas concentrações de 10 e 150  $\mu\text{g/L}$ . Produzem ácidos a partir da fermentação de diversos açúcares (arabinose, maltose, sacarose, manitol) e algumas vezes de gases (CAHILL; MACRAE, 1992; HOLT *et al.*, 1994; ICMSF, 1996; JOSEPH; CARNAHAN, 1994).

As bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* possuem uma morfologia celular distinta, tendo considerável variação na forma e tamanho das células. Apresentam-se na forma de bacilos curtos, formatos cocóides até formas finas e filamentosas. Em geral, as células são retas com extremidades arredondadas, apresentando-se isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (Figura 2) (ICMSF, 1996; VARNAN; EVANS, 1991).

O comprimento das bactérias varia de 1,0 a 3,5  $\mu\text{m}$ , tendo de 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura. Seu flagelo polar tem em média 1,7  $\mu\text{m}$  (Figura 3). As espécies *A. salmonicida* e *A. media* são imóveis e algumas espécies podem perder o flagelo esporadicamente (HOLT *et al.*, 1994).



Figura 2 - Características morfológicas de *Aeromonas* spp. (Coloração Gram)  
Fonte: MORRETTI, 2007

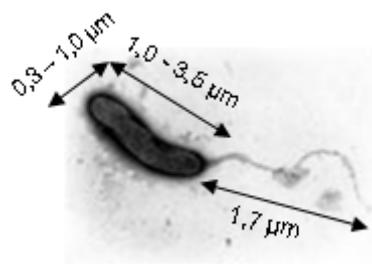


Figura 3 - Dimensões de *Aeromonas* spp.  
Fonte: FIOCRUZ, 2008

As bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* são ubíquas na água doce e salobra, podendo ser também encontradas em água de esgotos e no solo. (MURRAY *et al.*, 2004; VIEIRA, 2003).

Bactérias desse gênero também têm sido isoladas a partir de diversas fontes de águas potáveis (cloradas) e águas minerais engarrafadas destinadas ao consumo humano (PAVLOV *et al.*, 2003; VILLARI *et al.*, 2003). GAVRIEL, LANDRE e LAMB (1998).

Avaliaram-se 31 sistemas de distribuição de água e demonstrou-se a capacidade de sobrevivência de *Aeromonas* em reservatórios de água com níveis de cloro de 0,45 mg/L.

Conforme Vieira (2003), a água, habitat do gênero *Aeromonas*, contribui como uma via de acesso para a contaminação dos alimentos. Sabe-se que a cloração de águas e outros desinfetantes tem sido eficaz no controle da contaminação por *Aeromonas*, bem como de outras bactérias Gram negativas, apesar de também terem sido reportados alguns casos de recuperação em águas cloradas.

Quanto à atmosfera de crescimento, desenvolvem-se bem em anaerobiose e aerobiose, sendo, portanto, micro-organismos anaeróbicos facultativos. *Aeromonas* spp. desenvolvem-se pouco em atmosferas modificadas, dependendo da microbiota natural e do número de micro-organismos competidores (KIROV, 2001).

*Aeromonas* são comumente recuperadas de culturas de fezes, de misturas de culturas de feridas, de abscessos, do trato respiratório, de injúrias traumáticas, de infecções pós-operatórias e após a exposição a fontes ambientais contaminadas por essas bactérias. São isoladas também de culturas de sangue e de outros fluídos corporais, tais como a bile, fluido peritoneal e efluentes de diálises (KUHN *et al.*, 1997).

As infecções provocadas por estas bactérias se devem à ingestão de água e alimentos contaminados. Pessoas imunodeprimidas são suscetíveis a doenças sistêmicas oportunistas. Em pessoas saudáveis, *Aeromonas* pode provocar diarreia e infecções de feridas (MURRAY *et al.*, 2004).

O armazenamento dos alimentos à temperatura de refrigeração (4 °C) não é um método seguro de inibição do crescimento de bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, devido a sua característica psicrófila (KIROV, 1993). Conforme Franco e Landgraf (2005), algumas espécies do gênero *Aeromonas* têm capacidade de sobreviver e multiplicar-se em uma variedade de produtos alimentícios quando armazenados entre -2 e -10 °C. Desse modo, é necessário o uso de outros métodos de preservação tais como processamento térmico (pasteurização) e controle da contaminação cruzada, a fim de impedir a transmissão dessa bactéria pelos alimentos (KIROV, 2001).

O calor e a irradiação são métodos bastante efetivos na destruição de *Aeromonas*. Essas bactérias são mais sensíveis ao calor do que *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium* (NISHIKAMA; OGASAWARA; KIMURA, 1993).

### 3.3.1. Aspectos taxonômicos

*Aeromonas* spp. foi isolada pela primeira vez em água potável por Zimmerman em 1890 e, no ano seguinte, foi isolada em sangue de rã por Sanarelli. Os microbiologistas a classificaram como *Bacillus punctata* e *Bacillus hydrophilus*, respectivamente. Somente na década de 30 foi descrito pela primeira vez o gênero *Aeromonas*, criado para agrupar as bactérias de forma bacilar que possuíam propriedades semelhantes às *Enterobacteriaceae*, mas que apresentavam motilidade devido a um único flagelo polar. Concluiu-se então que as primeiras bactérias isoladas eram *Aeromonas* spp. (ADAMS; MOSS, 1995; ICMSF, 1996).

O gênero *Aeromonas*, juntamente com *Vibrio* e *Plesiomonas*, forma o segundo principal grupo de bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores. Anteriormente eram classificados na família *Vibrionaceae* (POPOFF, 1984), devido a semelhanças nas propriedades fisiológicas: terem como habitat natural a água e a capacidade de produzir doença gastrointestinal no homem (MURRAY *et al.*, 2004).

Ao longo dos anos, o gênero *Aeromonas* tem sofrido muitas mudanças taxonômicas. Estudos incluindo a hibridização rRNA-DNA, análises sequenciais 5S rRNA, catalogação de 16 rRNA e as diferenças imunológicas propuseram sua inclusão em uma nova família, pois existem distinções com espécies pertencentes à família *Vibrionaceae*. Assim, foi proposta a adoção de uma nova família separada, de acordo com evidências moleculares e genéticas, a família *Aeromonadaceae* (ALTWEGG; LÜTHY-HOTTENSTEIN, 1991; KÄMPFER; ALTWEGG, 1992; MARTINEZ-MURCIA; BENLLOCH; COLLINS, 1992).

A taxonomia do gênero é complexa e tem sofrido constantes alterações, sendo que o número de espécies reconhecidas tem aumentado. O gênero *Aeromonas* era anteriormente dividido, de acordo com a 7ª edição do Manual Bergey's (POPOFF, 1984), em dois subgrupos e classificado dentro da família *Vibrionaceae*. As espécies móveis incluíam *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* e as imóveis, *A. salmonicida*, subespécies *salmonicida*, *achromogenes* e *masoucida*. No entanto, novos estudos evidenciaram a existência de formas atípicas e viu-se então a necessidade de uma nova classificação das espécies (JOSEPH; JANDA; CARNAHAN, 1988). Então foi proposta a classificação do gênero em cinco espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. media* (JANDA; DUFFLEY, 1988). JOSEPH *et al.* (1991), porém consideraram quatro espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, agrupando *A. sobria* e acrescentando a espécie *A. jandaei*. Subsequentemente, novas espécies foram descobertas e incluídas no gênero *Aeromonas* ao longo dos últimos anos.

Segundo Galbis *et al.* (2002) haviam sido definidos para o gênero *Aeromonas* dezessete grupos de hibridização a partir de estudos DNA-DNA: *A. hydrophila* HG1, *A. hydrophila-like* HG2, *A. salmonicida* HG3, *A. caviae* HG4, *A. media* HG5, *A. eucrenophila* HG6, *A. sobria* HG7, *A. veronii* biovar *sobria* HG8, *A. jandaei* HG9, *A. veronii* biovar *veronii* HG10, unnamed (*Aeromonas sp.*) HG11, *A. schubertii* HG12, unnamed HG13, (grupo entérico 501), *A. trota* HG14, *A. allosaccharophila* HG15, *A. encheleia* HG16 e *A. popoffii*. (Tabela 1).

Na atualidade, de acordo com o Taxonomic outline of the prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, o gênero *Aeromonas* encontra-se classificado na ordem *Aeromonadales*, família *Aeromonadaceae* e inclui dezesseis espécies e onze subespécies: *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. culicicola*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. eucrenophila*, *A. ichthiosmia*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. schubertii*, *A. sobria*, *A. simiae*, *A. trota*, *A. veronii*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *ranae*, *A. punctata* subsp. *punctata*, *A. punctata* subsp. *caviae*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, *A. salmonicida* subsp. *smithia*, (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004).

Dentre estas espécies algumas estão mais frequentemente relacionadas a doenças humanas, tais como *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. eucrenophila.*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, (DAVIES *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Grupos de hibridização, genoespécies e fenoespécies do gênero *Aeromonas*  
**Grupo de hibridização DNA**

| <b>(HG)</b> | <b>Genoespécies</b>                  | <b>Fenoespécies</b>                                 |
|-------------|--------------------------------------|---|
| 1           | <i>A. hydrophila</i>                 | <i>A. hydrophila</i>                                |
| 2           | <i>A. bestiarium</i>                 | <i>A. hydrophila-like</i>                           |
| 3           | <i>A. salmonicida</i>                | <i>A. salmonicida</i> subsp.<br><i>salmonicida</i>  |
| 3           | <i>A. salmonicida</i>                | <i>A. salmonicida</i> subsp.<br><i>achromogenes</i> |
| 3           | <i>A. salmonicida</i>                | <i>A. salmonicida</i> subsp.<br><i>masoucida</i>    |
| 3           | <i>A. salmonicida</i>                | <i>A. salmonicida</i> subsp.<br><i>smithia</i>      |
| 3           | <i>Unnamed</i>                       | <i>A. hydrophila-like</i>                           |
| 4           | <i>A. caviae</i>                     | <i>A. caviae</i>                                    |
| 5A          | <i>A. media</i>                      | <i>A. caviae-like</i>                               |
| 5B          | <i>A. media</i>                      | <i>A. media</i>                                     |
| 6           | <i>A. eucrenophila</i>               | <i>A. eucrenophila</i>                              |
| 7           | <i>A. sobria</i>                     | <i>A. sobria</i>                                    |
| 8x          | <i>A. veronii</i>                    | <i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>              |
| 8y          | <i>A. veronii</i>                    | <i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>              |
| 9           | <i>A. jandaei</i>                    | <i>A. jandaei</i>                                   |
| 10          | <i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> | <i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>             |
| 11          | <i>Unnamed</i>                       | <i>Aeromonas</i> sp. (ornitina<br>positivo)         |
| 12          | <i>A. chubertii</i>                  | <i>A. chubertii</i>                                 |
| 13          | <i>Aeromonas</i> Grupo 501           | <i>A. chubertii-like</i>                            |
| 14          | <i>A. trota</i>                      | <i>A. trota</i>                                     |
| 15          | <i>A. Allosaccharophila</i>          | <i>A. Allosaccharophila</i>                         |
| 16          | <i>A. encheleia</i>                  | <i>A. encheleia</i>                                 |
| 17          | <i>A. popoffii</i>                   | <i>A. popoffii</i>                                  |

Fonte: adaptado de KIROV, 2001.

### 3.3.2. Fatores que interferem no crescimento de *Aeromonas* spp.

O gênero *Aeromonas* inclui espécies capazes de crescer em temperaturas que variam de 0°C a 45°C. Algumas linhagens de *Aeromonas* apresentam crescimento em temperaturas entre 0°C a 5°C, enquanto outras crescem em temperaturas mais elevadas, entre 40 a 45 °C (JAY, 2005). Espécies deste gênero estão presentes naturalmente em diversos alimentos e são capazes de se multiplicar em um período de 7 a 10 dias, quando estes estão estocados a 5° C. Cepas isoladas de espécimes clínicos são capazes de crescer a temperatura de refrigeração, sendo também observada a capacidade de produção de enterotoxinas e hemolisinas dada essa temperatura. As espécies móveis de *Aeromonas* estão relacionadas a patologias no homem e crescem em temperaturas que variam de 10°C a 42°C, com ótimo de crescimento a 28°C (KIROV, 2001; MARTINS; MARQUEZ, YANO, 2002).

*Aeromonas* spp. apresentam crescimento em valores de pH entre 5,5 a 9,0, sendo sensíveis a pH inferior a 5,5. Não toleram concentração salina superiores a 5 % de NaCl. A tolerância ao pH e concentração salina varia com a temperatura de crescimento. Alimentos estocados a baixas temperaturas com concentração de 3 a 3,5% de NaCl e valores de pH inferior a 6,0 inibem o seu o crescimento. Para a temperatura de crescimento a 28°C, as bactérias crescem na concentração salina de 4% de NaCl, sendo esta tolerância diminuída quando a temperatura é de 5°C (ADAMS; MOSS, 1995; FRANCO; LANDGRAF, 2005; KIROV, 2001).

Os ácidos acético, tartárico, lático, sulfúrico e hidrocloreídrico são efetivos para restringir o crescimento de *Aeromonas*. Os polifosfatos também podem controlar seu desenvolvimento em certos alimentos (KIROV, 2001). A utilização de polifosfatos em combinação com outros fatores que restringem o desenvolvimento de *Aeromonas* spp., tais como pH abaixo de 5,0 e concentração de NaCl acima de 3,5 %, tem uma maior eficiência (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

De uma maneira geral, *Aeromonas* spp. isoladas de amostras clínicas, ambientais e alimentos são sensíveis aos seguintes agentes antimicrobianos: cloranfenicol, colistina, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim. Porém resistentes a ampicilina, carbenicilina, cefazolim, cefalotim e ticarcilina (MURRAY *et al.*, 2004).

Vivekanandhan *et al.*, (2002) avaliaram cepas de *A. hydrophila* isoladas de 536 amostras de peixes e 278 de camarões produzidos no Sul da Índia, por um período de dois anos e constataram um alto percentual de resistência aos antibióticos meticilina, rifampicina, bacitracina e novobiocina.

### 3.4. Fatores de virulência

Os fatores de virulência conhecidos para *Aeromonas* spp. são resultados de pesquisas com isolados de pacientes com doenças gastroentéricas, sendo escasso o conhecimento dos fatores que podem ser significantes em doenças extraintestinais. Porém, sabe-se que alguns determinantes de virulência são comuns para ambas as formas de infecção (KIROV, 2001).

