



VI CONGRESSO LATINOAMERICANO
E XII CONGRESSO BRASILEIRO DE
**HIGIENISTAS
DE ALIMENTOS**

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZOOSE

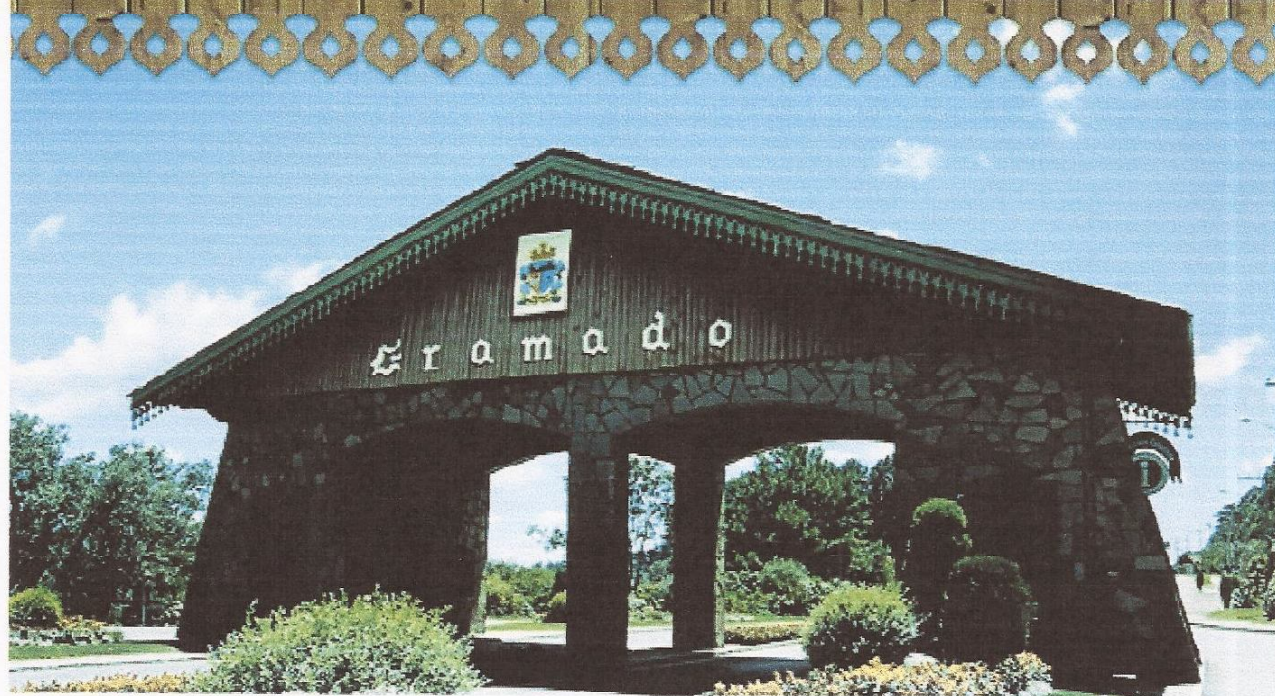
IV ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO
DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

23 a 26

Abril de 2013

**Hotel Serrano Resort
Gramado - RS**

**OS ALIMENTOS SOB A ÓTICA DA SUSTENTABILIDADE:
ENTRE A CONSCIÊNCIA E A PRÁTICA**



Realização



Organização e
Operadora de Turismo



Apoio



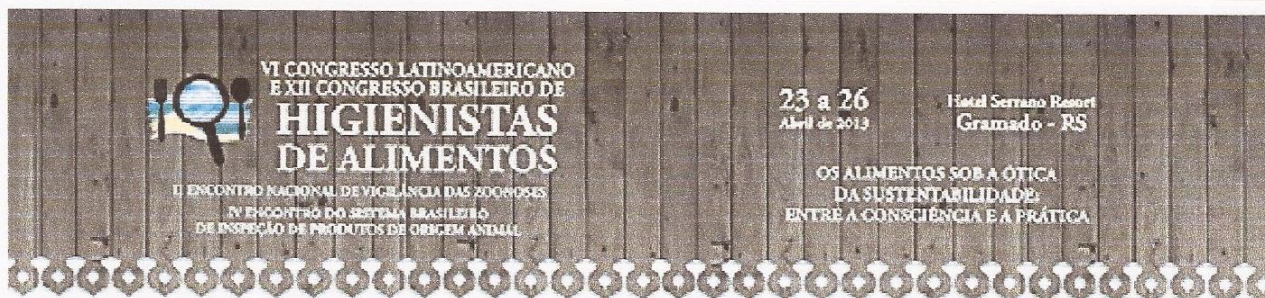
Ministério da
Saúde

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Parceria





PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *AEROMONAS* SPP. ISOLADA NO FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL INDUSTRIAL E ARTESANAL

