

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE
SALMÃO (*Salmo salar*) COMERCIALIZADO EM
ALGUMAS CIDADES DA REGIÃO NORDESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Natália Maramarque Nespolo
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS
DE SALMÃO (*Salmo salar*) COMERCIALIZADO EM
ALGUMAS CIDADES DA REGIÃO NORDESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Natália Maramarque Nespolo

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva.

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NATÁLIA MARAMARQUE NESPOLO – nascida na cidade de Ribeirão Preto-SP, em 24 de junho de 1983, é Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília – Unimar, Marília-SP, no ano de 2005. Durante o período de graduação realizou diversos estágios, entre eles, na Prefeitura Municipal de Marília participando de campanhas de vacinação anti-rábica e ações em Educação em Saúde, e também no Serviço de Inspeção Federal (SIF 421) na Indústria e Comércio de Carnes Minerva Ltda. Após o término do Curso de Graduação realizou estágio junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal, na área de Análise de Alimentos e frequentou o Curso de Capacitação para Médicos Veterinários Responsáveis Técnicos em Estabelecimentos Produtores de Alimentos de Origem Animal, oferecido pela FCAV/UNESP. Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior.

DEDICATÓRIA

A DEUS por guiar minha vida.

Aos meus pais, Roberto Aparecido Nespolo e Suely Maramarque Nespolo, por me dar a vida em primeiro lugar e também pelo amor, amizade, companheirismo, dedicação, atenção, compreensão, apoio incondicional e presença em todos os momentos de minha vida. Sem vocês eu nada seria...

A minha irmã, companheira fiel, pessoa maravilhosa em que pude me espelhar e aprender crescendo ao seu lado. Obrigada pelo amor, carinho, brincadeiras e apoio que foram imprescindíveis em minha formação.

A minha amiga Vanessa Páfaro, companheira de todas as horas, sempre me alegrando com seu bom-humor e me entendendo em cada dia de convivência. Obrigada pela amizade, amor e carinho durante esses anos.

A todos os amigos, antigos e recentes, distantes e presentes, que enriquecem a minha vida diariamente. Muito obrigada pela amizade e todo o amor e carinho, a mim dispensados.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Oswaldo Durival Rossi Júnior pela confiança, compreensão, amizade e orientação na elaboração deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo carinho e conhecimentos transmitidos a mim, contribuindo indiretamente com esta dissertação e diretamente com a minha vida profissional.

A minha amiga Thaís Miotto Martineli que sempre me ajudou, auxiliou e cedeu seus conhecimentos e idéias para a contribuição deste projeto. Obrigada pela amizade, paciência, conselhos e companheirismo.

Aos técnicos do laboratório, Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibelli Júnior (Diba), meus amigos, companheiros de trabalho que tanto me ajudaram na execução deste projeto.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	07
2.2. <i>Salmonella</i> sp	09
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4. <i>Escherichia coli</i>	12
2.5. <i>Aeromonas</i> sp.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras	19
3.2. Metodologia empregada.....	19
3.2.1. Preparo das diluições das amostras.....	19
3.2.2. Contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos mesófilos/grama.....	20
3.2.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais/grama.....	20
3.2.4. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> / grama.....	20
3.2.5. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.2.6. Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	22
3.2.7. Determinação de NMP de <i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	23
3.2.8. Isolamento de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	25
3.2.9. Semeadura direta em meio seletivo e contagem do gênero <i>Aeromonas</i>	26
3.3. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. População de microrganismos heterotróficos mesófilos em amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.....	27
2. Distribuição das amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de microrganismos heterotróficos mesófilos.....	28
3. População de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g) em amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.....	32
4. Distribuição das amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de coliformes totais (NMP/g).....	33
5. Distribuição das amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de coliformes termotolerantes (NMP/g).....	33
6. População de <i>Staphylococcus</i> sp. em amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.....	39
7. Distribuição das amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g).....	40
8. População de <i>Aeromonas</i> sp. em amostras de salmão (<i>Salmo salar</i>), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.....	43

9. Distribuição do número de amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de *Aeromonas* sp..... 44
10. Distribuição do número de amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo as espécies de *Aeromonas* identificadas 46

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE SALMÃO (*Salmo salar*)
COMERCIALIZADO EM ALGUMAS CIDADES DA REGIÃO NORDESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

RESUMO – Tem sido evidente o aumento no consumo de pescado, especialmente do salmão (*Salmo salar*) sob a forma “in natura”, em pratos da cozinha oriental. Como conseqüência, tem havido maior preocupação quanto às suas características higiênico-sanitárias, tendo em vista a facilidade que microrganismos encontram para se desenvolverem em sua carne, o que pode expor os consumidores a agentes que causam desde uma simples gastroenterite até o óbito. Diante desta preocupação, desenvolveu-se este estudo com objetivos de avaliar características microbiológicas do salmão por meio da quantificação de microrganismos heterotróficos mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, o perigo de veiculação de *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. através da carne e contribuir com subsídios técnicos para criar uma legislação brasileira com padrões microbiológicos específicos para o pescado consumido cru. Foram colhidas 31 amostras de salmão, 16 refrigeradas e 15 congeladas, no comércio varejista de cidades da região nordeste do estado de São Paulo. Os resultados obtidos mostram populações de microrganismos heterotróficos mesófilos variando entre $1,0 \times 10^1$ e $3,9 \times 10^6$ UFC/g, coliformes totais e termotolerantes em, respectivamente, 32,24% e 19,33% das amostras e *Aeromonas* sp. em 35,48% das amostras com variação populacional de $2,0 \times 10^2$ a $8,0 \times 10^3$ UFC/g. Ainda houve a presença de *Staphylococcus aureus* em uma amostra e ausência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos podem servir de parâmetro para a criação de um padrão microbiológico específico para o pescado consumido cru e servem também de alerta para os consumidores do produto tendo em vista a veiculação de microrganismos potencialmente patogênicos.

Palavras-chave: pescado, salmão, microbiologia, bactérias patogênicas.

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SALMON (*Salmon salar*)
COMERCIALIZED IN SOME CITIES OF THE NORTHEAST REGION OF SÃO
PAULO STATE.**

ABSTRACT – The increasing of seafood consumption has become evident especially in the use of salmon (*Salmo salar*) consumed raw in oriental dishes. Consequently, it has risen up the concern related to their hygienic-sanitary characteristics due to the facility that microorganisms multiply in the meat which can expose consumers to the causative agents of a mild gastroenteritis until the death. Regarding such informations, this study was aimed to evaluate microbiological characteristics of salmon by quantifying microorganisms heterotrophic mesophiles, total coliforms and thermotolerant. It was also evaluated the danger of transmission of *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp. on the fish muscle and contributed to technical informations to create a Brazilian regulations about specific microbiological standards for consumption of raw seafood. Thirty-one samples of salmon were collected, 16 chilled and 15 frozen, from the retail market in cities of the northeast region of São Paulo State. The results show populations of mesophilic heterotrophic microorganisms ranging from 1.0×10 and 3.9×10^6 CFU/g, in total and fecal coliforms, respectively, 32.24% and 19.33% of samples and *Aeromonas* sp. in 35.48% of samples ranging population of 2.0×10^2 to 8.0×10^3 CFU/g. *Staphylococcus aureus* was present in one sample and were not found *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. The results may serve as a parameter for the establishment of a microbiological standard for the consumption of raw seafood and also as a warning to consumers of the product for the presence of potentially pathogenic microorganisms.

Keywords: seafood, salmon, microbiology, pathogenic bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, no seu artigo nº 438, pescado compreende peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana (BRASIL, 1997).

Os peixes se constituem em alimento de fácil digestibilidade, com fonte de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos poliinsaturados, podendo ser consumido por pessoas de qualquer idade e pacientes convalescentes, sendo importante também para o desenvolvimento de células cerebrais no feto e nos recém-nascidos. Por outro lado, esta rica composição protéica e o alto teor de umidade os tornam excelente substrato para o desenvolvimento microbiano.

Dentre os microrganismos passíveis de serem encontrados em peixes estão os deteriorantes e os patogênicos que, na sua grande maioria, chegam neste alimento por contaminação ambiental durante as etapas do processamento, que vai desde a captura até seu preparo para consumo.

Devido às descobertas da ciência da nutrição tem havido um incremento no consumo do pescado, incluindo o produto cru. Dentre os peixes cujo hábito do consumo “in natura” vem aumentando gradativamente está o salmão (*Salmo salar*), principalmente sob a forma de “sushi” e “sashimi”. Em consequência a esta forma de consumo, deve haver uma maior preocupação com a qualidade higiênico-sanitária deste tipo de alimento, pois ele pode expor os consumidores a diferentes microrganismos patogênicos, que podem causar desde uma simples gastroenterite até o óbito.

Dentre os microrganismos potencialmente patogênicos e que podem ser veiculados através do pescado pode-se destacar *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., entre outros.

Diante do exposto idealizou-se o presente estudo com objetivos de:

- avaliar as características microbiológicas do salmão comercializado refrigerado e congelado em algumas cidades da região nordeste do estado de São Paulo por meio da quantificação de microrganismos heterotróficos mesófilos, coliformes totais e termotolerantes;
- avaliar o perigo da veiculação de agentes de enfermidades de origem alimentar através da carne, especialmente *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp., representando risco à saúde da população consumidora;
- contribuir com subsídios técnicos para a criação de uma legislação brasileira referente aos padrões microbiológicos específicos para o pescado consumido cru.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Em relação a outros setores da agropecuária brasileira, a aquicultura teve um incremento de 23% na produção anual entre os anos de 1990 e 2003, enquanto que as taxas de crescimento dos setores de aves (10%), suínos (7,9%), bovinos (4%), trigo (13,4%), soja (8,6%), milho (7,6%) e arroz (3,4%), foram significativamente menores (ALBINATI, 2007).

A produção mundial de pescado aumentou de 18.000.000 toneladas no ano de 1950, para 159.790.000 toneladas em 2006. A pesca extrativa marinha também elevou sua produção global nos respectivos anos, passando de 17.527.010 toneladas para 93.043.344 toneladas (FAO, 2008). A pesca extrativa marinha brasileira obteve um crescimento de 9% no ano de 2001 em relação ao ano anterior, e em 2004 obteve uma produção de 1.015.916 toneladas (FAO, 2006).

Globalmente, mais de 90,0 milhões de toneladas de frutos do mar são capturados e consumidos (FAO, 2008). Nos Estados Unidos, o consumo por pessoa de 4,5 Kg no ano de 1960 passou para 7,0 Kg em 2002 (BUTT et al., 2004). No Brasil, apenas 10% da população incorpora o peixe em sua alimentação, no entanto, nos últimos anos houve um aumento da procura por ser um alimento saudável (GERMANO et al., 1998). Relatórios indicam a relação inversa entre a ingestão de alimento marinho e a mortalidade causada por doenças coronarianas (YUAN et al., 2001).

Paralelamente, o aumento no consumo de frutos do mar aumentou os relatos de surtos de doenças veiculadas por esses alimentos. Nos Estados Unidos, de uma estimativa de 76,0 milhões de casos de doenças veiculadas por alimentos relatados anualmente, 10 a 19% envolvem alimento marinho como veículo transmissor. Em 15 anos de estudo, em Nova Iorque, 10% de todos os casos de doenças veiculadas por alimentos e 9% das mortes causadas por essas doenças, foram relacionados ao consumo de frutos do mar (WALLACE et al., 1999).

No período entre 1983 e 1993, o peixe ficou em terceiro lugar como veículo transmissor de agentes de surtos relacionados a alimentos nos Estados Unidos (LIPP & ROSE, 1997). No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, de 3.737

surtos de doenças veiculadas por alimentos durante o período de 1999 a 2004, 37 foram causados por consumo de pescados, sendo os locais de maior ocorrência desses surtos as residências, seguido de restaurantes (BRASIL, 2008).

O hábito de consumir peixes crus vem aumentando gradativamente, sendo cada vez maior a oferta deste tipo de alimento para o consumo “in natura”, principalmente sob a forma de “sushi” e “sashimi”, fato que faz crescer proporcionalmente a preocupação com a qualidade higiênico-sanitária deste alimento, uma vez que peixes crus ou mal cozidos podem veicular agentes de toxinfecções alimentares (SATO et al., 2005). Neste contexto, torna-se imprescindível o controle de qualidade cada vez mais rigoroso e a garantia ao consumidor do acesso às informações sobre todas as etapas envolvidas na produção, desde o local de criação até o ponto de venda (CUNHA NETO et al., 2002; SOUZA, 2003; SOARES & GERMANO, 2004).

Um estudo quanto às condições higiênico-sanitárias em pesque-pagues revelou a presença de *Aeromonas* sp. em 87% das 26 amostras de peixe e em 93% das 28 amostras de água, representando risco à saúde dos usuários desses estabelecimentos, uma vez que são patógenos emergentes e podem causar sérias doenças ao ser humano (AZEVEDO et al., 2008). ALBUQUERQUE et al. (2006) revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo em 57% das 30 amostras de “sushis” comercializados em Fortaleza, CE.

Em Teresina, PI, MURATORI et al. (2004) identificaram populações elevadas de microrganismos heterotróficos mesófilos entre 10^5 e 10^6 UFC/g em 55,9% das amostras e de coliformes termotolerantes entre 10^3 e 10^4 NMP/g em 35,3% das amostras de branquinhas (*Curimatus ciliatus*). Estudo semelhante foi realizado com pescado congelado em Manaus, AM, por AQUINO et al. (1996), que obtiveram populações de microrganismos heterotróficos mesófilos entre 10^4 e 10^5 UFC/g em 46,7% das amostras e de coliformes termotolerantes entre 10^2 e 10^3 NMP/g em 40,0% das amostras.

Na Itália, 600 mexilhões comercializados em mercados apresentaram microrganismos como *V. parahaemolyticus* (7,83%), *V. vulnificus* (2,83%), *Salmonella* sp. (0,16%), coliformes fecais (4,66%) e *Escherichia coli* (3,5%) (NORMANNO et al.,

2006). VERNOCCHI et al. (2007) verificaram presença de microrganismos heterotróficos mesófilos com populações entre $4,0 \times 10^5$ e $6,5 \times 10^5$ UFC/g em mexilhões capturados no mar Adriático.

Bactérias patogênicas foram encontradas em 132 amostras de alimentos de origem animal e vegetal preparados por 132 famílias rurais em Malawi. Dentre as amostras de peixe (37), 49% apresentaram *E. coli*, 30% *Salmonella* sp. e 51% *S. aureus* (TAULO et al., 2008). A ocorrência de *Aeromonas* sp. (62%), *Listeria monocytogenes* (10%), *Staphylococcus aureus* (30%) e *Vibrio parahaemolyticus* (4%) foi verificada por HERRERA et al. (2006) em um estudo com 50 amostras de peixes comercializados na Espanha, apontando a carne crua como veículo transmissor de patógenos causadores de doenças ao ser humano.