De uma maneira geral, pacientes com doença gastrointestinal apresentam um quadro clínico de diarreia aquosa e febre moderada, sendo que em alguns casos podem ocorrer muco e sangue nas fezes (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O gênero *Aeromonas* inclui espécies comumente capazes de produzir inúmeros fatores de virulência, os quais têm importante papel no desenvolvimento de doenças tanto em seres humanos quanto em animais. Dentre os fatores conhecidos, destacam-se as enzimas extracelulares, as exotoxinas, endotoxinas (lipopolissacarídica), sideróforos, hemolisinas, camada-S, invasinas e adesinas (CHOPRA; HOUSTON,1999; GRANUM *et al.*, 1998; TROWER *et al.*, 2000).

Dentre as várias enzimas extracelulares produzidas por *Aeromonas*, destacam-se as proteases, as DNases, as lipases, as elastases, as amilases, as lecitinases e as gelatinases. Ainda não foram determinadas sua função nos mecanismos de virulência, mas sabe-se que as proteases podem contribuir para a patogenicidade, causando danos diretos aos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão. Já as lipases, representadas pela glicerofosfolipídeo-colesterol-aciltransferase (CGAT), têm a propriedade de provocar a lise da membrana celular e de eritrócitos (KIROV, 2001; MERINO *et al.*, 1995).

Scoglio *et al.* (2001) verificaram a produção de enzimas extracelulares por 7 cepas de *A. hydrophila* e 11 de *A. caviae* isoladas de amostras de frutos do mar e detectaram que 100% das cepas eram produtoras de lipase, enquanto que a produção de DNase e caseinase foi observada somente para as cepas de *A. hydrophila* (100 %).

Quanto à produção de enterotoxinas, *Aeromonas* spp. produzem dois tipos: citotônicas e citotóxicas. As enterotoxinas citotônicas têm peso molecular de aproximadamente 15kDa e estudos demonstraram sua capacidade de provocar arredondamento das células da adrenal de camundongos sem provocar a lise, são inativadas quando aquecidas a 60 °C por 20 minutos e estáveis se o aquecimento for a 56°C por 10 min. Já as enterotoxinas citotóxicas causam o engurgitamento das células e a morte do tecido celular e podem estar associadas à atividade hemolítica assim com a toxina colérica. Em

temperaturas de 4 °C, podem ser produzidas por algumas cepas de *Aeromonas* (ELEY; GEARY; WILCOX, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 2005). A maioria das cepas *Aeromonas* produzem aerolisina, uma enterotoxina termolábil,  $\beta$ -hemolítica e citotóxica com peso molecular de 52kDa (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2005).

Rall *et al.* (1998) isolaram as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* de 50 amostras de peixes Pintado comercializadas em supermercados do estado de São Paulo e verificaram que 88 % das cepas de *A. hydrophila*, 27 % *A. sobria* e 13 % de *A. caviae* produziram enterotoxinas *in vitro*.

As endotoxinas (lipopolissacarídica), um importante componente estrutural de muitas bactérias Gram negativas, podem ter um papel direto ou indireto na patogenicidade de *Aeromonas* spp. (KIROV, 2001). O antígeno lipopolissacarídico (LPS) age na adesão bacteriana nas células da mucosa intestinal (ISONHOOD; DRAKE, 2002). Khashe *et al.* (1996), caracterizando cepas de *A. hydrophila* de diferentes origens, concluíram que o O:34 é um importante sorogrupo de *Aeromonas*.

*Aeromonas* spp. produzem também sideróforos, compostos de baixo peso molecular com afinidade por várias formas de ferro, sendo considerados essenciais para a virulência durante a infecção. São produzidos dois tipos: a enterobactina, produzida por várias bactérias Gram negativas e a amonabactina, produzida somente por *Aeromonas* spp. Enterobactina é encontrada nas espécies *A. veronii* biovar *sobria* (HG8/10) e *A. jandaei* (HG9), enquanto a amonabactina é encontrada em *A. hydrophila* (HG1, HG2 e HG3), *A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5), *A. schubetii* (HG12) e *A. trota* (HG14) (KIROV, 2001).

Na produção de hemolisinas *Aeromonas* spp. estão incluídas duas classes: alfa e beta. Hemolisinas são proteínas citolíticas extracelulares que agem formando perfurações na membrana celular por sua inserção na camada bi-lipídica, destruindo a barreira de permeabilidade da membrana e dissolvendo as células vermelhas do sangue. A  $\beta$ -hemolisina é a mais caracterizada das hemolisinas bacterianas em termos de suas propriedades moleculares, são formadas na fase log de crescimento e tem peso molecular de 49 a 53 kDa. Causam lise completa dos eritrócitos e são inativadas a temperatura de 56 °C por 5 minutos. A alfa-hemolisina é formada durante a fase estacionária de crescimento, tem peso molecular de 65 kDa e causa lise incompleta dos eritrócitos (KIROV, 2001; KUHN *et al.*, 1997).

Gibotti *et al.* (2000) isolaram *Aeromonas* spp. no rio Cambé (Paraná) e verificaram que 45 % das cepas apresentaram atividade hemolítica, indicando seu potencial de causar patologia para homem e animais.

Rodríguez *et al.* (2007) determinaram alguns fatores de virulência (DNase, gelatinase, elastase, lecitinase e hemolisina) em 44 cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de sangue de pacientes com bacteremia e constataram que todas as cepas (100 %) apresentavam pelo menos um dos fatores investigados.

A camada-S, macromoléculas organizadas como subunidades protéicas (45 a 58 kDa), é ligada à parede celular bacteriana. *A. salmonicida* produz a camada-S, que é conhecida como camada-A. É útil como reservatório de água e nutrientes, aumenta a aderência a superfícies através da formação de biofilmes e do poder infectante, aumenta a capacidade invasiva das bactérias patogênicas que escapam mais facilmente à ação dos fagócitos e aumenta a resistência microbiana a biocidas (SCHIAVANO *et al.*, 1998).

Ainda não é conhecida com exatidão a função da camada-S em *Aeromonas* mesófilas, porém sabe-se que tem atividade antifagocitária que facilita a disseminação sistêmica após a invasão. Em infecções extraintestinais (ferimento e peritonite) já foram identificadas as espécies *A. hydrophila* (HG1) e *A. veronii* biovar *sobria* (HG8/10), produtoras destas macromoléculas (KIROV, 2001).

As adesinas são componentes da superfície microbiana que se fixam a receptores celulares do hospedeiro. As adesinas mais estudadas e conhecidas são as fímbrias, estruturas cilíndricas, longas e flexíveis ou curtas e rígidas. A fixação das adesinas aos receptores celulares depende de afinidade estrutural entre ambos. Alguns micro-organismos fixam-se a receptores da orofaringe, outros à mucosa intestinal, dependendo da especificidade das adesinas microbianas e dos receptores das membranas celulares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As fímbrias possibilitam a adesão de *Aeromonas* spp. a diferentes tipos de células. Fímbrias pequenas e rígidas, que ocorrem em um grande número de bactérias, e as fímbrias longas e flexíveis, que ocorrem em um pequeno número de células bacterianas. Os dois tipos têm sido encontrados em diferentes cepas oriundas de isolados clínicos e ambientais (MERINO *et al.*, 1995).

Existem diferenças entre as espécies de *Aeromonas* no processo de adesão. Estudos com culturas de células e modelos animais demonstraram que *A. hydrophila* foi menos eficiente na adesão à célula hospedeira do que *A. veronii* biovar *sobria* e *A. caviae* (HO *et al.*, 1990).

No que diz respeito à produção de invasinas, que são proteínas também denominadas fatores de invasão, são responsáveis pela invasão de células epiteliais. A invasão

é um processo ativo, induzido pela própria bactéria patogênica. Outras substâncias com capacidade de invasão têm sido também designadas invasinas (TRABULSI *et al.*, 2004).

A habilidade invasiva de cepas de *Aeromonas* spp. têm sido constatada mais comumente em amostras de pacientes com disenteria. É sugerido para as invasinas um mecanismo de invasão tecidual, que ainda necessita de mais estudos (JANDA, 1991).

### 3.5. Envolvimento de *Aeromonas* spp. em doenças extra e gastrointestinais

#### 3.5.1. Doenças extraintestinais

Em seres humanos, o primeiro relato de infecção extraintestinal foi a miosite aguda causada por *Aeromonas*, no ano de 1954, em uma mulher da Jamaica e, alguns anos depois, vários outros relatos foram publicados (ADAMS; MOSS, 1995).

Apesar de ainda não ser conhecida a dose infecciosa por *Aeromonas* spp., o gênero inclui espécies que causam uma ampla variedade de infecções extraintestinais no homem, dentre as quais peritonites, endocardites, pneumonia, conjuntivites, infecções do trato urinário, síndrome urêmica hemolítica, septicemias, etc. A septicemia é a doença mais invasiva causada por espécies de *Aeromonas* spp. Embora originalmente descrita em indivíduos imunodeprimidos, essa doença foi detectada também em pessoas saudáveis e de todas as idades. Os acometidos pelas diversas doenças associadas à *Aeromonas* spp. são frequentemente imunodeprimidos (crianças e adolescentes), idosos e, particularmente, pacientes com septicemias e meningites (CORREDORIA *et al.*, 1994; ICMSF, 1996).

Espécies móveis de *Aeromonas* têm sido isoladas de amostras clínicas e relacionadas a diferentes doenças no homem. *A. veronii* bv. *sobria* (HG8/10) é mais frequentemente associada com bacteremias que as demais espécies (KIROV, 2001). No entanto, Ko e Chang (1995) avaliaram 59 casos de bacteremia provocados por *Aeromonas* spp. e notaram que a espécie *A. hydrophila* foi mais comum.

*Aeromonas schubertii* possui importância clínica relacionada ao seu isolamento a partir de infecção de feridas subsequentes à exposição à água, ao solo ou a alimentos contaminados, com incidência máxima nas estações quentes. Por sua vez, *A. veronii* foi descrita como produtora de bacteremia, infecções de feridas e diarreia. *A. jandaei* foi isolada como agente de infecção em quatro pacientes (PETERSEN; DALSGAARD, 2003).

Estudos de isolados clínicos (sangue) de pacientes com hepatite B crônica evidenciaram que *A. veronii* biovar *veronii* foi responsável por septicemias e colangite aguda (MENCACCI *et al.*, 2003).

### 3.5.1. Doenças gastrointestinais

*Aeromonas* spp. têm sido incriminadas como agentes causadores de doenças diarreicas desde os primeiros isolados de fezes humanas em 1961. O papel de *Aeromonas* spp. como um enteropatôgeno ainda tem evidências controversas. Para as fenoespécies conhecidas, quatro têm sido isoladas de fezes humanas com frequência significativa: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria* e *A. trota*. *A. jandaei*, *A. eucrenophila* e *A. schubertii* são isoladas de fezes raramente. A enteropatogenicidade é devida à presença de certos genes, por exemplo, genes para hemolisina em isolados obtidos de pacientes com diarreia (GRAEVENITZ, 2007).

De acordo com Kirov (1993), a principal fonte de infecção por *Aeromonas* spp. é a água, mesmo em águas cloradas. Na Austrália, estudos evidenciam que o aumento da sua incidência em águas tratadas coincide com o aumento de gastroenterites nos meses de verão.

No que se refere às infecções gastrointestinais, a primeira causada por *Aeromonas* spp. foi transmitida pela água. Estudos revelaram que o aumento da população de *Aeromonas* em bebidas contendo água, coincide com o aumento na incidência de doenças gastrintestinais (KIROV, 2001).

*A. hydrophila* (HG1 e HG3), *A. caviae* (HG4), *A. veronii* biovar *sobria* (HG8/10), *A. trota* (HG14) e *A. jandaei* (HG9) são espécies que têm sido associada a gastroenterites. Em diarreias pediátricas, *A. caviae* é a mais comumente encontrada (KIROV, 2001). *A. sobria* tem sido isolada de casos de diarreia aquosa apresentando uma toxina similar à cólera (ARAÚJO, 2001).

Os casos de gastroenterites associados com *Aeromonas* são mais frequentes em crianças menores de cinco anos de idade. Em geral é autolimitada e benigna, as diarreias são aquosas - em alguns casos têm muco ou sangue - acompanhadas de febre leves, sendo que vômitos podem ocorrer, em geral, em crianças menores de dois anos de idade. A infecção, normalmente, não se estende por mais de uma semana. Em adultos os fatores de riscos para uma predisposição se devem a terapias antimicrobianas, inibição ou neutralização da secreção

gástrica, doenças hepáticas, dentre outros. Casos de diarreia em viajantes também têm sido atribuídos a *Aeromonas* spp. (ADAMS E MOSS, 1995; KIROV, 2001).

As gastroenterites relacionadas com *Aeromonas* spp. podem ser devido a múltiplos fatores de virulência, bem como à combinação entre eles. Embora não tenha sido claramente demonstrado que *Aeromonas* spp. seja o responsável por gastroenterites, espécies têm sido isoladas e epidemiologicamente vinculadas para esta doença (ICMSF, 1996). De acordo com Rall (1998), o mecanismo de patogenicidade não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que as *Aeromonas* produzem enterotoxinas e enzimas, responsáveis pelo sintoma de diarreia.

Doenças diarreicas são enfermidades de destaque na mortalidade em países em desenvolvimento, estando principalmente envolvidos crianças e idosos. *Aeromonas* têm sido considerada, nos últimos anos, um relevante agente etiológico de doenças gastrointestinais. Em pesquisa com 408 isolados clínicos de pacientes com diarreia em dois diferentes hospitais no Rio Grande do Sul (Brasil), 27 % foram positivas para o gênero. As espécies isoladas foram *A. hydrophila* (51,8 %), *A. caviae* (40,8 %) e *A. veronii* biovar *sobria* (7,4 %). Na maioria das cepas, foram identificados vários fatores de virulência (atividade hemolítica, lipolítica, proteolítica e formação de biofilmes) (GUERRA *et al.*, 2007).

Reina *et al.* (1991), realizando estudos na Espanha, durante dois anos, sobre a etiologia de casos de diarreia de crianças lactantes, verificaram que 53,8 % dos casos eram devido à *Aeromonas* spp. Dessas, 68 % eram decorrentes de *Aeromonas caviae*.

Vila *et al.* (2003), pesquisando *Aeromonas* spp. como causa de diarreia dos viajantes, relataram que *A. caviae* e *A. sobria* estavam mais frequentemente associadas com essa enfermidade.

