

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Aeromonas* EM  
CARCAÇAS SUÍNAS.**

**ROBERTO FRANCISCO LUCENA**

**CAXIAS DO SUL  
2007**

**ROBERTO FRANCISCO LUCENA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Aeromonas* EM  
CARÇAÇAS SUÍNAS.**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de mestre em  
Biotecnologia.**

**Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula  
Longaray Delamare**

**Co-orientador: Dr. Sérgio O. P. da Costa  
Dr. Sergio Echeverrigaray**

**CAXIAS DO SUL**

**2007**

**ROBERTO FRANCISCO LUCENA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Aeromonas* EM  
CARCAÇAS SUÍNAS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de  
Mestre em Biotecnologia.**

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 DE DEZEMBRO DE 2007.**

---

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare**

**Comissão examinadora:**

---

**Prof. Dr. Adriano Brandelli – UFRGS – RS**

---

**Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes – ESALQ/USP- SP**

---

**Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi – UCS – RS**

A meus pais, Francisco e Léa por suas histórias de sucesso diante de todas as adversidades.

A minha adorada companheira Ana Lúza,

A minha orientadora, e aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia da UCS.

## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração de uma tese de mestrado é um produto coletivo. Várias pessoas contribuíram para este trabalho tornando esta parte de agradecimentos uma tarefa difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças pelo esquecimento, mas destaco:

A Prof. Dra. Ana Paula Longaray Delamare, pela paciência, confiança, sabedoria e competência com o que conduziu a orientação deste trabalho. Sou inteiramente grato.

Aos Profs. Dr. Sergio Echeverrigaray e Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa, pelos ensinamentos e pelo apoio constante durante todo o trabalho e, principalmente, pela compreensão e estímulo para superar as dificuldades.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada, pela colaboração, convívio, solidariedade e amizade compartilhada em todo esse tempo e pela permanente solicitude em todas as fases do projeto.

À minha companheira Ana Luíza Spinelli Pinto que traz tanta luz e gosto para a minha vida, sua presença foi a responsável pela minha saúde afetiva.

Aos meus pais, não agradeço tanto pela razão biológica, mas agradeço especialmente por uma razão espiritual. Foram eles que me deram a possibilidade, a curiosidade, a coragem de me maravilhar com o mundo, meus eternos agradecimentos.

As professoras Dra. Miriam Salvador e Dra. Suelen O. Paesi que me ofereceram, durante a qualificação, muitas sugestões, exemplos e críticas fundamentais nos ajustes do projeto.

A todas as outras pessoas que embora não nomeadas, me brindaram com seu inestimável apoio e afeto em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	v
<b>LISTA DE QUADROS</b>	vi
<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1. Produção de carne suína no Brasil e no Mundo	3
2.2. Procedimentos operacionais do abate de suínos	5
2.3. O gênero <i>Aeromonas</i>	9
2.3.1. Distribuição e ocorrência de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	11
2.3.2. Aspectos clínicos associados a bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	15
2.3.3. Classificação bioquímica da <i>Aeromonas</i>	17
2.3.4. Uso de Marcadores Moleculares na detecção de <i>Aeromonas</i>	19
2.4. Fatores de virulência e resistência a antibióticos em <i>Aeromonas</i>	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
3.1. Local e procedimento de coleta	25
3.2. Determinação e isolamento de <i>Aeromonas</i> por plaqueamento	27
3.3. Classificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> através de testes bioquímicos	27
3.4. Avaliação de resistência ou sensibilidade a antibióticos	30
3.5. Avaliação fenotípica dos fatores de virulência	31
3.5.1. Atividade proteolítica qualitativa	31
3.5.2. Atividade hemolítica extracelular	32
3.5.3. Atividade <i>lipolítico</i> qualitativa	32
3.5.4. Formação de biofilme	33
3.6. Amplificação do gene <i>lipA</i>	33
3.7. Separação e visualização dos segmentos amplificados correspondente ao gene <i>lipA</i>	34
3.8. Determinação da especificidade do gene <i>lipA</i> na caracterização de	34

<i>Aeromonas</i>	
3.9. Teste de padronização da determinação de <i>Aeromonas</i> por PCR do gene <i>lipA</i>	35
3.10. Enriquecimento de amostras para PCR	35
3.11. Classificação dos isolados por RFLP-PCR do gene 16S rRNA	36
3.12. Análises de bioinformáticas	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
4.1. Utilização da amplificação do gene <i>lipA</i> pela PCR na determinação da presença de <i>Aeromonas</i>	38
4.2. Prevalência de <i>Aeromonas</i> em carcaças suínas.	45
4.3. Caracterização bioquímica e molecular de <i>Aeromonas</i> isoladas de carcaças de suínos	49
4.4. Perfil de resistência a antibióticos em <i>Aeromonas</i> isoladas de carcaças de suínos	57
4.5. Fatores de virulência em <i>Aeromonas</i> isoladas de carcaças de suínos	62
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1-</b> Fluxograma de produção – abate de suínos (Brasil, 1995)	6
<b>Figura 2-</b> Localização da região de origem dos animais amostrados	26
<b>Figura 3-</b> Chave de identificação Aerokey II. Testes bioquímicos para classificação dos isolados do gênero das <i>Aeromonas</i> . (adaptado de Carnahan <i>et al.</i> , 1991).	28
<b>Figura 4-</b> Figura 4. Especificidade do PCR <i>lipA</i> na determinação de <i>Aeromonas</i> . Legendas: 1- <i>Salmonella thyphimurium</i> , 2- <i>Aeromonas caviae</i> , 3- <i>Escherichia coli</i> , 4- <i>Staphylococcus aureus</i> , 5- <i>Bacillus subtilis</i> , 6- <i>Staphylococcus epidermidis</i> , 7- <i>Aeromonas sobria</i> , 8- <i>Bacillus megatherium</i> , 9- <i>Enterococcus faecalis</i> , 10- <i>Pseudomonas fluorescens</i> , 11- <i>Sarcina sp.</i> , 12- <i>Citrobacter sp.</i> , 13- <i>Escherichia coli</i> , 14- <i>Lactococcus lactis</i> , 15- Controle negativo.	39
<b>Figura 5-</b> Representação esquemática da região de homologia dos genes <i>lipA</i> (lipase extracelular) e <i>alt</i> (enterotoxina citotóxica) de <i>A. hydrophila</i> ATCC7966. A área riscada corresponde a região de anelamento dos primers utilizados.	41
<b>Figura 6-</b> Dendrograma (Fast Minimum Evolution) baseado na análise de BLAST utilizando a seqüência de aminoácidos da lipase extracelular de <i>A. hydrophila</i> ATCC7966.	42
<b>Figura 7-</b> Amplificação pela PCR do gene <i>lipA</i> com distintas quantidades de <i>Aeromonas</i> na amostra. Legenda: 1- 10 <sup>4</sup> células/reação, 2- 10 <sup>3</sup> células/reação, 3- 10 <sup>2</sup> células/reação, 4- 10 <sup>1</sup> células/reação, 5- 1 células/reação, B- controle negativo.	43
<b>Figura 8-</b> Amplificação do gene <i>lipA</i> por PCR utilizando distintas diluições de amostra enriquecida por 24h a 37°C em água peptonada alcalina. Legenda: 1- amostra não diluída, 2- diluição 1/5, 3- diluição 1/10, 4- diluição 1/20 e 5- diluição 1/40.	44
<b>Figura 9-</b> Perfil da amplificação pela PCR do <i>primer lipA</i> em agarose 1,5%. O teste comparou o efeito de enriquecimento (E) em água peptonada alcalina (24 horas a 37°C) com as amostras diretas de campo sem enriquecimento (N), ambas diluídas 1/10 para inclusão nas reações de PCR.	45
<b>Figura 10 A e B-</b> Identificação de <i>Aeromonas sp.</i> em amostras enriquecidas e diluídas (1/10) de 60 carcaças de suínos, coletadas na sangria,	

	através da amplificação pela PCR do gene <i>lipA</i> .	46
<b>Figura 11-</b>	Crescimento de <i>Aeromonas</i> sp. em meio M-Aer, colônias com coloração amarelada.	47
<b>Figura 12-</b>	Amostras de <i>Aeromonas</i> clivadas com as Enzimas <i>Alu I</i> e <i>Mbo I</i> . Amostras clivadas (em seqüência): 1- IBAer002 (padrão <i>A. sobria</i> ), 2- IBAer001 (padrão <i>A. hydrophila</i> ), 3- IBAer008 (padrão <i>A. caviae</i> ), 4- IBAer140, 5- IBAer141, 6- IBAer142, 7- IBAer144, 8- IBAer145, 9- IBAer146, 10- IBAer150, 11- IBAer151, 12- IBAer153, 13- IBAer 155, 14- IBAer157, 15- IBAer158, 16- IBAer159, 17- IBAer163, 18- IBAer166, 19- IBAer167, 20- IBAer168, 21- IBAer170, 22- IBAer171, e 23- IBAer178. Os números à esquerda representam os pesos moleculares (pb).	53
<b>Figura 13-</b>	Perfil de resistência (%) a antibióticos em <i>Aeromonas</i> isoladas de carcaças suínas	61
<b>Figura 14-</b>	Atividade proteolítica relativa nos distintos isolados de <i>Aeromonas</i> .	64
<b>Figura 15-</b>	Atividade lipolítico relativa nos distintos isolados de <i>Aeromonas</i> .	65
<b>Figura 16-</b>	Atividade hemolítica percentual nos distintos isolados de <i>Aeromonas</i> .	66

**LISTA DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 1-</b> Relação de amostras: municípios de origem, número das carcaças e local de coleta.	25
<b>Tabela 2-</b> Resultados da contagem de <i>Aeromonas</i> em carcaças suínas e do teste da amplificação pela PCR do gene <i>LipA</i> .	48
<b>Tabela 3-</b> Perfil da resistência/susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de <i>Aeromonas</i> de carcaças suínas. Valores representam o tamanho dos halos de inibição em centímetros.	58
<b>Tabela 4-</b> Fatores de patogenicidade de <i>Aeromonas</i> isoladas de suínos.	62

**LISTA DE QUADROS**

	Página
<b>Quadro 1-</b> Fragmentos das seqüências alinhadas dos genes de lipases extracelulares de <i>Aeromonas</i> .	40
<b>Quadro 2-</b> Isolados de <i>Aeromonas sp</i> obtidas de plaqueamento de amostras de carcaça de suínos em meio MAer.	50
<b>Quadro 3-</b> Caracterização bioquímica pela chave Aerokey II (Carnahan <i>et al.</i> , 1991).	51
<b>Quadro 4-</b> Caracterização bioquímica convencional dos em isolados de <i>Aeromonas</i> obtidos de carcaças suínas.	52
<b>Quadro 5-</b> Perfis dos fragmentos de restrição obtidos por RFLP- PCR do 16S RNA dos 60 isolados de <i>Aeromonas</i> .	54
<b>Quadro 6-</b> Comparação entre os métodos de classificação bioquímica e moleculares.	56
<b>Quadro 7-</b> Síntese dos resultados entre os métodos de classificação bioquímicos e moleculares.	57

## RESUMO

A criação de suínos representa uma importante atividade econômica, sendo o Brasil o quarto exportador de carne suína. O aumento da participação brasileira no mercado externo depende da adequação às normas internacionais de qualidade microbiológica nos produtos. Entre os microrganismos encontrados em carnes suínas destacam-se as bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. *Aeromonas* é um gênero de bactérias enteropatogênicas emergente encontrado no trato intestinal de diversos animais, incluindo o porco. No presente trabalho foi avaliada a ocorrência de *Aeromonas* em carcaças suínas na entrada de abate, utilizando plaqueamento e PCR do gene *lipA*. Os isolados foram classificados através de testes bioquímicos e RFLP-PCR 16S rRNA, e avaliados quanto à resistência a antibióticos e fatores de virulência. Os resultados obtidos mostraram que a amplificação por PCR do gene *lipA* representa um método rápido, eficiente e sensível de determinação da presença de *Aeromonas* em amostras de origem animal. Elevada incidência de *Aeromonas* foi constatada tanto por PCR-*lipA* (97%), quanto por plaqueamento (86,7%). As contagens bacterianas em carcaças suínas foi da ordem de 1 a 4 logUFC/100cm<sup>2</sup>. As espécies de *Aeromonas* mais prevalentes em suínos foram *A. media* (35,7%), *A. hydrophila* (26,2%) e *A. caviae* (21,4%). A maior parte dos isolados apresentaram produção de mais de um fator de virulência, indicando o seu potencial patogênico. A alta frequência observada de isolados resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima e tetraciclina é indicativo do uso indiscriminado destes antibióticos durante a criação de suínos. De um modo geral os dados reforçam a necessidade de avaliação de *Aeromonas* em amostras animais e alimentos derivados, assim como o potencial do PCR-*lipA* na determinação qualitativa destas bactérias.

## ABSTRACT

Pork production represents a very important economic activity in South Brazil. Today, Brazil holds the fourth place in pork meat international market. The expansion of Brazilian exports depends on the adequacy to the international rules of microbiological quality. Among the microorganisms currently found in pork meat, the most important ones belong to the genera: *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. *Aeromonas* is a genus of emergent enteropathogenic bacteria found in the intestinal tract of several animals, including pigs. In the present work it was evaluated the occurrence of *Aeromonas* in carcasses of pig using plating and PCR-*lipA* methods. The isolates were classified by biochemical tests and RFLP-PCR 16S rRNA, and evaluated for antibiotic resistance and the production of virulence factors. The results obtained showed that PCR amplification of *lipA* gene represents a rapid, efficient and sensible method to determine the presence of *Aeromonas* in animal samples. High incidence of *Aeromonas* in carcasses of pig was verified both by PCR-*lipA* (97%), and a conventional plating method (86.7%). Bacterial counts in carcasses of pig ranged from 1 to 4 logUFC/100cm<sup>2</sup>. The most prevalent *Aeromonas* species isolated from carcasses of pig were *A. media* (35,7%), *A. hydrophila* (26,2%) and *A. caviae* (21,4%). Most isolates showed the production of more than one virulence factor, indicating their pathogenic potential. The high frequency of sulfamethoxazole/trimethoprim and tetracycline resistant isolates is indicative of the indiscriminate use of these antibiotics during pig production. In general, the present results reinforce the necessity of *Aeromonas* evaluation in animal samples and derived products, as well as the potential of PCR-*lipA* in the qualitative determination of *Aeromonas*.

## 1. INTRODUÇÃO

A carne suína vem liderando o ranking do consumo mundial de proteína animal. Sua participação no mercado internacional tem obtido uma significativa ampliação, sendo que o Brasil, atualmente, ocupa a quarta posição em produção e exportação de carne suína do mundo. A produção nacional de carne suína cresceu aproximadamente 6,0% em 2006, atingindo 2,86 milhões de toneladas, resultante do abate de 36,43 milhões de cabeças.

O complexo agroindustrial da carne suína instalado no Brasil tem enfrentado nos últimos anos barreiras que estão dificultando ou restringindo as exportações. O principal entrave são as alegações de ordem sanitária. Assim sendo, é fundamental que a carne fresca e produtos derivados possuam qualidade sensorial, valores nutricionais, e principalmente, biossegurança para garantir a aceitação no mercado mundial.

Nos últimos anos, surtos de doenças bacterianas de origem alimentar têm sido reportados em todo o planeta, alguns causados por agentes denominados de clássicos, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella sp*, mas a grande maioria ocasionada por bactérias emergentes, entre as quais *Aeromonas*.

O interesse crescente pelo gênero *Aeromonas* vem gerando um grande número de estudos sobre a sua complexa taxonomia a fim de se identificar novas espécies e definir grupos patogênicos para o ser humano, assim como estabelecer os fatores de virulência destes microrganismos potencialmente envolvidos no desenvolvimento das síndromes clínicas.

As bactérias do gênero *Aeromonas* estão amplamente difundidas no meio ambiente, estando presentes nos meios aquáticos, nos animais e nos alimentos. As *Aeromonas* podem ser transmitidas aos alimentos pela água contaminada, insetos, fezes de animais que albergam a bactéria, moscas e pessoas que manipulam alimentos.

As *Aeromonas* já foram isoladas de suínos, e detectadas em abatedouros, em diversos pontos do processo de abate, o que demonstra a proliferação e permanência destes

microrganismos nestes ambientes. Entretanto pouco se conhece sobre a prevalência, o comportamento das *Aeromonas* durante as etapas de abate, as fontes de contaminação por estas bactérias e o significado dessa bactéria em alimentos de origem suína no Brasil.

A análise microbiológica é fundamental para estimar-se a extensão da carga microbiana existente na superfície das carnes e carcaças de suínos. A correta caracterização e identificação dos problemas de enfermidades e seus agentes causais é necessária para estabelecer a epidemiologia e lançar mão de métodos de controle e profilaxia. Com base em tais conhecimentos será possível efetuar intervenções estratégicas no abate, processamento e fabricação mediante o uso de métodos de garantia de segurança de produtos alimentícios como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e as Boas práticas de Fabricação (BPF) com enfoques sistemáticos os quais possibilitam identificar riscos específicos e determinar medidas preventivas para seu controle.

A complexidade e a demora na avaliação de *Aeromonas* através de plaqueamento, associada as dificuldades de identificação em nível de espécie, tem levado ao desenvolvimento de sistemas alternativos, a maior parte dos quais baseados em PCR.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Aeromonas* na superfície das carcaças suínas no processo de abate comparando-se o método tradicional por plaqueamento e um método qualitativo com base na amplificação do gene *lipA*. O estudo envolveu também a classificação de isolados de carcaças suínas através de métodos bioquímicos e moleculares, assim como a determinação de fatores de patogenicidade e resistência a antibióticos num conjunto de isolados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Produção de carne suína no Brasil e no Mundo**

A carne suína lidera o ranking do consumo mundial de proteína animal. Em 2005, a carne suína alcançou o volume mundial de 92 milhões de toneladas, tendo a carne de frango uma produção de 58 milhões de toneladas e a de bovino de 52 milhões de toneladas (ABIPECS, 2007).

A China é o maior produtor de carne suína com mais de 50 milhões de toneladas, seguido da União Européia com 21,6 milhões e os Estados Unidos com 9,5 milhões. Estima-se para o Brasil, em 2007, uma produção superior aos 3,0 milhões de toneladas. A posição dos principais países produtores de carne suína não deverá ser alterada pelo menos no curto e médio prazo, uma vez que a diferença entre eles é significativa (ABIPECS, 2007).

O Brasil é um grande expoente neste cenário ocupando a quarta posição em produção e exportação de carne suína do mundo com 2,86 milhões de toneladas equivalente carcaça em 2006, o que corresponde a 3% da produção mundial, com índices de produtividade equivalentes aos de seus principais concorrentes (ABIPECS, 2007). A concentração da produção suína no Brasil está localizada na região sul com 34,21%, seguido do Nordeste com 23,03%, sudeste com 18,95%, centro-oeste com 16,18% e o norte com 7,63%, sendo o estado de Santa Catarina o maior produtor seguido do Rio Grande do Sul e Paraná (Corrêa, 2007).

Em termos gerais, a atividade suinícola se desenvolve de forma consistente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. Excetuando o Mato Grosso, nos demais estados a produção está aumentando nas integrações e cooperativas. No sistema de integração as empresas integradoras disponibilizam recursos, na forma de insumos como rações, leitões para engorda, medicamentos e assistência técnica, para as granjas de produção. Por sua vez, o produtor integrado participa no ciclo produtivo com as

suas instalações e mão-de-obra. A expansão destaca-se entre os produtores integrados, em detrimento da suínocultura independente, que trabalha sem contrato antecipado de comercialização (ABIPECS,2007).

A disponibilização de carne suína para o mercado interno, em 2006, foi de 2.342 mil toneladas, o que possibilitou um consumo *per capita* de 12,7 kg/habitante/ano. Este consumo *per capita* coloca o Brasil em posição inferior ao vigésimo quinto colocado, mas em sexto lugar em volume de consumo. O contraste é perceptível quando se analisa o consumo por habitante na Dinamarca com 76 Kg/habitante/ano e Espanha com 66 kg/habitante/ano (ABIPECS, 2007).

O volume de carne exportada em 2006 atingiu o montante de 528,2 mil toneladas, contra 625,1 mil toneladas no ano anterior, representando 14% do total exportado no mundo. A redução ocorreu em função de barreiras sanitárias impostas, principalmente, pelo mercado russo. A Rússia permaneceu como o principal destino exportador, respondendo por 51% do mercado, seguido de Hong Kong, Ucrânia, Cingapura, Moldávia, Argentina e outros (ABIPECS, 2007).

Com relação às exportações de carne suína, é preocupante o direcionamento da exportação para um determinado país, como é o caso da Rússia, ao qual o Brasil destina mais da metade de sua exportação. Este fato torna o Brasil vulnerável a qualquer medida restritiva tomada com objetivo de negociar preços, volume exportado, cotas de importação, e da adoção de medidas sanitárias.

As exportações continuam a influenciar o comportamento recente da produção brasileira por representarem em torno de 20,0% da produção, contribuindo para a modernização da cadeia suína. Por outro lado, as exportações tem um peso significativo no comportamento dos preços no mercado interno, fato que até certo *pronto* tem limitado a expansão do mesmo.

O Brasil apresenta amplas possibilidades de se firmar como grande fornecedor de proteína animal quando comparado com os grandes produtores mundiais. O Brasil apresenta um dos menores custos de produção mundial, e produz carcaças de qualidade comparável a dos grandes exportadores. O mercado internacional tem sinalizado para o crescimento das exportações brasileiras de carne suína, com possibilidades de abertura de novos mercados como o do NAFTA, China, África do Sul, Chile e Taiwan. A abertura do Mercado Europeu para a carne suína brasileira deverá merecer atenção especial, assim como também o ingresso no Japão, maior importador mundial. No mercado interno espera-se que, uma crescente recuperação da economia com o conseqüente aumento do poder aquisitivo da população, aumente o consumo *per capita*, estimulando o setor produtivo (Corrêa, 2007).

O Brasil sendo este arcabouço de produtividade necessita dedicar-se ao aspecto da saúde do rebanho nacional e garantir a transformação do animal em carne com excelência de qualidade, inclusive no aspecto de inocuidade. Atualmente, a conquista e manutenção de mercados dependem cada vez mais expressivamente dos aspectos sanitários (Matsubara, 2005). Atento a esta realidade, em 2006 foi lançado oficialmente o Plano Nacional de Suínocultura desenvolvido e implantado pelo governo e pelas entidades representativas dos vários elos da cadeia produtiva com o objetivo de desenvolver a suínocultura como um todo (Corrêa, 2007).

## **2.2. Procedimentos operacionais do abate de suínos**

O abate de suínos e processamento de suas carcaças seguem um fluxograma básico representado na Figura 1. Este fluxograma prioriza os elementos de racionalidade e higiene determinados por legislações brasileiras normatizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em conformidades com legislações internacionais.

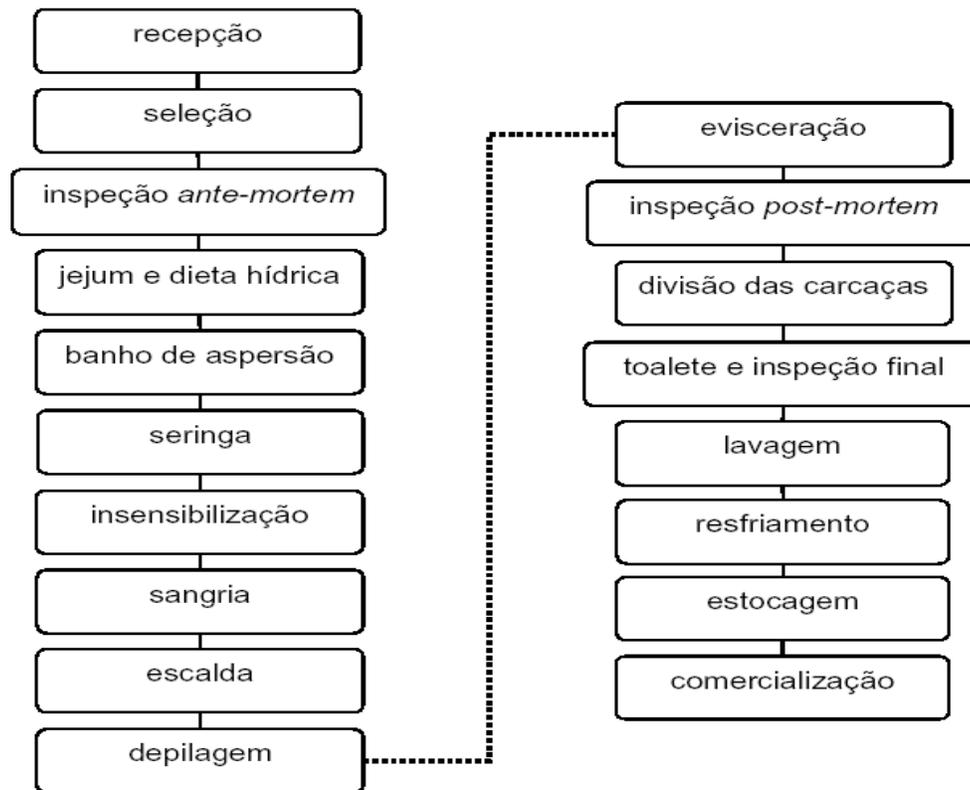


Figura 1 – Fluxograma de produção – abate de suínos (BRASIL, 1995a).