HUSS et al. (2000) afirmam que algumas bactérias presentes naturalmente na água como *Clostridium botulinum* tipo E, *Vibrio* sp. e *Aeromonas* sp., e outras no ambiente como *Clostridium botulinum* tipo A e B e *Listeria monocytogenes*, podem ser encontradas no peixe vivo ou em sua carne crua, podendo ser resultado de contaminação durante o processamento ou transporte do pescado cru.

Segundo GERMANO et al. (1993), CARDONHA et al. (1994) e NUNES (1994), clostrídios sulfito redutores, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., enterococos e coliformes fecais podem ser encontrados nos frutos do mar e nos produtos industrializados. AYULO et al. (1994) acrescentam a esta lista a *Escherichia coli* O157:H7, a *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* sp.

Entre os anos de 1996 e 1999, em Taiwan, ocorreram 850 surtos de doenças de origem alimentar, sendo 610 destes causados por agentes bacterianos como *Vibrio parahaemolyticus* (63,8%), *Salmonella* sp. (5,2%) e *Staphylococcus aureus* (2,5%). Outros microrganismos como *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei* e *Aeromonas* sp. também estavam presentes e juntos contabilizaram 1,5% dos casos (CHIOU et al., 2000).

Um estudo realizado com produtos mantidos a 18°C e prontos para consumo, vendidos em Taiwan, mostrou a presença de microrganismos heterotróficos mesófilos na maioria das amostras (98,0%) de frutos do mar (FANG et al., 2003).

MELDRUM et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo através da presença de microrganismos heterotróficos mesófilos, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Os autores concluíram pelo baixo risco para a saúde do consumidor, em função da pequena presença dos agentes estudados.

Na baixada Santista, CUNHA et al. (2008) analisaram a qualidade microbiológica do pescado comercializado e verificaram que 4,16% de 48 amostras deveriam ser descartadas em função da população de coliformes fecais. Os autores concluíram que a presença destas bactérias é um indicativo da não observância de medidas higiênico-sanitárias adequadas na cadeia de comercialização no que concerne a manipulação, transporte ou conservação do pescado.

LANDEIRO et al. (2007) analisaram os perigos e pontos críticos de controle na preparação de refeições à base de peixe e frutos do mar em Salvador, BA, e sugeriram o monitoramento do processamento e maiores cuidados higiênico-sanitários na preparação dos pratos com a finalidade de diminuir as gastroenterites em turistas.

PIZZOLITTO (2008) analisando 431 surtos de doenças diarréicas agudas em núcleos receptores turísticos no estado de São Paulo, verificou que as bactérias apareceram em segundo lugar (72,72%) entre os agentes etiológicos mais freqüentes, sendo 28,38% de coliformes, 13,55% de *Salmonella* sp., 10,71% de *Escherichia coli*, 7,77% de *Shigella* sp., 4,99% de *Staphylococcus aureus*, 2,91% de *Cryptosporidium*, 2,64% de *Clostridium* sp., 2,02% de *Bacillus cereus* e 0,05% de *Campylobacter* sp. O peixe mostrou ser um alimento importante associado aos surtos, pois estava presente em 56% dos casos, perdendo somente para os alimentos mistos (91%).

2.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Dentre os microrganismos mais importantes encontrados no pescado, destacam-se os do gênero *Vibrio*. O *V. parahaemolyticus* é usual na água do mar, principalmente em regiões costeiras. PEREIRA et al. (2007) verificaram a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em 7,7% das 15 amostras de mexilhões (*Perna perna*) coletadas e analisadas na região de Itaipu, Rio de Janeiro.

Vibrio parahaemolyticus é o patógeno veiculado por alimentos marinhos que mais causa problemas de saúde em todo o mundo. Segundo SU & LIU (2007), é o principal agente causador de gastroenterite aguda devido ao consumo deste tipo de alimento.

Vibrio sp. são microrganismos Gram negativos, que se apresentam em forma de bastão ou vírgula e móveis devido à presença de um flagelo polar simples (VARNAM & EVANS, 1991). São anaeróbios facultativos e fermentam a glicose sem produzir gás (BUTT et al., 2004). A maioria produz oxidase e catalase (APHA, 2001). São halófilos, distribuídos mundialmente nas águas litorâneas tropicais e na fauna do litoral Pacífico, do Golfo e do Atlântico, mas há poucos dados quantitativos da distribuição sazonal ou geográfica (DEPAOLA et al., 2000).

O gênero pertence à família *Vibrionaceae* e possui espécies patogênicas ao ser humano, vertebrados e invertebrados marinhos. Três espécies, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são responsáveis pela maior parte das infecções adquiridas através da ingestão de alimentos de origem aquática (VARNAM & EVANS, 1991).

LEITÃO & ARIMA (1975) observaram que a ocorrência da bactéria nas águas do litoral de São Paulo variou segundo as estações do ano, sendo de 17,5% no outono, 40% na primavera e 88% no verão. CHIOU et al. (2000) citam que os surtos são menos prevalentes durante o inverno.

Recentemente, os três sorotipos mais comuns nas infecções por *Vibrio parahaemolyticus* no mundo, foram listados em ordem cronológica de aparecimento como O3:K6, O4:K68 e O1:K sem tipo (KUT). Na Índia, o sorotipo O3:K6 foi

considerado pandêmico, pois possui alta capacidade de infecção e alto potencial de distribuição ambiental (MATSUMOTO et al., 2000).

A patogenicidade desse agente está relacionada a vários fatores como a capacidade da bactéria de produzir enzimas hemolíticas citotóxicas como a hemolisina termoestável direta (TDH) e a hemolisina termoestável relacionada (TRH), a urease e também com a capacidade de invasão do microrganismo em células epiteliais intestinais (HONDA et al., 1988; NISHIBUCHI & KAPER, 1995; APHA, 2001).

O teste de Kanagawa é usado para revelar a presença da hemolisina termoestável direta (TDH), considerada a maior determinante da virulência. Este teste é baseado no uso do Wagatsuma agar, no qual culturas positivas, independente do sorotipo, apresentam uma reação β -hemolítica típica (LEITÃO & ARIMA, 1975; VARNAM & EVANS, 1991; NISHIBUCHI & KAPER, 1995; APHA, 2001). A hemolisina é associada com a maioria (96,5%) das cepas patogênicas encontradas entre os isolamentos clínicos (MIYAMOTO et al., 1969; NISHIBUCHI et al., 1986; HONDA et al., 1988). É uma enterotoxina citotóxica que atua dentro e fora da célula do hospedeiro, induzindo a morte através da apoptose e necrose (NAIM et al., 2001). Atua diretamente nos eritrócitos de diversas espécies de hospedeiro, determinando hemólise e aumento da permeabilidade vascular (NISHIBUCHI & KAPER, 1995).

Antes da identificação da TRH, acreditava-se apenas que as cepas Kanagawa positivo eram virulentas, no entanto, estudos demonstram que a TRH atua como outro fator responsável pela enteropatogenicidade, sugerindo que o fenômeno Kanagawa não seria o indicador absoluto. Estudos realizados na Ásia demonstraram a produção de TRH por estirpes Kanagawa negativo, isoladas de gastroenterites (HONDA et al., 1989; PEREIRA et al., 2004b). Sabe-se, atualmente, que a gastroenterite causada pelo consumo de pescado cru pode ser conseqüente à ação da TDH ou da TRH.

OKUDA et al. (1997) sugerem a correlação entre a produção de urease e a presença do gene que codifica a TRH como mais um determinante de virulência. Entre 60 cepas urease positivas, 59 (98%) possuíam o gene que codifica a TRH e 54 (90%) o gene que codifica TDH. Das 25 cepas urease negativas, 20 (80%) tinham o gene que codifica TDH, mas nenhuma carregava o gene que codifica TRH.

Pelo fato de possuir flagelo, importante na locomoção e adesão do agente na célula hospedeira, o microrganismo pode aderir a célula de tecido normal ou degenerado, afetando as células epiteliais.

A capacidade de adesão da célula bacteriana a célula hospedeira está correlacionada com a capacidade de muitas espécies de microrganismos causarem infecção na superfície epitelial do trato intestinal, respiratório, urinário e genital. Esta bactéria pode causar septicemia se disseminada pelo sistema linfático ou circulatório (VARNAM & EVANS, 1991).

2.2. *Salmonella* sp.

As salmonelas são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são Gram negativos, se apresentam em forma de bacilos, são oxidase negativos e catalase positivos, não formam esporos, são anaeróbios facultativos, fermentam glicose e reduzem o nitrato. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullorum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis (VARNAM & EVANS, 1991; BUTT et al., 2004; FORTUNA & FRANCO, 2005).

A temperatura de desenvolvimento varia de 5°C a 45°C, com um ótimo de 37°C (VARNAM & EVANS, 1991). Porém, COELHO et al. (1984) mostraram a sobrevivência da salmonela em amostras de carne bovina moída, armazenadas durante 90 dias a temperaturas de 0°C e -18°C.

O gênero *Salmonella* consiste em duas espécies, *S. bongori*, e *S. enterica*, esta última dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *díarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, e *S. enterica* subespécie *indica* (POPOFF et al., 2004). O ser humano parece ser susceptível a todos eles, sendo fontes de infecção importantes os animais e seus subprodutos (HIRSH, 2003).

Aproximadamente 2000 sorotipos causam doenças em humanos. Mais de 500 casos fatais por ano são estimados nos Estados Unidos e metade deles é causada por dois sorotipos: *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (CDC, 2007).

Segundo HEINITZ et al. (2000) de 768 amostras de frutos do mar colhidas nos Estados Unidos, durante os anos de 1990 a 1998, 10 foram positivas para salmonela, sendo os sorotipos presentes: *Salmonella* Weltevreden, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Lexington e *Salmonella* Paratyphi B.

Salmonella Weltevreden foi o sorotipo mais encontrado entre 210 culturas isoladas a partir de amostras de peixe, camarão, ostras, caranguejo e “scargot”, em 20 países durante 5 anos (PONCE et al., 2008).

Um estudo realizado em mercado de caranguejo na cidade de Fortaleza, Ceará, mostrou que entre 7 sorotipos identificados, 5 eram *S. Senftenberg* e 2 *S. Pomona* (VIEIRA et al., 2004). LOURENÇO et al. (2006) analisando amostras de carne de caranguejo-uçá coletadas em São Caetano de Odivelas e Belém no estado do Pará, encontraram *Salmonella* sp. em 20% delas.

No Irã, um estudo com bactérias patogênicas em peixes frescos, defumados e salgados, revelou a presença de *Salmonella* Dublin (2,6%) nas amostras de peixes frescos (67), e ausência do gênero nos peixes defumados e salgados (BASTI et al., 2006).

A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o sorotipo, idade e condições de saúde do hospedeiro. As salmonelas são intracelulares facultativas e a infecção se inicia com a penetração nas células epiteliais intestinais, invasão da lâmina própria e entrada na corrente linfática. Os microrganismos são fagocitados por células de defesa (macrófagos), onde se multiplicam, causando a destruição dos macrófagos, com liberação de inúmeras bactérias na corrente circulatória, podendo atingir diversos órgãos, até estabelecer uma infecção sistêmica (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A virulência das salmonelas é determinada pela capacidade de adesão na mucosa intestinal, penetração e produção de toxinas. Atuam na determinação da patogenicidade genes presentes em cromossomos e em plasmídeos. As toxinas produzidas envolvem uma endotoxina, derivada da porção lipídica da molécula do

lipopolissacarídeo; uma citotoxina, que inibe a síntese protéica da célula atingida e é, em parte, responsável por danos da mucosa intestinal, parecida com a toxina de Shiga; e três enterotoxinas: a primeira associada à parede celular, demonstrada originalmente em *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, que determina a perda de fluídos em camundongos e outras duas que aumentam a permeabilidade vascular. Uma é termoestável e de ação rápida (uma hora) e a outra termolábil de ação retardada (18 horas), relacionada à toxina termolábil da *Escherichia coli*. A virulência determinada por plasmídeos facilita a penetração da bactéria para o interior das células do hospedeiro e a sua multiplicação, estimulando o mecanismo de defesa (VARNAM & EVANS, 1991).

2.3. *Staphylococcus aureus*

A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas do *Staphylococcus aureus* é um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar em todo o mundo (RODRIGUES et al., 2004).

Os estafilococos pertencem à família *Micrococcaceae* e são bactérias Gram positivas, imóveis, de forma esférica, agrupadas em massas irregulares na forma de “cacho”. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre os carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbios ou anaeróbios facultativas. Podem crescer em temperaturas de 7°C a 48°C, com um ótimo de 30°C a 37°C (JABLONSKI & BOHACH, 1997).

Sua presença reflete as condições inadequadas de higiene após o processamento, isto é, consequência direta da manipulação inadequada, uma vez que o microrganismo se encontra nas mucosas e superfície da pele do ser humano, e encontra no pescado um ambiente favorável para multiplicação (GERMANO et al., 1993; GERMANO et al., 1998; CUNHA NETO et al., 2002).

Na Índia, 168 amostras de pescados coletadas de supermercados e indústrias de processamento de peixe foram analisadas e 21 delas apresentavam *S. aureus*, mostrando a influência da manipulação incorreta, temperaturas de armazenamento inadequadas e contaminação cruzada sobre o produto (SIMON & SANJEEV, 2007).

HILUY et al. (1996) mostraram a presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de peixe, lagosta e camarão resfriadas e congeladas no estado do Ceará, em quantidades acima dos padrões, com condenação de 20% das amostras de peixes e 50% das de camarão. No litoral de Santa Catarina, AYULO et al. (1994) mostraram contaminação em 20% de amostras de carne de peixe, caranguejo, camarão e moluscos, com 60% dos bivalves contendo *S. aureus* coagulase positivo.

BASTI et al. (2006) obtiveram populações de *S. aureus* maiores que $1,0 \times 10^5$ UFC/g em 55% das 20 amostras de peixes defumados, comercializados em mercado de peixe no Irã. Já, em 40 peixes salgados, a bactéria estava presente em apenas 10% das amostras.

A patogenicidade do *S. aureus* é decorrente da produção de várias toxinas, exoenzimas, adesinas e proteínas imunomoduladas. Segundo FOURNIER & PHILPOTT (2005), nenhum fator de virulência isoladamente mostrou-se suficiente para provocar doença, exceto as toxinas específicas, como as enterotoxinas e toxinas da síndrome do choque tóxico.

Os estafilococos produtores da enzima coagulase, quando presentes em alimentos “in natura” podem indicar a possível presença de enterotoxinas. Entretanto, a ausência ou presença de pequeno número destes microrganismos, sobretudo em alimentos submetidos a tratamento térmico, não indica que estes produtos não possam ocasionar a intoxicação. As características do alimento e as condições de processamento podem diminuir ou eliminar as bactérias, porém, as enterotoxinas, dado à termorresistência, podem permanecer ativas (CUNHA NETO et al., 2002).

2.4. *Escherichia coli*

Inúmeros agentes bacterianos podem, ainda, contaminar o pescado e causar riscos à saúde. Os enterococos e coliformes fecais podem ser encontrados nos peixes frescos ou congelados, frutos do mar e produtos industrializados (GERMANO et al., 1993; TÔRRES, 2004).