Na investigação de 2.323 amostras de swabs retais de neonatos hospitalizados no Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2006, com diarreia aguda, foram isoladas 56 cepas de *Aeromonas* spp. Identificaram-se as espécies *A. caviae* (42,8 %), *A. media* (25 %), *A. veronii* biovar *sobria* (10,7 %), *A. hydrophila* (9 %), *A. veronii* biovar *veronii* (5,3 %), *A. sobria* (1,8%), *A. jandaei* (1,8 %) e *A. schubertii* (1,8 %). A presença de *Aeromonas* spp. Evidência as implicações clínico-epidemiológicas, bem como a dimensão desses patógenos para a saúde pública (PEREIRA *et al.*, 2008).

Em 582 coproculturas de um surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una (Pernambuco), no ano de 2004, foi constatada em 25 % das amostras a presença de *Aeromonas* spp. (HOFER *et al.*, 2006).

Martins, Márquez e Yano (2002) relataram um maior percentual de produção de toxinas por cepas de *Aeromonas* isoladas em amostras clínicas do que as de amostras de alimentos. Das 194 cepas (94 de alimentos e 95 de amostras clínicas), 29,4% eram enterotoxigênicas, 43,1% eram hemolíticas e 89% eram citotoxigênicas para os isolados clínicos. Para as amostras de alimentos, 18,2% foram enterotoxigênicas, 17,1% hemolítica e 72,7% citotoxigênicas.

### **3.6. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal**

A contaminação por *Aeromonas* spp. tem sido relatada em diversos tipos de alimentos de origem animal, incluindo peixes, frutos do mar, carnes vermelhas e aves (ADMS; MOSS, 1995).

Apesar do aumento do número de patologias provocadas por bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, poucos relatos de surtos foram publicados e ainda pouco se sabe sobre o impacto de *Aeromonas* spp. patogênicas em doenças relacionadas com alimentos. Estas bactérias têm como habitat ambientes aquáticos, sendo encontradas, na maioria das vezes, em alimentos como peixes e frutos do mar (MATTÉ, 2004).

A habilidade de algumas cepas de *Aeromonas* spp. crescerem em baixas temperaturas pode levar ao desenvolvimento de um elevado número de bactérias sob condições de refrigeração, tornando-as uma parte importante da microbiota deteriorante de alimentos refrigerados (TSAI; CHEN, 1996). O número de bactérias pode aumentar de 10-1000 vezes em amostras de carnes e pescado durante uma semana de armazenamento sob refrigeração (ICMSF, 1996).

O consumo de alimentos marinhos contaminados por espécies de *Aeromonas* tem sido associado a casos de septicemias (CHAN et al., 2000). Em Taiwan, espécies de *Aeromonas* móveis foram detectadas em 88% dos frutos do mar comercializados nos mercados varejistas e supermercados. O consumo habitual de frutos do mar *in natura* na Ásia pode ser responsável pelo aumento da presença de uma série de espécies de *Aeromonas* de origem fecal (YAUN; LIN, 1993).

Martinez-Manzanares *et al.* (1991) avaliaram a contaminação de moluscos por *Aeromonas* spp. na Espanha e constataram maior incidência na primavera que em outras estações do ano.

Na avaliação de 43 amostras de mexilhões *in natura* e 43 pré-cozidos foram isoladas 372 cepas de *Aeromonas* spp., sendo identificadas nove espécies: *A. media*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. chubertii*, *A. jandaei*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. trota* e *A. sobria*. O envolvimento dessas bactérias em casos de doenças no homem revela a importância de alertar as autoridades de saúde pública de sua ocorrência nesse tipo de alimento (PEREIRA *et al.*, 2004).

Barreto *et al.*, 2006 coletaram ostras no período de abril a outubro de 2002, de um criadouro natural com 30 coletas quinzenais, no estuário do rio Cocó (Fortaleza/CE) e observaram que 50 % das amostras foram positivas para o gênero *Aeromonas*. As espécies identificadas foram *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. media*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. veronii* biovar *veronii*. Na Turquia também foram encontradas *Aeromonas* spp. em ostras. Das 127 amostras avaliadas, 84 (66,1 %) continham a bactéria (COLAKOGLU; SARMAK; KOSEOGLU, 2006).

Na Alemanha foram isoladas 134 cepas de *Aeromonas* spp. de 84 amostras de pescado, sendo identificadas 67,9 % de *A. hydrophila*, 26,1 % de *A. caviae* e 6 % de *A. sobria* (ULLMANN *et al.*, 2005). Na Índia também foram isoladas *A. hydrophila* em 33,58 % (180/536) das amostras de peixes comercializados no mercado de Coimbatore (VIVEKANANDHAN *et al.*, 2005). Em outro estudo, Radu *et al.* (2003) encontraram as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv. *sobria* em 87 amostras de peixes comercializados na Malásia.

Em São Luís (Maranhão), Martins *et al.* (2006) evidenciaram *Aeromonas* spp. em todas as 30 amostras de peixes avaliadas, coletadas do rio Bacanga, com contagens variando de  $3,2 \times 10^2$  a  $2,4 \times 10^4$  UFC/g. Foram isoladas 245 cepas de bactérias, das quais 184 positivas para o gênero *Aeromonas* spp., com identificação para as seguintes espécies: *A. caviae* (43,4 %), *A. hydrophila* (28,2 %), *A. veronii* (26,6 %) e *A. sobria* (1,6 %).

Morita (2004) pesquisou a presença de *Aeromonas* spp. em 30 amostras de água e 30 de peixes de pesque-pague da região metropolitana de São Paulo (SP) e observou que 33,3% (10/30) e 26,6 % (8/30), respectivamente, estavam contaminados.

A avaliação de peixes congelados comercializados no México revelou a contaminação por *Aeromonas* spp. com as seguintes espécies identificadas: *A. salmonicida* (67,5 %), *A. bestiarium* (20,9%), *A. veronii* (5,2 %), *A. encheleia* (3,9 %) e *A. hydrophila* (2,6%) (FIGUERAS *et al.*, 2000).

Na investigação de vísceras de peixes (bagres e peixes-gato), água e sedimentos de um criadouro, *Aeromonas* spp. foram detectadas em todas as amostras, tendo uma

contagem mais elevada nas vísceras de peixes quando comparadas à contagem na água e nos sedimentos dos tanques de criação. Os autores ressaltaram, dessa forma, os riscos da possível contaminação cruzada na etapa de evisceração dos peixes (LEUNG; HUANG; POCORBO, 1992).

Diversos alimentos de origem animal e vegetal foram investigados para a incidência e identificação de *Aeromonas* spp. mesófilas coletadas de sete supermercados de Flanders, na Bélgica. De um total de 68 amostras (27 amostras de vegetais, 23 de aves, carnes e produtos cárneos, 18 de peixes e camarões), foram isoladas *Aeromonas* spp. de 26 % das amostras de vegetais, 70 % das de aves e carnes e 72 % dos peixes e camarões (NEYTS *et al.*, 2000). Villari *et al.* (2000), também investigando diferentes alimentos (alface, rúcula, queijo, salame, presunto e sorvetes), identificaram a espécie *A. hydrophila* como a mais comumente isolada em alimentos de origem animal e *A. caviae* a espécie dominante entre os vegetais.

Hanninen, Oivanen e Hirvelä-Koski (1997) também isolaram bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* de amostras de peixes, ovas de peixes, camarões e água doce. Das 29 amostras de peixes analisadas, foram positivas para o gênero 27 (93 %). Todas as 17 (100%) amostras de ovas de peixes, 2 (16 %) das 12 de camarões e todas as 23 (100%) amostras de água doce também foram positivas para *Aeromonas* spp.

Cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de penas, fezes, carcaças de frango não evisceradas, carcaças de frango evisceradas resfriadas e água de pré-resfriamento de um abatedouro de frango foram investigadas para a capacidade enterotoxigênica. Das 75 cepas testadas, 31 produziram enterotoxinas na prova de inoculação intragástrica em camundongos lactantes, sendo 9 (29 %) cepas da espécie *A. hydrophila*, 9 (29 %) *A. sobria*, 6 (19,4 %) *A. caviae*, 4 (12,9 %) *A. veronii*, 1 (3,2 %) *A. chubertii*, 1 (3,2 %) *A. trota* e 1 (3,2 %) *A. jandaei* (COSTA; ROSSI JÚNIOR, 2007).

Freitas, Nunes e Milhomem (1993) na avaliação de 35 amostras de leite pasteurizado e 25 de queijo branco coletados de supermercados do Rio de Janeiro isolaram *Aeromonas* spp. em 28,5% das amostras de leite pasteurizado e 32 % das amostras de queijo.

Carneiro e Rossi Júnior (2006) coletaram e investigaram 80 amostras de leite tipo A de diferentes pontos ao longo do processo de beneficiamento do leite (leite na entrada e saída do pasteurizador, tanque de abastecimento da máquina de envase e do leite empacotado pronto para comercialização) e observaram que 37 (46,25 %) delas estavam contaminadas por *Aeromonas* spp.

Bulhões e Rossi Júnior (2002) constataram a presença de *Aeromonas* spp. em 51,2 % das 160 amostras avaliadas de queijo Minas Frescal tipo artesanal, comercializado em

Poços de Caldas (MG) e Jaboticabal (SP), com contagens que variaram de  $5,0 \times 10^3$  a  $4,0 \times 10^5$  UFC/g. As espécies identificadas foram: *A.cavie*, *A.hydrophila* e *A.chubertii*.

Ibrahim e Macrae (1991) verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em 150 amostras de leite de vaca *in natura* e 150 amostras de carne, sendo 50 amostras de carne bovina, 50 de carne de cordeiro e 50 de carne suína. Os autores constataram a presença dessas bactérias em 27 % das amostras de leite, 60 % das de carne bovina, 58 % das de carne de cordeiro e 74 % das de carne suína.

Na avaliação de 24 amostras de alimentos na Suécia - incluindo carnes de aves, peixes, carnes bovina e suína, leite *in natura* e hortaliças - detectaram a presença de *Aeromonas* spp. em 27 % das amostras, não sendo encontradas em nenhuma das amostras de leite *in natura* e hortaliças. As cepas isoladas também se revelaram produtoras de diversos fatores de virulência (hemolisina, citotoxina, toxina citotônica e proteases) (KROVACEK *et al.*, 1992).

### **3.7. Meios de cultura para isolamento de *Aeromonas* spp.**

Diferentes meios de cultura têm sido utilizados para o isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de alimentos. Muitos meios usam carboidratos como agente diferencial e ampicilina ou penicilina como agentes seletivos. O ágar amido ampicilina (SA) elaborado por Palumbo *et al.* em 1985 tem sido muito utilizado para esse fim, pois seleciona uma alta taxa de colônias presuntivas confirmadas para o gênero. Outros meios também têm sido usados, tais como: ágar xilose-desoxicolato citrato, ágar Maconckey manitol-ampicilina, ágar Maconckey xilose-ampicilina, ágar sangue com ampicilina, ágar peptona extrato de carne glicogênio, o meio Rimler-Shotts, o meio Rimler-Shotts modificado, o ágar verde brilhante com sais biliares, o ágar Maconckey e ágar Wagatsuma modificado (KROVACEK *et al.*, 1992).

No ágar amido ampicilina (SA), o amido incorporado ao meio age como agente diferencial, uma vez que muitas bactérias Gram negativas não são capazes de hidrolisar o amido. A ampicilina adicionada ao meio tem a finalidade de inibir o crescimento de bactérias pertencentes ao grupo coliformes, algumas outras *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*. As colônias típicas de *Aeromonas* spp., no ágar amido ampicilina, têm um diâmetro de 3-5 mm e têm uma coloração que varia de amarelo a mel e quando inundadas com solução de lugol apresentam um halo transparente ao seu redor, devido a hidrólise do amido (ICMSF, 1996).

*Aeromonas* móveis podem ser isoladas através da semeadura direta em ágar seletivo ou após o enriquecimento. É requerida a utilização de meios de enriquecimento em alguns casos, quando o número previsto de *Aeromonas* spp. é pequeno ou existem suspeitas de células injuriadas. O caldo de soja e tripticaseína, o caldo tripton, o caldo Rimler Shotts modificado e a água peptonada alcalina são alguns meios utilizados (ICMSF, 1996).

Segundo Varnan e Evans (1991), o caldo de soja e tripticaseína, adicionado de ampicilina, tem sido amplamente utilizado, embora alguns pesquisadores prefiram fazer uso da água peptonada alcalina, devido à possível sensibilidade de algumas cepas à ampicilina. Em outro estudo, Sachan e Agarwal (2000), na avaliação de caldo dextrina e água peptonada, adicionado de 10 mg/L cefalotina para o isolamento de *Aeromonas* spp. de amostras de carne de frango, observaram que houve uma maior taxa de isolamento na água peptonada adicionada do agente.

A maioria das espécies de *Aeromonas* spp. cresce em meios de cultura entéricos, no entanto têm sido identificadas de forma errônea como coliformes. Como se sabe, o requerimento para bactérias isoladas de amostras clínicas é diferente das isoladas de amostras de alimentos. Para amostras clínicas, Rocha *et al.* (2008) avaliaram um novo meio seletivo, o ágar unisc, para o isolamento de *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* e enteropatógenos clássicos, como uma alternativa aos coprocultivos clássicos, favorecendo no diagnóstico laboratorial de gastroenterites. O meio se mostrou nesse estudo eficiente na detecção de *Aeromonas* spp., bem como das demais bactérias.

Na identificação das espécies de *Aeromonas*, é possível separar facilmente as espécies móveis das imóveis, devido à produção, pelas espécies imóveis, de um pigmento pardo e hidrossolúvel observado no ágar de soja e tripticaseína (TSA). Para as demais espécies móveis, faz-se necessária a utilização de provas bioquímicas para confirmação do gênero e identificação de espécies (ICMSF, 1996).

Tsai *et al.* (1997) testaram meios de cultura de diferentes composições, além de outros fatores como temperatura, pH, concentração salina e oxigênio dissolvido na produção de hemolisinas e citotoxinas por *Aeromonas hydrophila* isoladas de amostras de ostras. Os meios testados foram: caldo infusão cérebro coração (BHIB), caldo extrato de levedura casamina (CAYEB), caldo nutriente (NB) e caldo de soja e tripticaseína (TSB). Foi observado que, em todos os meios, a taxa de crescimento apresentou-se semelhante, contudo os níveis na produção de toxinas foram diferentes. O meio BHIB apresentou melhor produção de hemolisinas e citotoxinas e o NB detectou uma menor produção.