De acordo com Warris (2000), a qualidade da carne suína é o resultado líquido dos efeitos e da interação a longo prazo do melhoramento genético, nutrição, sanidade e manejo de matrizes, e a curto prazo do manejo dos suínos na granja, embarque, transporte, desembarque, período de descanso no frigorífico, método de atordoamento e abate.

A legislação estabelecida pelo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determinou, desde 1998, a implantação paulatina do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nas indústrias de produtos de origem animal. O sistema APPCC já está implantado nos estabelecimentos exportadores e em implantação nos estabelecimentos para abastecimento do mercado interno. Entretanto, ainda é premente a necessidade de pesquisas que subsidiem a implantação e manutenção

deste programa de garantia de qualidade nos estabelecimentos de abate de suínos em todo o território nacional (Socorro *et al.* 2004).

As atividades da inspeção tradicional de carnes, *ante e post-mortem*, fundamentadas na observação e exame clínico dos animais, palpação, cortes de tecidos e vísceras são capazes de identificar animais doentes e condenar suas carcaças para o consumo humano e/ou animal. Por outro lado, a obtenção de carnes inócuas depende também do monitoramento da contaminação por um amplo grupo de microrganismos patogênicos ou deteriorantes não detectados pelos sistemas de inspeção anteriormente citados (Gill & Jones, 1995).

Segundo Borch *et al.* (1996), o abate de suínos é um processo aberto com diversas oportunidades de contaminação da carcaça por bactérias patogênicas e contaminantes. Apesar de não haver nenhum ponto em que os perigos possam ser completamente eliminados, medidas podem ser tomadas no sentido de reduzir sensivelmente a carga microbiana.

Para Rivas *et al.* (2000) as principais fontes geradoras de contaminantes para a carne suína são: (1) os próprios animais (conteúdo gastrointestinal, pele, pêlos, região orofaríngea), (2) os operadores e (3) o meio ambiente do local de abate. Assim sendo, o controle e redução da contaminação microbiana no produto final pode ser obtido mediante a utilização de boas práticas de manejo dos animais pré-abate, de um programa de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos, da sala de abate, da manutenção constante da higiene pessoal e dos procedimentos durante o abate (Borch *et al.*, 1996; Gill & Mcginins, 2000; Martins *et al.*, 2004).

Uma série de etapas do processo de abate contribuem positiva ou negativamente sobre a presença de microrganismos nas carcaças suínas. A primeira destas etapas no fluxograma de abate é a escaldagem, segundo Borch *et al.* (1996) a redução da carga microbiana da pele de suínos durante a escaldagem depende do tempo, condições de uso

dos equipamentos e da resistência bacteriana a altas temperaturas. Já Berends *et al.* (1997), Rivas *et al.* (2000) e Veloso (2000) afirmam que efetuado adequadamente, o processo de escaldagem contribui para uma redução significativa de bactérias mesófilas e psicrófilas, entre as quais, *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *E. coli*, *Salmonella* spp e *Listeria* spp. Pearce *et al.* (2003), observou durante o escaldamento uma diminuição em torno de 3,5 Log da carga microbiana, caracterizando essa etapa como um ponto de controle.

A depilação, fase seguinte a escaldagem, envolve a movimentação intensa dos animais provocando extravasamento de fezes pelo ânus facilitando a distribuição de microrganismos por toda a carcaça. Segundo Berends *et al.* (1997) e Veloso (2000) esta etapa pode aumentar a contaminação superficial da pele com enterobactérias em até 100 vezes. No entanto, Rivas *et al.* (2000) não constataram aumento significativo de *E. coli* após a etapa de depilação. A manutenção e a eficaz higienização da depiladeira é fundamental para a obtenção de carcaças com qualidade higiênico-sanitária aceitável (Rivas *et al.*, 2000; Veloso, 2000; Matsubara, 2005).

Diversos autores concordam que a etapa de chamuscamento é responsável por importante redução na contagem de bactérias aeróbias mesófilas e enterobactérias (Borch *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1997; Gill & McGinnis, 2000; Rivas *et al.*, 2000; Veloso, 2000). Porém, segundo Rivas *et al.* (2000) este procedimento não altera a carga de *E. coli*. Esta aparente discordância é possivelmente fruto da grande variação existente na prática de chamuscagem em distintos estabelecimento, e conseqüentemente, de diferenças na sua eficiência.

A evisceração é uma etapa de alto risco de contaminação microbiológica das carcaças, especialmente em relação às enterobactérias. A ruptura do trato digestivo em qualquer uma de suas porções tem como conseqüência a contaminação massiva da carcaça e vísceras. Rivas *et al.* (2000) constataram aumento da carga microbiana apenas na etapa de evisceração. Gill & Jones (1997) defendem que as operações que oferecem elevada

probabilidade de contaminar as carcaças com *E. coli* e outros potenciais patógenos devam ser consideradas como pontos críticos de controle.

Os principais agentes patogênicos provenientes de material fecal e que contaminam as carcaças suínas são: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (Borch *et al.* 1996).

Do ponto de vista de contenção da multiplicação microbiana, é desejável que nas primeiras horas do resfriamento atinjam-se rapidamente baixas temperaturas, pois, desta forma, não haverá tempo de adaptação especialmente das bactérias (redução da fase lag) para dar prosseguimento à multiplicação sobre a superfície da carcaça. Além disso, a redução rápida da temperatura da carcaça, após a evisceração, é uma manobra eficaz voltada para a diminuição da velocidade de queda do pH muscular e conseqüentemente aumento da capacidade de retenção de água em carcaças de suínos (Maribo *et al.*, 1998).

Lopes & Oliveira (2002), encontraram valores médios em carcaças suínas de 5,25 log UFC/cm<sup>2</sup> (após a divisão de carcaça), 5,17 log UFC/cm<sup>2</sup> (após a lavagem) e 4,99 log UFC/cm<sup>2</sup> (24 h na câmara fria). A água utilizada no escaldamento de suínos revelou-se negativa para coliformes, porém apresentou níveis crescentes de mesófilos ao longo dos trabalhos de abate, atingindo 3,90 log UFC/cm<sup>2</sup>.

### **2.3. O gênero *Aeromonas***

O gênero *Aeromonas* é formado por bacilos Gram-negativos em forma de vírgula, retas com extremidades arredondadas, ou células que se aproximam da forma esférica (1,0 a 3,5 mm em comprimento e 0,3 a 1,0 mm em diâmetro). As bactérias deste gênero são catalase e oxidase positivas, anaeróbicas facultativas, redutoras de nitrato a nitrito, inositol negativas, fermentadoras de glicose e vários outros carboidratos, com

formação de ácido e/ou gás (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005). As *Aeromonas* são microrganismos psicrófilos e mesófilos e produzem diversas exoenzimas e enzimas hidrolíticas, tais como amilases, DNAses, estearases, proteases, lipases, peptidases, entre outras (Carnahan & Altwegg, 1996; Altwegg, 1999; Koneman *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 2003; Bernardes *et al.*, 2003; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005). Estas bactérias podem se apresentar isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, sendo geralmente monotríquias, embora flagelos peritríquios possam ser formados em culturas jovens em meio sólido (Carnahan & Altwegg, 1996; Koneman *et al.*, 2001).

As bactérias do gênero *Aeromonas* crescem em uma ampla faixa de condições ambientais: valores de pH entre 4 e 10, concentrações salinas de até 6,5%, temperatura de crescimento entre 4°C a 42°C, sendo 28-30°C, a temperatura ideal de crescimento (Blair *et al.*, 1999; Delamare *et al.*, 2000; Zucolotto *et al.*, 2006).

Alguns estudos demonstram que as bactérias do gênero *Aeromonas* a 5°C são capazes de quadruplicar sua população em curto espaço de tempo, indicando a possibilidade de crescimento psicrotrófico competitivo em grande variedade de alimentos (Palumbo *et al.*, 1989; Kirov *et al.*, 1993a; Kirov *et al.*, 1993b). É importante ressaltar que cepas de *Aeromonas hydrophila* mantidas sob temperatura de refrigeração (5°C), comumente utilizada no armazenamento e conservação de alimentos perecíveis, são capazes de produzir enterotoxinas e hemolisinas (Majeed *et al.*, 1990).

Este grupo de bactérias pode ser distinguido da família Enterobacteriaceae pelo teste positivo de oxidase (Baron *et al.*, 1994; Altwegg, 1999, Koneman *et al.*, 2001). Entretanto, devido ao pequeno número de caracteres diferenciais encontram-se dificuldades na classificação de *Aeromonas* dentro do grupo dos bacilos Gram-negativos oxidase-positiva, entre os quais se encontram os gêneros *Aeromonas*, *Pleisiomonas*, *Vibrio* e *Pseudomonas*. Segundo Baron *et al.* (1994), as características diferenciais mais

importantes de *Aeromonas* dentro dos bacilos oxidase positivos são a resistência ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato), a capacidade de fermentação de glicose, a produção de ácido a partir de manitol, a liquefação da gelatina e a ausência de crescimento em NaCl 1,44 M (Baron *et al.*, 1994).

Durante algum tempo o gênero *Aeromonas* foi classificado dentro da família Vibrionaceae (Carnahan & Altwegg, 1996; Altwegg, 1999). Entretanto, análise de seqüências de 16S rRNA e 5S rRNA levaram a criação de uma nova família denominada Aeromonadaceae (Martinez-Murcia *et al.*, 1992).

Com base em caracteres bioquímicos, na hibridização DNA-DNA, e outros métodos moleculares 15 genoespécies ou grupos de hibridização, e 14 fenoespécies tem sido validadas ou propostas (Popoff *et al.*, 1981; Carnahan & Altwegg, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Chacón *et al.*, 2003). Entre estas, apenas cinco (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) são reconhecidas como patógenos humanos (Janda & Abbott, 1998).

### **2.3.1. Distribuição e ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas***

As bactérias do gênero *Aeromonas* são ubíquas em ambientes aquáticos sendo facilmente isoladas em águas doces ou marinhas em praticamente todas as latitudes (Handfield *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Janda & Abbott, 1998; Chacón *et al.*, 2003). Em rios limpos ou no mar as contagens variam entre  $10^1$  e  $10^2$  UFC/ml, podendo chegar a número acima de  $10^8$  UFC/ml em esgotos, o que indica que níveis elevados de matéria orgânica na água favorecem o desenvolvimento destas bactérias. Em águas potáveis as contagens são da ordem de  $10^1$  a  $10^3$  UFC/ml (Holmes *et al.*, 1996). Estas bactérias são também freqüentes em peixes, frutos do mar, fezes de animais, podendo ser encontradas eventualmente em fezes humanas (Koneman *et al.*,

2001; Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2003). Estudo realizado no interior de São Paulo mostrou a presença de *Aeromonas* em 4,6% das amostras de água tratada e em 42,4% das amostras de águas não tratadas, indicando o risco potencial do consumo de água não tratada ou submetida a tratamento inadequado.

As bactérias do gênero *Aeromonas* tem sido também frequentemente encontradas em águas utilizadas para diferentes fins, isoladas em indústria de alimentos, em águas de abastecimento público, água engarrafada e em diferentes fontes de água utilizadas na irrigação agrícola, e em águas utilizadas para lavagens de alimentos. Neste sentido, Araujo *et al.* (1989) e Neves *et al.* (1990) observaram correlação, particularmente em águas poluídas, entre presença de *Aeromonas* sp. e de microrganismos do grupo dos coliformes, normalmente utilizados como indicadores da qualidade higiênico-sanitária da água. Em águas livres de poluição foi verificada a presença de *Aeromonas* e não de coliformes, o que de acordo com Abeyta Júnior *et al.* (1990) pode caracterizar a origem não fecal das *Aeromonas* sp. ou a sua capacidade de crescimento e competição em ambientes aquáticos. Cabe lembrar que *Aeromonas* não necessitam de um hospedeiro humano ou animal para se multiplicar (Rocha, 2004).

Além dos ambientes aquáticos, as *Aeromonas* são encontradas em grande número de alimentos frescos tanto de origem animal como vegetal, e alimentos processados, inclusive naqueles refrigerados (Buchanan & Palumbo, 1985; Saad *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000). No Brasil, a presença de *Aeromonas* foi constatada em 43% das amostras de vegetais comercializados na CEASA de São Paulo (Saad *et al.*, 1995), com números que variavam entre  $10^2$  a  $2 \times 10^6$  UFC/g.

No que diz respeito a animais e produtos de origem animal, Morse & Hird (1984) isolando bactérias de linfonodos de 280 suínos abatidos na Califórnia constataram a presença de 5,7 % de animais positivos para a presença de *A. hydrophila*. Já Olsson *et al.* (2003) com a análise do 16S rRNA demonstrou a presença de 17,1% de *Aeromonas* em

cortes suínos estocados a baixa temperatura. Em trabalhos realizados na Tailândia foram observados que 67% das carnes de suínos comercializadas tinham a presença de *Aeromonas*, com alta prevalência de *A. hydrophila* (Saiyudthong & Japakaset, 2001). Em trabalho semelhante, Soithong & Jantima (2001) constataram elevadas frequências de *Aeromonas* em amostras de carne de suínos, aves e bovinos comercializadas na Tailândia.

Com o objetivo de verificar a capacidade enterotoxigênica de cepas de *Aeromonas* sp. isoladas em diferentes produtos e locais no fluxograma de abate bovino, Costa & Rossi Júnior (2002) testaram 102 cepas (18 isolados de *A. hydrophila*, 65 de *A. caviae* e 19 atípicas) em testes de inoculação intra-gástrica em camundongo lactente e em alça intestinal ligada de coelho. Este trabalho permitiu identificar três cepas produtoras de enterotoxinas caracterizadas como *A. hydrophila*, originárias das mãos do manipulador antes que ele iniciasse seus trabalhos e, da carne desossada pronta para o consumo, e um isolado de *A. caviae*, também proveniente das mãos. Os resultados são preocupantes pela presença de cepas enterotoxigênicas de bactérias do gênero *Aeromonas* em indústria de alto nível higiênico-sanitário.

Análises de água de abastecimento e escoamento de abatedouros de bovinos em Porto Alegre (RS) permitiram constatar a presença de *Aeromonas* em 21,4% das amostras, o que sugeriu como fonte de contaminação a água de abastecimento (Bizani & Brandelli, 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Rossi *et al.*, (2001) em outros abatedouros.

Já em aves, Costa & Rossi Júnior (2002), avaliaram 200 amostras de diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frangos. Isolaram *Aeromonas* spp. em 36% das amostras de penas, em 56% de fezes, em 72% de carcaças evisceradas, não evisceradas, e resfriadas, e em 80% de água de pré-resfriamento. Neste trabalho, não foram isoladas *Aeromonas* spp. da água de abastecimento da indústria e da água do tanque de escaldagem.

As análises de mexilhões comercializados no Rio de Janeiro mostraram a presença de *Aeromonas* em 86% das amostras, sendo *A. media* a espécie mais freqüente (Pereira *et al.*, 2004). Na Espanha, Miñana-Galbis (2002) encontraram 45,5% de *A. caviae* em amostras de moluscos bivalves.

Castro-Escapurlli *et al.* (2003) evidenciaram a presença de *Aeromonas* em 32,8% das 250 amostras de peixes congelados de água doce comercializados no México. A caracterização bioquímica dos isolados mostrou: *A. salmonicida* (35,36%), *A. hydrophila* (20,73%), *A. caviae* (17,07%), *A. veronii* bv *sobria* (13,42%) e *A. eucrenophila* (13,42%). Por outro lado, em estudo realizado na Turquia, *Aeromonas* foram isoladas de 15,8% dos salmões retirados do Mar Negro (Dugenci & Candan, 2003).

Bulhões *et al.* (2007) analisaram amostras de queijo-de-minas frescal artesanal, adquiridas no comércio varejista dos municípios de Poços de Caldas - MG e Jaboticabal - SP, constatando a presença de *Aeromonas* em 51,2% das amostras, com populações que variavam de  $5,0 \times 10^3$  a  $4,0 \times 10^5$  UFC/grama. Foram identificadas as espécies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas schubertii*, além de cepas consideradas atípicas.

As variáveis que determinam a distribuição e incidência de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de águas, alimentos ou isolados clínicos, assim como suas propriedades de virulência associadas, podem ser alteradas de acordo com a região de localização geográfica (Bizani & Brandelli, 2001). Fatores que favorecem a variabilidade e a estabilidade destes microrganismos em alimentos são, em sua maior parte, atribuída a condições de: pH neutro, umidade, e principalmente, temperatura, considerando uma larga escala de tolerância, que pode oscilar de 5 a 42°C (Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2003). Além de tolerância e capacidade de crescimento em baixas temperaturas, algumas espécies de *Aeromonas* apresentam tolerância à salinidade (Delamare *et al.*, 2000), o que lhes confere o potencial de manter elevada viabilidade ou mesmo, crescer em

concentrações salinas comumente utilizadas na conservação de produtos alimentícios de origem animal e vegetal.

### **2.3.2. Aspectos clínicos associados a bactérias do gênero *Aeromonas***

As bactérias do gênero *Aeromonas* são consideradas agentes emergentes de toxinfecções alimentares e oportunistas para o homem e animais (Albert *et al.*, 2000). Nas últimas décadas estas bactérias têm sido reconhecidas como patógenos humanos emergentes, sendo associadas a gastroenterites, endocardites, infecções oculares, meningites, abscessos intra-abdominais, osteomielites, peritonites, infecções dos tratos respiratório e urinário, septicemia (Burke *et al.* 1983; Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000; Bizani & Brandelli, 2001; Koneman *et al.*, 2001; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005), síndrome urêmica hemolítica (Janda *et al.*, 1995), entre outras. Isolados de *Aeromonas* foram detectados em feridas de pacientes que sofreram lesão seguida de exposição à água (Ghenghesh *et al.*, 2001), sendo *A. hydrophila* o principal agente causal nestes casos (Abbott *et al.*, 2003). Estes fatos tornam o gênero de interesse clínico e de saúde pública. (Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000).

Segundo Abbott *et al.* (2003), a gastroenterite é a infecção humana mais prevalente causada por *Aeromonas* spp. As gastroenterites associadas a estes microrganismos acometem principalmente crianças menores de cinco anos de idade, indivíduos imuno deprimidos, e idosos porém, casos em adultos são freqüentes (Burke *et al.* 1983; Janda *et al.*, 1995; Nojimoto *et al.*, 1997). Em humanos, as infecções gastrintestinais, são atribuídas à ação de enterotoxinas. As espécies mais relatadas neste quadro clínico são *A. caviae*, *A. hydrophila*, e *A. veronii* biovar *sobria* (Janda & Abbott, 1998). Outras espécies de *Aeromonas*, tais como, *A. schubertii* e *A. jandaei* são relatadas como potencialmente patogênicas para seres humanos (Kannan *et al.*, 2001).

Estudos demonstram uma relação direta entre a ingestão de alimentos contaminados com espécies de *Aeromonas* e o desenvolvimento de doenças gastrintestinais (Saad *et al.*, 1995; Janda *et al.*, 1995; Altwegg, 1999; Santos *et al.*, 1999). Entretanto, a ingestão de água contaminada (Koneman *et al.*, 2001; Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2003) e a transmissão por mosca doméstica (Echeverria *et al.*, 1983) não podem ser descartadas.

A gravidade das infecções entéricas por *Aeromonas* é variada, podendo ser autolimitada ou apresentar-se como uma doença severa semelhante à cólera. O paciente com gastroenterite por *Aeromonas* apresenta diarreia líquida, febre, vômitos, dor abdominal, e em casos mais graves, diarreia mucosanguinolenta (Buchanan & Palumbo, 1985; Gosling, 1996). A incidência de gastroenterite por *Aeromonas* tende a ser mais elevada no período de verão do que em outras estações (Burke *et al.* 1983; Lakshmanaperumalsamy *et al.*, 2004).

A possibilidade de que gastroenterites por *Aeromonas* seja consequência da ingestão de toxinas pré-formadas presentes nos alimentos (Majeed *et al.*, 1990) é reforçada pela constatação de que estas bactérias são capazes de produzir enterotoxinas e hemolisinas mesmo a temperaturas de 4°C (Palumbo, 1996).

Estudos realizados na Líbia permitiram detectar *Aeromonas* em 15% das crianças com diarreia e 18% das crianças sem diarreia, sendo *A. caviae* a espécie mais frequente (Ghenghesh *et al.*, 1999). No Irã foram analisadas 50 amostras fecais, isolando *A. hydrophila* em 28 (56%) de amostras diarréicas e 22 (44%) em um grupo controle (Aslani & Hamzeh, 2004). Na Índia, Subashkumar *et al.* (2006) confirmaram a presença de *A. hydrophila* em 9,7% de amostras diarréicas em crianças. Na Austrália, Kirov (1993a), constatou aumento dos níveis de *Aeromonas* na água tratada coincidindo, com o aumento de sua incidência associada a gastroenterites nos meses de verão.

No estado do Rio Grande do Sul, Guerra *et al.* (2001), identificou bactérias do gênero *Aeromonas* em 57,4% das diarreias bacterianas em pacientes do Hospital Geral de Caxias do Sul, evidenciando maior incidência em crianças. Zanella (2002) detectou a ocorrência de *Aeromonas* em fezes (não diarréicas) de trabalhadores de aviários da região noroeste do Estado.

No primeiro semestre de 2004 ocorreu um surto de diarreia em São Bento do Una, Pernambuco, registrando-se 2170 casos. A faixa etária mais acometida foi a de crianças de 0 a 4 anos (taxa de ataque=8,7%) comparando com as outras faixas etárias. Dentre as 582 coproculturas realizadas 145 (25%) revelaram um enteropatógeno bacteriano, destacando 114 casos (19,5%) com a participação de *Aeromonas*, representadas por *Aeromonas caviae* (9,8%), *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (3,9%), *Aeromonas veronii* biovar *veronii* (2,6%) e outras espécies (3,2%). Nos 31 episódios restantes (5,3%), foram detectados *V. cholerae* *O*<sub>1</sub> *Ogawa* toxigênico (3,1%), *Salmonella spp* (1,4%), *Shigella spp* (0,5%) e *Vibrio cholerae não O*<sub>1</sub>/*não O*<sub>139</sub> (0,3%) (Hofer *et al.*, 2006).

Na cidade de Goiânia, Goiás, no período de dois anos (1995 e 1996) foram analisadas 163 amostras de fezes de crianças com idade inferior a 5 anos, sendo 91 de fezes diarréicas e 72 de fezes não diarréicas. Este trabalho identificou a presença de *Aeromonas* em 20 amostras (21,9%) sendo que *A. caviae* foi encontrada em 7,7% dos casos a *A. salmonicida* em 6,6%, *A. sobria* em 4,3%, *A. hydrophila* em 2,2% e a *A. salmonicida achromogenes* em 1,1%. Nenhuma *Aeromonas spp* foi isolada dos 72 pacientes-controle (Nojimoto, 1997).

### **2.3.3. Classificação bioquímica da *Aeromonas***

As *Aeromonas* compartilham características bioquímicas com enterobacteriaceae, mas as aeromonadaceas diferem destas pela reação positiva ao teste da oxidase. Porém, outros gêneros de bacilos Gram-negativos e oxidase positivos existem: *Pseudomonas*,

*Plesiomonas* e *Vibrio*, exigindo a realização de testes complementares como: resistência ao agente vibriostático O/129, ausência de crescimento em ágar tiosulfato citrato-sais biliares-sacarose (TCBS), ausência de crescimento em meio com 6,5% de NaCl, crescimento em meio sem cloreto de sódio, produção de ácido a partir de manitol e fermentação de glicose (Blair *et al.*, 1999; Abbott *et al.*, 2003).