RESISTANCE PROFILE OF *AEROMONAS* SPP. ISOLATED ON INDUSTRIAL AND ARTISANAL PRODUCTION FLUXOGRAMA OF MINAS FRESCAL CHEESE

Natacha Deboni CERESER¹, Oswaldo Durival Rossi JÚNIOR², Thais Mioto MARTINELLI³, Viviane de SOUZA⁴, Laura Reatriz Rodrigues⁵, Daniela de Avila Silva BOHRZ⁶, Carla Ferreira da SILVA⁷, Lillian Andriava dos SANTOS⁷

¹ Professora Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas-RS;

² Professor, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista-UNESP/Jaboticabal-SP;

³ Doutoranda, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista-UNESP/Jaboticabal-SP;

⁴ Pesquisadora, Embrapa Caprinos e Ovinos;

⁵ Professora, Universidade de Passo Fundo-RS;

⁶ Médica Veterinária, Prefeitura Municipal de Quinze de Novembro-RS;

⁷ Mestrandas em Bioexperimentação – Universidade de Passo Fundo-RS.

Palavras-Chave: Antimicrobiano, *A. hydrophyla*, produtos lácteos.

Introdução

Aeromonas spp. são bastonetes gram-negativos, de vida livre, anaeróbios facultativos, classificadas em uma família própria, *Aeromonadaceae* (GHENGHESH et al., 2008), sendo importantes agentes de gastroenterites transmitidas aos seres humanos pelo contato e consumo de carne e água contaminadas (ABDULLAH et al., 2003). As três espécies de *Aeromonas* mesofílicas consideradas mais importantes e causadoras de várias enfermidades em humanos são *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* e *A. caviae* que correspondem a 85% de todos os isolados clínicos envolvidos em infecções gastrointestinais e extraintestinais (DASKALOV, 2006). Procedimentos adequados de higiene são essenciais na prevenção da propagação de infecções por *Aeromonas* (IGBINOSA et al., 2012).

O aparecimento de cepas com múltipla resistência a agentes antibacterianos constitui um problema na atualidade de grande importância para a saúde pública (VIVEKANANDHAN et al., 2002). Isolados de *Aeromonas* com múltipla resistência a antimicrobianos têm sido relatados em diversas partes do mundo (HUYS et al., 2001, VIVEKANANDHAN et al., 2002, PETERSEN e DALSGAARD, 2003, AWAN et al. 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de resistência de *Aeromonas* spp. isoladas do fluxograma da produção de queijo fresco, de produção artesanal e industrial, frente às drogas de uso comum na medicina humana e animal.

Material e Métodos

Foram analisados os perfis de resistência de um total 98 isolados de diferentes espécies (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii* e *A. jandaei*) obtidos a partir de produtos e pontos do fluxograma de produção do queijo Minas Frescal de produção industrial e artesanal, incluindo água de abastecimento, superfície de equipamentos, mãos de manipuladores, leite cru e após processamento térmico, massa coagulada e queijo pronto para consumo.

As coletas foram realizadas em dias normais de trabalho seguindo a metodologia estabelecida pela American Public Health Association (2001). Quanto ao processamento do queijo Minas Frescal, as amostras foram obtidas em 12 dias de coleta em uma usina de beneficiamento de grande porte, localizada no Estado do Rio Grande do Sul, submetida a controle higiênico-sanitário permanente. As amostras de queijo artesanal foram obtidas em cinco coletas, realizadas diretamente em uma fazenda leiteira, também localizada no Estado do Rio Grande do Sul, que destina parte de sua produção diária de leite para elaboração de queijo de forma artesanal.



Para isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas* spp. foi adotada a metodologia estabelecida por Palumbo et al. (1985) e Abeyta Júnior et al. (1990). A caracterização das espécies foi realizada seguindo o esquema de Popoff (1984). Os testes de sensibilidade a antimicrobianos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Bauer et al. (1966) e NCCLS (1986). Foram testados 15 princípios ativos de uso rotineiro na medicina humana e animal, sendo eles: amicacina, amoxicilina, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim e tetraciclina.