Coliformes totais e fecais foram encontrados em 90 ostras (*Crassostrea gigas*) em Santa Catarina, sendo que *Escherichia coli* estava presente em 35,5% das 45 amostras provenientes do local de cultivo (PEREIRA et al., 2006).

KUMAR et al. (2005) testando 188 amostras de peixe (fresco e congelado), água e gelo de diferentes mercados na Índia, detectaram a presença de coliformes fecais em 115 amostras. Entre elas 47% estavam contaminadas com *Escherichia coli*.

SOARES & GERMANO (2005) analisando “sashimis” de salmão comercializados em 15 estabelecimentos de shopping centers no estado de São Paulo, verificaram populações bacterianas entre $1,45 \times 10^2$ e $1,10 \times 10^6$ UFC/g e $3,50 \times 10$ e $1,10 \times 10^6$ UFC/g para enterobactérias e coliformes totais, respectivamente. MARTINS (2008) avaliou a qualidade higiênico-sanitária de “sushi e sashimi” servidos em bufês na cidade de São Paulo e verificou a presença de coliformes termotolerantes em 50% das amostras.

SANTOS (2008) avaliou a qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo e verificaram a presença de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em 2 (10%) das 20 amostras analisadas.

O gênero *Escherichia* contém seis espécies, *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* e *E. blattae*. A mais comum é a *Escherichia coli*, sendo a espécie comensal predominante na microbiota anaeróbia facultativa do trato intestinal dos humanos e dos animais de sangue quente.

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*. É um bastonete Gram negativo, catalase positivo, oxidase negativo, anaeróbio facultativo e fermentador da lactose. É um mesófilo típico que desenvolve em temperaturas de 7°C a 48°C, com um ótimo de 37°C (VARNAM & EVANS, 1991).

As linhagens de *E. coli* patogênicas são classificadas de acordo com sua ação no hospedeiro, podendo ser enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas ou produtoras de verotoxina (EHEC ou VTEC) e enteroagregativas (EAEC) (DOYLE et al., 1997).

VALENTE et al. (2006) estudando amostras de mexilhões pré-cozidos, congelados e embalados, verificaram a presença de coliformes termotolerantes, indicadores de contaminação fecal. Das colônias de *E. coli* isoladas, 31,5% foram positivas para os sorotipos EPEC e EIEC.

As enteropatogênicas (EPEC) são responsáveis pelos casos de diarreia infantil e quando acometem os adultos geralmente é decorrente de doses infectantes altas. O mecanismo de patogenicidade está relacionado à aderência da bactéria na membrana da célula epitelial, invasão por processo endocítico e destruição das vilosidades intestinais, com perda do equilíbrio eletrolítico. Essas cepas produzem uma ou mais toxinas (VARNAM & EVANS, 1991; NATARO & KAPER, 1998).

E. coli enterotoxigênicas (ETEC) são produtoras de toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). Foram encontradas primeiramente em suínos jovens e acometem animais, crianças e adultos. A bactéria coloniza a superfície da mucosa intestinal, resiste aos movimentos peristálticos e elabora enterotoxinas que são colocadas para dentro da célula através de processo de transporte vesicular chamado trans-Golgi (NATARO & KAPER, 1998).

As cepas enteroinvasivas (EIEC) aderem à mucosa do intestino grosso, penetram nas células epiteliais, lisam o vacúolo endocítico, realizam a multiplicação intracelular e espalham-se para as células epiteliais adjacentes. Quando a infecção é severa causa forte reação inflamatória pela destruição dos tecidos, promovendo diarreia aquosa com sangue e muco. As enteroagregativas (EAEC) são designadas pela aderência às células HEp-2 do tipo agregativa, provocando diarreia persistente em crianças com muco e sangue (NATARO & KAPER, 1998).

As enterohemorrágicas (EHEC) provocam lesões através de adesão nas células do hospedeiro, mesmo quando em pequeno número, promovendo diarreia sanguinolenta, com baixa ou sem febre. São associadas à colite hemorrágica (HC) e casos esporádicos da síndrome urêmica hemolítica (HUS). Produzem citotoxinas nomeadas Shiga-like ou verotoxinas, fatores de virulência comum entre as síndromes e responsáveis pela destruição dos tecidos do intestino e do rim. O sorotipo predominante é O157:H7 (VARNAM & EVANS, 1991; NATARO & KAPER, 1998).

KUMAR et al. (2001) verificaram a presença de *E. coli* (EHEC) em frutos do mar, entre eles peixes frescos, colhidos em mercados em Mangalore, na Índia, identificando esses alimentos como veículos para a transmissão da bactéria.

Um estudo realizado na Índia durante 10 anos identificou *E. coli* O157:H7 em 16 (8,4%) de 190 amostras de frutos do mar, 10 (1,8%) de 553 amostras de leite, 8 (1,6%) de 486 amostras de água e 13 (0,9%) de 1376 amostras de carne (SEHGAL et al., 2008).

2.5. *Aeromonas* sp.

As aeromonas podem estar presentes em vários ambientes, principalmente em ambiente aquático, tanto de água doce como salgada, por isso são facilmente encontradas no pescado. Podem ainda estar presentes no solo, nas fezes de animais e água clorada. São isoladas de diferentes tipos de alimentos além do pescado, tais como leite, carne e seus derivados, sorvetes, queijos, alface e outras folhas utilizadas como alimentos (SOUZA, 2003; SOARES & GERMANO, 2005).

As bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão associadas aos ambientes aquáticos e são reconhecidas como patogênicas para peixes desde 1984 (KIRKAN et al., 2003). Consistem de microrganismos oxidase e catalase positivos, anaeróbios facultativos, geralmente móveis devido à presença de flagelo polar, Gram negativos e fermentadores da glicose. Apesar da maioria das cepas isoladas de alimentos serem mesófilas, muitas podem se multiplicar sob temperatura de refrigeração (KIROV, 1997).

Um estudo sobre a qualidade bacteriológica de camarões crus (*Penaeus indicus*) realizado na Índia, identificou a presença de *Aeromonas* sp. em 38% do total analisado, fazendo deste gênero um dos predominantes (JEYASEKARAN et al., 2006).

HOZBOR et al. (2006) estudando mudanças na microbiota do salmão cru (*Pseudoperca semifasciata*) durante a estocagem em gelo por 20 dias e sua correlação com o índice de qualidade, relataram a presença de *Aeromonas* sp. no músculo do salmão e seu alto potencial de deterioração do pescado.

O gênero *Aeromonas* foi inicialmente incluído na família *Vibrionaceae* a qual também pertencem os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. Subseqüentes investigações filogenéticas indicaram que as aeromonas não estão estreitamente relacionadas aos vibrios, mas ao contrário, formam uma unidade no subgrupo γ -3 da classe *Proteobacteria* (ABBOTT et al., 2003). Oficialmente, as aeromonas estão classificadas dentro da família *Aeromonadaceae* (JOSEPH & CARNAHAN, 2000).

A taxonomia do gênero *Aeromonas* tem sido alterada durante as últimas décadas. Inicialmente, a diferenciação era limitada à aeromonas psicrófilas não móveis e mesófilas móveis (JANDA & ABBOTT, 1998). A nomenclatura foi, posteriormente, desenvolvida para incluir distinções entre as espécies mesófilas *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e a espécie psicrófila *A. salmonicida*. Segunda JANDA (1991) e GAVÍN et al. (2002), as três espécies mesófilas são consideradas as mais importantes e causadoras de várias enfermidades em humanos, sendo responsáveis por 85% dos isolados clínicos.

A lista de espécies inclui *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii* (TACÃO et al., 2005), *A. culicola* (PIDIYAR et al., 2002), *A. simiae* (HARF-MONTEIL et al., 2004) e *A. molluscorum* (MIÑANA-GALBIS et al., 2004). Entretanto, a classificação para algumas espécies como *A. ichthiosmia* e *A. enteropelogenes* é controversa, sendo consideradas sinônimos de *A. veronii* e *A. trota*, respectivamente, pois são idênticas pelo seqüenciamento gênico 16S rRNA (COLLINS et al., 1993).

Na Alemanha, um estudo sobre o isolamento e a caracterização de *Aeromonas* sp. potencialmente patogênicas para o ser humano, identificou 134 cepas do gênero em 84 amostras de pescado, incluindo o salmão. Entre as cepas isoladas, 67,9% eram *Aeromonas hydrophila*, 26,1% *Aeromonas caviae* e 6,0% *Aeromonas sobria* (ULLMANN et al., 2005).

Na análise de 86 amostras de mexilhões (*Perna perna*), no Rio de Janeiro, avaliou-se a presença de patógenos emergentes como *A. hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*, isolando do total das amostras a seguinte proporção: 37,10% *A. media*, 15,50% *A. hydrophila*, 14,80% *A. caviae*, 4,20% *A. sobria*, 4,20% *A. trota*, 1,31% *A.*

schubertii, 1,31% *A. jandaei* e 2,10% *Plesiomonas shigelloides* (PEREIRA et al., 2004a). OTTAVIANI et al. (2006) também estudaram a ocorrência de *Aeromonas* sp. em mexilhões do mar Adriático e verificaram o risco de desenvolver doença pela ingestão do produto cru ou mal cozido.

O fato das *Aeromonas* sp. possuírem vários fatores de virulência justifica sua ameaça como patógeno. Elas podem ser causadoras de diarreia, sérias feridas em indivíduos saudáveis e enfermidades pouco relatadas tais como peritonite, infecções nos olhos, articulações e ossos (ABBOTT et al., 2003). Em imunocomprometidos podem causar septicemia, meningite e óbito (YAMADA et al., 1997).

A patogenicidade das aeromonas mesofílicas é atribuída a vários fatores determinantes, incluindo toxinas, proteases, proteínas de membrana externa, lipopolissacarídeos, motilidade e presença de flagelo (THORNLEY et al., 1997) entre outros fatores (ISONHOOD & DRAKE, 2002).

A capacidade de produzir pelo menos três enterotoxinas tem sido atribuída às aeromonas. As de ação citotônica e citolítica têm sido detectadas em filtrados de cultura de bactéria. A enterotoxina citotônica, como a toxina da cólera, não causa degeneração das criptas e vilos do intestino delgado, enquanto que a enterotoxina citolítica promove um extenso dano ao epitélio. A terceira, de ação citotóxica, é caracterizada por alguns pesquisadores como uma β -hemolisina e/ou aerolisina (CHOPRA & HOUSTON, 1999).

As aeromonas também produzem uma grande variedade de proteases que causam danos aos tecidos e favorecem o estabelecimento da infecção por sobrepujar as defesas do hospedeiro. Pelo menos três tipos de proteases foram identificados, inclusive alguns estáveis ao calor. Também podem produzir um glicerofosfolípídeo que atua como uma lipase ou fosfolipase e pode causar lise de eritrócito por digestão de sua membrana plasmática (PEMBERTON et al., 1997).

Ainda, as aeromonas são capazes de produzir várias lecitinas e adesinas que permitem à bactéria aderência a glicoconjugados específicos nas superfícies epiteliais, nos eritrócitos ou na mucina da mucosa gástrica (CHOPRA & HOUSTON, 1999).

Em relação aos flagelos, cepas de aeromonas mesofílicas expressam um único flagelo polar em todas as condições de cultura e produzem flagelos laterais em meios

de cultura sólidos. As células hiperflageladas têm alta capacidade de aderência e de formar biofilmes (GAVÍN et al., 2002).

A presença de inúmeros patógenos tem sido detectada em peixes e demais produtos marinhos comestíveis encontrados, principalmente, em águas contaminadas e no pescado incorretamente manipulado e armazenado (AYULO et al., 1994; VALENTE et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido com amostras de salmão (*Salmo salar*) “in natura” sob a forma de filé e postas, conservados refrigerados e sob congelamento, comercializados na região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho de 2007 a abril de 2008.

3.1. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

Um total de 31 amostras, 16 refrigeradas e 15 congeladas, foi adquirido no comércio varejista dos municípios de Araraquara, Jaboticabal, Ribeirão Preto e São Carlos, em quantidade aproximada de 500 gramas, embaladas na forma comum de venda ao consumidor. As mesmas foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, para análise.

3.2. Metodologia empregada

3.2.1. Preparo das diluições das amostras (APHA, 2001)

De cada amostra foram pesados, assepticamente, 50 gramas e colocados em 450 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada e, após homogeneização em aparelho Stomacher por um minuto, foi obtida a diluição inicial 10^{-1} . A seguir, foram preparadas diluições decimais até 10^{-5} utilizando-se o mesmo diluente.

3.2.2. Contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos mesófilos (APHA, 2001)

Foram depositados 1 mL de cada diluição no fundo de placas de Petri esterilizadas, em duplicata. A seguir, adicionados 15 mL a 17 mL de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C.

Após homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. As contagens foram realizadas em contador de colônias segundo a técnica padrão, preferencialmente em placas com 25 a 250 colônias.

3.2.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais/grama (APHA, 2001)

Teste presuntivo: cinco séries de três tubos de caldo lauril sulfato triptose com tubo de Durham invertido foram inoculados com 1 mL a partir das diluições 10^{-1} a 10^{-5} . Após foram incubados a 35°C por 24 a 48 horas e consideradas positivas aquelas culturas que se revelaram com desenvolvimento bacteriano e produção de gás.

Teste confirmativo: de cada tubo com resultado positivo no teste presuntivo foi transferido, com alça de níquel-cromo de 3 mm de diâmetro, uma alçada da cultura para tubos correspondentes contendo caldo lactose-verde brilhante-bile a 2% e tubo de Durham invertido. A incubação foi realizada a 35°C por 24 a 48 horas e considerados positivos os que revelaram desenvolvimento bacteriano e produção de gás.

3.2.4. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* (APHA, 2001)

Coliformes termotolerantes: a partir de cada tubo de caldo lauril sulfato triptose com resultado positivo no teste presuntivo para coliformes totais, foi inoculado com alça

tubos correspondentes contendo caldo EC e tubo de Durhan invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a $45,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas e considerados positivos os tubos com multiplicação bacteriana e produção de gás.

Escherichia coli: a partir dos tubos com resultados positivos para coliformes termotolerantes em caldo EC, foram semeadas placas de ágar eosina-azul de metileno (EMB) e em seguida incubadas a 35°C por 24 horas. Após, foi isolada de cada placa uma colônia característica, de cor negra, chata, seca e com brilho metálico, a qual foi semeada em ágar nutriente inclinado. Após a incubação a 35°C por 24 horas, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, para verificação da morfologia. Uma vez constatada a presença de bacilos Gram-negativos, em cultura pura, estes foram semeados em meios para a confirmação bioquímica através das provas do IMViC ou seja: produção de indol (I), Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e do aproveitamento de citrato (C). Na realização destas provas foram adotadas metodologias descritas por Mac FADDIN (1976).