Tipicamente, a identificação do gênero *Aeromonas* envolve a coloração de Gram (bacilos Gram-negativos), testes da oxidase e teste de catalase positivos, e resistência ao agente vibriostático O/129 (Koneman *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 2003).

De acordo com Bernardes *et al.*, (2003) as características bioquímicas que podem diferenciar as espécies de *Aeromonas* incluem: hidrólise da esculina, utilização da L-histidina, L-arginina, L-arabinose, fermentação da salicina, produção de gás a partir da glicose e ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) a partir da cisteína.

Além de provas bioquímicas, Koneman *et al.*, (2001) sugeriram uma rápida diferenciação de espécies de *Aeromonas*, através da avaliação do “fenômeno suicida”. Este procedimento se fundamenta na inibição do crescimento de algumas espécies de *Aeromonas* quando cultivadas em caldo contendo 0,5% de glicose, por um período de 24 horas, em uma faixa de temperatura de 30-37°C. Neste período, dependendo da temperatura, ocorre declínio diferencial nas culturas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*.

Tradicionalmente, as *Aeromonas* são classificadas ao nível de espécies através de uma série de testes bioquímicos de rotina, dentre os quais os mais importantes são: produção de H<sub>2</sub>S a partir de cisteína, fator CAMP, atividade β-hemolítica, motilidade, produção de gás a partir de glicose, produção de indol, atividades de lisina, ornitina e arginina descarboxilase, teste de esculina, e crescimento em arabinose, sacarose, manitol e inositol (Koneman *et al.*, 2001).

Em 1991, Carnahan e colaboradores, descreveram uma chave dicotômica e flexível (Aerokey II) para identificação de espécies de *Aeromonas*, baseada em sete testes bioquímicos: hidrólise da esculina, gás de glicose, ácido de arabinose, produção de indol, ácido de sacarose, reação de Voges-Proskauer e resistência a cefalotina. Esta chave de classificação simplificada apresentou eficiência de 97% para as espécies comumente associadas a casos clínicos humanos. Além disto, a chave mostrou-se eficiente para a classificação de *A. veronii* biovar *veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, e *A. trota*. Entretanto, Millership (1996) e Abbott *et al.* (2003) mostraram que os testes bioquímicos devem ser tomados com cautela, já que reações atípicas são comuns neste gênero e podem levar a erros de classificação.

#### **2.3.4. Uso de Marcadores Moleculares (gene *lipA*) na detecção e classificação de *Aeromonas*.**

O diagnóstico microbiológico utilizado na identificação de *Aeromonas* é em geral demorado, levando mais de 48 h para sua consumação. A utilização da técnica da amplificação de genes pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) pode diminuir esse período. A realização da PCR direto de material clínico, alimentos ou cultivos têm sido possível, mas é importante considerar que sofrem interferências com as diferentes substâncias presentes nas amostras como, concentrações elevadas de proteínas, gordura, íons cálcio, sais biliares e componentes de meios de cultivo os quais podem inibir a técnica (Rossen *et al.*, 1992).

A identificação de isolados bacterianos é um passo fundamental para a realização de estudos epidemiológicos, já que possibilita o acompanhamento de um determinado microrganismo em distintos ambientes e organismos. Assim sendo, diversos sistemas fenotípicos e genéticos têm sido avaliados quanto a sua eficiência na caracterização de isolados de *Aeromonas* (Miyata *et al.*, 1995).

Conforme discutido anteriormente, alguns autores não consideram os testes bioquímicos totalmente eficientes para o diagnóstico de *Aeromonas* sp., pois estes não conseguem diferenciar com precisão as espécies do gênero, desde as mais freqüentes, até as que foram recentemente descritas (Borrel *et al.*, 1997; Chacón, *et al.*, 2003; Saavedra, *et al.*, 2006).

Em decorrência da necessidade de diagnósticos que permitam maior certeza, nos últimos anos, um número relativamente grande de técnicas baseadas na análise de DNA tem sido introduzido no campo da caracterização e taxonomia bacteriana. Técnicas como hibridização DNA-DNA, marcadores de DNA (RAPD), e amplificações de genes específicos através da PCR, possibilitam a classificação do gênero *Aeromonas* (Carnahan & Altwegg, 1996; Delamare, 1999; Saavedra *et al.*, 2006).

Mesmo sendo eficiente na determinação de espécies, a hibridização DNA-DNA, não conseguiu solucionar todas as controvérsias que existem na taxonomia de *Aeromonas* (Carnahan & Altwegg, 1996; Borrel *et al.*, 1997). Portanto, outros métodos têm sido propostos para conhecer as relações filogenéticas do gênero.

Segundo Borrel *et al.* (1997), a técnica de RFLP - PCR, que analisa a seqüência do gene 16S rRNA, mostrou ser um bom método para classificar *Aeromonas*. Isto ocorre em virtude de que a seqüência deste gene, apesar de possuir alta similaridade entre as espécies, também apresenta sítios de restrição espécie específicos.

A taxonomia de *Aeromonas* sofreu recentemente grandes alterações, aumentando o número de espécies descritas e a sua identificação fenotípica tornou-se extremamente difícil e ambígua (Carnahan & Joseph, 2005; Saavedra *et al.*, 2006).

Os estudos filogenéticos baseados nas seqüências de genes relativamente conservados, permitiram identificar uma notável diversidade de espécies de *Aeromonas* em produtos cárneos de suíno e no ambiente do matadouro, onde constatou-se que a transmissão hídrica tem um papel relevante (Saavedra *et al.*, 2007).

## 2.4. Fatores de virulência e resistência a antibióticos em *Aeromonas*

O mecanismo de patogenicidade das *Aeromonas* é considerado multifatorial, sendo sua ação classificada como de nível não intestinal e gastrentérica (Ko & Chuang, 1995). Dentre os principais fatores de virulência podem ser destacados, a produção de biofilme, enterotoxinas (hemolíticas, citotônicas e citotóxicas), proteases, nucleases, lipases e outras proteínas com papel patogênico ainda pouco definido (Botarelli & Ossiprandi, 1999).

As enterotoxinas produzidas por *Aeromonas* são substâncias extracelulares, que podem agir sobre o epitélio intestinal produzindo inflamação. Neste sentido, Albert *et al.* (2000), identificaram três genes de enterotoxinas: *act*, que codifica uma enterotoxina citotóxica (Act), e os genes *alt* e *ast*, responsáveis por duas enterotoxinas citotônicas (Alt e Ast). Act é uma toxina que possui atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica. Por outro lado, Alt e Ast apresentam atividade enterotóxica, causando elevação dos níveis de AMP cíclico e prostaglandinas em modelos animais.

A atividade hemolítica em isolados de *A. hydrophila* foi verificada na década de 60 e Wretlind *et al.* (1971), identificaram duas hemolisinas, mediante focalização isoelétrica: a aerolisina (AerA), correspondente a enterotoxina citotóxica Act (Albert *et al.*, 2000) e a hemolisina HlyA, semelhante aquela produzida por *Vibrio cholerae* (Zhang *et al.*, 2000).

Algumas cepas de *Aeromonas* possuem ampla gama de fatores de virulência, e alta capacidade invasiva. Muitos autores relacionam a virulência de *Aeromonas* com a produção de enzimas proteolíticas extracelulares (Botarelli & Ossiprandi, 1999; Santos *et al.*, 1999; Cascón *et al.*, 2000; Albert *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Fadanelli, 2005). Estes fatores incidem tanto em cepas de origem ambiental, como em amostras clínicas (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Subashkumar *et al.*, 2006).

Artigos relatam que aerolisina contribui para a virulência de *A. hydrophila*, estando bem difundidas dentro do gênero (Santos *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Analisando a

distribuição de alguns genes de virulência em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas sp.* Chacón *et al.* (2003), detectaram que 72,6% do total de linhagens analisadas eram positivas para o gene da aerolisina sendo que a sua presença foi mais freqüente em isolados clínicos do que em ambientais.

A expressão de alguns genes é regulada pela quantidade de homoserina-lactona, molécula sinalizadora de *quorum-sensing* (Swift *et al.*, 1999), e por fatores ambientais, assim, os produtos gênicos são liberados quando a população atinge uma massa bacteriana crítica num local favorável (Sandkvist, 2001).

Burke *et al.*(1983) avaliando os microorganismos responsáveis pela diarreia infantil demonstraram que as espécies de *Aeromonas* produtoras de enterotoxinas apresentam biótipos similares. Neste sentido, verificaram que testes para detecção de hemolisina são capazes de discriminar amostras enterotóxicas das não-enterotóxicas com 97% de precisão. Em um estudo da associação de *A. sobria* com infecção humana, Daily *et al.* (1981) demonstraram que as linhagens citotóxicas isoladas apresentavam atividade hemolítica.

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos livres e glicerol. O interesse por estas enzimas tem aumentado devido ao seu papel como importante fator de virulência (Snellman *et al.*, 2002), já que estas são capazes de interagir com os leucócitos humanos e afetar várias funções do sistema imune através da liberação de ácidos graxos (Chuang *et al.*, 1997).

A principal lipase extracelular (Lip) de *A. hydrophila*, codificada pelo gene *lipA*, apresenta 80 kDa e possui atividade máxima para hidrólise de ésteres C<sub>10</sub> e C<sub>12</sub>, e para triacilgliceróis C<sub>8</sub> e C<sub>10</sub>. Verificou-se que esta lipase apresentou elevada atividade no início da fase estacionária do crescimento celular com uma faixa de pH ótimo entre 7,5 - 8,0. A atividade máxima da enzima foi obtida a uma temperatura de 37°C, sendo que, após 30

minutos de incubação a 55°C, apenas 20% da atividade enzimática permaneceu (Chuang *et al.*, 1997).

Além da proteína Lip, as *Aeromonas* são capazes de produzir uma outra lipase extracelular, codificada pelo gene *lipH3*. Esta é capaz de degradar derivados do p-nitrofenil que possuem de C<sub>4</sub> até C<sub>10</sub> em sua cadeia, bem como triacilgliceróis de C<sub>4</sub> a C<sub>8</sub> (Chuang *et al.*, 1997). Outras duas enzimas com atividade fosfolipídica, foram caracterizadas em *Aeromonas*: a fosfolipase C (codificada pelo gene *apl-1*) e a fosfolipase A1 (codificada pelo gene *pla*) (Watanabe *et al.*, 2004).

Embora as propriedades físicas destas enzimas, como, peso molecular, estabilidade térmica e especificidade com substratos diferem uma da outra, a proteína, Lip mostrou forte similaridade com a Lipase H3 (67%) e Apl-1 (65%) (Watanabe *et al.*, 2004).

Devido à importância da lipase na nutrição bacteriana e como fator que afeta as funções do sistema imunológico pela geração de ácidos graxos livres, Cascón *et al.* (2000), têm proposto a identificação do gene *lipA*, através da técnica da PCR, para a avaliação da patogenicidade de isolados de *Aeromonas*. Chacón *et al.* (2003), também relataram em seus estudos uma elevada prevalência do gene *lipA*, já que dos 234 isolados de *Aeromonas* analisados, 221 apresentaram resultados positivos através da técnica da PCR. Em outro estudo, Cascón *et al.* (2000), constataram que 100% dos isolados de *Aeromonas* sp. analisados, apresentaram atividade lipolítico quando plaqueados em meio ágar LB (Lúria Bertani) suplementado com 0,5% de tributirim. Fadanelli (2005), também confirmou a alta prevalência do gene *lipA* em isolados de *Aeromonas*, apontando a possibilidade de utilização deste gene na identificação rápida de bactérias deste gênero.

Em termos de resistência a antibióticos, as *Aeromonas* representam um grupo particularmente preocupante, já que a maior parte das espécies e isolados possuem resistência a um ou mais antibióticos β-lactâmicos, em decorrência da presença de genes que codificam metalo-β-lactamases. Por outro lado, a sua ampla distribuição, associação

com animais e desenvolvimento em sistemas aquáticos e no solo, ajudam a imprimir uma importante pressão de seleção para resistência a outros antibióticos como tetraciclinas, sulfas, etc. Além disso, estas bactérias apresentam elevada capacidade de intercâmbio de genes entre si e com outros grupos bacterianos (enterobactérias, víbrios, etc.) (Carli, 2006).

A resistência à ampicilina é uma característica normalmente encontrada em bactérias do gênero *Aeromonas*, particularmente nas espécies consideradas patogênicas para humanos, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Esta frequência é tão elevada que este antibiótico é utilizado na maior parte dos meios empregados para o isolamento destas bactérias (Palumbo *et al.*, 1985; Albert *et al.*, 2000; Abbott *et al.*, 2003). Entretanto, em outras espécies de *Aeromonas*, como *A. trota*, a sensibilidade à ampicilina parece uma constante.

Trabalhos realizados em nosso laboratório com isolados de *Aeromonas* apresentaram além da resistência à ampicilina, percentagens elevadas de resistência a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A percentagem de resistência ao aztreonam foi de 44%, 40% para ceftazidima, 29% para ceftriaxona e cefotaxima, e 11% para cefoxitina. Quanto à resistência a outros antibióticos, elevada frequência de resistência a cloranfenicol (18%), tetraciclina (16%) e sulfa (15%) foram constatadas entre os isolados analisados. Estes valores diferem em parte daqueles obtidos por Goñi-Urriza *et al.* (2000) que observaram uma frequência de 14% de isolados resistentes à tetraciclina, baixa frequência de resistência ao cloranfenicol, e alta eficiência do cotrimazol sobre isolados de *Aeromonas* obtidos de águas fluviais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local e procedimento de coleta

O presente trabalho foi realizado a partir de amostras coletadas de carcaças suínas em matadouro-frigorífico, localizado no Estado do Rio Grande do Sul, na Encosta Superior do Nordeste. O referido matadouro é um estabelecimento exportador sob controle higiênico-sanitário permanente realizado pelo Serviço de Inspeção Federal. O estabelecimento possui capacidade de abate de 3.500 animais/dia, há uma velocidade de 400 animais/hora.

Os animais analisados foram oriundos de criadouros sob o regime de integração, onde a empresa fornece os animais, ração, medicamentos e assistência técnica.

Foram amostrados 60 animais na entrada do abate logo após a sangria. As coletas foram realizadas nos meses de abril a agosto de 2006. Os animais analisados foram provenientes de 15 municípios do Estado do Rio Grande do Sul pertencentes as regiões Nordeste, Vale do Taquari, Vale do Cai e Centro Norte abrangendo uma ampla área representada na Figura 2. O número de animais amostrados por município variou de 3 a 6 conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação de amostras: municípios de origem, número das carcaças.

<b>Município</b>	<b>Animal/Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Animal/Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Animal/Amostra</b>
Arroio do meio	1 – 2 – 3	Cotiporã	23-24-25-26	Antônio Prado	47-48-49-50-51-52
Guaporé	4-5-6-7	Roca Sales	27-28-29-30	Tupandi	53-54-55-56-57
Guabiju	8 -9-10-11	Pareci Novo	31-32-33-34-35	Selbach	58-59-60
Nova Araçá	12-13-14	Capitão	36-37-38-40		
Nova R. do sul	15-16-17-18	Serafina Correa	40-41-42-43		
Maratá	19-20-21-22	Nova Bassano	44-45-46		

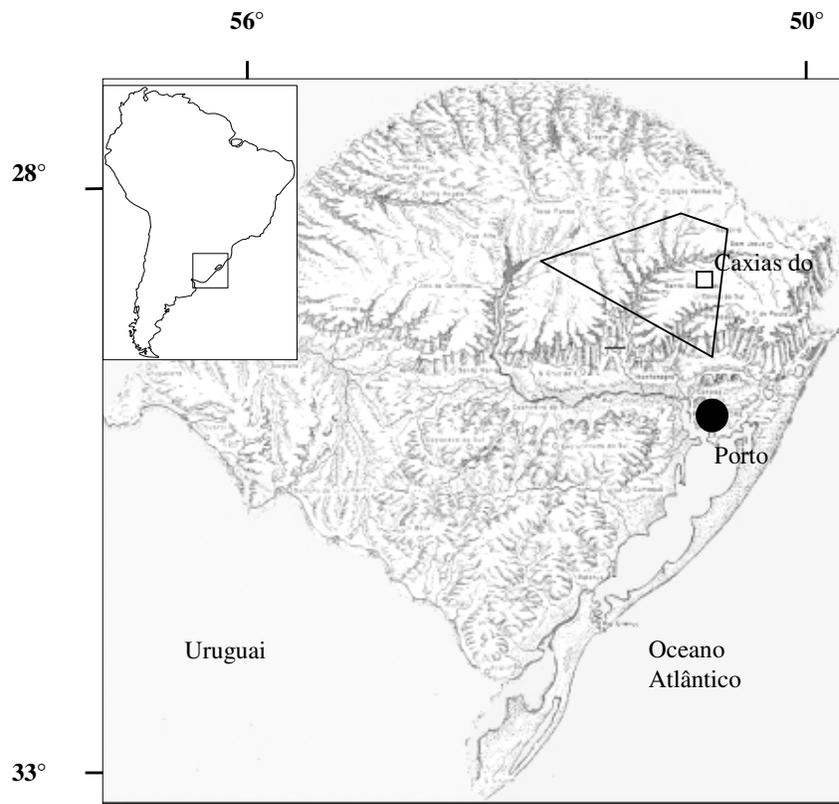


Figura 2- Localização da região de origem dos animais amostrados.

Em cada carcaça foi analisada uma área total de 300 cm<sup>2</sup>, subdividida em três subáreas de 100cm<sup>2</sup>, assim definidas: na região externa da paleta, na região média das costelas e na região externa do pernil. Essas subáreas foram delimitadas por moldes plásticos estéreis com área interna livre de 100cm<sup>2</sup> (10 X 10 cm), onde foram realizados esfregaços superficiais com o auxílio de *swabes* estéreis com haste de madeira, com 5 mm de diâmetro. Em cada subárea foi utilizado um *swabe*, que foi girado e movimentado sobre a superfície no sentido horizontal, perpendicular e transversal ao molde. Em seguida, com o descarte da haste de madeira os *swabes* foram acondicionados em sacos plásticos estéreis tipo “Wirl-Parker”, os três *swabes* constituíram uma amostra.

As amostras foram imediatamente acondicionadas e transportadas ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia/UCS

para a realização das análises. Logo da chegada ao Laboratório foram acrescentados 2 ml de água alcalina peptonada (10 mg/l de peptona pH8,6) por amostra (animal) e realizada a homogeneização. As amostras assim preparadas foram utilizadas imediatamente para os plaqueamentos e para o enriquecimento.

### **3.2. Determinação e isolamento de *Aeromonas* por plaqueamento.**

As amostras diretas e diluídas 1/10 foram plaqueadas em meio de cultura M-*Aeromonas* Selective Agar Base (M-Aer) (Havellar *et al.*, 1987) modificado: 5 mg/l de triptona; 11,4 mg/l de amido solúvel; 2 mg/l de extrato de levedura; 3 mg/l de cloreto de sódio; 2 mg/l de cloreto de potássio; 0,1 mg/l de sulfato de magnésio; 0,06 mg/l de cloreto de ferro; 0,08 mg/l de azul de bromotimol; 0,1 mg/l de desoxicolato de sódio; 13 mg/l de agar; pH 8,0 .

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, procedendo-se à contagem do número de colônias típicas de *Aeromonas* (colônias amareladas e com halo amarelo).

Colônias típicas com morfologia colonial distinta identificadas em cada amostra foram purificadas por esgotamento em placas de M-Aer até a obtenção de isolados puros. Os isolados foram repicados em placas contendo meio LB (Lúria Bertani) (10 mg/l triptona, 5 mg/l extrato de levedura e 5 mg/l cloreto de sódio, 15 mg/l ágar, pH 7,2) e posteriormente acondicionados em tubos com meio LB semi-sólido (LB com 7 mg/l ágar).

### **3.3. Classificação dos isolados de *Aeromonas* através de testes bioquímicos**

A classificação bioquímica dos isolados foi realizada utilizando a chave de classificação AerokeyII (Carnahan *et al.*, 1991) apresentada na Figura 3, e um conjunto de testes bioquímicos presentes nos kits Bactray I e II, da Probac (Curitiba).

Conforme preconizado pelo AerokeyII, os isolados foram inicialmente submetidos à coloração de Gram, teste de oxidase, teste de fermentação de glicose e teste de resistência ao O/129.

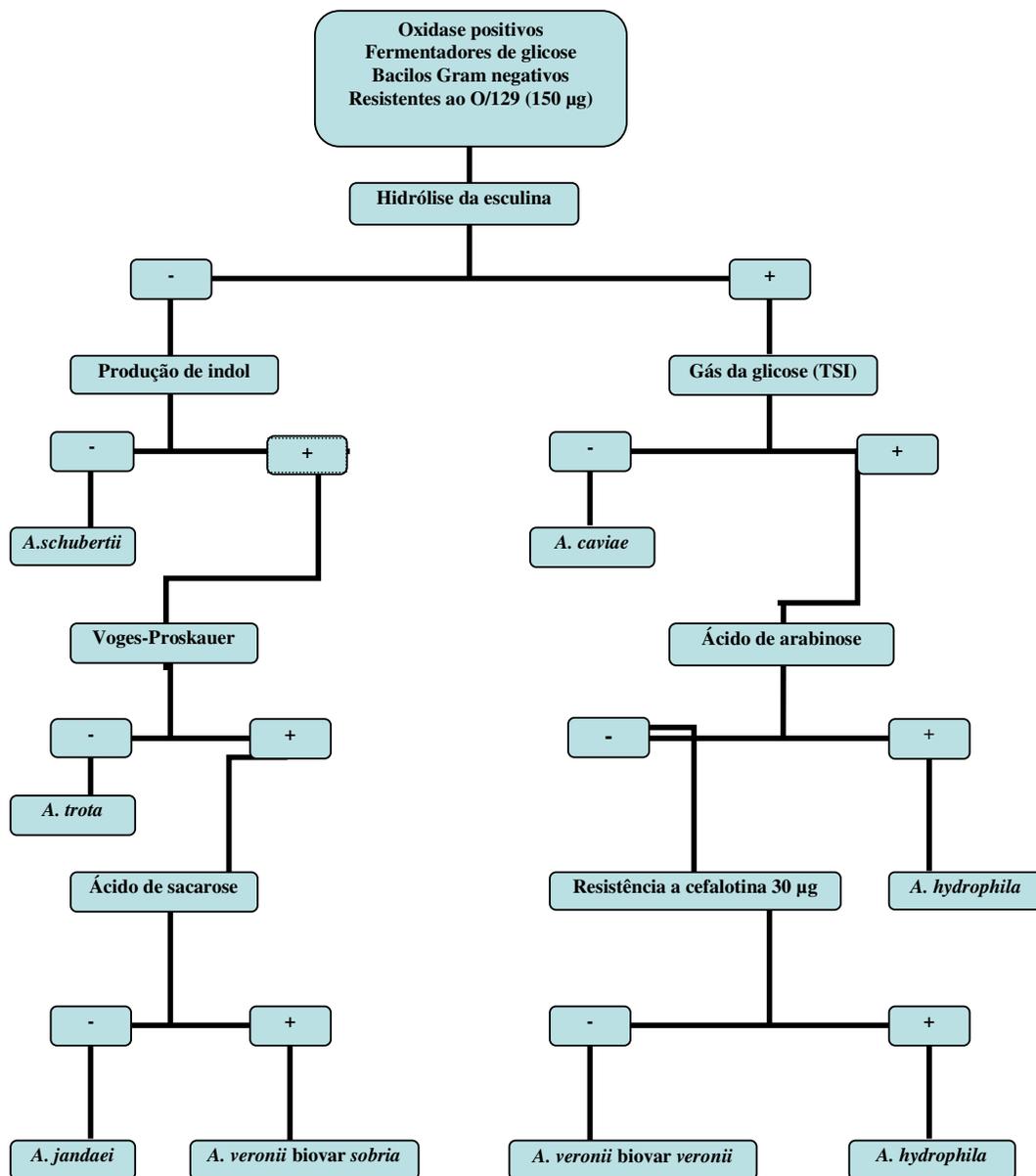


Figura 3 – Chave de identificação Aerokey II. Testes bioquímicos para classificação dos isolados do gênero das *Aeromonas*. (adaptado de Carnahan *et al.*, 1991).