### 3.8. Meios cromogênicos

Em um laboratório de microbiologia, a disponibilidade de meios de cultura que facilitam o trabalho do pesquisador é de suma importância. Em meados 1990 comprovou-se que é possível utilizar meios capazes de induzir a formação de colônias com coloração diferenciada por espécie. Desde então, ocorreu um grande aumento na produção, desenvolvimento e uso de tais meios testados para rotina do microbiologista.

Os meios cromogênicos permitem alterações de cores nas colônias dos microrganismos. Isto é possível, pois a sua composição contém substratos, em sua maioria espécie-específicos, que quando processados geram compostos dotados de coloração (e/ou fluorescência em alguns casos). Estas diferenças se dão devido às diferenças existentes entre as vias metabólicas utilizadas por cada espécie. Este conceito não difere do utilizado na identificação bioquímica dos microrganismos, porém a obtenção destes resultados está intimamente ligada à pesquisa dos mecanismos do metabolismo e de seus produtos resultantes aliada ao desenvolvimento de compostos químicos. Com esta especificidade é possível, por exemplo, em uma única placa identificar várias espécies de um mesmo gênero (DIFCO, 2003).

A aplicabilidade dos meios cromogênicos é obtida pela especificidade obtida, o que permite que algumas etapas no processo de identificação sejam descartadas, levando assim a uma identificação mais ágil e um melhor aproveitamento do tempo do profissional no laboratório.

Em laboratórios clínicos os meios de cultura cromogênicos são usados desde 1989 para o isolamento de uropatógenos, sendo uma alternativa para se fazer uma adequada urocultura. Em geral estes meios utilizam substratos cromogênicos combinados, sobre uma base nutricionalmente rica, favorecendo a multiplicação dos principais uropatógenos e, ainda, possibilitando o reconhecimento precoce de vários grupos e espécies (SILVA, 2008). Estudos têm demonstrado a eficiência destes meios na identificação direta de bactérias isoladas de amostras clínicas, tendo a confirmação de 99,3% das amostras investigadas posteriormente por provas bioquímicas (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Na identificação de *Escherichia coli* como possível contaminante em diferentes produtos também pode ser realizada, utilizando tais meios. Em uma identificação normal, se utilizaria um meio seletivo inicial (EMB ou MacConkey), associado a pelo menos mais duas etapas para identificação (Citrato de Simmons e testes de Indol, para diferenciação de *E. coli* de *Enterobacter aerogenes*). Já com a utilização de um meio cromogênicos específico, é

possível em uma passagem apenas identificar a presença de *E. coli* assim como também determinar a natureza (DIFCO, 2003).

Para o isolamento de *Aeromonas* spp., destaca-se o meio cromogênico cromocen AGN. É um meio comercial inovador com essa finalidade. No mesmo meio, é possível também isolar *Pseudomonas*, *Salmonella*, *E. coli* e coliformes, devido à coloração e características distintas. Após o crescimento nesse meio, as colônias de *Aeromonas* spp. apresentam-se verde-claras com ou sem um halo transparente. *Pseudomonas* são de coloração de rósea a laranja, com halo transparente amplo e fluorescência esverdeada; *Salmonellas* apresentam róseo intenso com bordas rosadas; *E. coli* são violeta azulada de coloração intensa com halo violeta e coliformes apresentam diferentes tonalidades de violeta (BIOCEN DO BRASIL, 2009).

O emprego do meio de cultura cromocen AGN é uma alternativa aos meios tradicionais usados no isolamento de *Aeromonas* spp. de amostras de alimentos. Suas vantagens se devem à sua praticidade, ao menor tempo gasto na análise e ao seu preço acessível.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aquisição de amostras

As amostras foram adquiridas em dez supermercados da cidade de Fortaleza/CE, levando em consideração os principais cortes e marcas comercializadas.

As coletas foram realizadas semanalmente, obtendo-se 5 amostras de 1 Kg de cortes de frango, totalizando 25 amostras analisadas de cortes resfriados e 25 de cortes congelados (Quadro 1 e 2).

| Marcas         | Cortes                   |                          |                     |                      |                      |
|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|                | Sobrecoxa com pele (SCP) | Sobrecoxa sem pele (SSP) | Coxa com pele (CCP) | Peito com pele (PCP) | Peito sem pele (PSP) |
| A <sub>1</sub> | 3                        | 4                        | 2                   | 4                    | 3                    |
| B <sub>2</sub> | 2                        | 1                        | 3                   | 1                    | 2                    |
| <b>Total</b>   | 5                        | 5                        | 5                   | 5                    | 5                    |

Quadro 1 - Número de amostras dos diferentes tipos de cortes de frango resfriados avaliados.

| Marcas       | Cortes                   |                          |                     |                      |
|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
|              | Sobrecoxa com pele (SCP) | Coxa com sobrecoxa (CCS) | Coxa com pele (CCP) | Peito com pele (PCP) |
| A            | 2                        | 1                        | 2                   | 1                    |
| B            | 1                        | 1                        | 1                   | 1                    |
| C            | 1                        | 1                        | 1                   | 2                    |
| D            | 1                        | 1                        | 1                   | 2                    |
| E            | 1                        | 2                        | 1                   | 1                    |
| <b>Total</b> | 6                        | 6                        | 6                   | 7                    |

Quadro 2 - Número de amostras dos diferentes tipos de cortes de frango congelados avaliados

As amostras foram coletadas em sua embalagem comercial original e não violada, transportadas em caixas isotérmicas com “ice-block” até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (DTA/UFC) e estocadas a temperaturas recomendadas. As amostras de cortes resfriados de frango foram mantidas em refrigerador a 4 °C e as amostras de cortes congelados de frango, à

– 10°C até o início das análises. As análises foram realizadas no mesmo dia da aquisição das amostras.

## **4.2. Análise das amostras**

As embalagens foram desinfetadas externamente com álcool 70 %. Em seguida, os cortes de frango foram acondicionados em vasilhas esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 minutos, cortados em partes menores com utilização de facas estéreis e homogeneizados para a retirada da unidade analítica. Todas as 50 amostras de cortes de frango foram avaliadas individualmente.

As análises foram realizadas de acordo com normas metodológicas preconizadas pela American Public Health Association (APHA, 2001), com adaptações. Foi utilizado o meio comercial Biocen AGN, para o isolamento de *Aeromonas* spp. e provas bioquímicas adicionais foram realizadas para a identificação fenotípica das espécies.

### **4.2.1. Enriquecimento seletivo**

Uma alíquota de 25g de cada amostra foi pesada assepticamente e transferida para um frasco, contendo 225 mL de caldo de soja e tripticaseína (TSB) adicionado de 30 µg/mL de ampicilina. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 28 °C por 24 horas.

### **4.2.2. Plaqueamento seletivo e isolamento das colônias suspeitas**

Após a incubação, foi estriada uma alçada, com auxílio de alças descartáveis (0,1 µL), de cada cultura sobre a superfície de placas de petri, contendo os meios: ágar amido ampicilina (SA) e Cromocen AGN (meio comercial produzido pela Biocen do Brasil). Em seguida, procedeu-se a incubação a 28 °C por 24 horas.

Decorrida a incubação, as placas contendo ágar amido ampicilina (SA) foram cobertas com a solução de lugol a 1%. Foram selecionadas, no mínimo, cinco colônias suspeitas de *Aeromonas* e que apresentaram coloração amarela com um halo claro ao redor da colônia, como mostrado na Figura 4. No meio comercial Cromocen AGN, foram

selecionadas, no mínimo, cinco colônias com coloração verde-clara com ou sem halo transparente, de acordo com a Figura 5.



Figura 4 - Características das Colônias de *Aeromonas* spp. em ágar amido ampilicina (SA)



Figura 5 - Características das Colônias de *Aeromonas* spp. em Meio Cromococ AGN  
Fonte: BIOCENTRO DO BRASIL, 2008

Todas as colônias selecionadas foram transferidas para placas contendo ágar de soja e tripticaseína (TSA) e incubadas a 28 °C por 24 horas para verificação da pureza das colônias. As colônias típicas foram então transferidas para tubos de ensaio contendo ágar de soja e tripticaseína (TSA) inclinado para posteriores provas bioquímicas para a caracterização do gênero e a identificação das espécies presentes. A Figura 6 apresenta um esquema representativo do procedimento analítico para isolamento das colônias suspeitas de *Aeromonas* spp.

#### 4.3. Caracterização e identificação das cepas suspeitas de *Aeromonas* spp.

A identificação fenotípica dos isolados foi realizada a partir das culturas ativadas, cultivadas em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas. Foram utilizados testes bioquímicos para caracterização do gênero e identificação das espécies de acordo com reações fenotípicas padrões (Quadro 3) (APHA, 2001; HOLT *et al.*,1994). *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 foi utilizada como controle positivo.

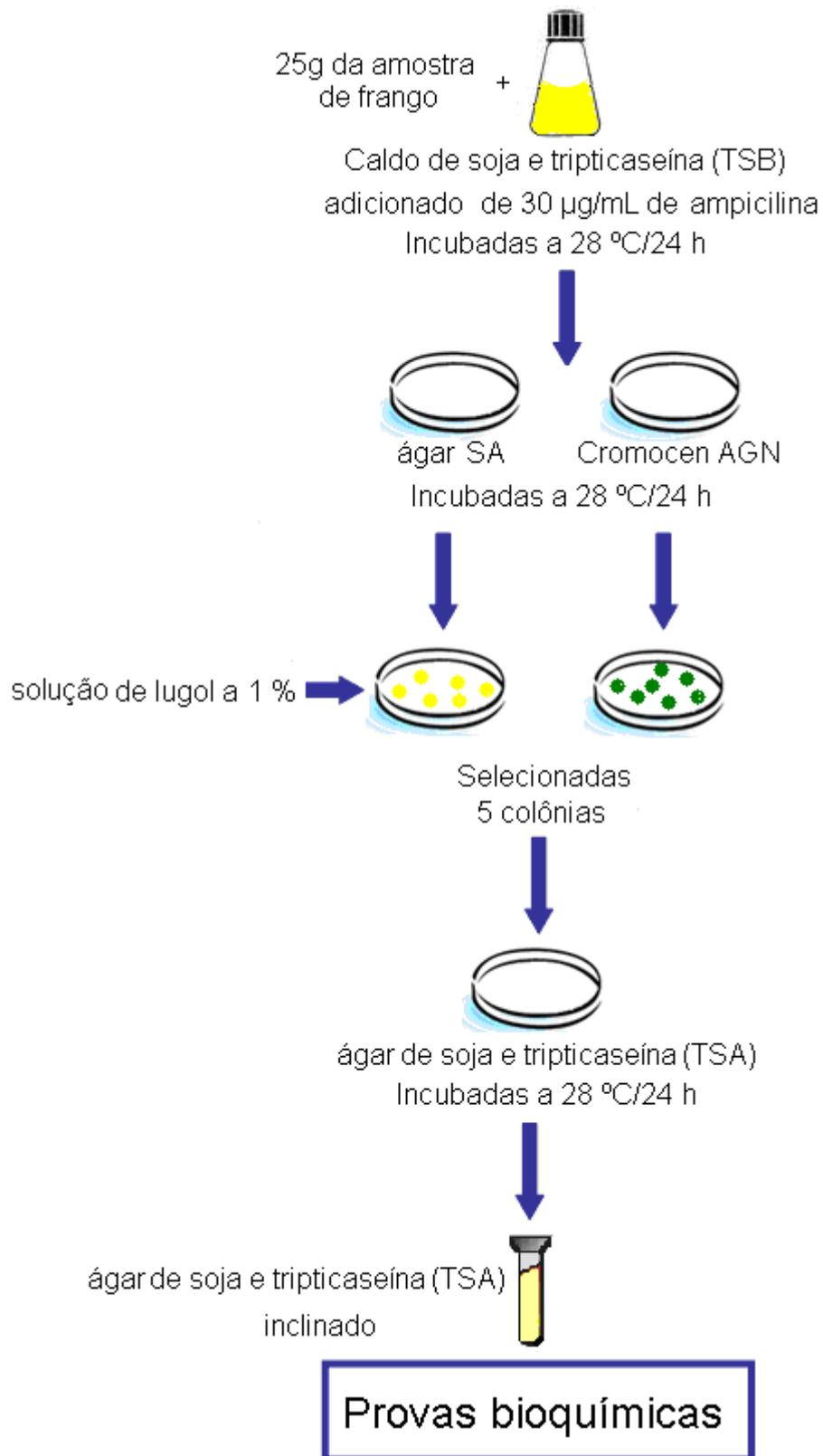


Figura 6 - Esquema do procedimento analítico para isolamento das colônias suspeitas de *Aeromonas* spp.

| Provas bioquímicas                         | Fenoespécies e grupos de hibridização |                               |                           |                         |                               |                         |  |  |                          |   |                              |                             |                               |                         |
|--|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|--|--|--------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
|  | HG1<br><i>A. hydrophila</i>           | HG2/3<br><i>A. hydrophila</i> | HG4/5<br><i>A. caviae</i> | HG5b<br><i>A. media</i> | HG6<br><i>A. eucrenophila</i> | HG7<br><i>A. sobria</i> | HG8x<br><i>A. Veronii</i> bv <i>sobria</i> | HG8y<br><i>A. Veronii</i> bv <i>sobria</i> | HG9<br><i>A. jandaei</i> | HG10<br><i>A. Veronii</i> bv <i>veronii</i> | HG11<br><i>Aeromonas</i> sp. | HG12<br><i>A. chubertii</i> | HG13<br><i>A. spp. gr.501</i> | HG14<br><i>A. trota</i> |
| *Coloração Gram                            | -                                     | -                             | -                         | -                       | -                             | -                       | -  | -  | -                        | -   | -                            | -                           | -                             | -                       |
| *Prova de oxidase                          | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| *Prova de catalase                         | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| *Teste DNase                               | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| *Resistência ao agente vibriostático O/129 | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| **Crescimento em NaCL a 0%                 | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| **Crescimento em NaCL a 1%                 | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| **Crescimento em NaCL a 6%                 | -                                     | -                             | -                         | -                       | -                             | -                       | -  | -  | -                        | -   | -                            | -                           | -                             | -                       |
| **Hidrólise de uréia                       | -                                     | -                             | -                         | -                       | -                             | -                       | -  | -  | -                        | -   | -                            | -                           | -                             | -                       |
| **Motilidade                               | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| **Produção de ácidos a partir de maltose   | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| **Produção de ácidos a partir de D-glicose | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | +                           | +                             | +                       |
| *Produção de gás a partir de D-glicose     | +                                     | +                             | -                         | -                       | -                             | ±                       | +  | +  | +                        | +   | -                            | -                           | -                             | +                       |
| *Produção de ácidos a partir de manitol    | +                                     | +                             | +                         | +                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | -                            | -                           | -                             | +                       |
| *Produção de ácidos a partir de sacarose   | +                                     | +                             | +                         | +                       | -                             | +                       | +  | +  | -                        | +   | +                            | -                           | -                             | +                       |
| *Produção de Indol                         | +                                     | +                             | +                         | ±                       | +                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | +                            | -                           | +                             | +                       |
| *Voges-proskauer                           | +                                     | +                             | -                         | -                       | -                             | -                       | -  | +  | +                        | +   | -                            | -                           | +                             | -                       |
| **Produção de H <sub>2</sub> S             | +                                     | +                             | -                         | -                       | -                             | -                       | -  | -  | -                        | -   | -                            | -                           | -                             | -                       |
| *Hidrólise de esculina                     | +                                     | +                             | +                         | +                       | -                             | -                       | -  | -  | -                        | +   | -                            | -                           | -                             | -                       |
| *Descarboxilação de ornitina               | -                                     | -                             | -                         | -                       | -                             | -                       | -  | -  | -                        | ±   | +                            | -                           | -                             | -                       |
| *Descarboxilação de lisina                 | +                                     | -                             | -                         | -                       | -                             | +                       | +  | +  | +                        | +   | -                            | +                           | -                             | +                       |

Quadro 3 – Características bioquímicas para as espécies pertencentes ao Gênero *Aeromonas*.