3.2.5. Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e pesquisa de *Staphylococcus aureus* (APHA, 2001)

Das diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram retirados 0,2 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-Parker, em duplicata. A seguir, com auxílio de um bastão em forma de “L” esterilizado, foi procedida a distribuição do inóculo por toda superfície do meio e as placas incubadas a 35°C por 24 a 48 horas.

Após incubação, foram contadas placas contendo 20 a 200 colônias, separadamente, colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro, e as que se apresentavam somente negras e brilhantes.

A seguir, 3 a 5 colônias de cada tipo foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas. Após, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de

cocos Gram-positivos e agrupadas em forma de cachos de uva foram submetidas às provas da catalase e oxidação e fermentação da glicose (O/F), para confirmação do gênero.

Cepas com resultados positivos nas provas confirmativas do gênero *Staphylococcus* foram submetidas à prova da coagulase livre. O resultado final da contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo foi obtido com base no resultado desta prova, proporcionalmente ao número de colônias contadas na placa, multiplicado por cinco e pelo fator de diluição.

Dentre as cepas coagulase positivas foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus* através das provas de fermentação do manitol em anaerobiose e da produção de acetoina (VP) (Mac FADDIN, 1976).

3.2.6. Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* (APHA, 2001)

Pré-enriquecimento: de cada amostra foram retirados, assepticamente, 50 gramas e adicionados a 450 mL de água peptonada a 0,1%. Após homogeneização em aparelho Stomacher, o conjunto permaneceu em repouso por 6 horas à temperatura ambiente. A seguir, incubou-se a 37°C por 18 horas, após o que foi realizado enriquecimento seletivo.

Enriquecimento seletivo: nesta fase, duas alíquotas de 2 mL cada da cultura de pré-enriquecimento, foram inoculadas, respectivamente, em 20 mL de caldo selenito cistina e em 20 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, adicionados de 0,2 mL de solução de novobiocina a 0,4%, dando uma concentração de 40 microgramas do princípio ativo por mililitro do meio. Em seguida, os caldos seletivos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Plaqueamento seletivo: com auxílio de alça de níquel-cromo, cada cultura em caldo de enriquecimento foi semeada pela técnica de esgotamento em ágar verde-brilhante e ágar MacConkey, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

Identificação presuntiva: das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, com auxílio de agulha de níquel-cromo, previamente flambada, de cada uma das placas semeadas, 3 a 5 colônias com características sugestivas do gênero *Salmonella* e inoculadas em tubos contendo meio tríplice açúcar ferro e meio para a realização da prova da descarboxilação da lisina.

Confirmação sorológica: seria realizada através de testes sorológicos com soros polivalentes anti-salmonela somáticos e flagelares. Para tal, cultivos que na identificação presuntiva apresentassem reações condizentes com o gênero seriam transferidos, com alça de níquel-cromo, para lâminas de vidro contendo gotas de solução fisiológica. Após homogeneização de cada cultura, seria acrescentada uma gota de soro anti-salmonela polivalente somático-O, seguido de movimentação da lâmina e leitura. Ocorrendo aglutinação na mistura a prova seria considerada positiva. O mesmo procedimento seria realizado para o teste com soro polivalente flagelar-H. Seria considerado como do gênero *Salmonella* o cultivo que apresentasse positividade em ambas provas, que seriam sempre acompanhadas com soros ou culturas padrões positivas e negativas.

3.2.7. Determinação do NMP de *Vibrio parahaemolyticus* (APHA, 2001)

Inicialmente foram preparadas diluições decimais até 10^{-5} , a partir de 50 gramas da amostra em 450 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada.

A enumeração do *Vibrio parahaemolyticus* foi realizada através da técnica do número mais provável (NMP), inoculando-se 10 mL da diluição 10^{-1} , em triplicata, em tubos contendo água peptonada alcalina (APW) em concentração dupla. Do mesmo modo inoculou-se em triplicata 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-4} em 10 mL de APW em concentração simples. Após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas, o material dos tubos contendo as três maiores diluições com desenvolvimento, foi semeado pelo

método de esgotamento, em placas de Petri contendo ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS). Após, as placas foram incubadas a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

A seguir, 3 a 5 colônias típicas de cada placa, ou seja, opacas, verde-azuladas com 2 a 3 mm de diâmetro, foram inoculadas em ágar arginina glicose inclinado (AGS) e incubadas a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, as cepas presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus* apresentavam desenvolvimento com acidificação na base (arginina dehidrolase negativa) e alcalinização no bisel, sem produção de H_2S e de gás. Inoculou-se também, por picada profunda, tubos com meio semi-sólido para teste de motilidade. Após a incubação a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas, o crescimento circular ao redor da linha de semeadura constituía no resultado positivo.

Somente as culturas móveis, Gram negativas, que produziram ácido na base e foram alcalinas no bisel em ágar AGS e não formadoras de gás foram submetidas às provas da oxidase, hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina, crescimento em caldo nutriente com 0% a 10% de cloreto de sódio, crescimento a 42°C , fermentação da sacarose, da D-celobiose, da lactose, da arabinose, da D-manose e do D-manitol, ONPG, Voges-Proskauer (VP), sensibilidade a 10μ e 150μ do agente vibriostático O/129, gelatinase e urease para a confirmação da espécie. Estas provas foram realizadas através da metodologia descrita em Mac FADDIN (1976).

A diferenciação do *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* se daria através do crescimento exclusivo até a 8% de cloreto de sódio, pela fermentação variável da D-celobiose, fermentação da arabinose, pela resistência no teste de sensibilidade a 10μ do agente vibriostático O/129 e variabilidade na produção de urease.

Todas as cepas identificadas bioquimicamente como *Vibrio parahaemolyticus* seriam submetidas ao teste de Kanagawa. Para isso, o microrganismo suspeito seria inoculado em caldo soja tripticase (TSB) com 3% de cloreto de sódio e incubado a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após esse período, seriam inoculadas várias gotas, com ajuda de alça de níquel-cromo, em placas contendo ágar Wagatsuma. Após a incubação a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 24 horas, seria realizada a leitura.

3.2.8. Isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas*

Enriquecimento seletivo: realizado em TSB adicionado de ampicilina (30 mg/L) após a homogeneização em aparelho Stomacher, de 25 gramas da amostra com 225 mL do referido caldo. A incubação foi realizada a 28 °C por 24 horas.

Plaqueamento seletivo: a partir das culturas de enriquecimento seletivo, foram semeadas, com auxílio de alça de níquel-cromo, placas contendo ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina (PALUMBO et al., 1985; MAJEED et al., 1990) e ágar dextrina-ampicilina, segundo HAVELAAR & VONK (1988). Nos dois casos a ampicilina foi adicionada após a esterilização, na concentração de 10 mg por litro. A incubação foi realizada em incubadora para BOD, a 28 °C por 24 horas.

Isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero *Aeromonas*: das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, para cada um dos meios utilizados, até cinco colônias com características sugestivas do gênero, quais sejam, colônias amareladas, com um halo transparente devido à hidrólise do amido e da dextrina. Estas colônias foram semeadas em tubos com ágar tripticase soja e incubadas a temperatura de 28 °C por 24 horas. Após a incubação foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentavam na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) (SAAD et al., 1995). Após a incubação, as cepas que apresentavam reação ácida tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em TSA inclinado e incubadas a temperatura de 28 °C por 24 horas. Após o crescimento foram submetidas à prova da oxidase. Os cultivos positivos nesta prova foram considerados como pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Caracterização das espécies: realizada seguindo o esquema proposto por POPOFF (1984), atualizado por FURUWATARI et al. (1994), complementado com

algumas provas recomendadas por ABOTT et al. (2003) que consiste na realização dos seguintes testes: produção de indol, hidrólise da esculina e da arginina, descarboxilação da lisina e da orinitina, fermentação do inositol, da salicina, da sacarose, do manitol e da arabinose, produção de acetoína (VP) e gás a partir da glicose, crescimento em caldo nutriente a 37°C com 0%, 3% e 6% de cloreto de sódio e redução do nitrato. Estas provas foram realizadas seguindo a metodologia de Mac FADDIN (1976).

3.2.9. Semeadura direta em meio seletivo e contagem do gênero *Aeromonas*

Para a realização da contagem do gênero *Aeromonas* foram utilizadas placas de ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina, preparadas conforme já descrito, sendo a semeadura realizada em superfície, em volumes de 0,1 mL de cada diluição. Para uma distribuição homogênea do inóculo na superfície do meio, foi utilizado um bastão de vidro em forma de “L”.

A incubação das placas foi realizada em incubadora para BOD a 28°C por 24 horas, a partir do que se identificou e realizou a contagem das colônias com característica do gênero *Aeromonas*, que foram colônias amareladas, circundadas por halo transparente formado em função da hidrólise do amido. Para a confirmação do gênero foram isoladas até cinco colônias com as características descritas, as quais foram submetidas às provas de identificação, já apresentadas anteriormente.

O resultado final da contagem de aeromonas foi obtido com base no resultado das provas de identificação do gênero, proporcionalmente ao número de colônias contadas na placa, multiplicado por dez e pelo fator de diluição.

3.3. Análise estatística

Os resultados referentes à população de microrganismos heterotróficos mesófilos foram submetidos ao teste t de student (SAS,2005) e os resultados das demais determinações foram analisados através do teste não paramétrico do qui-quadrado (BEIGUELMAN, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram agrupados em tabelas numeradas de 1 a 10 de acordo com o grupo ou microrganismo estudado.

A Tabela 1 refere-se aos resultados da contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos mesófilos, obtidos em cada uma das amostras.

TABELA 1. População de microrganismos heterotróficos mesófilos em amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, colhidas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.

Número da amostra	População (UFC/g) segundo a forma de conservação	
	Refrigeração	Congelamento
1	$6,0 \times 10^4$	
2	$3,2 \times 10^3$	
3	$6,6 \times 10^3$	
4		$1,2 \times 10^4$
5		$3,6 \times 10^3$
6		$3,8 \times 10^2$
7	$9,8 \times 10^3$	
8		$4,7 \times 10^3$
9		$8,5 \times 10$
10		$3,0 \times 10^2$
11	$1,3 \times 10^5$	
12	$9,2 \times 10^5$	
13	$2,6 \times 10^6$	
14	$1,4 \times 10^5$	
15	$4,9 \times 10^4$	
16	$5,6 \times 10^3$	
17	$4,0 \times 10^3$	
18	$3,9 \times 10^6$	
19	$1,1 \times 10^3$	
20	$4,8 \times 10^3$	
21		$2,0 \times 10^3$
22		$3,5 \times 10$
23		$1,8 \times 10^2$
24		$1,0 \times 10$
25		$4,8 \times 10^2$
26	$5,0 \times 10^4$	
27	$5,6 \times 10^4$	
28		$4,2 \times 10^4$
29		$3,5 \times 10$
30		$6,9 \times 10^2$
31		$1,0 \times 10$
Média	$5,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^3$

A Tabela 2 apresenta a distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*) segundo a população de microrganismos heterotróficos mesófilos.

TABELA 2. Distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de microrganismos heterotróficos mesófilos.

População de microrganismos heterotróficos mesófilos (UFC/g)	Número de amostras (%)
1,0 x 10	2 (6,45)
1,0 x 10 — 1,0 x 10 ²	3 (9,68)
1,0 x 10 ² — 7,0 x 10 ²	5 (16,13)
1,0 x 10 ³ — 9,8 x 10 ³	10 (32,26)
1,0 x 10 ⁴ — 6,0 x 10 ⁴	6 (19,35)
1,0 x 10 ⁵ — 9,2 x 10 ⁵	3 (9,68)
2,0 x 10 ⁶ — 3,9 x 10 ⁶	2 (6,45)
Total de amostras	31 (100,00)

Os valores das populações de microrganismos heterotróficos mesófilos, conforme pode ser verificado nas Tabelas 1 e 2, variaram de 1,0 x 10 a 3,9 x 10⁶ UFC/g. Resultados próximos, de 3,0 x 10³ a 2,5 x 10⁷ UFC/g, foram encontrados por AQUINO et al. (1996) em um estudo microbiológico de pescado de água doce congelado, correspondendo a tucunaré, tambaqui e pirarucu, obtido no comércio de Manaus, AM. Os autores justificaram os elevados valores como decorrentes de fontes de contaminação do transporte à comercialização do produto, destacando ainda o descongelamento não controlado ou as falhas na manutenção de temperaturas adequadas na estocagem.

Tal conclusão pode ser considerada no presente estudo apenas para o produto refrigerado, pois verifica-se na Tabela 1 que a variação das populações de microrganismos heterotróficos mesófilos no salmão conservado desta forma foi de 1,1 x 10³ a 3,9 x 10⁶ UFC/g, enquanto que a variação naquele mantido sob congelamento foi de 1,0 x 10 a 4,2 x 10⁴ UFC/g, inferior à encontrada por AQUINO et al. (1996) de 3,0 x 10³ a 2,5 x 10⁷ UFC/g no pescado congelado. Essas variações, comparadas às obtidas pelos autores citados, revelam uma condição razoável do produto mantido sob

congelamento e a importância deste método de conservação para manter as características microbiológicas iniciais do peixe e evitar sua deterioração.

Resultados inferiores aos do presente estudo foram encontrados em produtos mantidos a 18°C prontos para consumo, vendidos em mercados de Taiwan, no qual a maioria das amostras (98,0%) de frutos do mar apresentava contagens de microrganismos heterotróficos mesófilos entre $0,33 \times 10$ e $0,73 \times 10$ UFC/g, evidenciando boas práticas de higiene na elaboração, bem como o controle da temperatura dos mesmos durante o armazenamento (FANG et al., 2003). Cuidados da mesma natureza deveriam ser aplicados em todos os pontos de comercialização nos quais as amostras do presente estudo foram colhidas, a fim de evitar sua deterioração com a presença de populações acima de 10^5 UFC/g, populações encontradas no produto refrigerado (Tabela 1).

Na Tabela 2 verifica-se que quatro das 31 amostras analisadas apresentaram populações bastante distintas, sendo duas com $1,0 \times 10$ UFC/g e duas entre $2,0 \times 10^6$ a $3,9 \times 10^6$. A faixa de variação com maior número de amostras (10/32,26%) foi de $1,0 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^3$. Ainda houve três amostras entre os intervalos de $1,0 \times 10$ a $1,0 \times 10^2$ UFC/g e de $1,0 \times 10^5$ a $9,2 \times 10^5$ UFC/g. Cinco amostras ficaram entre $1,0 \times 10^2$ a $7,0 \times 10^2$ UFC/g, enquanto seis delas entre $1,0 \times 10^4$ a $6,0 \times 10^4$ UFC/g, contabilizando um total de 5 (16,13%) amostras com a vida comercial comprometida devido à presença de populações maiores que 10^5 UFC/g.