Resultados e Discussão

O presente estudo mostrou uma realidade preocupante, por revelar culturas de *Aeromonas* de diferentes espécies, resistentes a múltiplas drogas, conforme está demonstrado nas Tabelas 1 e 2, especialmente dos isolados obtidos na linha de produção do queijo Minas Frescal industrial. Neste caso, 98,3% dos isolados apresentaram resistência a dez ou mais princípios, 51,8% dos isolados foram resistentes a todos os princípios testados. Para *A. caviae*, *A. sobria* e *A. schubertii* 100,0% das culturas apresentaram resistência a seis ou mais princípios. A múltipla resistência já havia sido relatada por ROSSI JÚNIOR et al. (2000) que detectaram 84,3% de cepas resistentes a dois ou mais antimicrobianos.

Tabela 1 - Distribuição das culturas de *A. caviae*, *A. sobria* e *A. schubertii* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do queijo Minas Frescal Industrial, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes.

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

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

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

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

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



Tabela 2 - Distribuição das culturas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veroni* e *A. jandaei* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do queijo artesanal, na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes.

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

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

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

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

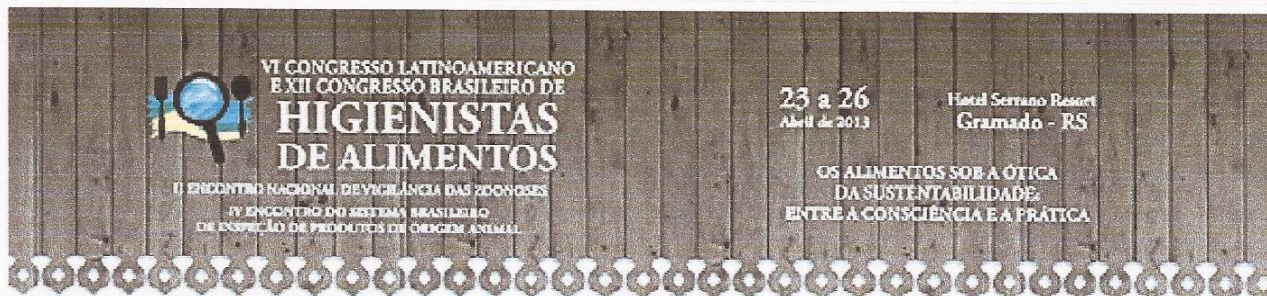
Para os isolados obtidos durante o fluxograma de produção do queijo artesanal, 75% foram resistentes a pelo menos dez antimicrobianos. Verifica-se que das 17 culturas de *A. hydrophila* submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, 15 (88,2%) apresentaram resistência a, no mínimo, onze princípios.

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

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

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

Para alguns grupos de antimicrobianos, houve diferença significativa quanto ao perfil de resistência de isolados obtidos durante o fluxograma de produção dos diferentes tipos de queijos. Para os Beta-lactâmicos e aminoglicosídeos ($p < 0,01$) e para quinolonas e cloranfenicol ($p < 0,05$), a resistência foi maior nos isolados *Aeromonas* spp. identificados durante a produção do queijo Minas Frescal industrial. Para tetraciclinas e sulfamídicos não existiu diferença entre os grupos. É possível que a maior resistência observada nos isolados



a partir da produção industrial, esteja associada ao uso de diferentes antimicrobianos, representando diversas propriedades rurais e não apenas uma como ocorre na produção artesanal.

A comparação, com resultados obtidos por outros autores, quanto ao perfil de resistência, revela-se preocupante, especialmente em aspectos ligados à saúde pública. Guerra et al. (2007) isolaram *Aeromonas* spp. em 27 (6,6%) de 408 pacientes acometidos de gastroenterite aguda em dois hospitais do Rio Grande do Sul, sendo *A. hydrophila* (51,8%), *A. caviae* (40,8%) e *A. veronii* biotipo sobria (7,4%). A maior prevalência de *Aeromonas* ocorreu em lactantes e crianças. Todos os isolados de *Aeromonas* apresentaram resistência a ampicilina, ticarcilina/ácido clavulânico, cefalotina e cefazolina, e a maior parte (>70%) exibiram resistência a imipenem, carbenicilina, amoxicilina/sulbactam e piperacilina. Resistência múltipla foi evidenciada em 29,6% dos isolados. Os antibióticos mais eficientes foram as quinolonas (ciprofloxacim e norfloxacin) e os aminoglicosídeos (amicacina e netilmicina).