O teste de oxidase foi realizado com tiras Probac contendo tetrametil p-fenilenodiamina, colocando-se uma pequena quantidade de células bacterianas pré-

crescidas por 24h sobre a tira e verificando a oxidação do reagente (coloração púrpura-violeta). A prova de fermentação da glicose foi desenvolvida em Caldo Carboidrato Vermelho de Fenol (peptona 11,1 mg/l ; cloreto de sódio 5,5 mg/l; vermelho de fenol 0,02 mg/l; glicose 55 mg/l ; pH 7,0), conforme Siqueira (1995).

O teste de resistência ao agente vibriostático O/129 indicado por Carnahan *et al.*, (1991), foi realizado em placas de Petri contendo meio de Mueller-Hinton (Difco). Discos impregnados com 150 µg de agente vibriostático O/129 (Oxoid), foram inseridos no centro das placas de Petri, sobre o ágar Mueller-Hinton, entre as amostras inoculadas. As placas foram crescidas em estufa a 36°C/24h. A resistência das amostras foi verificada pelo crescimento bacteriano em toda a extensão do inoculo, desde o ponto mais próximo, até o mais distante do disco contendo o agente vibriostático.

A reação de hidrólise da esculina foi verificada pelo meio ágar esculina (agar triptona de soja (TSA) 40 mg/l ; citrato férrico 0,5 mg/l ; esculina 1 mg/l; pH 7,0), conforme a técnica descrita por Oplustil *et al.* (2004).

A produção de indol seguiu a metodologia proposta por Siqueira (1995). O meio de cultura utilizado foi o Caldo Triptona (10 mg/l de triptona, dissolvido em água destilada). O pH foi ajustado para 6,9.

A prova de Voges Proskauer (VP) foi realizada segundo Siqueira (1995). O meio de cultura utilizado foi o Caldo VM-VP (meio de Clark e Lubs): (peptona de carne 7 mg/l; glicose 5 mg/l ; monofosfato de potássio; pH 6,9).

Para a verificação da produção de ácido a partir de arabinose e sacarose, foi utilizado o meio de Oxidação-Fermentação de Hugh e Leifson, descrito por Koneman *et al.*, (2001), com modificações (peptona 2 mg/l; cloreto de sódio 5 mg/l, arabinose ou sacarose 10 mg/l; azul de bromotimol 0,03 mg/l ; agar 3 mg/l; fosfato dipotássico 0,3 mg/l; pH 7,1).

Para completar os testes as amostras foram testadas quanto a susceptibilidade à cefalotina pelo método por difusão com discos, em ágar de Bauer-Kirby, conforme descrito por Koneman *et al.*, 2001, com adaptações. As amostras foram crescidas em 4 ml de meio Caldo Nutriente (peptona 5 mg/l ; extrato de levedura 3 mg/l , cloreto de sódio 5 mg/l ; pH 6,8), em estufa a 36°C/24h e o diâmetro dos halos foi medido.

Como provas adicionais à Aerokey II, foram realizadas provas para verificação de motilidade, com o meio sulfeto indol motilidade SIM (peptona de caseína 20 mg/l; peptona de carne 6,6 mg/l; citrato férrico amoniacal 0,2 mg/l; tiosulfato de sódio 0,25 mg/l; ágar 3 mg/l; solução de trifeniltetrazólio 10 mg/l; pH 7,3), descrito por Siqueira (1995) sendo que o controle negativo para motilidade foi a cepa de *S. aureus*.

Além dos testes anteriormente descritos os isolados foram também avaliados utilizando os kits Bactray I e II da Probac, seguindo as indicações do fabricante. Estes sistemas miniaturizados de classificação de bactérias incluem testes de: esculina, glicose ácido e gás, ONPG (orto nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, atividade de  $\beta$ -galactosidase), ADH (arginina dihidrolase), LDC (lisina descarboxilase), ODC (ornitina descarboxilase), urease, Vogel-Proskauer (VP), PD, indol, citrato, malonato, ramnose, adonitol, salicina, inositol, sorbitol, sacarose, manitol e rafinose.

Foram utilizadas as seguintes linhagens padrão para verificar os resultados dos experimentos: *A. hydrophila* (ATCC 7966), *A. sobria* (ATCC 43979) e *A. caviae* (ATCC15468). Os controles positivos e negativos para os testes foram: *Klebsiella* sp.; *Pseudomonas aeruginosa* (IBPse 102); *Enterococcus* sp; *Escherichia coli* (IBEsc 001); e *Enterobacter cloacae* (IBEnt 101).

### **3.4. Avaliação de resistência ou sensibilidade a antibióticos**

A sensibilidade às drogas antimicrobianas foi realizada através da difusão de discos em agar Muller-Hinton (Difco) conforme preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory

Standards Institute, 2005).

As bactérias cultivadas por 18h, em caldo LB, sob agitação (200µl) foram semeadas sobre o meio com o auxílio de alça de Drigalski. Após a completa absorção do líquido pelo ágar, foi colocado um multidisco de antibiograma para bactérias Gram-negativas (Multifar-15, Cefar). As placas foram então incubadas a 30°C por 24h. Após este período, os halos de inibição formados ao redor do disco de cada antibiótico foram medidos, em cm, com auxílio de uma régua.

O multi-disco para Gram - utilizado contém 15 discos com os seguintes antibióticos e concentrações: ampicilina (AMP- 10µg), amicacina (AMI- 30µg), tobramicina (TOB- 10µg), tetraciclina (TET- 30µg), ciprofloxacina (CIP- 5µg), gentamicina (GEN- 10µg), sulfametoxazol (23,75µg) e trimetoprima (1,25µg) (SUT), cloranfenicol (CLO- 30µg), ceftazidima (CAZ- 30µg), ceftriaxona (CRO- 30µg), cefotaxima (CTX- 30µg), cefoxitina (CFO- 30µg), aztreonam (ATM- 30µg), amoxicilina (20µg) e ácido clavulânico (10µg) (AMC) e cefepima (CPM- 30µg).

A interpretação de resistência e/ou susceptibilidade aos antibióticos foi realizada com base no diâmetro dos halos de inibição, em cm, conforme a tabela do M100-S15 (CLSI, 2005) para enterobactérias.

### **3.5. Avaliação fenotípica dos fatores de virulência**

#### **3.5.1. Atividade proteolítica qualitativa**

Isolados foram inoculados pelo método de gota (5 µl) em placas de Petri TSA (tryptone soya agar) modificado, com caseína e incubados a 37°C por 18 – 20 horas. Após crescimento foram medidos os diâmetros do crescimento bacteriano e do halo. Os halos transparentes foram considerados proteases positivas. A partir das medidas foi feita uma relação entre halo de atividade proteolítica e crescimento bacteriano; aonde foi considerado

(0 a 1) sem atividade proteolítica; (1,1 a 2) atividade proteolítica e (>2,1) elevada atividade proteolítica.

### **3.5.2. Atividade hemolítica extracelular**

A verificação da atividade hemolítica foi realizada sobre sangue de coelho, segundo o método modificado de Handfield *et al.* (1996). As bactérias foram crescidas em meio LB líquido a 37°C até atingirem a fase estacionária, e em seguida centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 gpm. Alíquotas de 500 µl do sobrenadante foram acrescidas de 1 ml de suspensão de hemácias (10 mg/l de tampão fosfato) e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após este período foi realizada nova centrifugação e a leitura em espectrofotômetro a 540nm. Como controle negativo foi utilizado a suspensão de eritrócitos e meio de cultura LB, e como controle positivo (100% de hemólise) suspensão de eritrócito, meio de cultura LB e SDS (0,1% final). Estes ensaios foram realizados em triplicata com inóculos independentes. Foi feita uma relação percentual de hemólise considerando o branco positivo como 100% de hemólise.

Também foram feitos testes de hemólise em placa de meio agar sangue de carneiro. Aonde as bactérias foram crescidas previamente em meio LB por 18 horas, a 37°C; foi inoculado em gota de 5 µl na placa de meio agar sangue de carneiro, e incubada a 37°C por 24 horas. Após crescimento foram avaliadas a formação de halo de degradação, aonde com halo foi considerado positivo e sem halo negativo.

### **3.5.3. Atividade lipolítica qualitativa**

Isolados foram inoculados em placas de Petri em meio contendo 10 mg/l de peptona; 5 mg/l NaCl; 0,1 mg/l CaCl<sub>2</sub>; 20 mg/l de ágar 1ml de Tween 20 após esterilização. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após crescimento foram medidos os diâmetros do crescimento bacteriano e do halo. Os halos de precipitação do

Tween ao redor das estrias foram considerados positivos. A partir das medidas foi feita uma relação entre halo de atividade lipolítica e crescimento bacteriano; aonde foi considerado (0 a 1) sem atividade lipolítica; (1,1 a 2) atividade lipolítica e (>2,1) elevada atividade lipolítica.

#### **3.5.4. Formação de biofilme**

As bactérias foram crescidas em meio LB líquido, a 37°C por 18h, para a obtenção de pré-inóculo. Após o crescimento da bactéria, ocorreu o preparo do material para o teste de formação de biofilmes. Foram utilizadas placas de cultura de célula de 96 poços. Cada poço foi colocado 200 µl de meio LB, após adicionou-se 5 µl do pré-inóculo por poço. Incubou-se a 30°C por 48 horas. Após 48 horas verificou-se a densidade ótica 540nm, sendo este utilizado como parâmetro de crescimento. O meio foi retirado por aspiração, e as placas lavadas com PBS (8 mg/l de cloreto de sódio, 0,2 mg/l de cloreto de potássio, 1,15 mg/l de fosfato de sódio dibásico, 0,2 mg/l potássio fosfato de potássio monobásico) por mais de 3 vezes. As placas foram secas em temperatura ambiente, e depois coradas com fucsina. Passados 30 minutos, as placas foram lavadas com PBS e lidas em leitor de microplacas Metrolab com absorvância de 490nm. Os experimentos foram realizados duas vezes com 3 repetições por experimento.

#### **3.6. Amplificação do gene *lipA***

A presença do gene *lipA* foi realizada utilizando os primers descritos por Chacón *et al.* (2003): *lipA*-F 5'- CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG- 3' e *lipA*-R 5'- GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA- 3', os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 247pb.

As reações de amplificações foram realizadas em volumes de 25 µl contendo 13,75 µl de água milliK, 2µl de Tris HCl (pH 8,3), 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1,5µl de Triton-X-100, 1µl de

solução dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,8 µl de cada *primer*, 0,15 µl (5U/µl) de enzima taq polimerase e 4 µl de suspensão bacteriana de cada um dos isolados, obtidas de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC100, programado para 10 minutos a 94°C, seguido de 39 ciclos de um minuto a 94°C para a desnaturação das fitas do DNA, um minuto a temperaturas que variaram de 56 a 64°C para anelamento de cada um dos pares de *primer* ao DNA, e dois minutos a 72°C para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 39 ciclos foi feita uma extensão suplementar por 10 minutos a 72°C.

### **3.7. Separação e visualização dos segmentos amplificados correspondentes ao gene *lipA*.**

Os produtos de amplificação, acrescidos de 5 µl de tampão de amostra (250mg de Azul de Bromofenol e 15g de Ficoll em 100ml de água destilada), foram submetidos à eletroforese (3V/cm), em géis horizontais de agarose 1,5% em tampão TBE (89mM Trisma, 89mM de Ácido Bórico e 8mM de EDTA), e acrescidos de solução de Brometo de Etídio (10mg/ml). Como tampão de corrida utilizou-se também o TBE. Os géis de agarose foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

### **3.8. Determinação da especificidade do gene *lipA* na caracterização de *Aeromonas***

Visando avaliar a eficiência e especificidade da PCR para o gene *lipA* na caracterização de *Aeromonas*, foram realizados experimentos de amplificação com uma bateria de linhagens pertencentes ao gênero *Aeromonas* e a espécies de distintas bactérias frequentes em fezes e outras amostras animais.

As bactérias utilizadas nestes testes, pertencentes ao acervo do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada, foram: *A. hydrophila* (ATCC 7699), *A.*

*caviae* (ATCC 15468), *A. sobria* (ATCC 43979), *Salmonella typhimurium* (IBSal101), *Escherichia coli* (IBEsc 101), *Enterococcus faecalis* (IBEnc101), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (IBBac101), *B. cereus* (IBBac 102), *B. megaterium* (IBBac 103), *Pseudomonas aeruginosa* (IBPse101 e 102), *P. fluorescens* (IBPse103), *Enterobacter cloacae* (IBEnt101), *Sarcina sp* (IBSar101), *Shigella sp* (IBShi101), *Serratia marcenscens* (IBSer101), *Klebsiella oxytoca* (IBKle 101), *Klebsiella pneumoniae* (IBKle 102), *Enterococcus sp* (IBEnt 101), *Proteus mirabilis* (IBPro101), *Micrococcus sp* (IBMic101), *Lactobacillus casei* (IBLac01), *Lactococcus lactis* (IBLac02) e *Citrobacter sp.* (IBCit101).

As bactérias acima descritas foram crescidas em meio LB por 24 horas a 30 ou 37°C conforme a espécie e utilizadas diretamente na avaliação de PCR conforme descrito no item 3.6.

### **3.9. Teste de padronização da determinação de *Aeromonas* por PCR do gene *lipA*.**

Visando a utilização da PCR do gene *lipA* na determinação rápida de *Aeromonas* em amostras de suínos, foi realizada: (1) a determinação do limite de detecção, e (2) a interferência de compostos presentes na amostra.

Para determinação do limite de detecção, a linhagem *A. hydrophila* ATCC7966 foi crescida em meio LB líquido por 24 h a 37°C, diluída e determinado o número de células por plaqueamento em meio M-Aer. As amostras foram então diluídas de tal forma a conter 1 a 10.000 células bacterianas por reação de PCR. A PCR foi realizada conforme descrito no item 3.6.

Para determinação da interferência de compostos presentes nas amostras de pele suína, diluições de uma amostra, com presença de *Aeromonas* confirmada por plaqueamento, foi utilizada diretamente e diluída (1/5, 1/10, 1/20 e 1/40) em água destilada autoclavada, para a realização de PCR conforme descrito no item 3.6.

### 3.10. Enriquecimento de amostras para PCR

As amostras obtidas de pele de carcaças suínas foram enriquecidas em 2ml de água alcalina peptonada (item 3.1) por 24 horas a 37°C sem agitação.

### 3.11. Classificação dos isolados por RFLP-PCR do gene 16S rRNA

A classificação por espécie dos isolados de *Aeromonas* spp. foi realizada utilizando-se o método RFLP-PCR, para o gene 16S rRNA, de acordo com o protocolo proposto por Borrell *et al.*, (1997), modificado. Os primers utilizados para a amplificação do gene 16S rRNA foram 16SAer-F 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG- 3' e 16SAer-R 5' -GGTTACCTTGTTACGACTT- 3' (Borrell *et al.*, 1997).

Os isolados foram crescidos a 36°C/24h em 2 ml de meio Lúria Bertani (LB) para a realização da PCR. As amostras assim obtidas foram diluídas 1/50 em água destilada autoclavada e utilizadas nas reações de PCR.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25µl, contendo 10mM de Tris HCl (pH 8,3), 50mM de KCl, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mg/l de Triton-X-100, 1,25mM de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1µl de cada *primer*, 0,15µl (5U/µl) de enzima Taq polimerase, e 4µl de suspensão bacteriana de cada um dos isolados.

As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf, programado para 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de um minuto a 94°C, para a desnaturação das fitas do DNA, um minuto a temperaturas que variaram de 56°C para o anelamento de cada um dos pares de *primers* ao DNA, e dois minutos a 72°C para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 35 ciclos, realizou-se uma extensão suplementar por 10 minutos a 72°C. Um controle negativo contendo todos os componentes, exceto a suspensão bacteriana foi realizado.

Os 5µl do amplificado foram submetidos a eletroforese em géis de agarose 1,5% (3V/cm) para conformação da amplificação e tamanho do fragmento amplificado.

A digestão enzimática foi realizada incubando 5µl dos produtos de amplificação com 5U de cada enzima (*AluI* e *MboI*) e 2 µl de tampão correspondente para cada enzima, num volume total de 20 µl.

As mistura de reação foram incubadas por 18 horas a 37°C. Alíquotas de 10 µl de cada mistura da reação de restrição, foram misturadas com 2 µl de tampão de corrida (2,5 mg/l de azul de bromofenol, 2,5 mg/l de xilol, 300 mg/l de glicerol). Os fragmentos foram separados em géis de agarose Metaphor 40 mg/l em tampão TBE, corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados sob transiluminador UV.

As seguintes linhagens foram utilizados como padrões visando a comparação com os perfis evidenciados por Borrell *et al.* (1997): *Aeromonas hydrophila* (ATCC7966 e CECT398), *A. caviae* (ATCC 15468), *A. sobria* (ATCC 43979), *A. trota* (ATCC49657), *A. media* (ATCC33907).

### **3.12. Análises bioinformáticas**

Dada a existência de vários genes para lipases no genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A, foi realizado inicialmente uma procura do gene correspondente aquele denominado de *lipA* por Chacón *et al.* (2003). Esta procura foi realizada no genoma de ATCC7966 e no banco de genes disponível no NCBI, buscando identificar genes que apresentam as *seqüências* correspondentes aos primers descritos por Chacón *et al.* (2003). Para tanto foi utilizado o programa BioEdit (Hall, 1999).

A partir da identificação do gene gi1175588 como aquele da lipase *lipA*, foi realizada uma análise BLASTn para verificar a existência de sequência homólogas a este gene em outros gêneros bacterianos. A seguir, foi obtida a sequência de aminoácidos da lipase extracelular de *A. hydrophila* ATCC7966 e realizada uma análise BLASTp para verificar a existência de lipases da mesma família em outras bactérias.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Utilização da amplificação do gene *lipA* pela PCR na determinação da presença de *Aeromonas*

De acordo com os dados obtidos por Chacón *et al.* (2003) e Fadanelli (2005), o gene *lipA* encontra-se presente em grande parte das bactérias do gênero *Aeromonas*. Assim sendo, foi utilizado os *primers* desenhados por Chacón *et al.* (2003) para avaliar a especificidade deste primer proposto contra vinte bactérias comumente encontradas em amostras de alimentos e fezes; incluindo bactérias Gram-negativas *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcenscens* e *Klebsiella pneumoniae*, e Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Sarcina sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus cereus*; *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*; além de dois representantes de *Aeromonas* (*A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. caviae* ATCC15468 ).

O segmento amplificado de 248 pb correspondente ao gene *lipA* foi detectado apenas nas amostras de *A. sobria* e *A. caviae*, demonstrando a especificidade do *primer* para bactérias deste gênero (representados na Figura 4). Estes dados confirmam aqueles obtidos por Chacón *et al.* (2003) que tinha constatado alta frequência de *lipA* em *Aeromonas* e a ausência de amplificação do *lipA* em algumas enterobactérias e de Fadanelli (2005) que constatou a amplificação do fragmento do gene *lipA* em 100% das onze espécies padrões avaliados e de 87% nos isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas*.

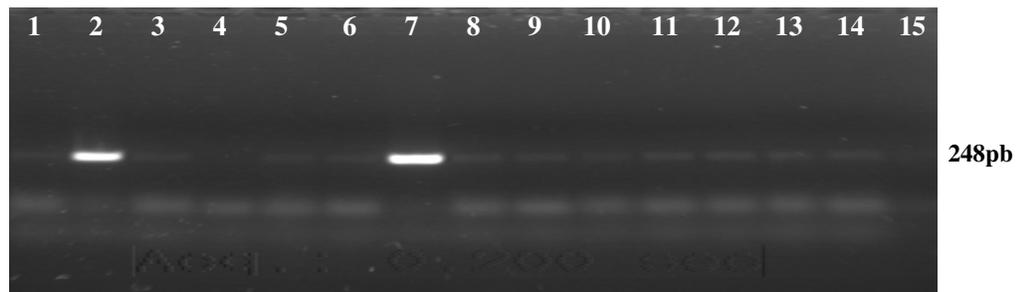


Figura 4. Especificidade do PCR *lipA* na determinação de *Aeromonas*.

Legendas: 1- *Salmonella thyphimurium*, 2- *Aeromonas caviae*, 3- *Escherichia coli*, 4- *Staphylococcus aureus*, 5- *Bacillus subtilis*, 6- *Staphylococcus epidermidis*, 7- *Aeromonas sobria*, 8- *Bacillus megatherium*, 9- *Enterococcus faecalis*, 10- *Pseudomonas fluorescens*, 11- *Sarcina sp.*, 12- *Citrobacter sp.*, 13- *Escherichia coli*, 14- *Lactococcus lactis*, 15- Controle negativo.

Através da análise *in silico* foi possível constatar que o gene referido por Chacón *et al.* (2003) como *lipA* corresponde ao gene de uma lipase extracelular localizado na posição 115445-117862 do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 (Seshadri *et al.*, 2006) e ao gene *pal* localizado na posição 4586292-4588706 do genoma de *A. salmonicida subsp. salmonicida* (Reith *et al.*, 2007). Além destes, uma análise de BLAST permitiu evidenciar que o gene *lipA* apresenta também alta homologia com a seqüência depositada do gene *pal* (97% de identidade e 0% falhas) descrito por Merino *et al.* (1999), à lipase extracelular (97% de identidade e 0% falhas) descrita por Anguita *et al.* (1993), ao gene da fosfolipase C (88% de identidade e 3% falhas) descrito por Ingham & Pemberton (1995), da lipase extracelular (82% de identidade e 5% falhas) descrita por Chuang *et al.* (1997), e de uma lipase extracelular (77% de identidade e 6% falhas) de *A. sobria* (Hoshino *et al.*, 2005). E que uma parte do gene *lipA* (entre as bases 1048-2180) apresenta elevada homologia (97% de identidade) com a seqüência do gene da enterotoxina citotônica (gene *alt*) descrita por Fang & Li (2005) e Fang *et al.* (2005) em diversas linhagens de *A. hydrophila*.

Os resultados da análise *in silico* (Quadro 1) mostram que os *primers* utilizados amplificaram e anelaram nas bases 448-466 e 677-696, gerando um fragmento de 249pb.

Conforme pode ser visualizado no Quadro 1, as *seqüências* complementares aos primers desenhados por Chacón et al (2003) e utilizados no presente trabalho são muito conservadas, sendo constatada apenas uma base, na seqüência “forward” do gene gi537628, e duas bases, na seqüência “reversa” do gene gi6045850, que não anelam com os primers empregados. Dada a posição, estas diferenças não são suficientes para evitar a amplificação.

Quadro 1- Fragmentos das seqüências alinhadas dos genes de lipases extracelulares de *Aeromonas*.

Gene (NCBI)	Espécie e descrição	Local do primer F' – lip A	Segmento amplificado	Local do primer R' – lip A
<i>Lip A</i>	Primer (Chacón et al., 2003)	CACCTGGTTCGCTCAAG T G	247 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGCAC T **
gil117617447	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966*	AACCTGGTGCCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil3746950	<i>A. hydrophila</i> phospholipase A1 (pla) gene	AACCTGGTGCCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil145306472	<i>A. hydrophila</i> J-1 lipase extracelular	AACCTGGTGCCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil410653	<i>A. hydrophila</i> , H3 lip-lipase extracelular	AACCTGGTTCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil1938254	<i>A. hydrophila</i> lipase extracelular (lip)	AATCTGGTGCCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil537628	<i>A. hydrophila</i> fosfolipase C	CACCTGGTTCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil142849896	<i>A. salmonicida</i> A449	AATCTGGTGCCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTCGGTAC
gil60458504	<i>A. sobria</i> AS228 lipase-like	AATCTGGTTCGCTCAAG	249 pb	TTCTCCGACTGGTTGCCAC

\*ATCC – American Type Culture Collection

\*\* Sequência complementar ao primer reverse

Negrito- bases que variam na região de anelamento dos primers

Sombreado- bases não complementares aos primers utilizados

A análise de BLASTn mostrou que a seqüência do gene *lipA* encontra-se presente apenas em *Aeromonas*, sendo constatada em seqüências completas ou parciais depositadas

de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. punctata* (*A. caviae*) e *A. popoffii*. A homologia entre estas sequências é superior a 75%.



Figura 5- Representação esquemática da região de homologia dos genes *lipA* (lipase extracelular) e *alt* (enterotoxina citotóxica) de *A. hydrophila* ATCC7966. A área riscada corresponde a região de anelamento dos primers utilizados.