Resultados semelhantes a três amostras deste estudo variando de $1,0 \times 10^5$ a $9,2 \times 10^5$ UFC/g para populações de microrganismos heterotróficos mesófilos foi verificado por VERNOCCHI et al. (2007), que analisaram dez quilos de mexilhões capturados no mar Adriático, na Itália, e verificaram variações entre $4,0 \times 10^5$ a $6,5 \times 10^5$ UFC/g, sendo que nos meses de agosto/2002 a fevereiro/2003 as populações ultrapassaram os limites para a qualidade do produto estabelecidos pela região romana de Emília de $5,0 \times 10^5$ UFC/g. Os autores consideraram que o aumento populacional teve influência sazonal por aumento da temperatura ambiente.

MURATORI et al. (2004) avaliaram a qualidade sanitária de pescado “in natura” em Teresina, PI, e encontraram 34 (55,9%) amostras de “branquinha” (*Curimatus ciliatus*) com populações de microrganismos mesófilos superiores a 10^5 UFC/g, o que levou os autores a destacarem a importância da preocupação com a qualidade higiênico-sanitária e conservação do pescado, principalmente durante as etapas tecnológicas e manipulação geral pós-captura. O mesmo destaque pode ser dado a este estudo, pois 5 (16,13%) das 31 amostras apresentaram populações de microrganismos mesófilos acima de 10^5 UFC/g.

A média da população de microrganismos heterotróficos mesófilos entre as amostras conservadas refrigeradas e congeladas foi de, respectivamente, $5,0 \times 10^5$ UFC/g e $4,4 \times 10^3$ UFC/g (Tabela 1). Aplicado o teste t de student aos valores dessas populações, a diferença entre as médias mostrou-se significativa do ponto de vista estatístico ($p < 0,01$) (SAS, 2005), isto é, entre as duas formas de conservação do peixe, o congelamento mostrou ser mais eficiente em relação à refrigeração sob o ponto de vista microbiológico, pois se bem realizado pode prolongar a vida de prateleira do produto.

Como há valores elevados para a população de microrganismos heterotróficos mesófilos tanto nas amostras refrigeradas quanto nas congeladas, prevalecendo populações maiores nas amostras refrigeradas, tais resultados indicam que os dois tipos de produto são expostos a fontes de contaminação que podem ir desde a captura até o transporte e comercialização, passando pelas diferentes fases industriais. A população relativamente menor no produto congelado sugere que este método de conservação, quando aplicado logo em seguida à industrialização, é um fator de importância na manutenção de características microbiológicas iniciais, tendo em vista que impede a multiplicação microbiana; multiplicação que pode ocorrer, mesmo que lentamente, naqueles produtos mantidos sob refrigeração.

É importante salientar que os microrganismos mesófilos encontrando condições de temperaturas favoráveis, podem se multiplicar rapidamente, levando o produto à decomposição em um pequeno período de tempo. Quanto maior a população

microbiana inicial, como visto no produto mantido sob refrigeração, menor será a sua vida útil ou comercial, especialmente se houver falhas na manutenção de temperaturas adequadas na estocagem e comercialização.

SOARES & GERMANO (2005) observaram que quanto menor a temperatura das amostras de salmão utilizadas em “sashimis”, menores eram também os valores das populações microbianas, que variaram de $1,0 \times 10^3$ a $1,9 \times 10^6$ UFC/g, valores semelhantes ao encontrado neste estudo.

A importância de o peixe ser mantido congelado também foi observada por LOURENÇO et al. (2006) na análise da carne de caranguejo-uçá em dois municípios do estado do Pará. Na cidade de São Caetano de Odivelas a população de microrganismos heterotróficos mesófilos variou de $9,0 \times 10^5$ a $3,7 \times 10^8$ UFC/g, e em Belém de $1,3 \times 10^4$ a $3,1 \times 10^4$ UFC/g, sendo que as amostras provenientes da cidade de Belém foram submetidas ao congelamento por um período maior de tempo em relação às amostras coletadas em São Caetano de Odivelas, supondo-se que a conservação em temperaturas baixas tenha afetado o número de microrganismos viáveis no produto.

Portanto, os microrganismos mesófilos servem de parâmetro para avaliar o estado de frescor do pescado oferecido ao consumidor, sendo de extrema importância a criação de uma legislação específica. Como sugestão, deveria ser estabelecido para o pescado fresco populações de microrganismos mesófilos de até 10^3 UFC/g, tendo em vista que a deterioração se inicia com populações de 10^5 UFC/g e que os locais que comercializam o peixe geralmente não mantêm a temperatura correta de refrigeração. Outro fator que justifica a criação dessa legislação é a falta de parâmetros para microrganismos heterotróficos mesófilos na legislação referente a pratos prontos para o consumo a base de pescado cru (ANVISA, 2001), fator que auxiliaria na fiscalização higiênico-sanitária tanto do pescado quanto dos pratos dele derivados.

A Tabela 3 refere-se à população de coliformes totais e coliformes termotolerantes em cada uma das amostras de salmão adquiridas nas diferentes cidades onde foi realizado o estudo.

TABELA 3. População de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g) em amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, colhidas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.

Número da amostra	Forma de conservação		População (NMP/g)	
	Refrigeração	Congelamento	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes
1	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
2	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	X		0,9 x 10	0,4 x 10
4		X	0,7 x 10	< 0,3 x 10
5		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
7	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8		X	4,6 x 10 ²	4,6 x 10 ²
9		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
11	X		4,6 x 10 ²	< 0,3 x 10
12	X		1,1 x 10 ³	0,4 x 10
13	X		9,3 x 10	0,9 x 10
14	X		9,3 x 10	4,3 x 10
15	X		0,7 x 10	< 0,3 x 10
16	X		0,9 x 10	< 0,3 x 10
17	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
18	X		2,9 x 10 ²	1,5 x 10 ²
19	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
20	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
21		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
22		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
23		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
24		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
25		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
26	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
27	X		< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
28		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
29		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
30		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
31		X	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

A Tabela 4 apresenta os resultados da população de coliformes totais (NMP/g) e o número de amostras correspondentes.

TABELA 4. Distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de coliformes totais (NMP/g).

População de coliformes totais (NMP/g)	Número de amostras (%)
< 0,3 x 10	21 (67,74)
0,7 x 10	2 (6,45)
0,9 x 10	2 (6,45)
9,3 x 10	2 (6,45)
2,9 x 10 ²	1 (3,22)
4,6 x 10 ²	2 (6,45)
1,1 x 10 ³	1 (3,22)
Total de amostras	31 (100,00)

A Tabela 5 mostra os resultados da população de coliformes termotolerantes (NMP/g) e o número de amostras correspondentes.

TABELA 5. Distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de coliformes termotolerantes (NMP/g).

População de coliformes termotolerantes (NMP/g)	Número de amostras (%)
< 0,3 x 10	25 (80,64)
0,4 x 10	2 (6,45)
0,9 x 10	1 (3,22)
4,3 x 10	1 (3,22)
1,5 x 10 ²	1 (3,22)
4,6 x 10 ²	1 (3,22)
Total de amostras	31 (100,00)

Os dados da Tabela 3 mostram que as populações de coliformes variaram de < 0,3 x 10 a 1,1 x 10³ NMP/g para o grupo dos totais e de < 0,3 x 10 a 4,6 x 10² NMP/g para os termotolerantes. Valores menores que 0,3 x 10 NMP/g, ou seja, praticamente ausência desses contaminantes, foram observados na maioria das amostras tanto para

coliformes totais (21/67,74%), como para coliformes termotolerantes (25/80,64%) como mostram as Tabelas 4 e 5, caracterizando a boa qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima, no que se refere às contaminações de origem fecal. Dentre as 21 amostras com população de coliformes totais menores que $0,3 \times 10$ NMP/g, oito delas eram refrigeradas e 13 congeladas, e para as 25 amostras de coliformes termotolerantes com a mesma população, 11 delas eram refrigeradas e 14 congeladas (Tabelas 3 a 5), mostrando a influência da temperatura na população dos microrganismos e na conservação do produto.

FANG et al. (2003) também encontraram baixas contagens para coliformes totais, entre $0,23 \times 10$ e $0,61 \times 10$ UFC/g, em 80,0% de 50 amostras de frutos do mar, em um estudo realizado com alimentos mantidos a 18°C e prontos para o consumo vendidos em Taiwan e, ao contrário deste estudo, os autores verificaram a presença de *E. coli* em 6,0% das amostras. Apesar de as contagens para coliformes totais serem baixas, os autores as consideraram fora dos padrões sanitários para alimentos em Taiwan que é de até 10 NMP/g e ausência de *E. coli*, justificando os resultados em função da contaminação do produto cru, contaminação cruzada durante a preparação dos alimentos, principalmente pelo uso de vegetais, e altas temperaturas de armazenamento.

Todas as justificativas apresentadas por FANG et al. (2003) são pontos importantes quando se trata de qualidade de alimento e devem ser consideradas neste estudo, principalmente no que diz respeito à contaminação cruzada, pois o brasileiro possui o hábito de expor peixes junto a folhas de alface para melhor apresentação do produto. Tendo em vista esses aspectos, somados à RDC n° 12 (ANVISA, 2001), referente a pratos prontos para o consumo a base de pescado cru que permite populações de 10^2 NMP/g para coliformes termotolerantes, aos exemplos de padrões sanitários mais rigorosos, como de Taiwan, às populações de coliformes totais e termotolerantes menores que $0,3 \times 10$ NMP/g verificadas na maioria das amostras deste estudo, bem como ausência de *E. coli*, poder-se-ia propor a criação de uma legislação brasileira específica para pescados consumidos crus com padrões próximos

aos valores encontrados no presente estudo, ou seja, máximo de 10 NMP/g para coliformes termotolerantes.

MURATORI et al. (2004) avaliando a qualidade higiênico-sanitária de pescado “in natura”, comercializado em Teresina, PI, verificaram que a maioria dos peixes analisados (67,6%) apresentava coliformes termotolerantes, sendo que 47,1%, com população superior a 10^4 NMP/g, considerados impróprios para o consumo. Os autores concluíram que há grande probabilidade de os peixes terem sido capturados em ambientes com elevados índices de poluição fecal. Tal conclusão não pode ser levada em consideração no presente estudo, tendo em vista a ausência de coliformes termotolerantes ($< 0,3 \times 10$ NMP/g) na maioria das amostras.

SOARES & GERMANO (2004) avaliaram a qualidade higiênico-sanitária de pescado servido cru em pratos típicos japoneses (“sashimis”) prontos para o consumo, comercializados em “shopping centers” na cidade de São Paulo, SP. Os autores utilizaram técnica de contagem em placas e encontraram populações de coliformes totais variando de 1,25 a $7,0 \times 10^4$ UFC/g e de coliformes termotolerantes entre $< 1,0 \times 10$ e $4,0 \times 10^3$ UFC/g. De 30 amostras, 66,4% apresentaram coliformes termotolerantes, diferentemente do presente estudo em que 80,64% das amostras não apresentaram o referido grupo. Em outro estudo os mesmos autores encontraram populações de coliformes totais da ordem de $3,5 \times 10$ a $1,1 \times 10^6$ UFC/g em salmão (*Salmo salar*), utilizado em “sashimis” (SOARES & GERMANO, 2005), diferentemente do presente estudo que foram de, no máximo, $1,1 \times 10^3$ NMP/g. A diferença entre os resultados pode ser decorrente de uma maior manipulação dos produtos preparados para serem servidos crus e também da temperatura de estocagem do pescado.

Relacionando os grupos de coliformes totais e termotolerantes com a temperatura de armazenamento e comercialização, verificou-se que para as amostras refrigeradas as populações de coliformes totais variaram entre $< 0,3 \times 10$ a $1,1 \times 10^3$ NMP/g, enquanto que valores inferiores foram encontrados nas amostras submetidas ao congelamento, com variação entre $< 0,3 \times 10$ a $4,6 \times 10^2$ NMP/g. Considerando como negativas para coliformes totais as amostras com resultados $< 0,3 \times 10$ NMP/g, aplicou-se o teste não paramétrico do qui-quadrado às médias encontradas e este

mostrou haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados, confirmando que o congelamento é a melhor forma de conservação do produto.

Porém, para os coliformes termotolerantes a diferença no número de amostras positivas entre os produtos congelados e refrigerados não se mostrou estatisticamente significativa ($p > 0,01$), pois a variação populacional para o produto refrigerado foi $< 0,3 \times 10$ a $1,5 \times 10^2$ NMP/g e para o produto congelado $< 0,3 \times 10$ a $4,6 \times 10^2$ NMP/g. A observação de uma população relativamente superior de $4,6 \times 10^2$ NMP/g em uma das 15 amostras congeladas, enquanto que no produto refrigerado o máximo encontrado foi de $1,5 \times 10^2$ NMP/g (Tabela 3), sugere uma contaminação durante o processamento ou preparação para venda.

LOURENÇO et al. (2006) atribuíram à falta dos princípios de Boas Práticas de Fabricação durante as etapas de captura e comercialização, a presença de coliformes fecais em 90% e 40% das amostras de carne de caranguejo-uçá comercializadas, respectivamente, nos municípios de São Caetano de Odivelas e Belém, PA. Apesar de a maioria das amostras deste estudo apresentar populações de coliformes fecais $< 0,3 \times 10$ NMP/g, a precariedade na execução dos princípios de boas práticas de fabricação também pode ser considerada naquelas cuja população ultrapassou os limites de 10^2 NMP/g.

Um estudo que avaliou a qualidade microbiológica de 90 ostras (*Crassostrea gigas*) colhidas em Florianópolis, SC, sendo 45 colhidas na área de cultivo e 45 colhidas em estabelecimentos comerciais, revelou uma população menor que $0,3 \times 10$ NMP/g em 20 e 52 amostras, respectivamente para coliformes totais e termotolerantes, e população $\geq 1,1 \times 10^3$ NMP/g em oito e quatro amostras, para coliformes totais e coliformes termotolerantes respectivamente. Dentre todas as amostras, *E. coli* esteve presente em quatro (9,0%) das coletadas na área de cultivo, e em 16 (35,5%) dentre as coletadas em estabelecimentos comerciais, levando os autores a concluírem pela necessidade de monitorar a qualidade do alimento “in natura” através da adoção de programas para melhorar a manipulação e as boas práticas (PEREIRA et al., 2006).

Os dados da Tabela 4 evidenciam que para a população de coliformes totais, a maioria das amostras (21/67,74%) apresentou valores menores que $0,3 \times 10$ NMP/g, e

apenas uma das 31 estudadas apresentou o maior valor, que foi de $1,1 \times 10^3$ NMP/g. Valores significativos de $4,6 \times 10^2$ NMP/g, $9,3 \times 10$ NMP/g, $0,9 \times 10$ NMP/g e $0,7 \times 10$ NMP/g foram observados, cada um, em duas das 31 amostras.

Assim como os coliformes totais, os coliformes termotolerantes também apresentaram valores menores que $0,3 \times 10$ NMP/g para a maioria das amostras (25/80,64%), e apenas uma do total apresentou a maior população que foi de $4,6 \times 10^2$ NMP/g. Valores significativos de $1,5 \times 10^2$ NMP/g, $4,3 \times 10$ NMP/g e $0,9 \times 10$ NMP/g foram observados, cada um, em apenas uma das 31 amostras (Tabela 5).