Fonte: Adaptado de \*APHA, 2001; \*\*HOLT *et al.*, 1994.

### 4.3.1. Provas bioquímicas para caracterização do gênero e identificação das espécies

#### a) Coloração de Gram

Os esfregaços foram fixados pelo calor na chama do bico de Bunsen e, em seguida, recobertos com as soluções recomendadas para a coloração de Gram (violeta de genciana, solução de lugol, descolorante e solução de safranina); para cada aplicação das soluções, realizava-se uma lavagem. O exame foi realizado em microscópio ótico para observação da coloração, bem como da forma e arranjos das colônias. As células microbianas que apresentaram coloração rósea foram então identificadas como Gram negativas. *Aeromonas* spp. são Gram negativas.

#### b) Prova da oxidase

Um esfregaço da colônia suspeita foi preparado, com auxílio de alças descartáveis, em tiras de papel filtro impregnadas em solução contendo 125 mg de N-N-dimetil-para-fenileno-diamina e 125 mg de alfa-naftol, dissolvidos em 25 mL de álcool etílico e 25 mL de água deionizada. Verificou-se a formação ou não da cor púrpura intensa (lilás) sobre a tira. A cor púrpura intensa (lilás) indica a produção de peroxidase (Figura 7). *Aeromonas* spp. são oxidase positivas.

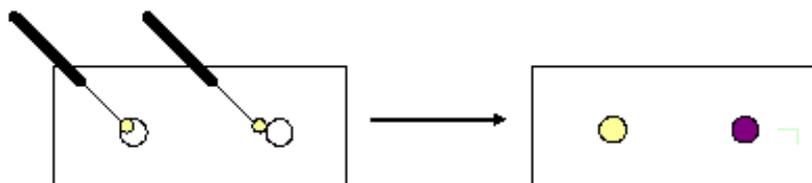


Figura 7 – Reação em tira de oxidase

#### c) Prova da catalase

Para verificar a produção de catalase, foram adicionadas gotas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3 % sobre as colônias cultivadas em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28°C por 24 horas. A liberação de  $O_2$  indica a presença da catalase. *Aeromonas* spp. são catalase positivas.

#### d) Prova da DNase

A cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi estriada, com auxílio de alça descartável, em placas de petri contendo ágar DNase e incubada a 28 °C por 24 horas. Após incubação, a placa foi embebida com solução de azul de toluidina a 0,05 %. A formação de um halo róseo ao redor da colônia indicou reação positiva (Figura 8). *Aeromonas* spp. são DNase positivas.

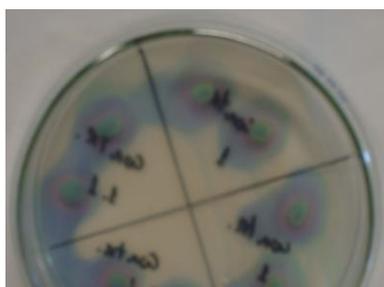


Figura 8 – Características das colônias de *Aeromonas* spp. em ágar DNase

#### e) Resistência ao agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-diisopropilpeteridine (O/129)

Uma cultura, após crescimento em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubos de ensaio, contendo 5 mL água peptonada para fazer uma suspensão. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e 0,1 mL da suspensão de células foi inoculada em placas de petri com ágar tripticase de soja (TSA) e espalhados com auxílio de alças de Drigaski estéreis. Discos de papel de filtro impregnados com 10 e 150 µg/mL do agente vibriostático O/129 foram depositados na superfície do ágar, com o auxílio de uma pinça esterilizada. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Após incubação, foi verificado se houve o crescimento das cepas em toda a superfície da placa ou formação de um halo de inibição ao redor dos discos. *Aeromonas* spp. são resistentes às duas concentrações desse agente.

#### f) Crescimento em NaCl

Uma alçada de cada cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo de soja e

tripticaseína adicionado de 0 %, 1 % e 6 % de NaCl. Em seguida, foi incubada a 28 °C por 24 horas. Após este período, foi verificada a turvação do meio, indicando crescimento da cepa. *Aeromonas* spp. crescem somente na ausência e na concentração de 1 % de NaCl.

#### **g) Motilidade**

Cada cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada por picada (agulhas descartáveis) em tubos de ensaio com ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubada a 28 °C por 24 horas. Observou-se, após esse período, se houve a migração das células para as regiões fora da linha de inoculação.

#### **h) Hidrólise de uréia**

Uma alçada de cada cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubo de ensaio, contendo 5 mL de caldo uréia e incubada a 28 °C por 24 horas. Observou-se a viragem alcalina do indicador, com alteração da cor do meio de pêssego para a cor rosa-escuro (teste positivo) ou permanência da cor original do meio (teste negativo). Cepas de *Aeromonas* não degradam a uréia em duas moléculas de amônia, resultando em teste negativo.

#### **i) Produção de ácidos e gases a partir da D-glicose**

Uma alçada da cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28°C por 24 horas, foi inoculada em tubo de ensaio com tubo de Duhan invertido, contendo 4 mL de caldo vermelho de fenol adicionado de 0,2 mL de D-glicose (concentração de 0,5 %) e incubada a 28 °C por 24 horas. Verificou-se a mudança da cor do meio de vermelho para amarelo, indicando a acidificação devido à fermentação da D-glicose e produção ou não de gases nos tubos de Duhan.

#### **j) Teste de fermentação de carboidratos: manitol, maltose e sacarose**

Uma alçada da cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubo de ensaio, contendo 4 mL de caldo vermelho de fenol adicionado de 0,2 mL dos carboidratos (concentração de 0,5 %) - manitol, maltose e

sacarose - e incubada a 28 °C por 24 horas. Verificou-se a mudança da cor do meio de vermelho para amarelo, indicando a acidificação do meio devido à produção de ácidos.

### **l) Prova de Indol**

Uma alçada da cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubos de ensaio com 5 mL de caldo tripton a 1% e incubada a 28°C por 24 horas. Após incubação, adicionou-se 0,3 mL do reativo de Kovacs (solução aquosa ou alcoólica de p-dimetil aminobenzaldeído). A formação de um anel de cor rósea na superfície do meio, devido à complexação do indol formado com o aldeído do reativo, indica teste positivo. A prova é negativa com qualquer outra tonalidade de cor (original do meio ou marrom).

### **m) Prova de Voges-Proskauer**

Uma alçada da cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28°C por 24 horas, foi inoculada em tubo de ensaio com 1 mL de caldo vermelho de metila Voges-Proskauer e incubada a 28°C por 48 horas. Após incubação, foram adicionados 0,6 mL de solução de  $\alpha$ -naftol a 5% e 0,2mL de solução de hidróxido de potássio a 40%. O tubo de ensaio foi agitado e observado por até uma hora para verificação do desenvolvimento da cor vermelha ou rósea no meio (teste positivo).

### **n) Produção de H<sub>2</sub>S**

A cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada por picada no centro do ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) inclinado, estriada na base da superfície da rampa e incubada a 28°C por 72 horas. Observou-se a produção de H<sub>2</sub>S devido à respiração anaeróbica do tiosulfato, formando gás sulfídrico e sulfeto. O sulfeto de hidrogênio, na presença de sais de ferro, forma sulfeto ferroso, originando um precipitado negro insolúvel (teste positivo).

#### **o) Hidrólise da Esculina**

A cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28°C por 24 horas, foi inoculada por picada no centro do ágar esculina inclinado, estriada na base da superfície da rampa e incubada a 28°C por 24 horas. Após incubação, foi verificada a mudança da coloração do meio para marrom escuro ou preto, indicando teste positivo.

#### **p) Descarboxilação de aminoácidos (lisina e ornitina)**

Uma alçada da cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubo de ensaio com caldo de Moeller suplementado com 1 % do aminoácido a ser testado. O tubo foi desaerado imediatamente antes do uso. Após inoculação o tubo foi coberto com uma camada de óleo mineral de aproximadamente 1,5 cm. e em seguida incubado a 28 °C por até 96 horas. A observação da viragem do meio de roxo para amarelo, devido à produção de ácidos a partir da glicose presente no meio e posterior reversão da cor original (descarboxilação das aminas e neutralização da reação ácida), indicava resultado positivo.

#### **4.4. Verificação da atividade hemolítica (produção de $\beta$ -hemolisina) das espécies de *Aeromonas* spp. identificadas**

Uma alçada da cultura ativada, cultivada em ágar soja e tripticaseína (TSA) a 28 °C por 24 horas, foi inoculada em tubo de ensaio com 5 mL água peptonada para fazer uma suspensão. Em seguida, o tubo foi homogeneizado e 0,1 mL do inóculo foi colocado em placa de ágar sangue de carneiro a 7%, espalhado com auxílio de alça de Drigaski estéril e incubada a 28°C por 24 horas. Após incubação, foi observado se houve a formação de um halo ao redor das colônias como mostrado na Figura 9, devido à hidrólise dos eritrócitos pela ação da  $\beta$ -hemolisina (teste positivo).



Figura 9 – Produção de  $\beta$ -hemolisina por cepas de *Aeromonas* spp.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação dos meios de cultura no isolamento de *Aeromonas* spp.

Os resultados da avaliação da eficiência dos dois meios de cultura no isolamento de *Aeromonas* spp. isoladas de cortes de frango resfriados e congelados produzidos industrialmente são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Para as 25 amostras de cortes de frango resfriados analisados, foram isoladas um total de 248 cepas suspeitas de *Aeromonas* spp. dos dois meios de cultura utilizados. Destas, 123 foram isoladas do ágar amido ampicilina (SA), sendo confirmadas para o gênero 112 cepas. Para as 112 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, 66 foram identificadas a nível de espécie a partir das provas bioquímicas realizadas (Tabela 2). Foram identificadas três diferentes espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*.

Das 125 cepas isoladas do meio cromocin AGN, 113 foram confirmadas como pertencentes ao gênero e, destas, 69 cepas identificadas a nível de espécie, sendo encontradas cinco espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* biovar *veronii* e *A. sobria* (Tabela 2).

Na Tabela 3, são apresentados os resultados das cepas de *Aeromonas* spp. isoladas das 25 amostras de cortes de frango congelados. Das 55 cepas obtidas do meio ágar amido ampicilina (SA) foram positivas para o gênero 51 e, destas, 12 foram identificadas a nível de espécie. As espécies encontradas foram: *A. caviae* e *A. eucrenophila*. No meio cromocin AGN das 55 cepas isoladas, 50 foram confirmadas para o gênero e, destas, 12 identificadas para espécies. As espécies presentes foram: *A. caviae*, *A. eucrenophila* e *A. veronii* biovar *veronii*.

Ambos os meios apresentaram eficiência similar no isolamento de cepas suspeitas de *Aeromonas* spp. Os resultados indicam que o meio comercial biocen AGN é uma alternativa para pesquisadores no isolamento rápido e preciso de *Aeromonas* spp. oriundas de alimentos, como demonstrado pela eficiência semelhante à do ágar amido ampicilina (SA), uns dos meios tradicionalmente utilizados.

Foi observado também que o número de espécies posteriormente identificadas com as provas bioquímicas foi maior para as cepas isoladas do meio cromocin AGN que no ágar amido ampicilina (SA) nos dois tipos de cortes (resfriados e congelados). Os dados obtidos sugerem que *Aeromonas* spp. podem ser recuperadas de alimentos resfriados ou con-

Tabela 2 - Comparação da eficiência de dois meios de cultura no isolamento de *Aeromonas* spp. de cortes de frango resfriados.

| Meios                      | Nº cepas suspeitas isoladas | Nº de cepas               |  |  |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|--|--|
|                            |                             | confirmadas para o gênero | bioquimicamente confirmadas como espécie | bioquimicamente não confirmadas como espécie |
| ágar amido ampicilina (SA) | 123                         | 112                       | 66                                       | 46   |
| cromocen AGN               | 125                         | 113                       | 69                                       | 44   |
| Total de cepas             | 248                         | 225                       | 135                                      | 90   |

Tabela 3 - Comparação da eficiência de dois meios de cultura no isolamento de *Aeromonas* spp. de cortes de frango congelados.

| Meios                      | Nº cepas isoladas | Nº de cepas               |  |  |
|----------------------------|-------------------|---------------------------|--|--|
|                            |                   | confirmadas para o gênero | bioquimicamente confirmadas como espécie | bioquimicamente não confirmadas como espécie |
| ágar amido ampicilina (SA) | 55                | 51                        | 12                                       | 39   |
| cromocen AGN               | 55                | 50                        | 17                                       | 33   |
| Total de cepas             | 110               | 101                       | 29                                       | 72   |

gelados, tendo como opção não somente meios tradicionais, mas também o meio comercial cromocen AGN, como constatado nesta pesquisa.