Como pode ser observado na Figura 5, apesar da alta homologia entre as regiões compartilhadas dos genes *lipA* e *alt*, os primers utilizados não anelam ou amplificam o gene *alt*.

Uma análise de pBLAST mostra que a lipase extracelular de *Aeromonas* é semelhante da triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3) tendo aproximadamente 805 resíduos de aminoácidos. Esta enzima está envolvida no metabolismo lipídico atuando na degradação de triacilglicerol em monoacilglicerol, o qual por sua vez é utilizado no metabolismo de ácidos graxos (KEGG metabolic pathways).

Como pode ser observado na Figura 6 a lipase extracelular de *Aeromonas* apresenta sequência de aminoácidos semelhante a lipases de *Vibrios* e outras protobactérias. Entretanto, a sequência nucleotídica dos genes correspondentes apresenta baixa homologia (<30%), fato que garante a especificidade da identificação de *Aeromonas* por parte dos primers utilizados no presente trabalho.

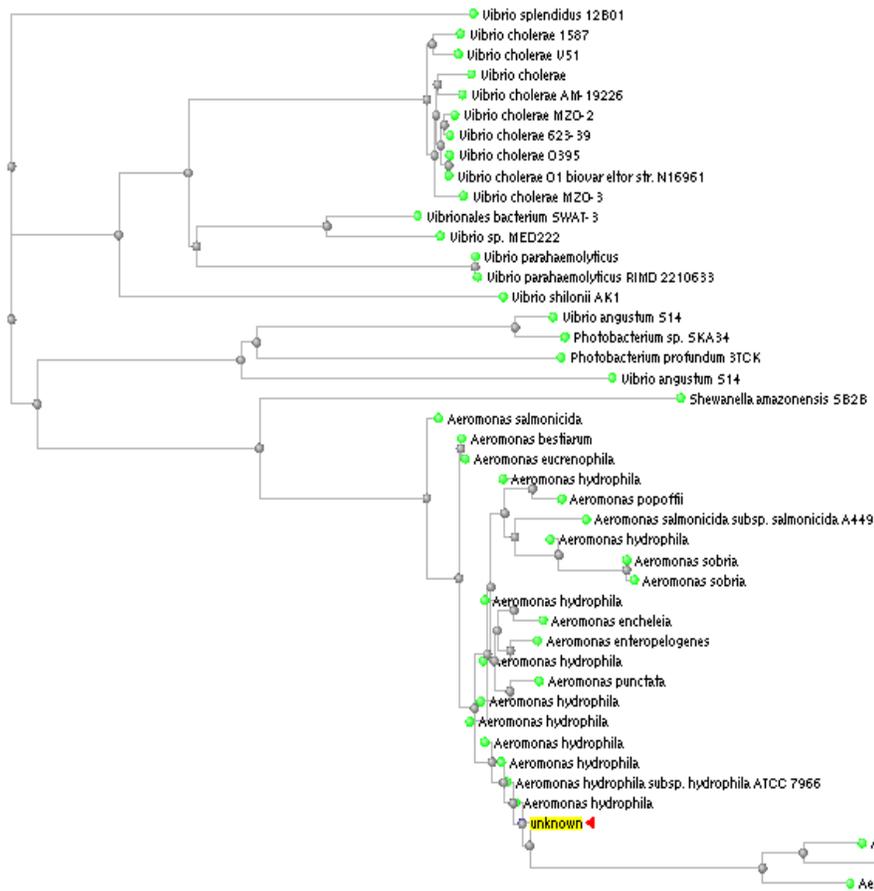


Figura 6- Dendrograma (Fast Minimum Evolution) baseado na análise de BLAST utilizando a seqüência de aminoácidos da lipase extracelular de *A. hydrophila* ATCC7966.

A fim de determinar o limite de detecção da amplificação pela PCR do gene *lipA* foram avaliadas amostras contendo distintas quantidades de células bacterianas (*A. hydrophila* ATCC7966). Como pode ser observado na Figura 7, amplificações consistentes foram obtidas em amostras contendo  $10^4$  a  $10^2$  células. Amostras contendo 100 a 1 células apresentaram uma banda tênue de difícil visualização. Assim sendo, o sistema da PCR utilizado apresenta como limite de detecção aproximadamente 1 célula por amostra de  $4\mu\text{l}$  utilizados na reação da PCR ou  $2,5 \times 10^2$  células por ml. Entretanto, visando assegurar a presença de DNA bacteriano na amostra, 10 cels/amostra são recomendáveis. Nesta base, a capacidade de detecção segura é de  $2,5 \times 10^3$  células por ml (25 células/ $1\mu\text{l}$ ).

Estes resultados são comparáveis com aqueles obtidos por Ozbas *et al.* (2000), os quais utilizando a amplificação pela PCR do gene *aer* na análise de *A. hydrophila* em leite constataram limite de detecção de aproximadamente 0,5 células/reacção ou  $1 \times 10^2$  células por ml.

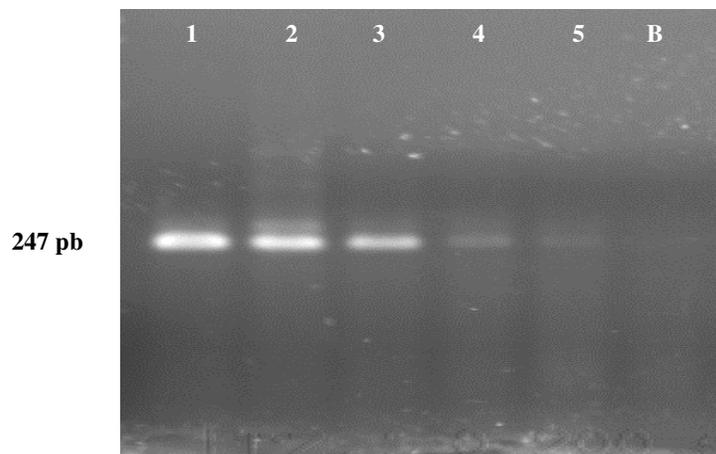


Figura 7- Amplificação pela PCR do gene *lipA* com distintas quantidades de *Aeromonas* na amostra. Legenda: 1-  $10^4$  células/reacção, 2-  $10^3$  células/reacção, 3-  $10^2$  células/reacção, 4-  $10^1$  células/reacção, 5- 1 células/reacção, B- controle negativo.

Em muitos casos tem sido evidenciado o efeito negativo de compostos presentes nas amostras quando das amplificações dos genes pela PCR (Rossen, 1992). Assim sendo, foi escolhida uma amostra, que apresentou crescimento de *Aeromonas* em placas (amostra 13), e utilizada diretamente da coleta de campo, apenas resuspendida em água, e diluída 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40. Os resultados sugerem que as amostras coletadas da pele de suínos apresentam compostos que inibem a reação da amplificação da PCR, de tal forma que o segmento amplificado de 249 pb são evidenciado de forma muito tênue em amostras não diluídas e na diluição 1/5.

Com base nestes resultados, e levando em consideração o limite estabelecido para o método (10 bactérias/reacção), foi avaliado o enriquecimento das amostras e a diluição deste crescimento, na determinação de *Aeromonas* pela PCR do gene *lipA*. Para tanto, a

amostra 13 foi enriquecida em água alcalina peptonada e incubada a 37°C por 24h. Foram testadas as amostras enriquecidas sem diluição e com diluições de 1/5 a 1/40. Como pode ser observada na Figura 8, a amostra enriquecida sem diluição apresentou uma banda fraca, enquanto que as diluições, especialmente acima de 1/10, mostraram uma banda intensa correspondente ao amplificado do gene *lipA*. A baixa eficiência da amplificação com amostra sem diluição pode ser atribuída ao grande número de moléculas alvos presentes já que a quantidade de células na mesma foi estimada em  $5 \times 10^5$  células/reação ou moléculas alvo por reação, com as diluições consecutivas a quantidade de bactérias na amostra foram reduzida para  $1 \times 10^5$  células/reação (1/5),  $5 \times 10^4$  (1/10),  $2,5 \times 10^4$  (1/20) e  $1,25 \times 10^4$  (1/40) ficando dentro das quantidades que mostraram alta eficiência de amplificação no testes prévio (Figura 7).

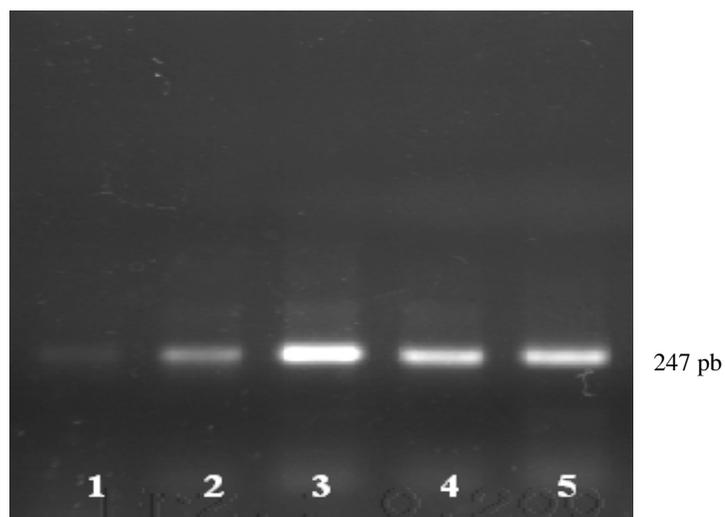
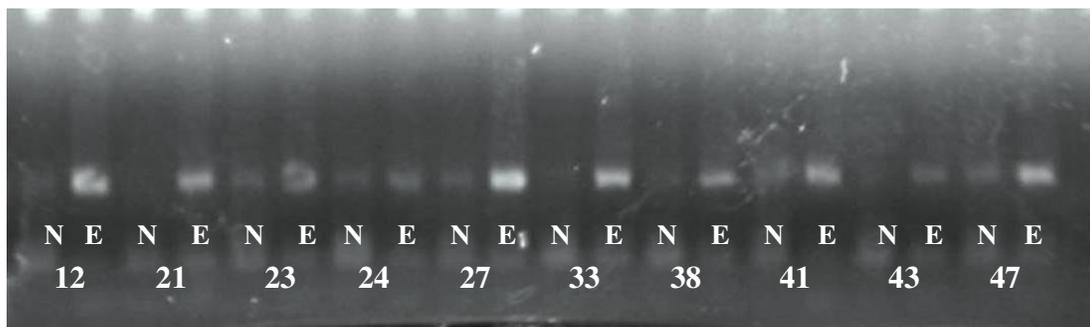


Figura 8- Amplificação do gene *lipA* por PCR utilizando distintas diluições de amostra enriquecida por 24h a 37°C em água peptonada alcalina. Legenda: 1- amostra não diluída, 2- diluição 1/5, 3- diluição 1/10, 4- diluição 1/20 e 5- diluição 1/40.

A continuação, dez amostras diretas (sem enriquecimento) e enriquecidas, ambas diluídas 1/10, foram amplificadas pela PCR para o gene *lipA*. Como pode ser observado na Figura 9, de um modo geral as amostras enriquecidas apresentaram bandas bem definidas,

enquanto que as amostras diretas exibiram bandas tênues ou ausência de amplificado, confirmando a necessidade de enriquecimento na avaliação da presença de *Aeromonas* pela PCR.



247 pb

Figura 9– Perfil da amplificação pela PCR do *primer lipA* em agarose 1,5%. O teste comparou o efeito de enriquecimento (E) em água peptonada alcalina (24 horas a 37°C) com as amostras diretas de campo sem enriquecimento (N), ambas diluídas 1/10 para inclusão nas reações de PCR.

#### 4.2. Prevalência de *Aeromonas* em carcaças suínas.

Um total de 60 amostras de superfície de carcaças de suínos, coletadas logo após a sangria, foram avaliadas quanto à presença de *Aeromonas* através de plaqueamento direto em meio M-Aer e pela amplificação pela PCR do gene *lipA* após enriquecimento por 18h a 37°C em água alcalina peptonada e diluídas em 1/10.

Como pode ser observado nas Figuras 10 A e B, 58 amostras (97%) exibiram a presença de segmento amplificado correspondente ao gene *lipA*. A intensidade da banda variou nas distintas amostras, sendo pouco evidente na amostra 1 (um). A diferença na intensidade pode ser atribuída ao número de bactérias presente em cada amostra, já que como constatado anteriormente no presente trabalho, o número de fragmentos amplificados em amostras com pouca concentração bacteriana é baixo e apenas detectável.

De um modo geral, os resultados confirmam a alta prevalência de *Aeromonas* sp. em carcaças suínas evidenciada previamente por Gill & Jones (1995), Yu *et al.* (1999) e Li *et al.* (2006). Yu *et al.* (1999) considerou que a alta frequência de *Aeromonas* em suínos

representa um problema potencial de saúde pública e de deterioração dos produtos derivados, e apontou a necessidade de modificações nos equipamentos de limpeza e sanitização utilizados durante o processo de abate. Neste sentido, Holley *et al.* (2004) mostraram que *Aeromonas* e *Shewanella* são as principais responsáveis pela deterioração de carne suína refrigerada.

Segundo Borch *et al.* (1996) a contaminação com bactérias potencialmente patogênicas durante o abate de suínos está relacionada à contaminação fecal, faríngea e ambiental. Entretanto, considerando que as coletas, do presente trabalho, ocorreram antes da evisceração, a elevada contaminação com *Aeromonas* pode ser atribuída ao contato com fezes durante o transporte e período prévio ao abate.

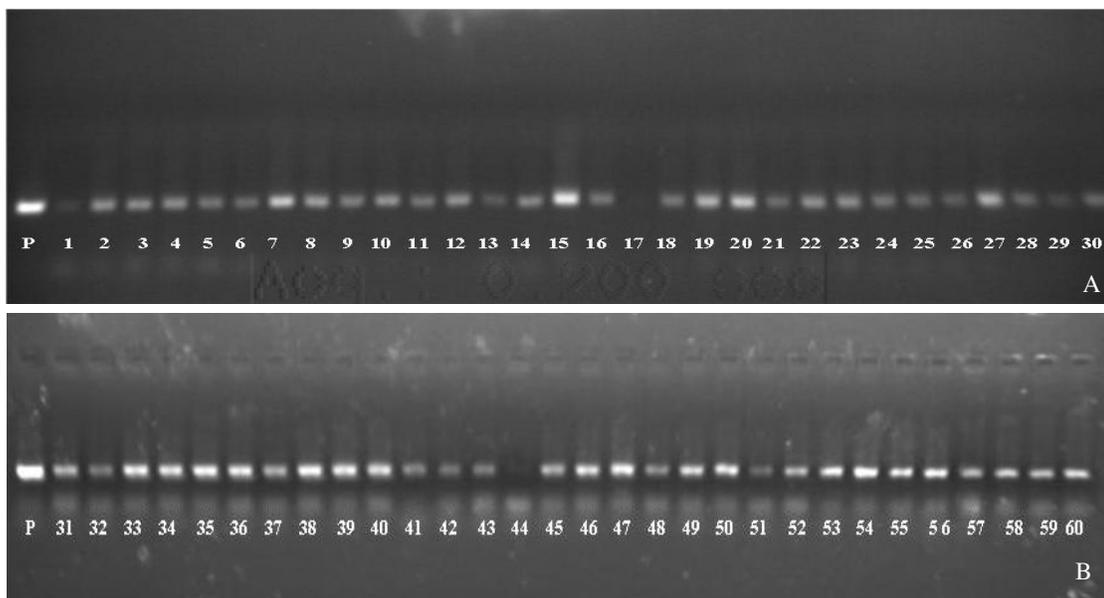


Figura 10A e B - Identificação de *Aeromonas sp.* em amostras enriquecidas e diluídas (1/10) de 60 carcaças de suínos, coletadas na sangria, através da amplificação pela PCR do gene *lipA*.

Conforme pode ser apreciado na Tabela 2, grande parte das amostras obtidas das carcaças suínas (86,7%) apresentaram *Aeromonas* quando analisadas diretamente através de plaqueamento em meio M-Aer. Neste meio, como esperado, as colônias de *Aeromonas* exibiram coloração amarelada devido a sua capacidade de reduzir o pH ( Figura 11 ).

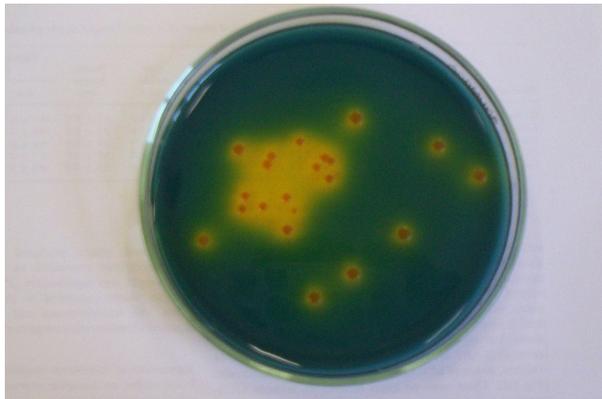


Figura 11- Crescimento de *Aeromonas* sp. em meio M-Aer, colônias com coloração amarelada.

Nas amostras positivas para a presença de *Aeromonas* o número estimado de bactérias variou entre 1 a 4 log UFC por 100 cm<sup>2</sup> de carcaça. Neste sentido, 20 amostras (33,3%) apresentaram 1 log UFC/100cm<sup>2</sup>, 22 (36,7%) tiveram contagens da ordem de 2 log UFC/100cm<sup>2</sup>, 9 (15%) exibiram 3 log UFC/100cm<sup>2</sup>, e a amostra 24 de Cotiporã apresentou contagem de 4 log UFC/100cm<sup>2</sup>. Em 8 amostras (13,33%) não houve crescimento de *Aeromonas*.

As duas amostras negativas na análise pela PCR-*lipA* (17 e 44) apresentaram contagens de 2 e 1 log UFC/100cm<sup>2</sup>, valores que em outras amostras levaram a reações da PCR positivas para o gene *lipA*. Este fato pode ser explicado pelas limitações inerentes ao sistema de avaliação por plaqueamento, no qual a presença de colônias com coloração amarelada foi considerada como indicativo de *Aeromonas*, quando eventualmente poderiam ser representantes de outros grupos bacterianos. Por outro lado, como evidenciado por Fadanelli (2005) nem todos os isolados de *Aeromonas* apresentam reação positiva para PCR-*lipA*, e competição de outras bactérias presentes na amostra podem impedir o crescimento de *Aeromonas* durante o período de enriquecimento prévio à amplificação pela PCR.

Tabela 2 - Resultados da contagem de *Aeromonas* em carcaças suínas e do teste da amplificação pela PCR do gene *LipA*.

Origem	Amostra	MAer*	PCR-lipA	Origem	Amostra	MAer*	PCR-lipA
1. Arroio Meio	1	1	+/-	9. Pareci Novo	31	2	+
	2	1	+		32	3	+
	3	2	+		33	3	+
2. Guaporé	4	2	+		34	3	+
	5	2	+		35	3	+
	6	2	+	10. Capitão	36	0	+
	7	1	+		37	3	+
3. Guabiju	8	1	+		38	3	+
	9	2	+		39	0	+
	10	1	+	11. Serafina Correia	40	0	+
	11	1	+		41	1	+
4. Nova Araçá	12	1	+		42	2	+
	13	2	+		43	3	+
	14	1	+	12. Nova Bassano	44	1	-
	5. Nova Roma Sul	15	1		+	45	2
16		2	+		46	2	+
17		2	-	13. Antônio Prado	47	1	+
18		2	+		48	2	+
6. Maratá	19	2	+		49	0	+
	20	2	+		50	0	+
	21	1	+		51	2	+
	22	2	+		52	0	+
7. Cotiporã	23	3	+	14. Tupandi	53	1	+
	24	4	+		54	2	+
	25	1	+		55	2	+
	26	3	+		56	1	+
8. Roca Sales	27	1	+		57	0	+
	28	1	+		15. Selbach	58	1
	29	2	+	59		0	+
	30	1	+	60		2	+

\* log UFC/100cm<sup>2</sup>

Variações importantes no número de bactérias presentes entre animais de uma mesma procedência foram observadas (Tabela 2), sendo particularmente evidente nos quatro animais de Cotiporã, de Capitão e de Serafina Correia, nos três animais de Selbach e nos seis animais de Antônio Prado. Cabe lembrar que todos os animais amostrados foram procedentes de estabelecimentos que seguem o princípio do sistema "todos dentro todos fora" (*all-in all-out*), onde os animais de cada lote ocupam ou desocupam as granjas num mesmo momento, em condições semelhantes de manejo e com vazios sanitários entre cada lote.

Os dados obtidos confirmam a alta prevalência de *Aeromonas* nestes animais constatada previamente em análises de fezes (Nayduch *et al.*, 2001) e em carnes e carcaças processadas (Borch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1999; Holley *et al.*, 2004).

A presença de *Aeromonas* em carnes, vegetais e na água pode contribuir para a alta frequência detectada destas bactérias em alimentos e a sua conseqüente transmissão para humanos (Saad *et al.*, 1995; Altwegg, 1999; Janda *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1999). Além disso, a alta prevalência de *Aeromonas* em fezes de animais e aves (Nayduch *et al.*, 2001), assim como nas águas de abatedouros e outras fontes (Rossi *et al.*, 2000; Costa & Rossi Júnior, 2002), deve ser tomado como um alerta na aplicação destes resíduos de forma inapropriada na agricultura.

#### **4.3. Caracterização bioquímica e molecular de *Aeromonas* isoladas de carcaças suínas**

Um total de 60 isolados de *Aeromonas* obtidos de carcaças de suínos (Quadro 2) no momento do abate foram caracterizados através de testes bioquímicos (Bactray I e II) utilizando chaves de classificações: Aerokey II (Carnahan *et al.*, 1991) e chave bioquímica convencional de *Aeromonas* (Carnahan & Joseph, 2005). Além dos métodos bioquímicos foram realizadas análises moleculares pelo RFLP-PCR do 16S RNA (Borrel *et al.*, 1997).

Utilizando a chave Aerokey II, Carnahan *et al.* (1991) avaliaram sessenta isolados clínicos de *Aeromonas*, encontrando um percentual de acerto na classificação de 97% (58 isolados). Além disto, foram avaliadas com exatidão 18 cepas padrão, que representavam as espécies *A. veronni*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, e *A. trota*, o que fez desta metodologia uma proposta para a identificação rápida e precisa segundo estes autores.

Quadro 2- Isolados de *Aeromonas sp* obtidas de plaqueamento de amostras de carcaça de suínos em meio MAer.

Isolados IBAer	Origem	Carcaça-isolado	Isolados IBAer	Origem	Carcaça-isolado
140	3. Guabiju	10-1	172	3. Guabiju	9-1
141	3. Guabiju	10-3	173	1. Arroio do Meio	1-1
142	4. Nova Araçá	12-1	176	13. Antônio Prado	51-1
143	5. N Roma do Sul	15-1	177	9. Pareci Novo	33-1
144	5. N Roma do Sul	15-2	178	9. Pareci Novo	34-1
145	4. Nova Araçá	14-1	179	9. Pareci Novo	35-1
146	9. Pareci Novo	31-1	181	9. Pareci Novo	31-2
147	9. Pareci Novo	32-1	182	1. Arroio do Meio	3-1
148	12. Nova Bassano	44-2	183	11. Serrafina Correia	41-1
149	7. Cotiporã	23-1	184	11. Serrafina Correia	42-1
150	7. Cotiporã	24-1	185	11. Serrafina Correia	43-1
151	8. Roca Sales	27-1	186	11. Serrafina Correia	43-2
152	13. Antônio Prado	47-1	187	15. Selbach	60-2
153	13. Antônio Prado	48-1	188	15. Selbach	58-1
154	13. Antônio Prado	48-2	189	7. Cotiporã	23-2
155	13. Antônio Prado	51-2	190	7. Cotiporã	23-3
156	14. Tupandi	53-1	191	7. Cotiporã	24-2
157	14. Tupandi	55-1	192	7. Cotiporã	24-3
158	15. Selbach	60-1	193	7. Cotiporã	25-1
159	10. Capitão	37-1	194	7. Cotiporã	25-2
160	9. Pareci Novo	35-2	195	2. Guaporé	7-1
161	2. Guaporé	6-1	196	7. Cotiporã	26-1
162	2. Guaporé	6-2	197	7. Cotiporã	26-1
163	5. N Roma do Sul	18-1	198	7. Cotiporã	26-2
164	6. Maratá	20-1	199	14. Tupandi	54-1
166	6. Maratá	19-1	200	14. Tuandi	56-1
167	13. Antônio Prado	48-3	201	8. Roca Sales	28-1
168	10. Capitão	38-1	202	8. Roca Sales	29-1
170	5. N Roma do Sul	16-1	203	8. Roca Sales	29-2
171	5. N Roma do Sul	17-1	204	8. Roca Sales	30-1

Como pode ser observado no Quadro3, a maioria dos isolados mostraram capacidade de hidrólise de esculina. Já o isolado IBAer 166 não teve a capacidade de hidrólise de esculina, apresentou reação de indol positiva, e VP e VM negativas, sendo assim classificado com *A. trota* pela chave de classificação Aerokey II. Este mesmo isolado quando foi classificado usando a chave convencional proposta no Manual Bergey's foi definido com *A. media* (Quadro 4).