Os resultados presentes nas Tabelas 4 e 5 confirmam a necessidade de se criar uma legislação específica para pescado consumido sob a forma “in natura”, estabelecendo padrões mais rigorosos que aqueles preconizados pela legislação para pratos prontos a base de pescado cru, estabelecidos na RDC nº12 (ANVISA, 2001), pois os pratos contêm outros ingredientes além do pescado, que podem causar a contaminação cruzada e interferir na qualidade microbiológica do produto final.

A importância de modificar os padrões atuais e criar padrões específicos também foi defendida por MARTINS (2008) quando avaliou a qualidade higiênico-sanitária de preparações (“sushi e sashimi”) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo, SP. A autora verificou populações de coliformes termotolerantes acima de 10^2 NMP/g em 50% das amostras, com *E. coli* em 45% delas. Três das que continham *E. coli* apresentaram contagem de coliformes termotolerantes abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira, de 10^2 NMP/g (ANVISA, 2001), levando a autora a afirmar que a quantificação abaixo deste valor para coliformes termotolerantes não garante a qualidade higiênico-sanitária e a inocuidade do produto.

No presente estudo foram realizados testes bioquímicos para a caracterização de *E. coli*, a partir dos isolados de coliformes termotolerantes, o que mostrou a ausência da bactéria em todas as amostras. O mesmo resultado foi obtido por SOARES & GERMANO (2004) na análise da qualidade microbiológica de “sashimis” comercializados em “shopping centers” em São Paulo e por MELDRUM et al. (2006) na análise microbiológica de 42 amostras de patê de peixe dentre 3.391 amostras de alimentos prontos para consumo obtidos em Wales, Inglaterra, o que levou os autores a

concluírem como satisfatória a qualidade dos produtos em função da ausência dos patógenos estudados e dos baixos níveis de microrganismos indicadores encontrados.

TAULO et al. (2008) analisando 37 peixes preparados em residências rurais em Lungwena, Malawi, encontraram a presença de *E. coli* em 18 (49%) amostras, sendo duas (5,0 %) delas *E. coli* O157:H7. SEHGAL et al. (2008) também verificaram a presença de *E. coli* O157:H7 em 16 (8,4%) de 190 amostras de frutos do mar analisadas, verificando a prevalência e a distribuição geográfica da bactéria durante dez anos na Índia. KUMAR et al. (2001) estudaram a presença de *E. coli* em 60 peixes frescos colhidos em mercados em Mangalore, na Índia, tendo encontrado a bactéria em apenas duas. Os autores relacionam a presença da bactéria com a presença de animais nos locais de preparação de alimentos, com contaminação cruzada do pescado e com a contaminação da água utilizada na preparação dos pratos e na lavagem das mãos.

Tradicionalmente, as bactérias do grupo coliformes têm sido consideradas como indicadoras de poluição fecal em águas (TÔRRES, 2004). Porém, SANTOS (2008) avaliando a qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo, SP, observou que o grupo reflete a condição geral de higiene durante o processo de produção. Essa condição também foi observada por LANDEIRO et al. (2007) na análise de riscos e pontos críticos de controle durante a preparação de refeições à base de peixe e frutos do mar, no qual cepas de *E. coli* produtoras de citotoxinas foram encontradas nas mãos dos manipuladores desses alimentos, e sugeriram o monitoramento do processamento e maiores cuidados na preparação dos pratos.

Com relação à população de microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes, a legislação brasileira não estabelece índices para o pescado consumido cru. Embora existam alguns padrões referentes a pratos prontos para o consumo a base de pescado cru, a pesquisa destes grupos microbianos deve ser mais rigorosa conforme mostra o presente estudo, pois fornece informações sobre aspectos higiênico-sanitários da produção e processamento, qualidade da matéria-

prima, estado de deterioração e frescor do pescado, bem como a previsão do tempo de vida útil.

A Tabela 6 apresenta a população de *Staphylococcus* sp. em cada uma das amostras de salmão colhidas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo.

TABELA 6. População de *Staphylococcus* sp. em amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, colhidas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.

Número da amostra	População (UFC/g) segundo a forma de conservação		População (UFC/g)
	Refrigeração	Congelamento	
1	X		3,0 x 10
2	X		< 5,0 x 10
3	X		5,0 x 10 ²
4		X	< 5,0 x 10
5		X	< 5,0 x 10
6		X	< 5,0 x 10
7	X		2,0 x 10 ³
8		X	2,6 x 10 ³
9		X	< 5,0 x 10
10		X	< 5,0 x 10
11	X		5,5 x 10 ²
12	X		2,2 x 10 ³
13	X		1,3 x 10 ⁴
14	X		6,2 x 10 ²
15	X		4,7 x 10 ³
16	X		5,5 x 10 ²
17	X		1,5 x 10 ²
18	X		1,2 x 10 ⁴
19	X		4,0 x 10 ²
20	X		4,5 x 10 ²
21		X	1,3 x 10 ³
22		X	< 5,0 x 10
23		X	< 5,0 x 10
24		X	< 5,0 x 10
25		X	< 5,0 x 10
26	X		1,2 x 10 ⁴
27	X		5,0 x 10 ²
28		X	1,8 x 10 ²
29		X	< 5,0 x 10
30		X	< 5,0 x 10
31		X	< 5,0 x 10

A Tabela 7 apresenta os resultados da população de *Staphylococcus* sp. (UFC/g) divididos em intervalos de variação e o número de amostras correspondentes.

TABELA 7. Distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de *Staphylococcus* sp. (UFC/g).

População de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g)	Número de amostras (%)
< 5,0 x 10	13 (41,93)
1,0 x 10 ² — 4,0 x 10 ²	4 (12,90)
4,5 x 10 ² — 6,2 x 10 ²	6 (19,35)
1,0 x 10 ³ — 4,7 x 10 ³	5 (16,13)
1,0 x 10 ⁴ — 1,3 x 10 ⁴	3 (9,68)
Total de amostras	31 (100,00)

Dentre as 31 amostras analisadas, conforme observado na Tabela 6, as populações de *Staphylococcus* sp. variaram de < 5,0 x 10 a 1,3 x 10⁴ UFC/g. Considerando-se a forma de conservação, a variação da população para o produto refrigerado foi de < 5,0 x 10 a 1,3 x 10⁴ UFC/g, e para o produto congelado de < 5,0 x 10 a 2,6 x 10³ UFC/g, revelando o congelamento como a melhor forma de conservação do pescado.

Resultados semelhantes, menores que 10² e 3,0 x 10⁴ UFC/g, foram encontrados por CUNHA NETO et al. (2002) na análise de 37 camarões “in natura” procedentes da bacia pesqueira do litoral de Natal, RN, e de 75 alimentos processados no estado de Pernambuco, entre eles peixe cozido. Os resultados das contagens de estafilococos coagulase positivos em uma amostra de peixe cozido e outra de camarão cru foram, respectivamente, de 9,5 x 10² UFC/g e de 4,0 x 10² UFC/g, semelhantes a uma amostra refrigerada de 5,5 x 10² UFC/g encontrada neste estudo. Os autores observaram que a contaminação por *Staphylococcus* sp. ocorreu durante os estágios de produção ou na estocagem dos alimentos, estágios onde houve a produção de toxinas, e ainda concluíram que estes alimentos representam risco à saúde humana se

não forem observadas práticas adequadas de higiene no seu manuseio e no armazenamento.

PEREIRA et al. (2006) também encontraram *Staphylococcus* coagulase positivos em apenas uma de 90 ostras (*Crassostrea gigas*) colhidas em Florianópolis, SC, com população de 80 UFC/g, sendo 45 colhidas na área de cultivo e 45 colhidas em estabelecimentos comerciais. Os autores destacaram que há a necessidade de se monitorar a qualidade das ostras cruas, com a implantação de programas de boas práticas de manipulação e manejo dos moluscos.

Os valores observados no presente estudo são considerados padrões aceitáveis de acordo com a RDC n°12 (ANVISA, 2001) que é de, no máximo, $5,0 \times 10^3$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positivo por grama de pratos a base de peixe. Porém, eles revelam a necessidade da criação de uma legislação específica para pescado cru com padrões abaixo de 10^2 UFC/g, visto que os parâmetros estabelecidos para pratos prontos a base de pescado cru são elevados e podem colocar em risco à saúde do consumidor, embora a população capaz de provocar intoxicação seja de aproximadamente 10^6 UFC/g (RODRIGUES et al., 2004).

Populações menores que $5,0 \times 10$ UFC/g foram encontradas em 13 (41,93%) amostras, sendo que uma delas era mantida sob refrigeração e 12 sob congelamento, confirmando a eficácia do congelamento na conservação do produto. Populações significativas, com variação entre $1,0 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^4$ UFC/g, $1,0 \times 10^3$ e $4,7 \times 10^3$ UFC/g, $4,5 \times 10^2$ e $6,2 \times 10^2$ UFC/g e, $1,0 \times 10^2$ e $4,0 \times 10^2$ UFC/g, foram observadas, respectivamente, em três, cinco, seis e quatro amostras (Tabela 7), revelando a importância de se manter a temperatura adequada de refrigeração do peixe durante a estocagem e exposição para a venda, no sentido de evitar a multiplicação. Hábitos de higiene pessoal durante a comercialização, tais como lavagem das mãos, uso de máscaras e ausência de objetos de adorno são medidas que também podem contribuir para a obtenção de produtos de melhor qualidade microbiológica.

A caracterização bioquímica das cepas isoladas identificou *Staphylococcus aureus* apenas na amostra número 11, conservada sob refrigeração. Mesmo tendo sido encontrado em apenas uma amostra, este achado caracteriza o perigo que o consumo deste tipo de alimento pode representar à população e também a importância dos hábitos de higiene durante a manipulação do produto para evitar sua contaminação. Resultados negativos para identificação da bactéria foram obtidos por MELDRUM et al. (2006) na análise microbiológica de 42 amostras de patê de peixe adquiridas em Wales, Inglaterra, o que levou os autores a concluir pelo baixo perigo de veiculação da bactéria através do alimento para os consumidores.

ALBUQUERQUE et al. (2006) estudando a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e estafilococos coagulase positivos em “sushis” comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza, CE, encontraram populações deste último grupo entre $< 10^2$ e $1,4 \times 10^6$ UFC/g, concluindo que esses resultados eram decorrentes da higiene inadequada dos manipuladores ou contaminação cruzada. CUNHA NETO et al. (2002) acrescentam que a contaminação por *Staphylococcus* sp. pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Em quantificação de *Staphylococcus aureus* na carne de caranguejo-uçá no estado do Pará, a variação obtida por LOURENÇO et al. (2006) foi de $3,0 \times 10^2$ a $28,0 \times 10^4$ UFC/g no município de São Caetano de Odivelas e entre $2,0 \times 10^2$ e 10^3 UFC/g em Belém, revelando más condições de processamento na extração da carne de caranguejo.

BASTI et al. (2006) obtiveram populações de *S. aureus* maiores de $1,0 \times 10^5$ UFC/g em 55% de 20 amostras de peixes defumados e em 10% de 40 peixes salgados, comercializados em mercado de peixe no Irã. Os autores não isolaram a bactéria de peixes recém-capturados e de peixes cultivados, indicando não ser parte da microbiota natural do pescado, concluindo que a presença deste microrganismo em pescados crus é devido à contaminação durante a captura e processo de manipulação sem higiene.

Em função dos resultados os autores concluem também pelo perigo de intoxicação através do consumo destes alimentos.

A mesma conclusão foi apresentada por AYULO et al. (1994) que também verificaram a presença de *S. aureus* com populações que variaram de 10 a $>10^4$ UFC/g em 175 amostras de frutos do mar comercializados em Florianópolis, Santa Catarina. Os autores sugeriram que a maior parte da contaminação se deu através da manipulação inadequada dos alimentos, o que os levou a recomendarem que cuidados devem ser tomados durante a captura e pós-captura do pescado para diminuir a contaminação do produto, e conseqüentemente, diminuir o risco de intoxicação estafilocócica pela ingestão destes alimentos.

A determinação de bactérias do gênero *Aeromonas* foi realizada de duas formas, por quantificação direta sem enriquecimento seletivo, e por isolamento e identificação após enriquecimento seletivo. No primeiro caso, de forma direta, foi possível quantificar e caracterizar como sendo do gênero *Aeromonas*, os cultivos de 11 amostras, cujos resultados das populações estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8. População de *Aeromonas* sp. em amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, colhidas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008.

Número da amostra	População (UFC/g) segundo a forma de conservação	
	Refrigeração	Congelamento
1	$5,0 \times 10^3$	
2	$4,6 \times 10^3$	
3	$4,0 \times 10^2$	
12	$2,0 \times 10^2$	
13	$8,0 \times 10^3$	
14	$4,5 \times 10^3$	
18	$6,6 \times 10^3$	
19	$4,0 \times 10^2$	
20	$1,9 \times 10^3$	
26	$1,1 \times 10^3$	
27	$3,0 \times 10^3$	
Média	$3,2 \times 10^3$	

A Tabela 9 apresenta a distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*) segundo a população de *Aeromonas* sp.

TABELA 9. Distribuição das amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, adquiridas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo a população de *Aeromonas* sp.

População de <i>Aeromonas</i> sp. (UFC/g)	Número de amostras (%)
$<1,0 \times 10^2$	20 (64,51)
$1,0 \times 10^2$ — $5,0 \times 10^2$	3 (9,68)
$5,0 \times 10^2$ — $1,0 \times 10^3$	0 (0,00)
$1,0 \times 10^3$ — $5,0 \times 10^3$	5 (16,13)
$5,0 \times 10^3$ — $1,0 \times 10^4$	3 (9,68)
Total de amostras	31 (100,00)

Verifica-se na Tabela 8 que as populações variaram de $2,0 \times 10^2$ a $8,0 \times 10^3$ UFC/g e que todas as amostras eram conservadas sob refrigeração. Os resultados revelam que não foi possível quantificar aeromonas nas amostras conservadas sob congelamento, sugerindo a ausência ou reduzida população do microrganismo e mostrando que essa forma de conservação seria a mais adequada para preservar o produto e dificultar a veiculação do agente através da carne.

HOZBOR et al. (2006) estudando mudanças na microbiota do salmão cru (*Pseudoperca semifasciata*) durante a estocagem em gelo a 0°C por 20 dias e sua correlação com o índice de qualidade, também observaram a presença de *Aeromonas* sp. no músculo do salmão. Os autores encontraram populações iniciais de $1,0 \times 10^2$ UFC/g e $1,0 \times 10^7$ UFC/g após 20 dias e relacionaram o alto potencial de deterioração do pescado a estas mudanças populacionais, concluindo que a vida de prateleira do salmão estocado em gelo a 0°C seria menor que 10 dias.