Comparativamente, o meio cromogen AGN apresenta melhor praticidade de uso e segurança do que o meio ágar amido ampicilina (SA). O ágar amido ampicilina (SA) é um meio formulado, ou seja, não é produzido comercialmente, sendo necessária a adição de ampicilina após sua esterilização. Na leitura das placas, é adicionada, após incubação, a solução de lugol, que contém iodo, para a avaliação da hidrólise do amido, através da formação de um halo transparente ao redor das colônias. O iodo presente na solução é letal para as células bacterianas, assim as colônias suspeitas no meio devem ser removidas imediatamente da placa para que não haja perda das cepas. Já o meio cromocen AGN é comercializado pronto para o uso, tem um prazo de validade de quatro meses, não requer a adição de solução, sendo a leitura, após incubação, realizada pela coloração das colônias e formação de halo.

Na confirmação das cepas suspeitas, isoladas dos dois meios de cultura, como pertencentes ao do gênero *Aeromonas*, foram realizadas onze provas bioquímicas e dez provas para a identificação das espécies. De um total de 248 cepas isoladas dos cortes de frango resfriados e de 125 dos cortes de frango congelados, houve uma baixa taxa de identificação de espécies. Os resultados obtidos indicam que o grande número de provas bioquímicas utilizadas não foi suficiente. Foi então possível verificar a dificuldade ainda existente e a necessidade de um grande número de provas para que haja a identificação dessas bactérias.

## 5.2. Perfil de contaminação das amostras de frango com *Aeromonas* spp.

De um total de 50 amostras de cortes de frango produzidos industrialmente (25 cortes resfriados e 25 cortes congelados), avaliados para a presença de bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* spp., foram detectadas sua incidência em 96 % (24/25) das amostras de cortes de frango resfriados e em 28 % (7/25) dos cortes de frango congelados. Os resultados são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

A presença de *Aeromonas* spp., tanto nas amostras de frango resfriadas quanto nas congeladas, indica que esses alimentos são passíveis de contaminação, independente do tipo de conservação adotado (resfriamento ou congelamento). A contaminação pode ser oriunda das etapas de processamento na indústria avícola, do contato com a água contaminada, de utensílios não-higienizados ou mesmo dos manipuladores, visto que foram adquiridas a partir do produto final nos locais de comercialização. Rossi Júnior *et al.* (2000) avaliaram a contaminação da superfície de mãos de manipuladores de carne bovina em um frigorífico e evidenciaram a presença de *Aeromonas* spp. em 15 % (9/60) das amostras.

A incidência de *Aeromonas* spp. nas duas marcas ( $A_1$  e  $B_2$ ) de cortes de frango resfriados investigados foi elevada. Todos os cinco diferentes cortes das marcas  $A_1$  e  $B_2$  (sobrecosta com pele, sobrecosta sem pele, coxa com pele, peito com pele e peito sem pele) estavam contaminados. Para a marca  $A_1$ , foram identificadas cinco espécies nos cinco diferentes tipos de cortes investigados, com predominância de *A.caviae* (5/5), seguida de *A.hydrophila* (4/5), *A. eucrenophila* (4/5), *A.veronii* biovar *veronii* (2/5) e *A.sobria* (1/5) (Tabela 4). Para a marca  $B_2$ , foram detectadas três espécies: *A.caviae* (5/5), seguida de *A.hydrophila* (3/5) e *A. eucrenophila* (2/5) (Tabela 4).

Os resultados obtidos podem ser atribuídos à temperatura de conservação em que são mantidos os cortes de frango. O resfriamento não inviabiliza a presença de bactérias, apenas retarda o crescimento da microbiota contaminante da carne. A confirmação da presença de *Aeromonas* spp. nos cortes de frango resfriados e o alto percentual de contaminação se devem à sua capacidade de crescimento em temperaturas de refrigeração. Estudos semelhantes foram relatados por Beuchat (1991), que observou a presença de espécies do gênero *Aeromonas* na maioria dos cortes de frango resfriados analisados, atribuindo esse resultado à habilidade dessas bactérias de crescerem sob refrigeração. Kirov, Anderson e McMeeke (1990) avaliaram a capacidade de crescimento à temperatura de refrigeração ( $5 \pm 2$  °C) de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de frango e constataram que 81% (18/22) das cepas apresentaram crescimento nesta temperatura.

Tabela 4 - Incidência de contaminação por *Aeromonas* spp. nos diferentes tipos de cortes de frango resfriados produzidos industrialmente.

| Corte                    | Quantidade de amostras | Marcas         | n° de Amostras | n° de amostras positivas (%) | Espécies identificadas   |
|--------------------------|------------------------|----------------|----------------|------------------------------|--|
| Sobrecoxa com pele (SCP) | 5                      | A <sub>1</sub> | 3              | 3/3 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.sobria</i><br><i>A.eucrenophila</i>  |
|                          |                        | B <sub>1</sub> | 2              | 2/2 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.eucrenophila</i>   |
| Sobrecoxa sem pele (SSP) | 5                      | A <sub>1</sub> | 4              | 4/4 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i><br><i>A.veroni</i> bv. <i>veronii</i><br><i>A.eucrenophila</i>  |
|                          |                        | B <sub>1</sub> | 1              | 1/1 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i>  |
| Coxa com pele (CCP)      | 5                      | A <sub>1</sub> | 2              | 2/2 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i><br><i>A.veronii</i> bv. <i>veronii</i><br><i>A.eucrenophila</i> |
|                          |                        | B <sub>1</sub> | 3              | 3/3 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i>   |
| Peito com pele (PCP)     | 5                      | A <sub>1</sub> | 4              | 3/4 (75,0 %)                 | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i>   |
|                          |                        | B <sub>1</sub> | 1              | 1/1 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i>   |
| Peito sem pele (PSP)     | 5                      | A <sub>1</sub> | 3              | 3/3 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i><br><i>A.eucrenophila</i>  |
|                          |                        | B <sub>1</sub> | 2              | 2/2 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.hydrophila</i><br><i>A.eucrenophila</i>  |
| <b>Total</b>             |                        | <b>25</b>      |                | <b>24/25 (96,0 %)</b>        | <b>5</b>   |

Outros estudos similares relataram também a ocorrência *Aeromonas* spp. Nociti *et al.* (1999) constataram a presença de *Aeromonas* spp. em 34,54 % das amostras de carcaças e cortes de frango comercializados na cidade de Jaboticabal (SP). Gobat e Jemmi (1995) isolaram *Aeromonas* mesófilas em 44 (23,3 %) das 189 amostras de aves analisadas na cidade de Switzerland.

Para os cortes de frango congelados, foram avaliados quatro diferentes tipos de cortes (sobrecoxa com pele, coxa com sobrecoxa, coxa com pele e peito com pele) de cinco marcas denominadas A, B, C, D e E. Apenas duas marcas (A e D) apresentaram contaminação por *Aeromonas* spp. presentes em três cortes: sobrecoxa com pele, coxa com sobrecoxa e peito com pele. As espécies presentes nesses cortes foram *A.caviae* (3/3), *A. eucrenophila* (1/3) e *A.veronii* biovar *veronii* (1/3) (Tabela 5).

A incidência de *Aeromonas* spp. nos cortes de frango congelados foi menor (28%) quando comparados com os cortes de frango resfriados (96 %). Isso pode ser devido às baixas temperaturas de estocagem. Conforme Santos *et al.* (2000), quando se trata do congelamento, espera-se a redução ou a ausência de células bacterianas viáveis. Desse modo, mesmo em menor número, sua sobrevivência indica que este tipo de alimento armazenado sob condições de congelamento é também veículo desse gênero bacteriano.

Outros estudos com carne de peixe têm também demonstrado a sobrevivência de *Aeromonas* spp. em alimentos, quando estocados sob temperaturas de congelamento. Castro-Escarpulli *et al.*, (2003) pesquisaram peixes congelados coletados de supermercados da cidade do México e isolaram 82 (32,8%) cepas de *Aeromonas* spp. em um total de 250 amostras investigadas. Também no México, a avaliação de peixes congelados revelou a contaminação por *Aeromonas* spp., com as seguintes espécies identificadas: *A. salmonicida* (67,5 %), *A.bestiarium* (20,9%), *A.veronii* (5,2 %), *A.encheleia* (3,9 %) e *A.hydrophila* (2,6 %) (FIGUERAS *et al.*, 2000).

Boari *et al.*, (2007) avaliaram os efeitos do congelamento e armazenamento em congeladores domésticos sobre a microbiota de files de tilápia do Nilo e constataram a sobrevivência de *Aeromonas* spp.; no entanto, ao longo de 30 dias, houve redução nas contagens.

Tabela 5 - Incidência de contaminação por *Aeromonas* spp. nos diferentes tipos de cortes de frango congelados produzidos industrialmente.

| Corte                    | Quantidade de amostras | Marcas    | nº de Amostras | nº de amostras positivas (%) | Espécies identificadas  |
|--------------------------|------------------------|-----------|----------------|------------------------------|---|
| Sobrecoxa com pele (SCP) | 6                      | A         | 2              | 1/2 (50,0 %)                 | <i>A.caviae</i>   |
|                          |                        | B         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | C         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | D         | 1              | 1/1 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i>   |
|                          |                        | E         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
| Coxa com sobrecoxa (CCS) | 6                      | A         | 1              | 1/1 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i>   |
|                          |                        | B         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | C         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | D         | 1              | 1/1 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i>   |
|                          |                        | E         | 2              | 0/2 (0,0 %)                  | -   |
| Coxa com pele (CCP)      | 6                      | A         | 2              | 0/2 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | B         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | C         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | D         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | E         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
| Peito com pele (PCP)     | 7                      | A         | 1              | 1/1 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i>   |
|                          |                        | B         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | C         | 2              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
|                          |                        | D         | 2              | 2/2 (100,0 %)                | <i>A.caviae</i><br><i>A.veronii</i> bv. <i>veronii</i><br><i>A.eucrenophila</i> |
|                          |                        | E         | 1              | 0/1 (0,0 %)                  | -   |
| <b>Total</b>             |                        | <b>25</b> |                | <b>7/25 (28,0 %)</b>         | <b>3</b>  |

As espécies identificadas nos cortes de frango resfriados do presente estudo são demonstradas na Tabela 6. Para os 24 cortes positivos dos 25 avaliados, foram detectadas as espécies: *A.caviae*, *A.hydrophila*, *A.eucrenophila*, *A.veronii* biovar *veronii* e *A.sobria*.

A prevalência foi observada na espécie *A.caviae*, que esteve presente em 19 amostras dos cortes de frango resfriados, sendo sua presença observada nos cinco tipos de cortes avaliados: sobrecoxa com pele (3/5), sobrecoxa sem pele (5/5), coxa com pele (4/5), peito com pele (3/5) e peito sem pele (4/5). *A.hydrophila* foi encontrada em oito amostras para os quatro cortes: sobrecoxa sem pele (2/4), coxa com pele (2/4), peito com pele (2/4) e peito sem pele (2/4). *A.eucrenophila* esteve presente em sete amostras: sobrecoxa com pele (3/7), sobrecoxa sem pele (2/7), coxa com pele (1/7) e peito sem pele (1/7). *A.veronii* biovar *veronii* esteve presente em duas amostras: nos cortes sobrecoxa sem pele (1/2) e coxa com pele (1/2). *A.sobria* presente somente no corte sobrecoxa com pele (1/1).

Algumas das espécies encontradas nos diferentes cortes avaliados são espécies que têm sido comumente identificadas em carnes de frango. Rossi Júnior *et al.* (2006) avaliaram 80 amostras de carne de aves mecanicamente separadas e detectaram 81,2 % de contaminação por *Aeromonas* spp., sendo as espécies identificadas *A.hydrophila*, *A.caviae*, *A.sobria*, *A.schubertii*, *A.trota* e *A.veronii*.

Em estudo com 22 amostras de carnes (6 de carne de frango, 14 de carne vermelha e 2 de produtos cárneos) adquiridas no mercado varejista de Flanders na Bélgica, foram isoladas *Aeromonas* mesófilas em 70 % das amostras. Na carne de aves, foram encontradas *Aeromonas* spp. em 5 das 6 amostras avaliadas, sendo as espécies identificadas: *A.hydrophila* (HG3), *A.caviae* (HG4 e HG5A) e *A.veronii* bv *sobria* (HG8) (NEYTS *et al.*, 2000).

Segundo Costa e Rossi Júnior (2002), foram identificadas *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A.jandaei*, *A.trota* e *A.chubertii* em uma linha de processamento de frango nas amostras de carcaças não evisceradas (72 %), carcaças evisceradas (72 %) e carcaças resfriadas (72 %) das 25 amostras de cada tipo de carcaças.

Hinton Júnior, Cason e Ingram (2004) também identificaram as espécies *A.caviae*, *A.hydrophila*, *A.salmonicida masoucida* e *A.chubertii* na investigação de 24 carcaças de frango evisceradas, 24 selecionadas e 24 resfriadas a 4°C, estocadas por um período de 14 dias, obtidas da linha de processamento de uma indústria.

Tabela 6 – Prevalência de espécies de *Aeromonas* spp. contaminantes para os diferentes cortes de frango resfriados produzidos industrialmente.

| Corte                    | Espécies identificadas |                     |                       |   |                 |
|--------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|---|-----------------|
|                          | <i>A.caviae</i>        | <i>A.hydrophila</i> | <i>A.eucrenophila</i> | <i>A.veronii</i> biovar<br><i>veronii</i> | <i>A.sobria</i> |
| Sobrecoxa com pele (SCP) | 3                      | 0                   | 3                     | 0   | 1               |
| Sobrecoxa sem pele (SSP) | 5                      | 2                   | 2                     | 1   | 0               |
| Coxa com pele (CCP)      | 4                      | 2                   | 1                     | 1   | 0               |
| Peito com pele (PCP)     | 3                      | 2                   | 0                     | 0   | 0               |
| Peito sem pele (PSP)     | 4                      | 2                   | 1                     | 0   | 0               |
| <b>Total</b>             | <b>19</b>              | <b>8</b>            | <b>7</b>              | <b>2</b>                                  | <b>1</b>        |

Na Tabela 7, são observados os resultados das espécies identificadas e a ocorrência nos cortes de frango congelados avaliados.. Foram positivas, para o gênero *Aeromonas*, 7 amostras com três tipos de cortes contaminados. As espécies identificadas foram: *A.caviae*, *A.veronii* bv *veronii* e *A.eucrenophila*. *A.caviae* foi encontrada nos cortes de sobrecoxa com pele (2/3), coxa com pele (2/3) e peito com pele (3/3). *A.veronii* bv *veronii* foi encontrada apenas em uma amostra de peito com pele (1/3) e *A.eucrenophila* também em uma amostra de peito com pele (1/3).