Quadro 3 - Caracterização bioquímica pela chave Aerokey II (Carnahan *et al.*, 1991).

		<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. schubertii</i>
Aerokey II	Esculina	+	+	-	+	-	-
	Glicose (gás)	-	+	nc	+	nc	Nc
	VP	nc*	nc	-	nc	+	Nc
	Indol	nc	nc	+	nc	+	-
	Arabinose	nc	+	nc	-	nc	Nc
	Sacarose	nc	nc	nc	nc	+	Nc
Isolados IBAer	140, 141, 142, 143, 146, 147, 148, 149, 152, 153, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 168, 171, 172, 173, 176, 177, 179, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 194, 196, 197, 198, 199	144, 145, 150, 151, 157, 158, 167, 170, 178, 201, 202, 204	166	200	193, 203	195	

Legendas: + positivas, - negativas, \* não consideradas pelo Aerokey II para esta espécie.

Doze isolados exibiram formação de gás a partir de glicose, característica que associada com a capacidade de hidrólise de esculina e positivo a produção de ácido da arabinose levaram a sua classificação como *A. hydrophila*. O isolado IBAer 200 se diferenciou das *A. hydrophila* por ser arabinose negativo, por este motivo por classificado como *A. veronii* (Quadro 3).

Com base nos testes bioquímicos e pela classificação do Aerokey II foi constatado que 71,67% (43/60) dos isolados foram classificados como *A. caviae*, 20% (12/60) como *A. hydrophila*, 3,33% (2/60) como *A. sobria*, e 1,67% (1/60) como *A. trota*, *A. veronii* e *A. schubertii*. Já quando foi levado em consideração a chave de classificação convencional (Carnahan & Joseph, 2005) foi observado que 55% (33/60) foram classificados como *A. media*, 16,67% (10/60) *A. hydrophila*, 13,33% (8/60) *A. caviae*, 6,67% (4/60), *A. salmonicida*, 3,33% (2/60), *A. veronii*, e 1,67% (1/60) *A. sobria* e *A. schubertii* (Quadro 4).

Quadro 4- Caracterização bioquímica convencional em isolados de *Aeromonas* obtidos de carcaças suínas

		Espécies						
		<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. schubertii</i>
Testes bioquímicos	Esculina	+/-	+	+	+	+	-	+/-
	Glicose (ácido)	+	+	+	+	+	+	+
	Glicose (gás)	+/-	-	+	-	+	-	-
	ONPG	+/-	+/-	+	+	+	+	+
	ADH	+/-	-	+/-	+/-	+	-	-
	LDC	-	-	+/-	+/-	+	-	-
	ODC	-	-	-	-	-	-	-
	Uréia	-	-	-	-	-	-	-
	VP	+/-	+/-	+	+/-	-	+	-
	PD (fenilalanina)	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-
	Indol	+/-	+	+/-	+	-	+	-
	Citrato	+/-	+/-	-	-	-	+	-
	Malonato	-	-	-	-	-	-	-
	Ramnose	-	-	+/-	-	-	-	-
	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
	Arabinose	+/-	+	+	+	-	-	-
	Salicina	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
	Inositol	-	-	-	-	-	-	-
	Sorbitol	-	-	-	+	-	-	-
	Sacarose	+	+	+/-	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	-	
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	
Isolados IBAer	140, 141, 146, 147, 149, 152, 153, 154, 156, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 166, 168, 172, 173, 176, 177, 179, 181, 186, 188, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 198, 204	142, 143, 148, 183, 184, 185, 187, 199	144, 145, 150, 151, 157, 158, 167, 170, 201, 202	155, 171, 192, 196	178, 200	203	197	

Estes dados discordam daqueles de Yu *et al.* (1999) que obtiveram 81% de *A. hydrophila* em amostras de carcaças suínas. Por outro lado, Nayduch *et al.* (2001) detectaram *A. caviae* em 100% das amostras de fezes de suínos analisadas e em 55% das

moscas presentes em fazendas de suínos na Carolina do Sul, USA. Estas avaliações mostram que a prevalência de uma ou outra espécie de *Aeromonas* pode variar consideravelmente dependendo de condições ambientais, geográficas ou do manejo da criação, e principalmente do sistema de classificação adotado. Rossi *et al.* (2000) analisando água de matadouros bovinos no interior de São Paulo, obtiveram maior frequência de *A. caviae* do que de *A. hydrophila*.

Além da classificação bioquímica através do Aerokey II e da chave convencional, os isolados foram classificados com base no sistema de RFLP-PCR proposto por Borrell *et al.* (1997). Como pode ser observado na Figura 12, perfil típico para cada espécie foram obtidos.

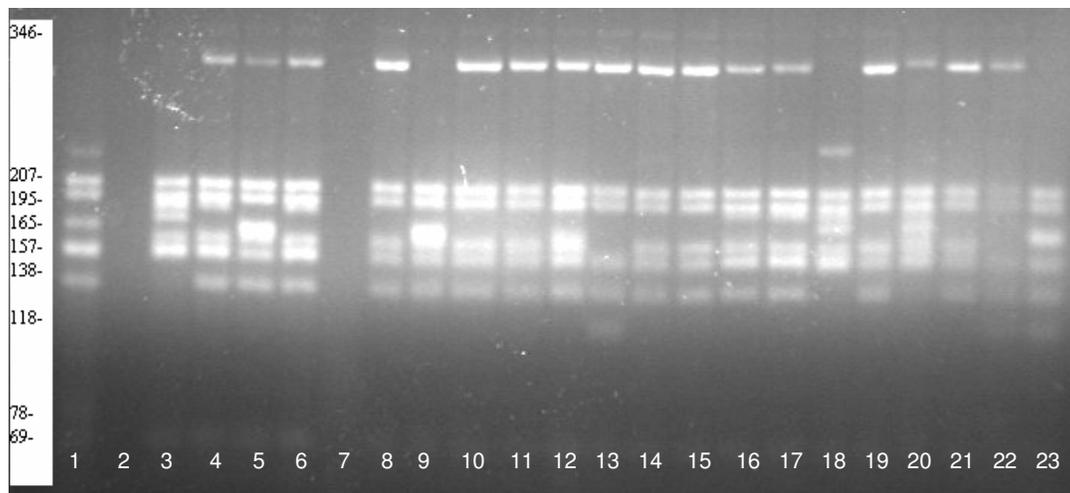


Figura 12 – Amostras de *Aeromonas* clivadas com as Enzimas *Alu I* e *Mbo I*. Amostras clivadas (em seqüência): 1- IBAer002 (padrão *A. sobria*), 2- IBAer001 (padrão *A. hydrophila*), 3- IBAer008 (padrão *A. caviae*), 4- IBAer140, 5- IBAer141, 6- IBAer142, 7- IBAer144, 8- IBAer145, 9- IBAer146, 10- IBAer150, 11- IBAer151, 12- IBAer153, 13- IBAer 155, 14- IBAer157, 15- IBAer158, 16- IBAer159, 17- IBAer163, 18- IBAer166, 19- IBAer167, 20- IBAer168, 21- IBAer170, 22- IBAer171, e 23- IBAer178. Os números à esquerda representam os pesos moleculares (pb).

Os isolados classificados como *A. hydrophila* apresentaram as bandas típicas de 346, 207, 195, 165, 157 e 138 pb (Figura 12) conforme descrito por Borrell *et al.* (1997). As bandas menores de 66, 54, 42 e 33 observadas por estes autores ficaram abaixo do limite de detecção. Os isolados IBAer 148, IBAer 156, IBAer 182, IBAer 183, IBAer 183,

IBAer 185, IBAer 187, IBAer 188 e IBAer 199 exibiram perfis típicos de *A. Caviae* (padrão IBAer 008 da Figura 12), caracterizados pela presença de bandas de 207, 195, 188/180, 165, 158/157 pb (Quadro 5).

Os isolados IBAer 141, IBAer 146, IBAer 147, IBAer 149, IBAer 152, IBAer 153, IBAer 172, IBAer 177, IBAer 179, IBAer 181, IBAer 186, IBAer 190, IBAer 192, IBAer 193, IBAer 195 exibiram um padrão de bandas constituído por 207, 195, 174/172, 165, 157, 138 pb (Quadro 5), sendo este perfil corresponde àquele observado previamente para *A. media*.

Quadro 5- Perfis dos fragmentos de restrição obtidos por RFLP- PCR do 16S RNA dos 60 isolados de *Aeromonas*.

		<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. trola</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>Aeromonas sp</i> padrão 1	<i>Aeromonas sp</i> padrão 2	<i>Aeromonas sp</i> padrão 3	<i>Aeromonas sp</i> padrão 4	<i>Aeromonas sp</i> padrão 5
Fragmentos obtidos no RFLP-PCR	346	-	-	X	-	-	X	-	X	X	-	-	-
	242	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
	228	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
	207	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
	195	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	188	X	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	X
	180	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	X
	174	-	X	-	-	X	-	-	-	X	X	X	-
	172	-	X	-	-	-	-	X	-	-	X	X	-
	165	X	X	X	X	X	-	-	X	X	-	-	X
	158	X	-	-	X	X	-	-	X	X	X	-	X
	157	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	138	-	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X	X
118	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	
Isolados IBAer	148, 156, 182, 183, 183, 185, 187, 188, 199	141, 146, 147, 149, 151, 152, 153, 172, 177, 179, 181, 186, 190, 192, 193, 195	144, 145, 150, 151, 157, 158, 167, 170, 198, 201, 202, 204	166, 168	200, 203	155, 171, 191, 196,	197	140, 142, 159, 161, 162, 163, 164, 176	143, 154, 160, 194	173	178	189	

Os isolados IBAer166 e IBAer 168 apresentaram bandas de 242, 207, 195, 180, 165, 158/157 pb correspondente ao perfil esperado para *A. trola*.

Os isolados IBAer155, IBAer171, IBAer 191 e IBAer 196 tiveram um perfil de RFLP-PCR caracterizado por bandas de 346, 207, 195, 157, 138 e 118 pb compatíveis com os perfis esperados para *A. salmonicida* ou *Aeromonas sp.* (Borrell *et al.*, 1997).

Conforme pode ser observado no Quadro 5, foram obtidos quatro padrões atípicos de *Aeromonas* sendo classificados como *Aeromonas sp.* Os isolados IBAer 140, IBAer 142, IBAer 159, IBAer 161, IBAer 162, IBAer 163, IBAer 164, IBAer 176 apresentaram os seguintes fragmentos: 346, 207, 195, 188, 165, 158/157, 138 sendo estão denominados de padrão 1. O padrão 2, representados por IBAer 143, IBAer 154, IBAer 160 e IBAer 194 são caracterizados por bandas de 346, 207, 195, 188, 174, 165, 158/157, 138 pb. O isolado IBAer 173 que apresenta bandas de 207, 195, 180, 174, 172, 158/157 sendo denominada de padrão 3. O padrão 4 que tem como representante o isolado IBAer 178 tem como perfis as seguintes bandas 207, 195, 174, 172, 157, 138, e 118 pb. Já o isolado IBAer 189 apresenta os seguintes perfis 195, 188, 180, 165, 158/157, e 138 pb. Devido a esta dificuldade na classificação de *Aeromonas*, Yáñez *et al.* (2003) e Saavedra *et al.* (2006) propõem a utilização de *seqüenciamento* do gene *gyrB* para classificação de espécies dentro do gênero *Aeromonas*.

Comparando os dados de classificação bioquímica e moleculares foi observado, que somente 17 dos 60 isolados (28,33%) são classificados como mesma espécie nos três sistemas de classificação (Quadro 6). Se levarmos em consideração somente a comparação entre o RFLP-PCR e o método convencional (17 testes bioquímicos) aumentamos para 37 isolados (61,67%) com consenso na classificação.

Quadro 6- Comparação entre os métodos de classificação bioquímicos e moleculares.

Isolados IBAer	Classificação pelo Aerokey	Classificação pelo método bioquímico convencional	Classificação pelo método molecular RFLP – PCR do 16SRNA
140	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
141	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
142	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>Aeromonas sp</i>
143	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>Aeromonas sp</i>
144	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
145	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
146	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
147	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
148	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A caviae</i>
149	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
150	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
151	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
152	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
153	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
154	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
155	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A salmonicida</i>
156	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
157	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
158	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
159	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
160	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
161	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
162	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
163	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
164	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
166	<i>A. trota</i>	<i>A. media</i>	<i>A trota</i>
167	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
168	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A trota</i>
170	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
171	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A salmonicida</i>
172	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
173	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
176	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
177	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
178	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>Aeromonas sp</i>
179	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
181	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
182	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
183	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
184	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
185	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
186	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
187	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A caviae</i>
188	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
189	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
190	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
191	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A salmonicida</i>
192	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
193	<i>A. sobria</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
194	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>Aeromonas sp</i>
195	<i>A. shubertii</i>	<i>A. media</i>	<i>A media</i>
196	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A salmonicida</i>
197	<i>A. caviae</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
198	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A hydrophila</i>
199	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A caviae</i>
200	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A veronii</i>
201	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
202	<i>A. hidrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A hydrophila</i>
203	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A veronii</i>
204	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>	<i>A hydrophila</i>

\* As amostras sombreadas apresentaram correlação entre os dois ou três métodos analisados.

O Aerokey que foi proposto por Carnahan *et al.* (1991) apresentou uma correlação com o método convencional bioquímico de somente 19 dos 60 isolados (31,67%), mostrando que esta chave tem problemas para classificar isolados obtidos de ambientes não clínicos, já que não separa *A. media* de *A. Caviae*

Quadro 7- Síntese dos resultados entre os métodos de classificação bioquímicos e moleculares.

Espécie	Aerokey II	Classificação Convencional	RFLP-PCR 16S rRNA
<i>A. caviae</i>	71,67% (43/60)	13,33% (8/60)	15% (9/60)
<i>A. media</i>	-----	55% (33/60)	25% (15/60)
<i>A. hydrophila</i>	20% (12/60)	16,67% (10/60)	20% (12/60)
<i>A. sobria</i>	3,33% (2/60)	1,67% (1/60)	-----
<i>A. trota</i>	1,67% (1/60)	-----	3,33% (2/60)
<i>A. veronii</i>	1,67% (1/60)	3,33% (2/60)	3,33% (2/60)
<i>A. salmonicida,</i>	-----	6,67% (4/60)	6,67% (4/60)
<i>A. schubertii</i>	1,67% (1/60)	1,67% (1/60)	1,67% (1/60)
<i>Aeromonas sp</i>	-----	-----	25% (15/60)

#### 4.4. Perfil de resistência a antibióticos em *Aeromonas* isoladas de carcaças de suínos

A tabela 3 mostra o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas de *Aeromonas* isoladas de em carcaças suínas. Em relação à sensibilidade e resistência frente aos antibióticos testados, todos os isolados apresentaram resistência à ampicilina (Tabela 3), característica freqüente na maior parte das *Aeromonas* móveis (Palumbo *et al.*, 1985). Ao mesmo tempo, 88% dos isolados de suínos exibiram resistência à amoxicilina acrescida de ácido clavulânico, característica esperada considerando a elevada prevalência de genes de  $\beta$ -lactamases no gênero *Aeromonas*, algumas das quais resistentes à inibição pelo ácido clavulânico (Iaconis & Sanders, 1990; Segatore *et al.*, 1993).

Com respeito às cefalosporinas testadas, 36% dos isolados de carcaças suínas mostraram resistência à ceftazidima, enquanto apenas 12% exibiram resistência (ou comportamento intermediário) frente à cefotaxima e à cefoxitina, e 8% apresentaram resistência intermediária à ceftriaxona (Tabela 3). Apenas um isolado IBAer140 apresentou resistência ao antibiótico carbapenêmico Aztreonam (Tabela 3).

Quanto aos outros antibióticos testados (Tabela 3), chama atenção a elevada taxa de resistência ao cotrimazol (sulfametoxazol/trimetoprima) (85%), à amoxicilina (73%), à tetraciclina (67%), à ciprofloxacina (40%), à ceftazidina (28%) e ao cloranfenicol (23%). Estes valores são muito superiores àqueles obtidos por Goñi-Urriza *et al.* (2000) que observaram uma frequência de 14% de isolados resistentes à tetraciclina, baixa frequência de resistência ao cloranfenicol, e alta eficiência do cotrimazol sobre isolados de *Aeromonas* obtidos de águas fluviais. Tal diferença pode estar relacionada com o uso massivo de tetraciclina durante o processo de criação de suínos, fato que deve levar à seleção de microrganismos resistentes a este antibiótico.

Tabela 3– Perfil da resistência/susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Aeromonas* de carcaças suínas. Valores representam o tamanho dos halos de inibição em centímetros.

	AMP	CAZ	CLO	SUT	GEN	CIP	TET	TOB	AMI	AMC	CPM	CRO	CTX	CFO	ATM
140	0	2	3	0	2,3	3	3,2	1,6	2,3	0	3,4	3,9	3,9	3	1
141	0	1,5	1	0	1,5	2	2,5	2	2	0,8	3	2,8	2	1,6	3,9
142	0	3	3,2	0	2	2,8	1,3	1,8	2,5	0	3,8	3,6	3,8	3,4	3,8
143	0	1,5	2	0	1,5	2	1,9	1	1	0,8	2,2	2,8	2,9	2,3	3
144	0	2,4	3	0	1,5	2	2,5	1,8	2,4	1,6	3	3	3,2	2	2,2
145	0	2,8	2,8	1,2	1,8	2,1	1,7	1,5	1,7	0	3	3	3	1,9	3,4
146	0	3,5	4	0	2	3	1,3	2	2,4	2	4	4	4	4	4
147	0	2	2,8	0,8	1,8	1,4	0	1,3	2	1	2,4	3,7	2,4	3	3
148	0	1	1	1	1,7	1,3	1,2	1,5	1,2	1	2,4	1,8	2,3	2,2	2,4
149	0	1,5	0,6	0	1,7	1,4	1	1,4	2	0,6	3	2,2	2,3	0,6	4
150	0	0	0	0	2,3	2	1,9	1,8	2,1	1,8	4	4	3,6	4	4
151	0	2,5	2,2	0	2	2,2	1,5	1,6	2,1	1,6	4	4	4	3	4
152	0	2,5	2	0	2	2,5	2	1,6	2	1	2,4	3	3	2,6	2,8
153	0,8	3	3	0	2	3	1	2,3	2	2	3,5	4	4	4	4
154	0	2	2	0,8	1,8	1,2	0	1,7	1,9	1	2,4	2,8	3,2	2,6	3,2
155	0	1,5	1,6	1	1,8	2,5	2,5	1,6	1,8	1,3	3,2	2,8	3,5	2,8	3,5
156	0	2	1,3	0	2	2,5	0,8	2	1,6	0,5	3	1,6	2	1,6	3,5
157	0	3	2	0,7	2	2	1,3	2,3	2,5	2	3,6	3,8	4	3	4

158	0	0	1,8	1,7	1,7	1,5	1,8	1,6	1,6	1,5	2,7	2,6	2,8	3	2,9
159	0	2,4	0	0	0	1,3	2	2,1	2,2	1,5	2,2	3,8	2,6	2,6	2,8
160	0	3	3,4	1,5	1,5	2,5	2,4	1,6	2	1,5	3	3	3	2,7	3
161	0	1,8	3,3	0	2	2,3	0	1	2,5	1	3	3	3	3	4
162	0	1,7	2,5	0	1,5	0	1,3	1,5	1,8	1	3	2,8	2,2	2,6	3,4
163	0	1,3	2,5	0	1,6	1,8	1	1,5	1,9	1	3	3	3,2	3	4
164	0	2	2,5	0	1,6	1,3	0	1,5	2	0	2,5	2	2,5	2,6	3,8
165	0	1,7	0	0	1,8	2,1	0	2,1	2,6	0	2,3	2,4	2,6	2,5	3,2
166	0	1,9	2,9	1,6	1,7	1,6	0	0	0,9	1,9	2,4	2,8	3,2	3	3,4
167	0	2,1	3,2	2,2	1,9	3,2	1,9	3	1,6	1,9	2,8	3,8	3,4	2,1	4
168	0	1,1	0,9	0	1	1	1,9	1,5	1,6	0,9	2,7	2,6	2,2	1,6	3,1
170	0	1	1,6	1,5	1,9	2,6	2,1	2	1	1,4	3	3,6	3	1,8	3,3
171	0	2,5	2,1	0	1,3	2,3	0	2	2,2	1,6	2,8	3,4	3,2	1,8	3,5
172	0	3	3,5	1,9	2,3	3,2	2,6	2,5	2	2,2	2,6	4	3,6	4,8	3,6
173	0	2,7	1	0	0	1,8	0,8	1,8	2,2	0,9	3,1	3,4	3	1,2	3,4
176	0	2,5	2,9	1	0	1,6	1,1	1,7	2,1	1,1	3,2	3,2	2,8	2,6	3,1
177	0	2,2	2,7	1,3	1,6	2,9	0	1,7	2	1,6	3,4	3,2	3,2	1,8	3,8
178	0	2,6	2,9	0	1,6	2,3	2,4	1,8	2,4	0,9	3	3,2	3,6	1,8	3,4
179	0	2,1	1,6	0	0,7	1,7	2,4	1,6	1,5	1,4	2,5	2,6	3,2	1	3,4
181	0	2,4	2,9	1,8	1,9	2,4	0,8	0,8	2,1	1,6	2,6	3,2	3	2,8	3,4
182	0	1,7	2,9	1,4	1,5	2,6	1,9	1,7	0,9	2,5	3	3,6	3,4	2,8	3,6
183	0	3,2	3	0	2,2	3	1,8	2,3	2,3	2,2	3,8	4,6	3,8	3,2	4,6
184	0	1,8	2	0	1,8	2,8	2	2	2	1,7	2,5	3	3	1,4	2,6
185	0	0	1,7	0	2,2	2,6	1,2	1,3	1,5	2	2,6	2,4	2,8	2,4	3
186	0	2,4	2,3	1,5	2	3,5	1,3	2,3	2,3	1,5	4	3,2	3	3	4
187	0	2,5	3	0	1,7	2,5	1,6	2,1	1,8	2	3	3	3	3,5	4
188	0	2	2,5	0	1,5	1	1,4	1,3	1,2	1,7	2,5	3	3	0	3
189	0	3	3	1,7	2,4	3	0	2,5	2,5	1	3	3	3,5	4	4
190	0	2,5	0,7	0	2	2,7	1	1,8	2,1	1,3	2,7	2,8	3	1,4	3,4
191	0	3	3,5	0	1	2	1,5	3	2,5	1,6	4	4	4	2	4
192	0	2,8	3	1	2	2,5	1,5	2,7	2,5	2	3,8	3,5	3,3	3,2	3,5
193	0,6	2,5	2,8	0	2,3	2,5	1,8	2,1	2,6	2	3	4	3	4	4
194	0	2,5	3,5	2,2	2,5	4	1,5	3	2	2,8	4	4	4	4	4
195	0	0,6	3,5	1,1	2,5	3,5	2,3	2,5	2,5	2,6	4	4	4	4	4
196	0	0	4	2,3	3	4	2,3	2,2	2,1	2,6	3	4	4	4	4
197	0	2,4	2,3	0	1,6	1,5	0,8	0,7	1,8	0,8	1,8	2,2	2,8	3	2
198	1,8	2,2	2,4	0,6	1,8	0	0	1	2,2	2,6	3	3,1	3	3	3,4
199	0	2,5	2,8	1	1,4	1,3	1,3	1,5	2	1,3	2,8	3	3	2,4	4
200	0	2,6	2,8	1,7	1,7	1,9	0	1,2	1,5	1,6	3,2	3,5	3,8	3,3	3,8
201	0	2,5	2,7	1,5	1,8	2,3	2	1,5	2	1,2	2,7	3,4	3,4	2,6	4
202	1,2	1,6	2,4	1,2	1,5	1,5	0,6	0,6	1	2,3	1,5	2,6	3	2,4	3
203	0	2,5	3	1,5	2	3	1	1,3	1,8	1,5	2,8	3,2	3,4	2,2	3

AMP (Ampicilina - 10µg), CAZ (Ceftazidima - 30µg), CLO (Cloranfenicol - 30µg), SUT (sulfametoxazol (23,75µg) e trimetoprima (1,25µg)), GEN (Gentamicina - 10µg), CIP (Ciprofloxacina - 5µg), TET (Tetraciclina - 30µg), TOB (Tobramicina - 10µg), AMI (Amicacina - 30µg), AMC (Amoxicilina (20µg) e ácido clavulânico (10µg)), CPM (Cefepima - 30µg), CRO (Ceftriaxona - 30µg), CTX (cefotaxima - 30µg), CFO (Cefoxitina - 30µg), ATM (Aztreonam - 30µg), nd (não determinada)

\* Fundo cinza corresponde à resistência com base na Tabela M100-15 (CLSI, 2005).