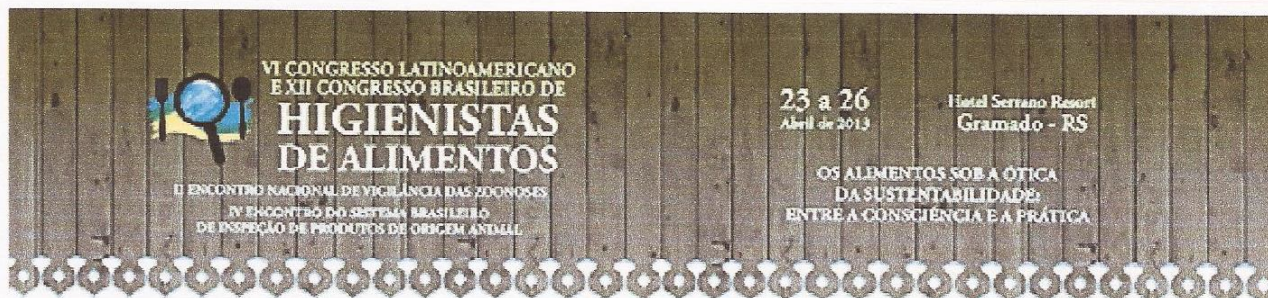
Entre os patógenos entéricos, o elevado índice de resistência constitui-se em problema grave nos países em desenvolvimento, onde existe uma alta taxa de gastroenterites e uso inadequado de antibióticos (GUERRA et al., 2007). A prevenção da propagação das linhagens de *Aeromonas* envolvidas em surtos de diarreia deve ser realizada através de medidas sanitárias adequadas na preparação de alimentos, como lavagem das mãos e sistema de eliminação eficiente de águas residuais. A vigilância adequada da água, alimentos, e instalações sanitárias, utilizando diagnósticos de saúde pública e procedimentos de detecção são essenciais para evitar surtos de diarreia por *Aeromonas* nos seres humanos (IGBINOSA et al., 2012).

Conclusão

Para todas as espécies de *Aeromonas* identificadas, o perfil de resistência às drogas de uso comum na medicina humana e animal, foi superior ao relatado na bibliografia consultada. Esses achados são preocupantes, especialmente considerando que os isolados foram obtidos na linha de processamento de dois diferentes tipos de queijos amplamente consumidos no Brasil, revelando risco à saúde pública, e evidenciando a necessidade de redução no uso indiscriminado de drogas antimicrobianas nos animais de produção.

Referência Bibliográficas

- ABDULLAH, A.I. et al. Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.1001-1007, 2003.
- ABEYTA JÚNIOR, C. et al. Incidence of motile *Aeromonas* from United States west coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, v. 53, n.10, p. 849-855, 1990.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. 676p.
- AWAN, M. B. et al. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. Isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates, **New Microbiologica**, v.32, n.1, p.17-23, 2009.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and emagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p.334-339, 2001.
- COSTA, F.N.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.5, 2002.



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

GHENGHESH, K.S. et al. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **Journal Infect Developing Countries**, v.2, n.2, p.81-98, 2008.

GUERRA, I.M.F. et al. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in South Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.638-643, 2007.

HUYS, G. et al. Comparison of the antimicrobial tolerance of oxytetracycline-resistant heterotrophic bacteria isolated from hospital sewage and freshwater fishfarm water in Belgium. **Systematic and Applied Microbiology**, v.24, n.1, p.122-130, 2001.

IGBINOSA, I.H. et al. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. **The Scientific World Journal**, Article ID 625023, 13p.doi:10.1100/2012/625023, Volume 2012, 2012.

MATYAR, F. et al. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environmental Monitoring Assessment**, v.167, p.309-320, 2009.

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

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

PEIXOTO, L.J.S. et al. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.3, p.453-461, 2012.

PETERSEN, A; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, v.219, n.4, p.71-82, 2003.

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

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

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.5, p.1077-1086, 2004.

VIVEKANANDHAN, G. et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, n.1-2, p.165-168, 2002.

Autor a ser contatado: Natacha Deboni Cereser, Professora Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas - RS – e-mail: natachacereser@yahoo.com.br