Na Tabela 9 verifica-se que a maioria (20/64,51%) das amostras analisadas apresentou populações menores que $1,0 \times 10^2$ UFC/g e que a faixa de variação com três amostras (9,68%) foi de $1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^2$ UFC/g e de $5,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g. Ainda houve cinco amostras entre os intervalos de $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/g.

Um estudo realizado na Espanha sobre a ocorrência de bactérias patogênicas em peixes comercializados em mercados, identificou *Aeromonas* sp. em 62% (31) das 50 amostras de peixes, com população variando entre $1,95 \times 10^2$ e $1,5 \times 10^7$ UFC/g (HERRERA et al., 2006), diferente do presente estudo em que 64,51% das 31 amostras de salmão apresentaram *Aeromonas* sp. com populações menores $1,0 \times 10^2$ UFC/g.

ULLMANN et al. (2005) também encontraram populações menores que 10^4 UFC/g de *Aeromonas* sp. potencialmente patogênicas para o ser humano na maioria (67,9%) das 84 amostras de pescado, incluindo o salmão, comercializados em Berlim, Alemanha. Porém, os autores observaram populações elevadas entre 10^4 e 10^5 UFC/g em 18 (21,4%) amostras e $>10^5$ UFC/g em nove (10,7%) delas, sugerindo o perigo de transmissão de doença através do consumo do pescado, tendo em vista que a dose infectante capaz de causar doença no ser humano foi estimada entre 10^3 e 10^9 UFC/g.

As Tabelas 8 e 9 mostram que a média populacional foi de $3,2 \times 10^3$ UFC/g e que das 11 amostras em que foi possível quantificar *Aeromonas* sp., oito (72,73%) apresentaram populações acima de 10^3 UFC/g, demonstrando perigo de causar doença ao ser humano através de sua ingestão, principalmente do produto cru, hábito crescente no Brasil.

A quantificação e pesquisa de aeromonas não são preconizadas pela RDC n° 12 (ANVISA, 2001), e tendo em vista os achados do presente estudo e a importância que o pescado vem assumindo como fonte de proteína na alimentação do ser humano, especialmente sob a forma "in natura", uma legislação específica deveria ser criada e como sugestão com um padrão populacional de até 10^2 UFC/g.

Após o enriquecimento seletivo foi possível caracterizar a presença de bactérias do gênero *Aeromonas* e identificar as espécies em 13 amostras, como apresentado na Tabela 10.

TABELA 10. Distribuição do número de amostras de salmão (*Salmo salar*), mantidas refrigeradas e congeladas, colhidas em diferentes cidades da região nordeste do estado de São Paulo, durante o período de junho/2007 a abril/2008, segundo as espécies de *Aeromonas* identificadas.

Forma de conservação	Número de amostras		%*	%**	Espécie identificada	Número de amostras em que a espécie ocorreu
	Analisadas	Positivas				
Refrigeradas	16	10	76,90	32,25	<i>A. caviae</i>	7
					<i>A. caviae</i> e <i>A. sobria</i>	1
					<i>A. caviae</i> e <i>A. trota</i>	1
					<i>A. sobria</i>	1
					<i>A. caviae</i>	3
Congeladas	15	3	23,10	9,70	<i>A. caviae</i>	3
Total	31	13	100,00	41,95		

* Porcentagem em relação ao total de amostras positivas.

** Porcentagem em relação ao total de amostras analisadas.

Os dados da Tabela 10 mostram que após o enriquecimento seletivo, das 31 amostras de salmão, 13 (41,95%) foram positivas para *Aeromonas* sp. Dentre estas, as conservadas sob refrigeração atingiram um percentual de 76,90% (10), enquanto que amostras mantidas sob congelamento perfizeram 23,10% (3), mostrando novamente a presença da bactéria em baixas temperaturas e a importância de manter o produto conservado sob congelamento.

AZEVEDO et al. (2008) obtiveram resultados superiores em um estudo sobre as condições higiênico-sanitárias em pesque-pagues. O estudo revelou a presença de *Aeromonas* sp. em 87% das 26 amostras de peixe e em 93% das 28 amostras de água, representando risco à saúde dos consumidores de peixes desses estabelecimentos, uma vez que são patógenos emergentes e podem causar sérias doenças ao ser humano.

A caracterização das espécies revelou *A. caviae* em 12 (38,70%), *A. sobria* em duas (6,45%) e *A. trota* em uma (3,22%) das 31 amostras estudadas, ou seja, 10 (32,25%) amostras apresentaram somente *A. caviae*, 1 (3,22%) amostra apresentou somente *A. sobria*, 1 (3,22%) amostra apresentou concomitantemente *A. caviae* e *A.*

trota e 1 (3,22%) amostra apresentou *A. caviae* e *A. sobria*. Das 16 amostras refrigeradas analisadas, foram identificadas *A. caviae* em nove (56,25%), *A. sobria* em duas (12,5%) e *A. trota* em uma (6,25%), enquanto que das 15 amostras conservadas sob congelamento, apenas três (20,0%) apresentaram a espécie *A. caviae*.

Resultados semelhantes para *A. caviae* e *A. sobria* foram encontrados por ULLMANN et al. (2005) na Alemanha através de um estudo sobre o isolamento e a caracterização de *Aeromonas* sp. potencialmente patogênicas para o ser humano. Os autores identificaram 134 cepas do gênero em 84 amostras de pescado, incluindo o salmão, e entre as cepas isoladas, 67,9% eram *A. hydrophila*, 26,1% *A. caviae* e 6,0% *A. sobria*, indicando que o pescado cru e produtos prontos para a ingestão a base de peixe podem abrigar cepas de aeromonas potencialmente patogênicas ao ser humano, produtoras de citotoxinas.

PEREIRA et al. (2004a) avaliaram a presença de patógenos emergentes como *A. hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides* em 86 amostras de mexilhões (*Perna perna*), no Rio de Janeiro, e identificaram 37,10% de *A. media*, 15,50% de *A. hydrophila*, 14,80% de *A. caviae*, 4,20% de *A. sobria*, 4,20% de *A. trota*, 1,31% de *A. schubertii*, 1,31% de *A. jandaei* e 2,10% de *P. shigelloides*. Em relação aos resultados do presente estudo, os autores encontraram porcentagens inferiores para *A. caviae* e *A. sobria*, e superiores para *A. trota*, apontando a relevância epidemiológica desses microrganismos em casos de gastroenterite humana por ingestão de mexilhões crus ou parcialmente cozidos e a importância de alertar as autoridades de saúde pública no Brasil sobre a presença desses patógenos na cadeia alimentar e seus riscos para a saúde humana.

AZEVEDO et al. (2008) identificaram *A. veronii*, *A. allosaccharophila* e *A. trota* como as espécies mais freqüentes isoladas de 30 amostras de peixe. Os autores encontraram 24,4% de *A. trota*, resultados superiores aos do presente estudo, caracterizando a espécie como potencialmente patogênica por possuir enzimas hemolíticas capazes de causar doenças sistêmicas e localizadas.

Resultados inferiores foram encontrados por OTTAVIANI et al. (2006) em um estudo com 144 amostras de mexilhões do mar Adriático, na Itália. Os autores identificaram 22,2% (32) das amostras positivas para *Aeromonas* sp. e 6,2% como *A.*

caviae, alertando para o risco de infecção pela bactéria, principalmente através do consumo de mexilhões crus ou mal cozidos.

HERRERA et al. (2006) encontraram resultados semelhantes para *A. sobria* em 50 amostras de peixes comercializados na Espanha. Os autores verificaram que de 31 amostras positivas para *Aeromonas* sp., 16% (5) pertenciam a espécie *A. caviae* e 6,5% (2) a espécie *A. sobria*, apontando o peixe cru como veículo transmissor de patógenos causadores de doenças ao ser humano e a importância de considerar fatores como a origem do peixe, características do produto, manipulação, processamento e preparação antes do consumo a fim de minimizar a prevalência de bactérias patogênicas no produto.

A água consiste no habitat primário dessa bactéria, conseqüentemente peixes consumidos crus podem contribuir para a ocorrência de infecções se contaminados com este microrganismo. Ainda, os mesmos podem favorecer a contaminação cruzada de outros alimentos na cozinha do consumidor.

Considerando que *Aeromonas* sp. tem sido reportada como patógeno emergente isolada de fontes humanas e animais, é de suma importância monitorar sua presença em pescados e avaliar seus riscos para a Saúde Pública.

Não foram isolados microrganismos do gênero *Salmonella* bem como *V. parahaemolyticus* nas amostras estudadas mostrando, nas condições em que este trabalho foi realizado, que o salmão quando bem obtido pode não veicular esses agentes. Esses resultados caracterizam que as amostras estavam dentro dos padrões da RDC nº12 (ANVISA, 2001), de ausência para *Salmonella* e de no máximo 10^3 UFC de *V. parahaemolyticus* por grama para pratos a base de peixe cru. Pode-se sugerir a criação de uma legislação específica para pescado consumido cru com parâmetros semelhantes aos encontrados neste estudo, qual seja ausência de salmonela e de *Vibrio parahaemolyticus*.

AQUINO et al. (1996), MARTINS (2008), BASTI et al. (2006), PEREIRA et al. (2006) e RODRIGUES et al. (2004) analisando, respectivamente, pescado, alimentos a base de pescado cru, peixes, ostras e sanduíche de frango, também não identificaram microrganismos do gênero *Salmonella*, sugerindo que a presença em alimentos ocorre

devido à falta de higiene na manipulação. Os mesmos autores, exceto AQUINO et al. (1996) e RODRIGUES et al. (2004), também pesquisaram *V. parahaemolyticus*, encontrado apenas por BASTI et al. (2006) em níveis elevados nos peixes salgados e menores nos peixes frescos, indicando possível ocorrência de contaminação cruzada.

Ausência de *V. parahaemolyticus* também foi verificada por ALBUQUERQUE et al. (2006) na análise de “sushis” comercializados em Fortaleza, CE, caracterizando o resultado como satisfatório. Por outro lado, *V. parahaemolyticus* e *Salmonella* sp. foram encontrados por NORMANNO et al. (2006) em ostras comercializadas na Itália mostrando que a saúde do consumidor pode ser colocada em risco quando há o consumo deste tipo de alimento cru.

LOURENÇO et al. (2006) verificaram a presença de *Salmonella* sp. em 20% de 20 amostras de carne de caranguejo, revelando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante a extração da carne e no ambiente de trabalho. A presença da bactéria também foi verificada por BASTI et al. (2006) no Irã, em um estudo com bactérias patogênicas em peixes frescos, defumados e salgados que revelou *Salmonella* Dublin em 2,6% de 67 amostras de peixes frescos e ausência do gênero nos peixes defumados e salgados. Os autores concluem que a ausência foi devido a altas concentrações de sal e que a ingestão do produto cru ou mal cozido pode contribuir para doenças de origem alimentar.

A presença de 7,7% de *V. parahaemolyticus* foi mostrada por PEREIRA et al. (2007) na análise de 15 amostras de mexilhões (*Perna perna*) coletadas na região de Itaipu, Rio de Janeiro. Os mesmos autores em outro estudo verificaram a presença da bactéria em 50 amostras de ostras coletadas “in natura” em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural no Rio de Janeiro (PEREIRA et al., 2004b). Os autores ressaltam o risco de infecções pelo consumo destes alimentos sem prévio cozimento e a importância de adotar medidas corretivas e preventivas baseadas nas Boas Práticas de Manufatura (BPM). Ressaltam também a participação integrada de órgãos da Vigilância Sanitária e Epidemiológica como fundamental para o processo tecnológico na cadeia de produção dos alimentos, diminuindo a ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), especialmente pelo pescado.

Tendo em vista os resultados obtidos, é de extrema importância a adoção de Boas Práticas de Produção (BPP) durante todas as etapas do processamento do peixe, desde a captura até o preparo para o consumo, a fim de minimizar o risco de contaminações ou da multiplicação dos microrganismos deteriorantes ou patogênicos que podem causar danos à saúde dos consumidores, principalmente se for consumido cru. HUSS et al. (2000) ainda destacam que a aplicação de parâmetros preventivos, como o controle da temperatura dos produtos, seria adequado para controlar o desenvolvimento da maioria dos patógenos. Portanto, a participação de órgãos governamentais brasileiros com a criação de leis específicas para o pescado consumido cru e com a fiscalização destes produtos em todas as etapas de produção é fundamental para melhorar a qualidade microbiológica do pescado comercializado no país.

5. CONCLUSÕES

Devido ao hábito crescente no Brasil do consumo de peixes, principalmente do salmão (*Salmo salar*) sob a forma “in natura”, é importante salientar a relevância deste estudo e as conclusões que se seguem:

- Microrganismos heterotróficos mesófilos foram encontrados em 100% das amostras, com variação populacional de $1,0 \times 10$ a $3,9 \times 10^6$ UFC/g;

- Nas amostras mantidas sob refrigeração as populações de microrganismos mesófilos variaram de $1,1 \times 10^3$ a $3,9 \times 10^6$ UFC/g, sendo que em 16,13% se apresentaram acima de 10^5 UFC/g, caracterizando um produto com populações favoráveis ao início da deterioração;

- Nas amostras mantidas sob temperatura de congelamento as populações foram inferiores, variando de $1,0 \times 10$ e $4,2 \times 10^4$ UFC/g, caracterizando este método como o mais adequado para a conservação;

- A presença de coliformes totais e termotolerantes em apenas 32,26% e 19,36% das amostras, respectivamente, com populações reduzidas e *E. coli* em nenhuma delas, caracteriza uma boa qualidade higiênico-sanitária do produto em relação a estes indicadores;

- As populações de coliformes totais com variações $< 0,3 \times 10$ a $1,1 \times 10^3$ NMP/g nas amostras de peixe refrigerado e $< 0,3 \times 10$ a $4,6 \times 10^2$ NMP/g nas amostras de peixe congelado, reafirmam o congelamento como a melhor forma de conservação do produto;

- A presença de *Staphylococcus aureus* ainda que em apenas uma amostra e com população que pode ser considerada reduzida, pode caracterizar risco à saúde do consumidor, o que não aconteceu com *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, que se mostraram ausentes em todas as amostras estudadas;

- A presença de *Aeromonas* sp. em 41,95% das amostras, sendo em 76,90% das refrigeradas e 23,10% das congeladas, confirma o congelamento como melhor método para a conservação do salmão e como forma de dificultar a veiculação da bactéria através da carne;

- A presença de *A. caviae*, *A. sobria* e *A. trota* em, respectivamente, 38,70%, 6,45% e 3,22% das amostras, caracteriza risco à saúde do consumidor.

Os resultados encontrados neste estudo podem servir de subsídios para a criação de um padrão microbiológico específico para o pescado consumido cru, em particular para o salmão, especialmente pelo fato de existirem poucos trabalhos em nosso meio sobre o assunto.

6. REFERÊNCIAS *

ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.

ALBINATI, R. C. B. Aqüicultura: cadeia produtiva e a inserção do médico veterinário e do zootecnista. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, ano 13, n. 40, p. 9-13, 2007.