A utilização de tetraciclina e derivados nas rações utilizadas para suínos é uma constante devido ao efeito deste antibiótico como promotor de crescimento (Rutz e Lima,

2006). Esta prática tem levado ao aumento de bactérias resistentes à tetraciclina em amostras de suínos, como mostra o trabalho realizado por Corrêa *et al.* (2005). Neste trabalho, os autores constataam alta frequência de enterococos resistentes à tetraciclina em fezes de suínos tratados com rações. Dados referentes à resistência à tetraciclina em *Aeromonas* isoladas de suínos não são disponíveis.

A resistência à tetraciclina em *Aeromonas* tem sido associada à presença de genes específicos que conferem resistência à tetraciclina propriamente dita e à oxitetraciclina, sendo que alguns destes genes podem ser transferidos eficientemente para *E. coli* (DePaola *et al.*, 1988). Em diversos casos, a resistência à tetraciclina, assim como a outros antibióticos, tem sido associada a plasmídios de baixo peso molecular ou plasmídios conjugativos de alto peso molecular (Hedges *et al.*, 1985; Aoki, 1988; Chaudhury *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1998). Esses genes de resistência à tetraciclina são frequentemente encontrados em elementos transponíveis que podem mudar de posição sendo transferidos de plasmídios não conjugativos para conjugativos. Neste sentido, Rhodes *et al.* (2000) e Schmidt *et al.* (2001) mostraram evidências claras de íntegrans associados com a resistência à tetraciclina (*tetA*) e outros antibióticos em plasmídios conjugativos de *Aeromonas*. Tal observação indica a existência de diversos mecanismos de transferência de resistência a antibióticos nestas bactérias.

Um fato que merece citação é a presença de genes de resistência à tetraciclina e sulfas em elementos transponíveis já detectados em *Aeromonas* como o Tn1721 (Rhodes *et al.*, 2000), o que justifica a elevada (50%) frequência de isolados de suínos resistentes a ambos antibióticos.

Resistência múltipla à tetraciclina e cotrimazol (sulfametoxazol + trimetoprim) foi encontrada em 33 isolados (55%), frequência consideravelmente maior do que a observada por Schmidt *et al.* (2001) numa análise de *Aeromonas* móveis isoladas de trutas (28%).

Associação de resistência a estes dois grupos de antibióticos foi previamente constatada por Schmidt *et al.* (2001), sendo a mesma atribuída à presença de íntegrans de classe 1.

Alguns isolados exibiram resistência múltipla, sobressaindo: os isolados IBAer148, 149 e 156 com resistência ou sensibilidade intermediária a nove dos quinze antibióticos testados, incluindo representantes de  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfa, aminoglicosídicos e fluoroquinolonas; o isolado IBAer141 com resistência a cinco antibióticos, cloranfenicol, cotrimazol e fluoroquinolonas; os isolados IBAer 162 e 159 com resistência a sete e seis antibióticos, respectivamente (Tabela 3).

Nenhum dos antibióticos testados foi totalmente eficiente contra os isolados de *Aeromonas* avaliados, entretanto, apenas uma resistência intermediária (IBAer202) foi constatada para a cefepima, uma cefalosporina de quarta geração. Os outros antibióticos que mostraram-se eficientes sobre os isolados de *Aeromonas* foram: aztreonam (98% de isolados sensíveis), ceftriaxona (95% de isolados sensíveis), cefotaxima (93% de sensíveis) e gentamicina (88% de isolados sensíveis). Estes dados confirmam até certo ponto aqueles relatados por Ko *et al.* (1996), Goñi-Urriza *et al.* (2000), Vila et al (2003), entre outros, com exceção da baixa sensibilidade a ciprofloxacina e a elevada sensibilidade a aztreonam. Cabe lembrar, que estes autores trabalharam principalmente com amostras clínicas, fato que modifica a pressão de seleção à qual as populações bacterianas se encontram submetidas.

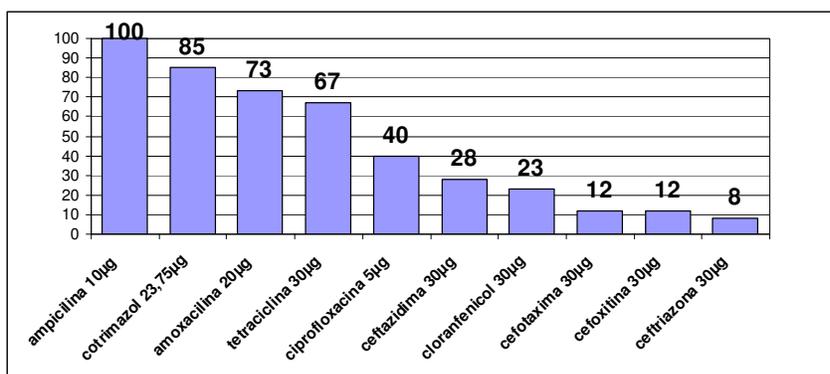


Figura 13. Perfil de resistência (%) a antibióticos em *Aeromonas* isoladas de carcaças suínas

Saliente-se que as suscetibilidades dos microrganismos, frente aos antibióticos empregados, ap comportamentos distintos e com frequências diversas, e do ponto de vista clínico, a sensibilidade intermediária é considerada como resistência.

#### 4.5. Fatores de virulência em *Aeromonas* isoladas de carcaças de suínos

O mecanismo de patogenicidade das *Aeromonas* é considerado multifatorial, sendo sua ação classificada como de nível não intestinal e gastrentérica (Ko & Chuang, 1995). Dentre os principais fatores de virulência podem ser destacados, a produção de biofilme, enterotoxinas (hemolíticas, citotônicas e citotóxicas), proteases, nucleases, lipases e outras proteínas com papel patogênico ainda pouco definido (Botarelli & Ossiprandi, 1999).

Como base nos dados obtidos foi possível observar que 78% dos isolados apresentaram atividade proteolítica (Tabela 4).

Tabela 4- Fatores de patogenicidade de *Aeromonas* isoladas de suínos.

Isolados	Atividade proteolítica (Relação entre halo/crescimento)	Atividade lipolítica (Relação entre halo/crescimento)	Atividade hemolítica (%)	Atividade hemolítica em placa	Formação de biofilme
IBAer 140	0,00	2,25	4,6	Negativo	Positivo
IBAer 141	1,50	2,60	4,8	Positivo	Positivo
IBAer 142	0,00	2,27	3,9	Positivo	Negativo
IBAer 143	1,70	2,89	6,0	Positivo	Negativo
IBAer 144	2,50	2,83	75,2	Positivo	Positivo
IBAer 145	2,67	2,31	76,7	Positivo	Positivo
IBAer 146	0,00	2,56	4,0	Positivo	Positivo
IBAer 147	1,60	2,90	4,8	Positivo	Positivo
IBAer 148	2,00	2,27	8,1	Positivo	Positivo
IBAer 149	1,80	2,43	4,6	Negativo	Positivo
IBAer 150	2,82	3,27	67,8	Positivo	Positivo
IBAer 151	1,90	2,50	74,5	Positivo	Positivo
IBAer 152	2,00	2,55	4,3	Positivo	Negativo
IBAer 153	2,17	2,58	5,2	Positivo	Negativo
IBAer 154	1,82	2,58	4,1	Negativo	Negativo
IBAer 155	0,00	2,89	4,6	Positivo	Positivo
IBAer 156	2,27	2,92	4,3	Positivo	Negativo
IBAer 157	2,91	3,45	78,5	Positivo	Negativo
IBAer 158	2,46	2,92	6,8	Positivo	Negativo
IBAer 159	1,45	2,80	8,6	Positivo	Positivo
IBAer 160	1,90	2,82	0,9	Positivo	Negativo
IBAer 161	0,00	2,64	2,2	Negativo	Negativo
IBAer 162	0,00	3,13	2,5	Negativo	Positivo

IBAer 163	0,00	3,33	2,0	Negativo	Positivo
IBAer 164	2,00	4,00	2,6	Negativo	Positivo
IBAer 165	2,00	2,40	2,7	Negativo	Positivo
IBAer 166	1,91	3,56	2,7	Negativo	Positivo
IBAer 167	2,27	4,13	91,9	Positivo	Positivo
IBAer 168	1,80	4,25	2,4	Positivo	Positivo
IBAer 170	2,80	4,00	92,0	Positivo	Positivo
IBAer 171	2,14	3,20	2,3	Positivo	Positivo
IBAer 172	1,40	3,20	3,0	Positivo	Positivo
IBAer 173	1,90	4,25	1,7	Negativo	Positivo
IBAer 176	2,88	4,29	1,9	Negativo	Positivo
IBAer 177	1,64	3,78	2,9	Positivo	Positivo
IBAer 178	1,89	4,75	2,4	Positivo	Positivo
IBAer 179	2,20	2,44	1,6	Negativo	Positivo
IBAer 181	0,00	2,50	2,4	Positivo	Positivo
IBAer 182	0,00	2,67	2,2	Positivo	Negativo
IBAer 183	0,00	2,71	43,8	Positivo	Negativo
IBAer 184	0,00	1,89	100,0	Positivo	Positivo
IBAer 185	1,91	3,27	41,6	Positivo	Positivo
IBAer 186	1,75	2,75	48,3	Positivo	Positivo
IBAer 187	2,00	3,00	50,8	Positivo	Positivo
IBAer 188	0,00	3,29	52,7	Positivo	Positivo
IBAer 189	1,90	3,29	43,5	Positivo	Positivo
IBAer 190	1,70	3,00	37,5	Positivo	Positivo
IBAer 191	1,91	3,33	49,8	Positivo	Positivo
IBAer 192	0,00	2,83	43,7	Positivo	Positivo
IBAer 193	1,83	2,18	45,3	Positivo	Positivo
IBAer 194	1,56	2,50	43,0	Positivo	Positivo
IBAer 195	2,25	1,39	45,4	Positivo	Positivo
IBAer 196	1,92	1,76	45,2	Positivo	Positivo
IBAer 197	2,50	1,82	44,9	Positivo	Negativo
IBAer 198	1,83	1,80	44,2	Positivo	Positivo
IBAer 199	2,17	2,64	49,8	Positivo	Negativo
IBAer 200	1,67	2,50	49,9	Positivo	Positivo
IBAer 201	2,08	3,29	54,0	Positivo	Positivo
IBAer 202	1,86	3,11	49,2	Positivo	Positivo
IBAer 203	1,80	3,50	51,8	Positivo	Positivo

As proteases foram consideradas importantes fatores de patogenicidade em peixes (Wakabayashi *et al.*, 1981) e em humanos (Cascón *et al.*, 2000). Segundo diversos autores, as proteases, em especial a elastase, podem atuar na degradação de anticorpos (principalmente IgA) e na degradação de proteínas presentes nas mucosas, propiciando assim a invasão de tecidos (Cascón *et al.*, 2000; Rivero *et al.*, 1991; Loewy *et al.*, 1993). A frequência de isolados proteolíticos foi menor do que aquela observada por Fadanelli (2005) em *Aeromonas sp* isoladas de fezes humanas, fato que pode estar associado à diferença entre espécies bacterianas preponderantes em cada tipo de amostra, já que a

frequência de *A. hydrophila*, espécie com alta atividade proteolítica, representam apenas 40% dos isolados de suínos.

Os 47 isolados proteolíticos exibiram halos de hidrólise de caseína com índices relativos à área de crescimento de 1,5 a 3,0, considerados altos (Figura 14). Este dado pode estar relacionado com a presença e expressão dos diferentes tipos de proteases, como metaloprotease (elastase), serina protease e zinco-protease (Rivero *et al.*, 1991; Loewy *et al.*, 1993; Cascón *et al.*, 2000). Análise do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 permitiu evidenciar a presença de pelo menos oito protease extracelulares e periplasmáticas nesta espécie (Seshadi *et al.*, 2006).

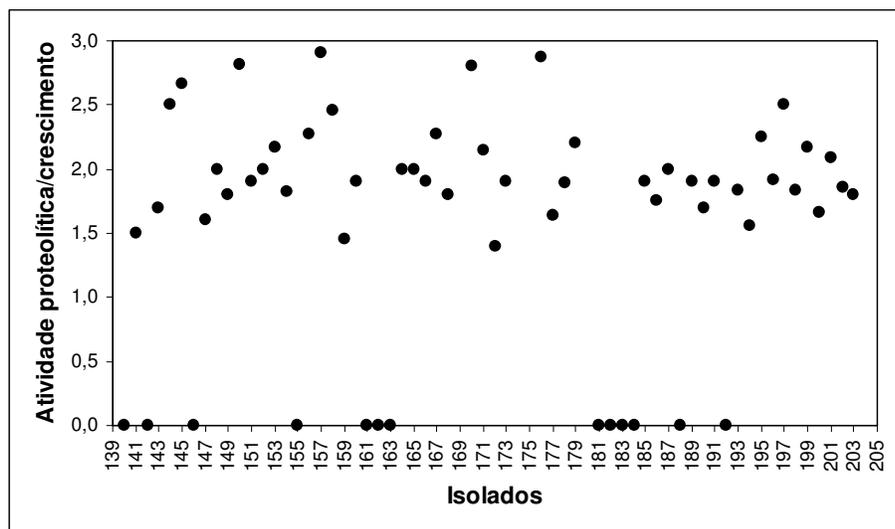


Figura 14- Atividade proteolítica relativa nos distintos isolados de *Aeromonas*.

Os isolados que não apresentaram atividade proteolítica foram classificados como *A. caviae*, *A. media*, ou *Aeromonas sp.* (Quadro 6).

Todos os isolados de suínos avaliados apresentaram atividade lipolítica (Tabela 4 e Figura 15). Estes dados podem estar relacionados, há que estes isolados foram obtidos de *swabe* de pele de suínos antes do processo de abate. A atividade lipolítica tem sido relacionada com sistemas de patogenicidade por causar interações com leucócitos e

distúrbios de sistemas imunológicos (Chuang *et al.*, 1997), mas pode estar também associada à permanência e competição de *Aeromonas* na pele.

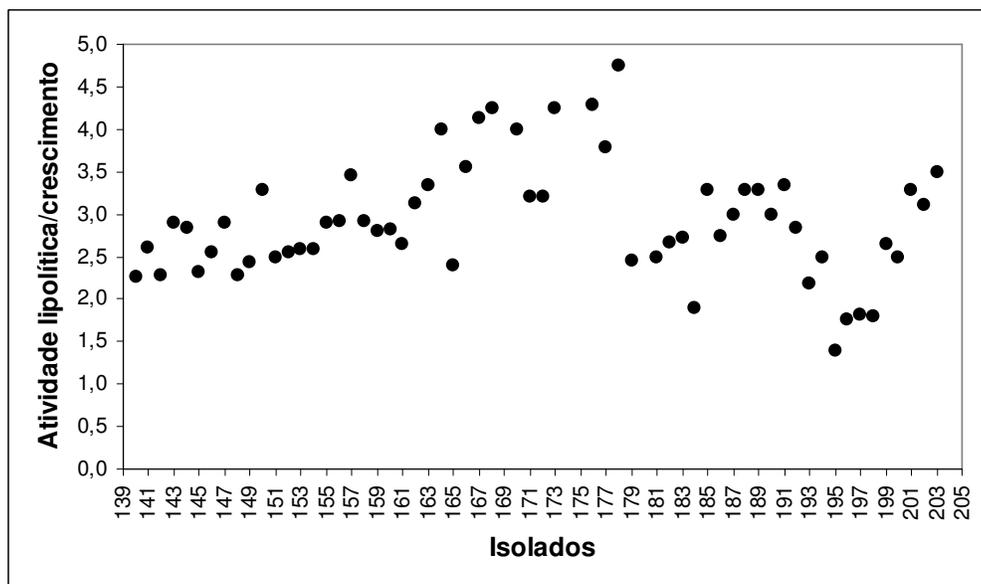


Figura 15- Atividade lipolítica relativa nos distintos isolados de *Aeromonas*.

Watanabe *et al.* (2004), constataram que 100% das linhagens de *Aeromonas* avaliadas apresentaram atividade *lipolítico*. Já Fadanelli (2005) mostrou que 87,6% dos isolados de fezes humanas e de aves apresentaram atividade *lipolítico*.

Vinte e oito isolados (46,67%) avaliados apresentaram atividade hemolítica (Figura 16). Trinta e dois isolados apresentaram uma atividade inferior a 10%, sendo, considerados negativas. Estes valores podem estar relacionados à falta de sistemas de indução, já que a expressão de alguns genes de virulência em *Aeromonas* é regulada pela quantidade de homoserina-lactona, molécula sinalizadora de *quorum-sensing* (Swift *et al.*, 1999).

A regulação da expressão dos genes codificadores de hemolisinas foi corroborada já que 80% dos isolados apresentaram atividade hemolítica em placas com sangue de carneiro. Cabe ressaltar que a atividade hemolítica tem sido reportada em *Aeromonas* como um dos mais importantes fatores de patogenicidade, já que a aerolisina, enterotoxina

citotóxica, é um tipo de hemolisina (Hsu *et al.*, 1981; Handfield *et al.*, 1996; Chacón *et al.*, 2003). Segundo Burke *et al.* (1983) a atividade hemolítica apresenta alta correlação (97%) com a presença de aerolisina e atividade citotóxica. Artigos relatam que aerolisina contribui para a virulência de *A. hydrophila*, estando bem difundidas dentro do gênero (Santos *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Analisando a distribuição de alguns genes de virulência em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas sp.* Chacón *et al.* (2003), detectaram que 72,6% do total de linhagens analisadas eram positivas para o gene da aerolisina sendo que a sua presença foi mais freqüente em isolados clínicos do que em ambientais.

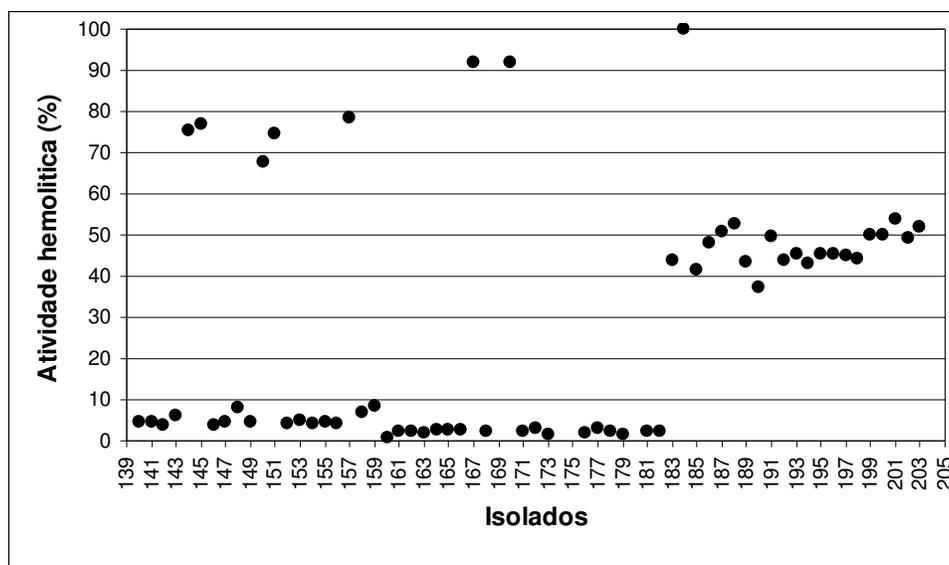


Figura 16- Atividade hemolítica percentual nos distintos isolados de *Aeromonas*.

Fadanelli (2005) demonstrou uma correlação positiva entre atividade hemolítica e proteolítica. Este fato pode estar relacionado à necessidade de maturação das hemolisinas, como por exemplo, a aerolisina é secretada na forma de proaerolisina (inativa) e é ativada por proteases produzidas pela própria bactéria (Howard & Buckley, 1985) ou pelo hospedeiro (Abrami *et al.*, 2003).

A formação de biofilmes esta associadas a capacidade de adesão (fimbrias e adesinas) e/ou formação de cápsulas. Dos isolados avaliados 77% formaram biofilmes em placas de poliestireno (Tabela 4).

Até o momento não existe uma compreensão exata dos mecanismos de colonização utilizados por *Aeromonas*. Entretanto, sabe-se que pilis do tipo IV estão implicados na adesão destas bactérias a enterocitos humanos (Kirov *et al.*, 2000) e que o flagelo de *Aeromonas* facilita a aderência destas bactérias a células epiteliais e a formação de biofilmes em plásticos (Gavín *et al.*, 2002; Gavín *et al.*, 2003). Deste forma, os pili de tipo IV e os flagelos podem ser considerados fatores de virulência em linhagens enteropatogênicas de *Aeromonas*.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho é possível tecer as seguintes conclusões.

- 1- A amplificação por PCR do gene *lipA* representa um método rápido, eficiente e sensível de determinação da presença de *Aeromonas* em amostras de suínos. Este sistema apresenta 100% de especificidade, tendo um limite de detecção de 10 (dez) bactérias por ml.
- 2- A obtenção de resultados confiáveis através de PCR-*lipA* em amostras de carcaças suínas requer enriquecimento por 12 a 18h e diluição das amostras prévio à amplificação.
- 3- Elevada incidência de *Aeromonas* foi constatada tanto pelo método de PCR-*lipA* (97%), quanto pelo plaqueamento (86,7%). As contagens bacterianas em carcaças suínas foi da ordem de 1 a 4 logUFC/100cm<sup>2</sup>.
- 4- Com base na correlação entre o RFLP-PCR e os métodos bioquímicos (42/60 isolados correlacionados) as espécies de *Aeromonas* presentes em carcaças suínas foram *A. media* 35,7% (15/42), *A. hydrophila* 26,2% (11/42), *A. caviae* 21,4% (9/42), *A. salmonicida* 9,5% (4/42), *A. trota* 2,4% (1/42), *A. schubertii* 2,4% (1/42), *A. veronii* 2,4% (1/42).
- 5- As dificuldades de avaliação do RFLP-PCR 16S rRNA, evidenciadas pelo elevado número de isolados não classificados (25%), mostra a necessidade de novos sistemas moleculares de classificação de *Aeromonas* com utilização de outros genes alvo.
- 6- As *Aeromonas* isoladas exibiram resistência a ampicilina (100%), sulfametoxazol/trimetoprima (85%), amoxicilina (73%), tetraciclina (67%), ciprofloxacina (40%), ceftazidima (28%), cloranfenicol (23%). Os antibióticos mais eficientes foram: aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona e gentamicina. A alta frequência de

isolados resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima e tetraciclina é indicativo do uso indiscriminado destes antibióticos durante a criação de suínos.

- 7- A maior parte dos isolados de *Aeromonas* obtidos de carcaças suínas exibiram atividade proteolítica, hemolítica, *lipolítico* e formação de biofilme, fatores de virulência que tornam estas bactérias potenciais causadoras de gastroenterites em humanos.