Houve predominância de *A.cavie* em ambos os cortes de frango, resfriados e congelados, o que pode ser devido a uma maior resistência dessa espécie quando submetida a diferentes condições de armazenamento.

Em diferentes fontes de alimentos, essa espécie tem também tido prevalência. Ullmann *et al.* (2005) encontraram *Aeromonas* spp. em 84 amostras de pescado resfriados e defumados comercializados na Alemanha, sendo que *A.caviae* (26,1 %) foi prevalente em relação às demais espécies presentes. Martins *et al.* (2006) encontraram *Aeromonas* spp. em todas as 30 amostras de peixes avaliadas coletadas do rio Bacanga em São Luís (Maranhão), sendo que, do total de 245 cepas isoladas, 184 foram positivas para o gênero *Aeromonas* com o percentual para cada espécie presente de: *A.cavie* (43,4 %) com maior incidência, seguida da *A.hydrophila* (28,2 %), *A.veronii* (26,6 %) e *A.sobria* (1,6 %).

A sobrevivência das demais espécies, tanto nos cortes de frango resfriados quanto congelados, é também motivo de preocupação, visto que estão também relacionadas à patogenia no homem. A incidência de *A.hydrophila* somente nos cortes de frango resfriados pode sugerir que o armazenamento sob resfriamento não é suficiente para inibir o seu crescimento, sendo necessária a adoção de outros métodos.

Tabela 7 – Prevalência de espécies de *Aeromonas* spp. contaminantes para os diferentes cortes de frango congelados produzidos industrialmente.

| Corte                    | Espécies identificadas  |                |                       |
|--------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------|
|                          | <i>A.veronii</i> biovar |                |                       |
|                          | <i>A.caviae</i>         | <i>veronii</i> | <i>A.eucrenophila</i> |
| Sobrecoxa com pele (SCP) | 2                       | 0              | 0                     |
| Coxa com sobrecoxa (CCS) | 2                       | 0              | 0                     |
| Coxa com pele (CCP)      | 0                       | 0              | 0                     |
| Peito com pele (PCP)     | 3                       | 1              | 1                     |
| <b>Total</b>             | <b>7</b>                | <b>1</b>       | <b>1</b>              |

### 5.3. Avaliação da atividade hemolítica das cepas identificadas dos cortes de frango resfriados e congelados

As Tabelas 8 e 9 apresentam os resultados da atividade hemolítica (produção da  $\beta$ -hemolisina) das espécies encontradas nos cortes de frango resfriados e congelados. Foram selecionadas 46 cepas, tendo um representante de cada uma das cinco diferentes espécies de *Aeromonas* spp. identificadas nas amostras de cortes de frango resfriados e congelados.

Das 37 cepas dos cortes de frango resfriados, 70% produziram  $\beta$ -hemolisina, *A.caviae* com 68,4% (13/19), *A.hydrophila* 87,5% (7/8), *A.eucrenophila* 57,1% (4/7) e *A.veronii* bv. *veronii* 100 % (2/2) (Tabela 8). Para os cortes de frango congelados das 9 cepas, 66,6 % apresentaram a atividade hemolítica: *A.caviae* com 71,4 % (5/7) e *A.veronii* bv. *veronii* com 100,0% (1/1) (Tabela 9).

Os resultados indicam que as espécies de *Aeromonas* isoladas de cortes de frango mantidos sob refrigeração e congelamento podem expressar um de seus fatores de virulência ( $\beta$ -hemolisina), o que pode representar um risco à saúde do homem. Segundo Majeed, Egan e Macrae (1990), cepas de *A.hydrophila* e *A.sobria* são capazes de produzir hemolisinas em carnes quando estocadas a 5 °C. Outros estudos também mostraram que *Aeromonas* spp. isolada de ostras produziu hemolisinas em diferentes temperaturas de crescimento: 37°C, 28°C e 5°C ( TSAI *et al.*,1997).

Têm também sido encontrados resultados com percentuais equivalentes na produção de  $\beta$ -hemolisina por cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras ambientais e clínicas. Gibotti *et al.* (2000) isolaram *Aeromonas* spp. da água do rio Cambé (Paraná), que serve de irrigação, recreação e consumo animal e verificaram que 45 % das cepas apresentaram atividade hemolítica. Na Áustria, *Aeromonas* spp. isoladas de um sistema de distribuição de água não clorada foram positivas para o gênero e, destas, 64 % eram produtoras de hemolisinas (BURK *et al.*, 1984).

*Aeromonas* spp. isoladas de amostras clínicas têm também demonstrado a capacidade de produção de hemolisinas. Rodríguez *et al.* (2007) avaliaram a produção de  $\beta$ -hemolisina por cepas isoladas de pacientes com septicemias e verificaram que, dos 44 isolados, 30 (68,1 %) foram positivas para o teste. O percentual para cada uma das espécies avaliadas foi de: *A.hydrophila* 100,0 % (4/4), *A.caviae* 100,0 % (5/5), *A.veronii* bv *sobria* 100,0 % (8/8), *Aeromonas* sp. 11,1 % (1/9) e *A.jadaei* 100,0 % (12/12).

*Aeromonas* spp. foram isoladas de 163 amostras de fezes de crianças com idade abaixo de 5 anos. Das espécies identificadas, as espécies *A. hydrophila* e *A. caviae*

Tabela 8 - Produção de  $\beta$ -hemolisina por espécies de *Aeromonas* spp. isoladas de cortes de frango resfriados.

| <b>Espécies</b>                     | <b>Nº de isolados</b> | <b>Produção de <math>\beta</math>-hemolisina</b> | <b>Percentual (%)</b> |
|-------------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|
| <i>A.caviae</i>                     | 19                    | 13   | 68,4 %                |
| <i>A.hydrophila</i>                 | 8                     | 7  | 87,5 %                |
| <i>A.eucrenophila</i>               | 7                     | 4  | 57,1 %                |
| <i>A.veronii</i> bv. <i>veronii</i> | 2                     | 2  | 100 %                 |
| <i>A.sobria</i>                     | 1                     | 0  | 0,0 %                 |
| <b>Total</b>                        | <b>37</b>             | <b>26</b>  | <b>70,0 %</b>         |

Tabela 9 - Produção de  $\beta$ -hemolisina por espécies de *Aeromonas* spp. isoladas de cortes de frango congelados.

| <b>Espécies</b>                     | <b>Nº de isolados</b> | <b>Produção de <math>\beta</math>-hemolisina</b> | <b>Percentual (%)</b> |
|-------------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|
| <i>A.caviae</i>                     | 7                     | 5  | 71,4 %                |
| <i>A.eucrenophila</i>               | 1                     | 0  | 0,0 %                 |
| <i>A.veronii</i> bv. <i>veronii</i> | 1                     | 1  | 100,0 %               |
| <b>Total</b>                        | <b>9</b>              | <b>6</b>   | <b>66,6 %</b>         |

produziram  $\beta$ -hemolisina (NOJIMOTO *et al.*, 1997).

Abbott, Cheung e Janda (2003) também encontraram espécies produtoras de  $\beta$ -hemolisina em 193 isolados de *Aeromonas* spp. de amostras clínicas, de animais, peixes e fontes ambientais. Dentre as espécies analisadas, os maiores percentuais foram para *A.hydrophila*, *A.veronii* (HG8 e HG10) e *A.jandaei*, com 100 %, *A.bestiarium* com 94 %, *A.eucrenophila* com 89 %, *A.chubertii* com 75 % e *A.caviae* com 52 %.

## 6. CONCLUSÃO

Os meios de cultura ágar amido ampicilina e cromocin AGN apresentaram eficiência similar no isolamento de *Aeromonas* spp., o que permite ao pesquisador optar pelo uso do meio comercial com a mesma segurança nos resultados.

A constatação da presença de bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* indicou que as temperaturas de resfriamento e congelamento em que são mantidos os cortes de frangos industrializados não inviabilizam a sobrevivência dessas bactérias, podendo esse tipo de alimento servir como veículo para sua disseminação.

Foi observada uma maior contaminação dos cortes de frango resfriados do que dos congelados, com predominância da espécie *A.caviae* em ambos. Os resultados sugerem que *A.caviae* foi a espécie mais resistente a baixas temperaturas de estocagem.

A atividade hemolítica foi detectada na maioria das cepas identificadas e com resultados elevados, indicando a produção de  $\beta$ -hemolisina das espécies recuperadas dos cortes de frango como um fator de risco para a saúde do consumidor.

As espécies *A.caviae*, *A.hydrophila*, *A.eucrenophila*, *A.veronii* biovar *veronii* e *A.sobria*. identificadas nos cortes de frango resfriados e congelados estão entre as comumente envolvidas em casos de patogenias ao homem.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal Clinical Microbiology**, California, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, jun. 2003.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. 278p.
- ALMEIDA, P. F.; SILVA, E. N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.2, p.105-120, 1992.
- ALTWEGG, M.; LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. Methods for the identification of DNA hybridization groups in the genus *Aeromonas*. **Experientia**, v. 47, p.403-406, 1991.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington: American Public Health Association, 2001.
- ARAÚJO, V. S. **Estudo de marcadores de virulência em cepas de *Aeromonas* isoladas de alimentos**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO (ABEF). **Dados estatísticos do consumo brasileiro de carne de frango no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoInterno/Historico.php>>. Acessado em: 11 out. 2008.
- ASSOCIAÇÃO CEARENSE DE AVICULTURA (ACEAV). **Perfil do setor avícola**. Disponível em: <<http://www.aceav.com.br>>. Acessado em: 11 out. 2008.
- AZEVEDO, Lúcio C.; LUCHIARI FILHO, A.; DELGADO, E. F. SORIA, R. F.; SILVEIRA, E. T. F.; TRINDADE, M. A.; PORTO, E.; CASTILLO, C. J. C.; ARINA, H. K.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ANTONIO, J. T.; GALVÃO, M. T. E. L.; VENTURINI, A. C.; MIYAGUSKU, L.; MOREIRA, J.; NORKUS, E.; CERQUEIRA A. A. **Qualidade da Carne**. São Paulo: Varela, 2006. 240p.
- BARRETO, N. S. E.; VIERIRA, R. H. S. F.; CARVALHO, F. C. T.; TORRES, R. C. O.; SANTANNA, E. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, C. M. F. *Aeromonas* spp. isolated from

oysters (*Cassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 129-133, maio/jun., 2006.

BEUCHAT, L. R. Behavior of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 217-224, 1991.

BIOCEN DO BRASIL. **Meios de cultura: cromocen AGN**. Disponível em: <<http://www.biocendobrasil.com.br/meiosdecultura.asp>>. Acessado em: 15 fev. 2009.

BOARI, C. A.; MORAES, V. M.; FERRUA, F. Q.; PICCOLI, R. H. Efeitos do congelamento lento e armazenamento em congeladores domésticos, sobre a microbiota associada a filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 153, p. 97-101, 2007.

BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 nov. 1998.

BRASIL. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.

BUENO, M. P.; BUENO, V. P.; ARAÚJO, G. C.; SAUZA, A. A.; SPROESSER, R. L. **Gestão da Qualidade nos Frigoríficos de Abate de Frangos Face as Exigências do Mercado Consumidor**. In: XIII SIMPEP SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2006, Bauru, **Anais...**, Bauru: [s.n.], 2006. Não paginado.

BULHÕES C. C. C; ROSSI JÚNIOR., O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo de minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 320-324, 2002.

BURK, V.; ROBINSON, J.; GRACEY, M.; PETERSON, D.; MEYER, N.; HALEY, V. Isolation of *Aeromonas* spp. from an unchlorinated domestic water supply. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 367-370, 1984.

CAHILL, M. M.; MACRAE, I. C. Characteristics of O/129 – sensitive motile *Aeromonas* strains isolated from freshwater on starch-ampicilin agar. **Microbiology ecology**, v. 24, p. 215-226, 1992.

CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais e

mesófilos em carcaças e cortes de frango. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144-150, jan-fev, 2005.

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

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G. O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M.R. Characterization of *Aeromonas* spp. From frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Foods Microbiological**, v. 84, p. 41-49, 2003.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Foodborne illness**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod>>. Acessado em: 28 set. 2008.

CHAN, F. K. L.; CHAN, F. K. L.; CHING, J. Y. L.; LING, T. K. W.; CHUNG, S. C. S.; SUNG, J. J. Y. *Aeromonas* infection in acute suppurative cholangitis: review of 30 cases. **Journal of Infection**, Hong Kong, v. 40, n. 1, p. 69-73, 2000.

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

COLAKOGLU, F. A.; SARMAŞIK, A.; KOŞEOĞLU, B.; Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested of Dardanelles coast of Turkey. **Food Control**, v. 17, n. 8, p. 648-652, 2006.

CORREDORIA, J.M.; ARIZA, J.; PALLARES, R. Gram-negative bacillary cellulitis in patients with hepatic cirrhosis. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.13, p.19-25,1994.

COSTA, F. N.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas em abatedouro de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n.5, p.534-535, 2002.

COSTA, F. N.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Enterotoxigenicidade de espécies de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate de frangos. **Arquivo do Instituto Biologia**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 5-9, 2007.

DAVIES, A. R.; CAPELLB A. C.; JEHANNOC, D.; NYCHASD, G. J. E.; AND KIRBYB, R. M. Incidence of foodborne pathogens on European fish. **Food Control**, v. 12, p. 67-71, 2001.

DELAZARI, I. **Controle de qualidade no abate de frangos**. Anais do 2º encontro Nacional de Higienistas de Alimentos. São Paulo (SP), 1992. 42p.

DIFCO. **Manual of Microbiological Culture Media**. BD & Co.: Spark. MA, 2003.

DIKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 2, p. 133-140, 1992.

ELEY, A.; GEARY, I.; WILCOX, M. H.; Growth of *Aeromonas* spp. at 4 °C and related toxin production. **Letters applied Microbiology**, v. 16, p. 36-39, 1993.

FIGUERAS, M. J.; SOLER, L.; CHACÓN, M. R.; GUARRO, J.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2069-2073, 2000.