ALBUQUERQUE, W. F.; BARRETO, N. S. E.; SILVA, A. I. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e estafilococos coagulase positivo, em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza – CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 146, p. 58-61, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Committee on Microbiological for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm >. Acesso em: 11 de out. 2001.

AQUINO, J. S.; VASCONCELOS, J. C.; INHAMUNS, A. J.; SILVA, M. S. B. Estudo microbiológico de pescado congelado comercializado em Manaus – AM. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 1-10, 1996.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.

* ABNT NR-6023 05/2003

AZEVEDO, V. M.; DROPA, M. M. M.; CABIANCA, M. A. A.; ESTEVES, K. E.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, R. H. Ocorrência de *Aeromonas* spp. e *Vibrio cholerae* em pescapagues da região metropolitana de São Paulo. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 114-119, 2003. Disponível em: <www.ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp03_vol3n4.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2008.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T. Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 3, p. 183-188, 2006.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 30.691 29 de mar. 1952, alterados pelos Decretos n. 12.555 25 jun. 1962, n. 1236 de 02 set. 1994, n. 1812 de 08 fev. 1996, n. 2244 de 04 jun. 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministerio da Agricultura, Departamento de Inspeção de Produtos de Origen Animal, 1997, 241 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, v. 5, n. 6, 2005. Disponível em: <www.bvms2.saude.gov.br/php/level.php/lang=pt&component=44&item=126.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2008.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. p. 272.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, Baltimore, v. 4, n. 4, p. 201-212, 2004.

CARDONHA, A. M. S.; CASIMIRO, A. R. S.; VIEIRA, R. H. S. F. Identificação de bactérias psicotróficas em caudas de lagostas, durante o processo industrial com tripolifosfato de sódio. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 31, p. 29-34, 1994.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonellosis**. 2005. Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_t.htm>. Acesso em: 21 fev. 2007.

CHIOU, C. S.; HSU, S. Y.; CHIU, S. I.; WANG, T. K.; CHAO, C. S. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 12, p. 4621-4625, 2000.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, n. 13, p. 1129-1137, 1999.

COELHO, M. S. L.; GUIMARÃES, W. V.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O.; ARAÚJO, A. F. Sobrevivência de *Salmonella* em carne bovina moída armazenada em baixas temperaturas. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 17-23, 1984.

COLLINS, M. D.; MARTINEZ-MURCIA, A.; CAI, J. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trola* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 855-856, 1993.

CUNHA, M. G.; ZAMARIOLLI, L. A.; FAUSTINO, J. S.; MELLO, A. R. P. Avaliação da qualidade microbiológica do pescado comercializado na Baixada Santista. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 92-96, 2003. Disponível em: <www.ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp03_vol3n3.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2008.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DEPAOLA, A.; KAYSNER, C. A.; BOWERS, J.; COOK, D. W. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4649-4654, 2000.

DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. cap. 10, p. 171-191.

FANG, T. J.; WEI, Q. K.; LIAO, C. W. ; HUNG, M. J.; WANG, T. H. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 241-250, 2003.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nation: 2004, Rome. **The State of world fisheries and agriculture**. Disponível em: <www.fao.org/DOCREP/007/y5600e00.htm>. Acesso em 23 dez. 2006.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nation. **Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service**. Disponível em: <www.fao.org/fishery/statistics/programme/3,1,1/en>. Acesso em: 12 agos. 2008.

FORTUNA, J. L.; FRANCO, R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 128, p. 33-44, 2005.

FOUNIER, B.; PHILPOTT, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 3, p. 521-540, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 182.

FURUWATARI, C.; KAWAKAMI, Y.; AKAHANE, T.; HIDAKA, E.; OKIMURA, Y.; NAKAYAMA, J.; FURIHATA, K.; KATSUYAMA, T. Proposal for an Aeroschem (modified Aerokey II) for the identification of clinical *Aeromonas* species. **Medical Science Research**, Surrey, v. 22, n. 9, p. 617-619, 1994.

GAVÍN, R.; RABAAN, A. A.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; GRYLLOS, I.; SHAW, J. G. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 43, n. 2, p. 383-397, 2002.

GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, J. C. F.; GERMANO, M. I. S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas, **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 28, p40-45, 1993.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. A. F. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53, p.30-37, 1998.

HARF-MONTEIL, C.; LeFLÈCHE, A.; RIEGEL, P. ; PRÉVOST, G. ; BERMOND, D. ; GRIMONT, P. A. D. ; MONTEIL, H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 2, p. 481-485, 2004.

HAVELAAR, A. H.; VONK, M. The preparation of ampicilin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 169-171, 1988.

HEINITZ, M. L.; RUBLE, R. D.; WAGNER, D. E.; TATINI, S. R. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n. 5, p. 579-592, 2000.

HERRERA, F. C.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M. L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 527-536, 2006.

HILUY, D. J.; PINHEIRO, H. C. G.; MOURÃO, A. F.; MACEDO, E. P.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 45, p.37, 1996.

HIRSH, D. C. *Salmonella*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 10, p. 69-73.

HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 4, p. 961-965, 1988.

HONDA, T.; NI, Y. MIWATANI, T. Purification of a tdh-related hemolysin produced by a Kanagawa phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus* O6:K46. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 57, n.2, p. 241-246, 1989.

HOZBOR, M. C.; SAIZ, A. I.; YEANNES, M. I.; FRITZ, R. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 2, p. 99-104, 2006.

HUSS, H. H.; REILLY, A.; EMBAREK, P. K. B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, Guildford, v. 11, n. 2, p. 149-156, 2000.

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

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: DC, 1997. cap. 10. p.353-375.

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

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the *Aeromonas*: and expanding panorama of species, disease presentation and unanswered questions. **Clinical of Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, n.4, p.332-344, 1998.

JEYASEKARAN, G.; GANESAN, P.; ANANDARAJ, R.; JEYA SHAKILA, R.; SUKUMAR, D. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. **Food Microbiology**, London, v. 23, n.6, p. 526-533, 2006.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. M. Update on the genus *Aeromonas*: despite progress, many questions about this pathogen remain unanswered. **ASM News**, Ann Arbor, v.66, n. 4, p. 218-223, 2000.

KIRKAN, S.; GÖKSOY, E. Ö.; KAYA, O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. B50, p. 339-342, 2003.

KIROV, S. M. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). ***Aeromonas* and *Plesiomonas* species**. Washington D.C.: ASM Press, 1997. p. 265-287.

KUMAR, H. S.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Detection of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 334-338, 2001.

KUMAR, H. S.; PARVATHI, A.; KARUNASAGAR, L. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 21, n. 5, p. 619-623, 2005.

LANDEIRO, C. M. P. A.; ALMEIDA, R. C. C.; NASCIMENTO, A. T. M.; FERREIRA, J. S.; YANO, T.; ALMEIDA, P. F. Hazards and critical points in Brazilian seafood dish preparation. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 513-520, 2007.

LEITÃO, M. F. F.; ARIMA, H. K. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 149-166, 1975.

LIPP, E. K.; ROSE, J. B. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. **Revue Scientifique et Technique del office International des Epizooties**, Paris, v. 16, n. 2, p. 620-640, 1997.

LOURENÇO, L. F. H.; OLIVEIRA, M. L.; PINTO, C. M. C.; PEREIRA, D. X. P. Análises físico-químicas e microbiológicas de carne de caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (linnaeus, 1763), comercializada nos municípios de São Caetano de Odivelas e Belém, PA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 90-95, 2006.

Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore. The Williams e Wikins Co, 1976, 312p.

MAJEED, K. N.; EGAN, A. F.; Mac RAE, I. C.; Production of exotoxins by *Aeromonas* spp at 5°C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, n.3, p.332-337, 1990.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), São Paulo – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br>. Acesso em: 11 jun. 2008.

MATSUMOTO, C.; OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; IWANAGA, M.; GARG, P.; RAMMAMURTHY, T.; WONG, H. C.; DEPAOLA, A.; KIM, Y. B.; ALBERT, M. J.;

NISHIBUCHI, M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidence by arbitrarily primed PCR and tox RS sequence analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 2, p. 578-585, 2000.

MELDRUM, R. J.; SMITH, R. M. M.; ELLIS, P.; GARSIDE, J. Microbiological quality of randomly selected ready-to-eat foods sampled between 2003 and 2005 in Wales, UK. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 397-400, 2006.

MIÑANA-GALBIS, D.; FARFÁN, M.; FUSTÉ, M. C.; LORÉN, J. G. *Aeromonas molluscorum* sp. nov. isolated from bivalve molluscs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 6, p. 2073-2078, 2004.

MIYAMOTO, Y.; KATO, T., OBARA, Y.; AKIYAMA, S.; TAKIZAWA, K.; YAMAL, S. In vitro hemolytic characterist of *Vibrio parahaemolyticus* its close correlation with human pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 100, n. 2, p. 1147-1149, 1969.

MURATORI, M. C. S.; COSTA, A. P. R.; VIANA, C. M.; PODESTA JÚNIOR, R. L. Qualidade sanitária do pescado "in natura". **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.116-117, p.50-54, 2004.

NAIM, R.; YANAGIHARA, T. I.; HONDA, T. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in Rat-1 cells from inside and outside of the cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 237-244, 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NISHIBUCHI, M.; HILL, W. E.; ZON, G.; PAYNE, W. L. KAPER, J. B. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, n. 6, p.1091-1095, 1986.

NISHIBUCHI, M.; KAPER, J. B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 6, p. 2093-2099, 1995.

NORMANNO, G.; PARISI, A.; ADDANTE, N.; QUAGLIA, N. C.; DAMBROSIO, A.; MONTAGNA, C.; CHIOCCO, D. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2; p. 219-222, 2006.

NUNES, A. M. N. Qualidade do pescado é fator primordial para o prestígio do setor. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 6-7, 1994.

OKUDA, J.; ISHIBACHI, M.; HAYASHI, E.; NISHINO, T.; TAKEDA, Y.; MUKHOPADHYAY, A. K.; GARG, S.; BHATTACHARYA, S. K.; NAIR, G. B.; NISHIBUCHI, M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 12, p.3150- 3155, 1997.

OTTAVIANI, D.; SANTARELLI, S.; BACCHIOCCHI, S.; MASINI, L.; GHITTINO, C.; BACCHIOCCHI, I. Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. In mussels from the Adriatic sea. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 50, p. 418-422, 2006.

PALUMBO, S. A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.; THAYER, D. W. Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 1027-1030, 1985.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-

cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 562-566, 2004a.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004b.

PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; NUERBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, C. S.; RODRIGUES, D. P.; VIANA, C. M. Isolamento de **Vibrio** spp. em mexilhões (*Perna perna*) coletados na região de Ponta de Itaipu, Niterói, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 137, p. 94-97, 2007.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 1-10, 1997.

PIDIYAR, V.; KAZNOWSKY, A.; BADRI NARAYAN, N.; PATOLE, N.; SHOUCHE, Y. S. *Aeromonas culicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinguefasciatus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 52, n. 5, p. 1723-1728, 2002.

PIZZOLITTO, N. **Caracteres epidemiológicos de surtos de doenças diarreicas agudas ocorridas em núcleos receptores turísticos do estado de São Paulo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos e Nutrição), São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Disponível em: <www.fcfar.unesp.br/posgraduacao/alimentosenutricao/Dissertação/2007/nadia_pizzolitto-completo.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2008.

PONCE, E.; KHAN, A. A.; CHEING, C. M.; SUMMAGE-WEST, C.; CERNIGLIA, C. E. Prevalence and characterization of *Salmonella* enterica serovar Weltevreden from imported seafood. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 29-35, 2008.

POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluver and Van Niel. In: DRIEG, N.; R. (Ed.). **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. p. 545-548.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (n°46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 7, p. 568-570, 2004.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAVAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 297-299, 2004.

SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

SANTOS, R. M. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo, SP**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), São Paulo – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br>. Acesso em: 11 jun. 2008.

SAS Institute. 2005. User's guide: Statistics. Cary.

SATO, N. H.; USUI, K.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C.; WATANABE, E. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 4, p.301-307, 2005.

SEHGAL, R.; KUMAR, Y.; KUMAR, S. Prevalence and geographical distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in India: 10-year survey. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 4, p. 380-383, 2008.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 12, p.1565-1568, 2007.

SOARES, C. M.; GERMANO, P. M. L. Análise da qualidade microbiológica de *sashimis*, comercializados em *shopping centers* da cidade de São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116/117, p. 88-92, 2004.

SOARES, C. M.; GERMANO, P. M. L. Características microbiológicas e físico-químicas do salmão (*Salmo salar*) utilizado em *sashimis*. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 59-63, 2005.

SOUZA, A. T. S. Certificação da qualidade de pescados. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 11-13, 2003.

SU, Y. C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 549-558, 2007.

TACÃO, M.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M. J.; CORREIA A. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 173-179, 2005.

TAULO, S.; WETLESEN, A.; ABRAHAMSEN, R.; KULULANGA, G.; MIKAKOSYA, R.; GRIMASON, A. Microbiological hazard identification and exposure assessment of food prepared and served in rural households of Lungwena, Malawi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p.111-116, 2008.

THORNLEY, J. P.; SHAW, J. G.; GRYLLOS, I. A. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species: Evidence for pathogenicity. **Reviews in Medical Microbiology**, London, v. 8, n. 2, p. 61-72, 1997.

TÔRRES, R. C. O. *Escherichia coli*. In: VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; BARRETO, N. S. E.; SOUSA, O. V.; TÔRRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V.; SAMPAIO, S. S.; NASCIMENTO, S. M. M. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Varela, 2004. cap. 11, p. 125-139.

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

VALENTE, A. M.; DUARTE, M. C. K. H.; FRANCO, R. M.; MESQUITA, E. F. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P.; FREITAS, M. Q.; JESUS, E. F. O. Enumeração, identificação e sorotipagem de coliformes termotolerantes (*E. coli*) em mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)], submetidos a doses de radiação de 3,5 e 7,0 kGy. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 139, p. 111-116, 2006.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. In: _____ **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London: Mosby Year Book, 1991. p. 101-128.

VERNOCCHI, P.; MAFFEI, M.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GARDINI, F. Characterization of mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic sea (Italy). **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 12, p. 1575-1583, 2007.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E. F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Revista do Instituto Médico tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 179-182, 2004.

WALLACE, B. J.; GUZEWICH, J. J.; CAMBRIDGE, M.; ALTEKRUSE, S.; MORSE, D. L. Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. **American Journal of Preventive Medicine**, New York, v. 17, n. 1, p.48-54, 1999.

YAMADA, S.; MATSUSHITA, S.; DEJSIRILERT, S.; KUDOH, Y. Incidence and clinical symptoms of *Aeromonas* associated traveller's diarrhea in Tokyo. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, n. 2, p. 121-126, 1997.

YUAN, J. M.; ROSS, R. K. R.; GAO, Y. T.; YU, M. C. Fish and shellfish consumption in relation to death from myocardial infarction among men in Shanghai, China. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 154, n. 9, p. 809-816, 2001.