## 6. Referências bibliográficas

- Abbott, S.L.; Cheung, W.K.W.; Janda, J.M. (2003). The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, 41: 2348-2357.
- Abeyta Júnior, C.; Kaysner, C.A.; Wekell, M.M. (1990). Incidence of motile *Aeromonas* from United States west coast shellfish growing estuaries. **J. Food Protection**, Des Moines. v.53, p.849-855.
- ABIPECS - Associação Brasileira de Indústrias Processadoras e Exportadoras de Carne Suína (2007). Relatório Anual 2006, São Paulo. **Disponível (on line)** [http://www.abipecs.org.br/relatorios/abipecs\\_2relatorio\\_ativ\\_2006.pdf](http://www.abipecs.org.br/relatorios/abipecs_2relatorio_ativ_2006.pdf). (12 de abril).
- Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Sugimoto N, Zurzolo C, van der Goot FG. (2003). Sensitivity of polarized epithelial cells to the pore-forming toxin aerolysin. **Infect Immun.** 71: 739-746.
- Adams, C.A.; Austin, B.; Meaden, P.G.; McIntosh, D. (1998). Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4194-4201.
- Albert, M.J.; Ansaruzzaman, M.; Talukder, K.A.; Chopra, A.K.; Kuhn, I.; Rahman, M.; Faruque, A.S.G.; Islam, M.S.; Sack, R.B.; Mollby, R.(2000) Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **J. Clin. Microbiol.** 38: 3785-3790.
- Altwegg, M. (1999). *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Murray, P.R.; Baron, M.A.; Pfaller, E.J.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (Ed.). **Man. Clin. Microbiol. Amer. Soc. Microbiol.** p.507-516.

- Anguita, J.; Rodríguez, A.; Naharro, G. (1993). Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **J. Appl. Environ. Microbiol.** 59(8):2411-2417.
- Aoki, T. (1988). Drug-resistant plasmids from fish pathogens. **Microbiol. Sci.** 5: 219-223.
- Araujo, R.M.; Arribas, R.M.; Lucena, F. (1989). Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. **J. Appl. Bacteriol.** 67:213-217.
- Aslani, M.M.; Hamzeh, H.S. (2004). Characterization and Distribution of Virulence Factors in *Aeromonas hydrophila* Strains Isolated from Fecal Samples of Diarrheal and Asymptomatic Healthy Persons, in Ham, Iran. **Iranian Biomedical Journal.** 8: 199-203.
- Baron, E.J.; Peterson, L.R.; Finegold, S.M.(1994). *Vibrio* and related species, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, and others. In:Forbes, B.A.; Sahm, D.F.; Weissfeld,A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** Boston: Morby-Year Book. p. 429-444.
- Berends, B.R.; Knapen F.; Snijders J.M.A.; Mossel D.A.A.(1997). Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **J. Food Microbiology.** 36:199-206.
- Bernardes, M.V.S.; Mesquita, A.J.; Nunes, I.A.; Silva, P.C.; Rios, E.R.; Marques, L.R.S. (2003). Avaliação de Três Diferentes Sanitizantes em Viveiros de Piscicultura pela Contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Ciência Animal Brasileira.** 4: 69-83.
- Bizani, D.; Brandelli, A.(2001). Perfil de resistência / sensibilidade e virulência de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água obtidas em abatedouro de bovinos. **Braz. J. Microbiology.** 32:334-339.
- Blair, I.S.; Mac Mahon, M.A.S.; Mc Dowell, D.A.(1999) *Aeromonas*. Studies Research Unit, University of Ulster at Jordanstown, Co. Antrim, Northern Ireland.

- Borch E.; Nesbakken T.; Christensen, H.(1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 30:9-25.
- Borrell, N.; Acinas, S.G.; Figueras, M.J.; Martinez-Murcia, A.J. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA gene. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1671-1674.
- Botarelli, E.; Ossiprandi, M.C. (1999). *Aeromonas* Infections: An update. **Disponível (online)** <<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bottarelli2/bottarelli.htm>>. (15 maio).
- Buchanan, R.L.; Palumbo, S.A.(1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Safet .** 7: 15-29.
- Bulhões, C.C.C.; Rossi Junior, O.D. (2002). Occurrence of the genus *Aeromonas* in minas frescal cheese. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v. 54, n. 3. **Disponível (online)** [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01029352002000300017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01029352002000300017&lng=en&nrm=iso)>. (26 Junho).
- Burke, V.; Gracey, J.; Robinson, D.; Peck, D.; Beaman, J.; Bundell, C. (1983). The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* espécies and other injective agents. **J. Infect. Dis.** 148:6874.
- Carli, A. (2006). Resistência a antibióticos e presença de b-lactamases de espectro expandido (ESBLs) em *Aeromonas*. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Carnahan, A.M.; Behram, S.; Joseph, S.W. (1991) Aerokey II: aflexible key for identifying clinical Aeromas species. **J. Clin. Microbiol.** 29: 2843-2849.
- Carnahan, A.M.; Altwegg, M. (1996). Taxonomy. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. **The Genus *Aeromonas***. New York: John Wiley & Sons. p. 1-38.
- Carnahan, A.M.; Joseph, S. W. (2005). Order XII. Aeromonadales ord. nov. In: Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Garrity, G. M. **Bergey's Manual of Systematic**

- Bacteriology**, 2nd vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), p. 556.
- Cascón, A.; Jugueros, J.; Temprano, A.; Sánchez, M.; Hemanz, C.; Lunego, M. J.; Naharro, G. A. (2000). A Major Secreted Elastase is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophilla*. **Infect. Immun.** 68: 3233-2341.
- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M.J.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Fernández-Rendón, E.; Aparicio, G.O.; Guarro, J.; Chacón, M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **Int. J. Food Microbiol.** 84:41–49.
- Chacón, M.R.; Figueras, M.J.; Castro-Escarpulli, G.; Soler, L.; Guarro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek.** 84: 269-278.]
- Chaudhury, A.; Nath, G.; Shukla, B.N.; Sanyal, S.C. (1998). Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. **J. Med. Microbiol.** 44: 434-437.
- Chuang, Y.C.; Chiou, S.F.; Su, J.H.; Wu, M.L.; Chang, M.C. (1997). Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology.** 143: 803-812.
- CLSI (2005) Manual Clinical and Laboratory Standards Institute traduzido pela ANVISA. <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>
- Corrêa, A.A.; Fuentesfria, D.B.; Corção, G. (2005). Resistência a antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de fezes de suínos. **Acta Sci. Vet.** 33: 155-159.
- Corrêa, S.; Rigon, L.; Rosa, G. R.; Reetz, E.; Vencato, A.; Beling, R. R.(2007). **Anuário brasileiro de aves e suínos 2006**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta de Santa Cruz. 136p.

- Costa, F.N.; Rossi Júnior, O.D.(2002) Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 54: 534-535.
- Daily, O.P.; Joseph, S.W.; Coobaugh, J.C.; Walker, R.I.; Merrel, B.R.; Rollins, D.M.; Seidler, R.J.; Colwell, R.R.; Lissner, C.R. (1981). Association of *A. sobria* with human infection. **J. Clin. Microbiol.** 13:769-777.
- Delamare, A.P.L. (1999). Produção de Anticorpos Monoclonais, Identificação Molecular e Tolerância à Salinidade em *Aeromonas*. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.
- Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Da Silveira, M.M.; Echeverrigaray, S. (2000). Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 57-60.
- DePaola, A.; Flynn, P.A.; McPhearson, R.M.; Levy, S.B. (1988). Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1861-1863.
- Dugenci, S.K.; Candan, A. (2003). Isolation of *Aeromonas* Strains from the Intestinal Flora of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L. 1758). **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 27: 1071-1075.
- Echeverria, P.; Harrison, B.A.; Tirapat, C.; McFarland, A.(1983). Flies as source of enteric pathogens in a rural village Thailand. **J. Clin. Microbiol.** 46: 32-36.
- Fadanelli, R. (2005). Prevalência de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em *Aeromonas* sp. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.
- Fang, B.; Li, J.N. (2005). Virulence gene sequence analysis for *Aeromonas* isolated from Anhui (Unpublished) *seqüência* depositada DQ302128.

- Fang, B.; Li, J.N; Wang,T.J. (2005). Virulence gene sequence analysis for *Aeromonas* isolated from Anhui (Unpublished) *seqüência* depositada DQ302130.
- Gavín, R.; Rabaan, A.A.; Merino, S.; Tomás, J.M.; Gryllos, I.; Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Mol. Microbiol.** 43:383-397.
- Gavín, R.; Merino, S.; Altarriba, M.; Canals, R.; Shaw, J.G.; Tomás, J.M. (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiol. Lett.** 224:77-83.
- Ghenghesh, K.S.; Bara, F.; Bukris, B.; El-Surmani, A.S.S. (1999). Characterization of Virulence Factors of *Aeromonas* Isolated from Children with and without Diarrhoea in Tripoli. **J. Diarrhoea Dis.** 17: 75-80.
- Ghenghesh, K.S.; El-Ghodban, A.; Dkakni, R.; Abeid, S.; Altomi, A.; Tarkumi, A.; Marialigeti, K. (2001). Prevalence, Species Differentiation, Haemolytic Activity, and Antibiotic Susceptibility of *Aeromonas* in Untreated Well Water. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96: 169-173.
- Gill, C.O., Jones, T. (1995). The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. **J. Food Microbiol.** 12:135-141.
- Gill, C. O.; Jones, T.(1997). Assessment of the hygienic characteristics of a process for dressing pasteurizad pig carcasses. **J. Food Microbiol.** 14:81–91.
- Gill, C. O.; Mcginnis, J. C. (2000). Contamination of beef trimmings with *Escherichia coli* during a carcass breaking process. *Food Research International.* 33:125– 130.
- Goñi-Urriza, M.; Pineau. L.; Capdepuy,M.; Roques, C.; Caumette, P.; Quentin,C. (2000). Antimicrobial resistanse of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. **J. Antimicrob. Chemother.** 46: 297-301.

- Gosling P.J. (1996). *Aeromonas* species in disease of animals. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. **The genus *Aeromonas***. New York: John Wiley & Sons. p. 175-196.
- Guerra, I. (2001). Prevalência de *Aeromonas* em pacientes hospitalizados com diarreia. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Handfield, M.; Simard, P.; Couillard, M.; Letarte, R. (1996). *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3459-3462.
- Havelaar, A.H.; During M.; Versteegh J.F.M. (1987). Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. **J. Appl. Microbiol.** 62: 279-287.
- Hedges, R.W.; Smith, P.; Brazil, G. (1985). Resistance plasmids of Aeromonads. **J. Gen. Microbiol.** 131: 2091-2095.
- Hofer, E.; Reis, C.M.F; Theophilo, G.N.D. (2006) Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **Disponível (online)**. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822006000200016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000200016) & Ing =pt&nrm=iso>. ISSN 0037-8682. (14 maio).
- Holley, R.A., Peirson, M.D., Lam, J., Tan, K.B.(2004). Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork and normal or short storage life. **Int. J. Food Microbiol.** 97: 53-62.

- Holmes P.; Niccolls L.M.; Sartory D.P. (1996). The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. **The genus *Aeromonas***. New York: John Wiley & Sons. p. 127-150.
- Hoshino,H.; Watanabe, N.; Morita, K. (2005). The nucleotide sequence of lipase-like protein gene in *Aeromonas sobria* (Unpublished) *seqüência* depositada AB206038.
- Howard, S. P.; Buckley, J. T. (1985). Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. **J. Bacteriol.** 163, 336–340.
- Hsu, T. C., Waltman, W. D. & Shotts, E. B. (1981). Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Dev. Biol. Stand.** 49, 101–111.
- Iaconis, J.P.; Sanders, C.C.(1990). Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.** 34:44-51.
- Ingham, A. B.; Pemberton, J. M. (1995). Lipase of *Aeromonas hydrophila* showing nonhemolytic phospholipase C activity. **Curr. Microbiol.** 31:28-33.
- Janda, J.M.; Abbott, S.L.; Morris, J.G. (1995). *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella* In: Blaser, M.J.; Smith, P.D.; Ravdin, J.I.; Greenberg, H.B.; Guerrant, R.L. **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press. p. 905-917.
- Janda, J.M; Abbott, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clin Infect. Dis.** 27: 332-344.
- Kannan, S.; Suresh Kanna, P.; Karkuzhali, K.; Chattopadhyay, U.K.; Pal, D. (2001). Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences** 5:91-94.

- Kirov, S.M.; Anderstani, E.K.; Hayward, L.J. (1993a). The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. **Int. J. Food Microbiol.**, 20:159-168.
- Kirov, S.M.; Hui, D.S.; Hayward, L.J.(1993b). Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **J. Food. Protection.**56:306-312.
- Kirov, S.M.; Barnett, T.C.; Pepe, C.M.; Strom, M.S.; Albert, M.J. (2000). Investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **Infect Immun.** 68: 4040-4048.
- Ko, W.C.; Chuang, Y.C. (1995). *Aeromonas* bacteremia: Review of 59 episodes. **Clin. Infect. Dis.**20:1298- 1304.
- Ko, W.C.; Yu, K.W.; Liu, C.Y.; Huang, C.T.; Leu, H.S.; Chuang, Y.C. (1996). Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40:1260-1262.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C.(2001). **Diagnóstico molecular.** Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica Ltda.
- Lakshmanaperumalsamy, P.; Thayumanavan, T.; Subashkumar, R. (2004). ***Aeromonas hydrophila: a re-emerging pathogen.*** Department of Environmental Sciences, Bharathiar University Coimbatore. Tamil Nadu. 2004 p 115-118.
- Li, M. Y.; Zhou, G. H.; Xu, X. L.; Li, C. B.; Zhu, W. Y. (2006). Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. **Food Microbiol.** 23: 607- 611.
- Loewy AG, Santer UV, Wieczorek M, Blodgett JK, Jones SW, Cheronis JC. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase from cultures of *Aeromonas hydrophila*. **J Biol Chem.** 268: 9071-9078.

- Lopes, C.M.M.; Oliveira, C.A.F. (2002). Avaliação da contaminação microbiana superficial de carcaças, em diferentes etapas do abate de bovinos e suínos. **Rev. Higiene Alimentar**.16:71-75.
- Majeed, K.N.; Egan, A.F.; Mac, R. I.C.(1990). Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. **J. Appl. Bacteriol.** 69: 332-337.
- Maribo, H.; Olsen, E. V.; Barton-Gade, P.; Moller, A. J.; Karlsson, A. (1998).Effect of early post-mortem cooling on temperature, pH fall and meat quality in pigs. **Meat Science.** 50:115-129.
- Martinez-Murcia, A.J.; Benlloch, S.; Collins, M.D. (1992). Phylogenetic interrelationship of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA/DNA hybridizations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42: 412-421.
- Martins, A.D.; Medonça, R.C.S; Sodre, A.(2004) Principais Patógenos Associados à Carne Suína. Grupo Dipemar - **Revista da Carne**. Ed. 332.
- Matsubara, E. N. (2005). Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Merino, M.; Aguilar, A.; Noguera, M. M.; Regue, M.; Swift, S.; Toma, J.T. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34, **Infect. Immun.** 67(8), 4008-4013.
- Miyata, M.; Aoki, T.; Inglis, V.; Yoshida, T.; Endo, M. (1995). RAPD Analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. **J.Appl. Bacteriol.**79: 181 - 185.
- Millership, S.E. (1996). Identification. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed) **The Genus Aeromonas**. John Wiley & Sons, New York, NY. p 1 - 38.

- Miñana-Galbis D. (2002). Biochemical Identification and Numerical Taxonomy of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Clinical Samples in Spain. **J. Appl. Microbiol.** 93: 420-430.
- Morse, J.W.; Hird, D.W. (1984). Bacteria isolated from lymph nodes of California slaughter swine. **J. Vet. Res.** 45:1648-9.
- Nayduch, D., Honko, A., Noblet, G.P., Stutzenberger, F. (2001). Detection of *Aeromonas caviae* in the common housefly *Musa domestica* by culture and polymerase chain reaction. **Epidemiol. Infect.** 127: 561-566.
- Neves, M.S., Nunes, M.P., Ricciardi, I.D. (1990). Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Protection.** 53:78-80.
- Nojimoto, I.T.I.; Bezana, C.S.C.; Carmo C.; Valadão, L.M.; Carrijo, K.M. (1997). Prevalência de *Aeromonas* spp em Fezes Diarréicas de Crianças Menores de 5 Anos de Idade na Cidade de Goiana, Goiás, no Biênio 1995-1996. **Rev. Soc. Bras. de Med. Tropical.** 30: 385-388.
- Olsson, C.; Ahrne, S.; Pettersson, B.; Molin, G. (2003). The bacterial flora of fish and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16SrRNA genes. **Int. J. Food Microbiol.** 83: 245-252.
- Ozbas, Z.Y., Lehner, A., Wagner, M. (2000) Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in raw milk. **Food Microbiology.** 17: 197-203.
- Palumbo, S.A.; Maxino, F.; Willians, A.C.; Buchanan, L.R.; Thayer, W.D. (1985). Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 50: 1027-1030.
- Palumbo, S.A.; Bencivango, M.M.; Del Corral, F. (1989). Characterisation of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. **J. Clin. Microbiol.** 27:854-859.

- Palumbo, S.A. (1996) The *Aeromonas hydrophila* group in food. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. **The Genus *Aeromonas***. New York: John Wiley & Sons. p. 287-304.
- Pearce, R.A.; Boltona, d. J.; Sheridanana, J.J.; McDowellb, D.A.; Blairb, I.S.; Harringtonc, D. (2003) Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control points systems. **Int. J. Food Microbiol.** 90:331-339.
- Pereira, C.S.; Possas, C.A.; Viana, C.M.; Rodrigues, D.P. (2004). *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) In Natura e Pré-Cozidas no Rio de Janeiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 24(4): 562-566.
- Popoff, M.; Coynault, C.; Kiredjan, M.; Lemelin, M.(1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. **Curr. Microbiol.** 1981; 5: 109-114.
- Reith, M.E., Singh, R.K.; Curtis, B.; Boyd, J.; Bouevitch, A.; Kimball, J.; Munholland, J.; Murphy, C.; Sarty, D.; Williams, J.; Nash, J.; Johnson, S.; Brown, L. (2007). **The genome sequence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449** (Unpublished) *seqüência* depositada NC\_009348.
- Rhodes, G.; Huys, G.; Sdwings, J.; McGann, P.; Hiney, M.; Smith, P.; Pickup, R.W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonas* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant TetA. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3883-3890.
- Rivas, T.; Vizcaíno, J.A.; Herrera, F.J.(2000). Microbial contamination of carcasses and equipments from na Iberian pig slaughterhouse. **J. Food Protection.** 63(12):1670-1675.
- Rivero O, Anguita J, Mateos D, Paniagua C, Naharro G. (1991).Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiol Lett.** 65:1-7.

- Rocha, S.M. (2004). Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins-SP. **Dissertação de Doutorado**. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K.(1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. **Int. J. Food Microbiol.** 17:37-45.
- Rossi Jr., O.D.; Amaral, L.A.; Nader Filho, A. (2000) Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. **Disponível (on line)** <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352000000500023&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000500023&lng=pt&nrm=iso)>. (11 Maio).
- Rossi Jr., O.D.; Amaral, L.A.; Nader Filho, A.(2001). Enterotoxigenicidade de cepas de *Aeromonas* sp. isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate bovino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 53:589-594.
- Rutz, F.; Lima, G.J.M.M. de (2006). O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil.
- Saad, S.M.I.; Iaria, S.T.; Furlanetto, S.M.P. (1995). Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Microbiol.** 26: 22-27.
- Saavedra, M.J.; Figueras, M.J.; Martinez-Murcia, A.J. (2006). Updated phlogeny of the genus *Aeromonas*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2481-2487.
- Saavedra M.J.; V. Perea; M.C. Fontes; C. Martins And Martínez-Murcia A.J. (2007). Phylogenetic identification of new *Aeromonas allosaccharophila* strains isolated from pigs, a species not detected since first description. **Antoine-van-Leeuwenhoek** 91: 159-167.
- Saiyudthong, S.; Japakaset, J. (2001). Study on *Aeromonas* spp from meat in Thailand. **Food.** 31: 257-267.

- Sandkvist, M.(2001). Biology of Type II Secretion. Molecular. **Microbiology**. 40: 271.
- Santos, J.A; Gonzalez, C.J; Otero, A.; García-López, M.I.(1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 5612-5614.
- Schmidt, A.S.; Bruun, M.S.; Dalsgaard, I.; Larsen, J.L. (2001). Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile *Aeromonas* from a fish farming environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 5675-5682.
- Segatore, B.; Massidda, O.; Satta, G.;Setacci, D.; Amicosante, G..(1993) High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 37:1324-1328.
- Seshadri,R.; Joseph, S.W.; Chopra, A.K.; Sha, J.; Shaw, J.; Graf, J.; Haft, D.; Wu, M.; Ren, Q.; Rosovitz, M.J.; Madupu, R.; Tallon, L.; Kim, M.; Jin, S.; Vuong, H.; Stine, O.C.; Ali, A.; Horneman, A.J.; Heidelberg, J.F.; (2006) Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **J. Bacteriol.** 188: 8272-8282.
- Siqueira, R. S. (1995) **Manual de Microbiologia de Alimentos**. 1. ed. Brasilia: EMBRAPA-SPI, 159 p.
- Snellman, E.A.; Sullivan, E.R.; Colwell, R.R. (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter*. sp. RAG-1. **Eur. J. Biochem.** 269: 5771-5779.
- Socorro, E.C.L.; Pinto, P. S. A; Santos, J. L; Vanetti, M. C. D; Bevilacqua, P. D; Almeida, L. P; Pinto, M. S.; Dias, F. S. (2004). Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus*

- aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesq.Vet. Bras.** 24(4):185-190.
- Soithong, S.; Jantima, J. (2001) Study on *Aeromonas* spp. from meat in Thailand. **Food.** 31(4): 257-267.
- Subashkumar, R.; Thayumanavan, T.; Vivekanandhan, G.; Kakshmanaperumalsamy, P. (2006). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in Acute Gastroenteritis Among Children. **Indian. J. Med. Res.** 123: 61-66.
- Swift, S.; Lynch, M. J., Fish, L.; Kirke, D. F.; Tomas, J. M.; Stewart, G. S. ; Williams, P. (1999). Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 67: 5192-5199
- Tequianes-Bravo, L.; Pérez-González, D. A.; González-Malvárez, M. M.; Flores-Pimentel, M.; Marroquín-Segura, R. (2005). Aislamiento de *Aeromonas* Productoras de Aerolisina y Enterotoxina, em Amuestras de Água Potable em la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y Otras. **Dep. Univ. Nac. Aut. México.** 30: 23-29.
- Veloso, M. G. (2000). Microbiologia das carnes. In: Gil, I (Ed.). **Manual de inspeção sanitária de carnes.** Serviço de Educação Fundação Calovste Gulbenkian. 1:251-279.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Gallardo, F.; Vargas, M.; Soler, L.; Figueras, M.J.; Gascon, J. (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerg Infect Dis.** 9: 552- 555.
- Wakabayashi, H., Kanai, K., Hsu, T. and Egusa, S. (1981) Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar. *hydrophila* (Chester), Popoff and Vernon, 1976 to shes. **Fish Pathology** 15:319-325.
- Warris, P.D. (2000). **Meat science: and introductory text.** Oxon: CABI Publishing, 312p.
- Watanabe, N.; Morita, K.; Furukawa, T.; Manzoku, T.; Endo, E.; Kanamori, M. (2004). Sequence and Analysis of Amplified DNA Fragments Containing the Region

- Encoding the Putative Lípase Substrate-Binding Domain and Genotyping of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 145-151.
- Wretling, B.; Möllby, R.; Wadström, T. (1971). Separation of two Hemolisin from *Aeromonas hydrophila* by Isoelectric Focusing. **Infect. Immun.** 4: 503-505.
- Yáñez, M.A.; Catalán, V.; Apráiz, M.J.; Figera, M.J.; Martínez-Murcia, A.J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 875-883.
- Yu, S.L.; Bolton, D.; Laubach, C.; Kline, P.; Oser, A.; Palumbo, S.A. (1999). Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. **J. Food Protect.** 62: 1478 – 1481.
- Zanella, J.F.P.(2002) Avaliação da incidência de *Aeromonas* em trabalhadores de aviários e estudo da resposta ao contato permanente com *Aeromonas*. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Zhang, Y.L.; Ong, C.T.; Leung, K.Y. (2000). Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. **Microbiology.** 146: 999-1009.
- Zucolotto, T.; Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Echeverrigaray, S. (2006). *Aeromonas* Growth Under Low Temperatures. In: Mendez-Vilas, A. (Org.) **Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions**. Weinheim: Willey-VCH. p. 276-280.