FRANCO, Bernadette D. G. M.; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FREITAS, A. C.; NUNES, M. P. MILHOMEM, A. M. Occurrence and characterizations of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 62-65, 1993.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ). Disponível em:  
<<http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>. Acessado em: 17 ago. 2008.

GALBIS, D. M.; FARFÁN, M.; LORÉN, J. G.; FUSTÉ, M.C.. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Barcelona, v. 93, p. 420–430, maio, 2002.

GARRIT, G. M.; WINTERS, M.; SEARLES, D. B. **Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Bergey's Manual trust. 2 nd. ed. New Work: Springer-Verlag. 2004. Disponível em:  
<http://www.cme.msu.edu/bergeys/april/2001-genus.pdf>. Acessado em:10 fev. 2009.

GAVRIEL, A. A.; LANDRE, J. P. B.; LAMB, A. J. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. **Journal Applied Microbiology**, v. 84, p. 383-392, 1998.

GIBOTTI, A.; SARIDAKS, H. O.; PELAYO, J. S.; TAGLIARE, K. C.; FALCÃO, D. P. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (Paraná, Brazil). **Journal Applied Microbiology**, v. 89, p. 70-75, 2000.

GOBAT, P. F.; JEMMI, T. Comparison of seven selective media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 375-384, 1995.

GRAEVENITZ, A. V. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**, Switzerland, v.35, n. 2, p. 59-64, Jan., 2007.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; TOMÁS, J. M.; ORMEN, O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. From food and water. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 131-137, 1998.

GUERRA, I. M. F.; FADANELI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A. P. L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian journal of microbiology**, v. 38, p. 638-643, nov., 2007.

HANNINEN, M. L.; OIVANEN, P.; HIRVELÄ-KOSKI, V. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 17-26, 1997.

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

HINTON JUNIOR, A.; CASON, J. A.; INGRAM, K. D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 155-165, 2004.

HO, A. S. Y.; MIETZNER, T. A.; SMITH, A. J.; SCHOOLNIK, G. K. The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated mini pillin. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 172, p. 795-806, 1990.

HOFER, E.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; CAVALCANTI, V. O.; LIMA, N. V.; HENRIQUES, M. F. C. M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2p. 217-220, mar./abr., 2006.

HOFFMANN, F.L.; CRUZ, C. H. G.; VINTURIM, T. M.; FÁZIO, M. L. S. Microbiologia de carcaças e carne mecanicamente separada (CMS), obtidas em abatedouro de aves na região de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92/93, p. 45-50, 2002.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9nd ed. New York: The Williams and Wilkins, 1994.

IBRAHIN, A.; MACRAE, I. C. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. In red meat and milk samples in Brisbane, Austrália. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 263-270, 1991.

INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRICOLA (INCEA). **Curso de Avicultura**. 6.ed. Campinas: 1991. 331p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. (ICMSF). **Microorganisms in foods 5: microbiological specification of food pathogens**. London: Blackie Academic e Professional, 1996. 513p.

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

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

JANDA, M. J.; DUFFEY, P.S. Mesophilic *Aeromonads* in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and in infectious disease Spectrum. **Reviews of Infectious Disease**, v.10, p. 980-997,1988.

JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

JOSEPH, S. M.; CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of *Aeromonas* species. **Ann. Rev. Fish Dis.**, v. 4, p. 315-343, 1994.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A.; BRAWITON, P. R.; FANNING, G. R.; ALMAZAN, R.; DRABICK, C.; TRUDO J. E. W.; COWEEL, R. R. *A. jadaei* and *A. veronii* dual infection of human wound following aquatic exposure. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 563-569, 1991.

JOSEPH, S. W.; JANDA, M.; CARNAHAN, A. M. Isolation, enumeration and identification of *Aeromonas* sp. **Journal of Food Safety Westport**, v. 9, p. 23-55, 1988.

KÄMPFER, P.; ALTWEGG, M. Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 341-351, 1992.

KHASHE, S.; WARREM, H.; JANDA, J. M. Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains of clinical, animal, and environmental origin expressing the O:34 antigen. **Current Microbiol.**, v. 33, p. 104-108, 1996.

KIROV, S. M.; ANDERSON, M. J.; MCMEEKIN, T. A. A note *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p. 327-334, 1990.

KIROV, S. M. **Food Microbiology**. In: \_\_\_\_. *Aeromonas and Plesiomonas* species. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2001. cap. 14, p. 301-326.

KIROV, S.M. The public health significance of *Aeromonas* sp. in foods. **International Journal of Foods Microbiological**, v.20, p. 179-198, 1993.

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

KROVACEK, A.; FARIAS, A.; BALODA, S. B.; PETERZ, M.; LINDBERG, T.; MANSSON, I. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. **Food Microbiol.** London, v. 9, n. 1, p.29-36, 1992.

KUHN, I.; ALLESTAM,G.; HUYS,G.; JANSSEN,P.; KERSTERS,K.; KROVACEK,K.; STENSTRÖM,T.A. Diversity, persistence and virulence of *Aeromonas* strains isolates from

drinking water distribution systems in Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, jul., p. 2708-2715, 1997.

LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. São Paulo: Artmed, 2005. 384p.

LEUNG, C. K.; HUANG, Y. W.; PANCORBO, O. C. Bacterial pathogens indicators in catfish and pond environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, n.6, p. 424-427, 1992.

MAJEED, K. N.; EGAN, A. F.; MACRAE, I. C. Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. At 5 °C. **Journal of Applied microbiology**, v. 69, p. 332-337, 1990.

MARTINEZ-MANZANARES, E.; MORINIGO, M. A.; CORNAX, R.; EGEA, F.; BORREGO, J. J. Relationship between classical indicators and several pathogenic microorganisms involved in shellfish – borne diseases. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, n. 9, p. 711-717, 1991.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; ESTEVE, C.; GARY, E.; COLLINS, M. D. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 70, p.199, 1992.

MARTINS, A. G. L. A.; VIEIRA, R. H. S. F.; NASCIMENTO, A. R.; MARINHO, S. C.; MOUCHREK FILHO, V. L. Incidência de bactérias do gênero *Aeromonas* em peixes capturados no estuário do rio Bacanga em São Luis (MA). **Revisa**, v. 2, n. 1, p. 41-45, 2006.

MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 237-242, 2002.

MATTÉ, M.H. **Aplicação de métodos moleculares no estudo de organismos do gênero *Aeromonas***. 2004. Tese de livre-docência – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; MAZZOLLA, R.; FERINELLI, S.; D'ALÒ, F.; VITALI, M.; BISTONI, F. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. **Journal of Medical Microbiology**, Italy, v.52, p. 727-730, 2003.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.157-168, 1995. **Microbiology Letters**, v.70, p.199, 1992.

MORENG, Robert E.; AVENS, Jonh S.. **Ciência e produção de aves**. São Paulo: Roca, 1990. 380p.

MORETTI, E. Microbiologia: **Fundamentos e Aplicações: Bacteriologia, Estrutura Celular**. Disponível em: < [http://www.fam.br/microrganismos/bacteriologia\\_envelope.htm](http://www.fam.br/microrganismos/bacteriologia_envelope.htm)>. Acessado em: 15 ago. 2008.

MORITA, M. Avaliação da qualidade sanitária e pesquisa de *Aeromonas* spp. em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. 2004. Dissertação – Faculdade de Saúde Pública da Usp, São Paulo. 2004.

MURRAY, Patrick R.; PFALLER, Michael A.; KOBAYASHI, George S.; ROSENTHAL, Ken S. **Microbiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762p.

NEYTS, K; HUYS, G.; UYTENDAELE, M.; SWINGS, J.; DEBEVERE, J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. From retail foods. **Letters in Applied Microbiology**, Bélgica, v. 31, p. 359-363, jul., 2000.

NISHIKAMA, Y.; OGASAWARA, J.; KIMURA, T. Heat and acid sensitivity of motile *Aeromonas*: a comparison with other food-poisoning bacteria, **Internation Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 18, p. 271-278, 1993.

NOCITI, D. L. P.; ROSSI JUNIOR, O. D.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A. Bactérias do gênero *Aeromonas* em carcaças e cortes comerciais de frangos comercializados em Jaboticabal, Estado de São Paulo e comportamento das estirpes frente a ação de antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 6, p. 69-73, 1999.

NOJIMOTO, I. T. I.; BEZANA, C. S. C.; CARMO, C.; VALADÃO, L. M.; CARRIJO, K.M. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995 - 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 385-388, 1997.

OLIVEIRA, B. G.; ALBINI, C. A.; BOTÃO, G. M. D.; SOUZA, H. H. M. A identificação direta pelos meios cromogênicos é confiável a ponto de dispensar as provas bioquímicas?. **Revista Newlab**, v. 75, p. 130-142, 2006.

OLIVO, Rubson. **O mundo das carnes: ciência, tecnologia e mercado**. 2.ed. Criciúma: Varela, 2005. 214p.

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

PAVLOV, D.; CME, D. W.; WOK, G.; MM. E. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untrated driking water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 275-287, 2003.

PEREIRA, C. S. POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. R. *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides* a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, Rj. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 562-566, out./dez., 2004.

PEREIRA, C. S.; AMORIM, S. D.; SANTOS, A. F. M.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; RODRIGUES, D. P. Caracterização de *Aeromonas* spp. isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 179-182, mar./abr., 2008.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, v. 219, p. 71-82, 2003.

POPOFF, M. *Aeromonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 7nd ed. Baltimore: Williams e wilkins, v.1, p. 545-548, 1984.

PORRAZ, L. T. *Aeromonas*, Necesidades de Identificación. **Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica**, México, v. 28, n. 4, p. 3, dez. 2003.

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

RALL, V. L. M.; IARIA, S. T.; HEIDTMANN, S.; PIMENTA, F.C.; GAMBAR, R. C.; PEDROSO, D. M. M.. *Aeromonas* species isolated from PINTADO fish (*Pseudoplatystoma* sp): virulence factors and drug susceptibility. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 3, 1998.

REINA, J.; LLOMPART, I.; GOMEZ, L.; BORRELL, N.; SERRA, A. *Aeromonas caviae*: principal espécie enteropatógena del grupo de lãs *Aeromonas* mesófilas durante el período de lactancia artificial em la polbación de Palma de Mallorca (Balaes). **Revista Espanhola de Pediatria**, v. 47, n. 2, p. 146-150, 1991.

ROCHA, M. P.; SCHEID, L. A.; ALVES, S. H. Novo meio seletivo-indicador para detecção de *Aeromonas* e *Plesiomonas*: ágar UNISC. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p.431-433, jul-ago, 2008.

RODRIGUES, A. C. A.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S.; NERO, L. A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p.1948-1953, out, 2008.

RODRÍGUEZ, L. E. C.; FARINÃS, L. B.; RAMIREZ, M. M.; HERNÁNDEZ, A. L.; ABREU, A. F.; MORIER, L.; BORREGO, G. Factores de virulência em cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de pacientes com bacteriemia. **Revista Panamericana de Infectología**, Cuba, v.9, n.4, p. 19-23, 2007.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; GARCIA, T. C. L. F. Bactérias do gênero *Aeromonas* em carne mecanicamente separada de origem avícola. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, n. 559-560, p. 253-256, 2006.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Isolamento de bactérias de gênero *Aeromonas* da superfície das mãos de manipuladores de carne bovina, em matadouro-frigorífico do estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 78/79, p. 90-94, nov./dez., 2000.

SACHAN, N.; AGARWAL, R. K. Selective enrichment broth for the isolation of *Aeromonas* sp. From chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.65-74, 2000.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, jan./mar., 2000.

SARIMEHMETOGLU, B.; KUPLULU, O. Isolation and identification of motile *Aeromonas* species from chicken. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 108, p. 465-467, 2001.

SCHIAVANO, G. F.; BRUSCOLINI, F.; ALBANO, A.; BRAND, G. Virulence factors in *Aeromonas* sp. and their association with gastrointestinal disease. **New Microbiology**, v. 21, p. 23, 1998.

SCOGGIO, M. E.; DI PIETRO, A.; PICENO, I.; MAURO, A. LAGANA, P. Virulence factors in *Vibrios* and *Aeromonads* isolated from seafood. **Microbiology**, v. 24, p. 273-280, 2001.

SILVA, C. H. P. M. Urocultura. **NewsLab**, v. 88, p. 132-137, 2008.

SILVA, J. A. Microrganismos Patogênicos em carne de Frango. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n.58, p. 9-14, out.,1998.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 893p.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTEZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.

TROWER, C. J.; ABO, S.; MAJEED, K. N.; VON ITZSTEIN, M. Production of an enterotoxin by a gastroenteritis associated *Aeromonas* strains. **Journal Medical Microbiology**, v. 49, p. 121-6, 2000.

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

TSAI, G. J.; TSAI, F. C.; KONG, Z. L. Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.111-116, 1997.

ULLMANN, D.; KRAUSE, G.; KNABER, D.; WEBER, H.; BEUTIN, L. Isolation and characterization of potentially human pathogenic, cytotoxin producing *Aeromonas* strains from retailed seafood in Berlin, Germany. **Journal of Veterinary Medicine**, Hamburg, v. 52, n. 2, p. 82-87, 2005.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). **UBA relatório anual 2006/2007**. Disponível em: <<http://www.uba.org.br>>. Acessado em: 11 set. 2008.

UPTON, M. Relationships between pathogen growth and the general microbiota on raw and processed meat and poultry. **Journal of Food Safety**, v.15, n.2, p.133-144, 1995.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. 565p.

VIEIRA, Regine Helena Silva dos Fernandes. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2003. 380p.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALARDO, F.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M. J.; GASCON, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical featural and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 552-555, 2003.

VILLARI, P.; CRIDPINO, P. MONTUORI, P.; BOCCIA, S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 697-701, 2003.

VILLARI, P.; CRIDPINO, P. MONTUORI, P.; STANZIONE, S. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in read-to-eat foods in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1757-1757, 2000.

VIVEKANANDHAN, G.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawn from the seafood market of Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, v. 22, n.1, p.133-137, 2005.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; HATHA, A. A. M. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n.1, p.165-168, 2002.

WANG, J. T.; FANG, C. T.; HSUEH P. R.; CHANG S. C.; LUH K.T. Spontaneous bacterial empyema caused by *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 37, p. 271-273, 2000.

YAUN, S.S.; LIN, L.P. Isolation and characterization of *Aeromonas* from seafoods in Taipei. **Chin Journal Microbiology Immunology**, v.26, p. 78-83, 1993.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)