

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE
TILÁPIAS (*Oreochromis* spp.) DE PESQUE-PAGUE DA
MICRORREGIÃO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Thayssa Duarte Costa

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE
TILÁPIAS (*Oreochromis* spp.) DE PESQUE-PAGUE DA
MICRORREGIÃO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Thayssa Duarte Costa

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

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 (Medicina
Veterinária Preventiva)

Costa, Thayssa Duarte
C837q Qualidade microbiológica e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de tilápias (*Oreochromis* spp.) de pesque-pague da microrregião do Estado de São Paulo / Thayssa Duarte Costa. – – Jaboticabal, 2016
viii, 86 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Ana Maria Centola Vidal
Banca examinadora: Andréia Cristina Nakashima Vaz, Karina Paes Bürger
Bibliografia

1. Antibióticos. 2. Coliformes termotolerantes. 3. *Listeria* spp. 4. Peixe. 5. *Salmonella* spp. 6. *Staphylococcus* coagulase positiva. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.3:639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

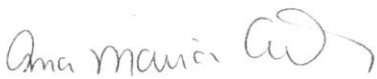
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE TILÁPIAS (*Oreochromis spp.*) DE PESQUE-PAGUE DA MICRORREGIÃO DO ESTADO DE SÃO PAULO

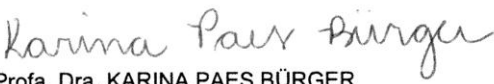
AUTORA: THAYSSA DUARTE COSTA

ORIENTADORA: ANA MARIA CENTOLA VIDAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Profa. Dra. ANDRÉIA CRISTINA NAKASHIMA VAZ
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA/USP - Pirassununga/SP


Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 15 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THAYSSA DUARTE COSTA – nascida em 24 de maio de 1991, na cidade de Pirassununga, Estado de São Paulo, é Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário Anhanguera, Campus de Leme - SP, em 2013. Vencedora dos Concursos Literários realizados pelo 13º Regimento de Cavalaria Mecanizado do Exército Brasileiro nos anos de 2004, 2005 e 2008. Na graduação organizou monitorias e realizou pesquisas científicas nos anos de 2011 e 2012, além disso, participou como bolsista do estágio profissionalizante oferecido pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, em 2013. Durante a pós-graduação, além no projeto de pesquisa proposto, pôde participar de palestras e projetos de pesquisa no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da UNESP/Jaboticabal, com a apresentação de trabalhos em eventos diversos e na organização do I e II Ciclo de palestras de qualidade em produtos de origem animal pela FZEA/USP. Ainda, membro do grupo de pesquisa cadastrado no CNPq, intitulado grupo de estudos em higiene e inspeção de produtos de origem animal, sob coordenação da Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal, FZEA/USP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Cleusa Silva Duarte Costa e Antonio Costa Neto, que sempre respeitaram minhas escolhas com muito carinho e entusiasmos, e pelos sacrifícios feitos para que eu atingisse meus objetivos.

Também dedico a minha adorada irmã, Rayssa Duarte Costa, grande companheira e parceira de todos os momentos. Amo você.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por sempre me apoiarem e incentivarem, vocês moram em meus pensamentos e coração.

A Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal, grande professora e amada orientadora, que me apoiou e me deu a oportunidade de alcançar meus objetivos. Agradeço por toda paciência, dedicação e confiança. Obrigada por compartilhar todo seu conhecimento científico, contribuindo assim na minha formação profissional e pessoal. As críticas construtivas foram essenciais para meu amadurecimento.

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões, pela paciência e compreensão.

A Andreia Nakashima Vaz, muito obrigada pelo constante apoio e atenção. Profissional extremamente competente, sábia e cativante, uma pessoa que tenho o prazer de chamar de amiga.

Aos “escraviários” pela ajuda prestada na execução do experimento, foram vários finais de semana no laboratório e sempre estiveram prontos e gentilmente ao meu lado. Muito obrigada!

As minhas amigas e aos amigos pelas histórias compartilhadas, pelo incentivo e apoio.

A todos os professores que influenciaram minha formação profissional até este momento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os demais professores do Departamento de Medicina Veterinária e Reprodução Animal, que de alguma maneira influenciaram em minha formação profissional.

Por fim a todos que, de alguma forma, contribuíram para a construção deste trabalho

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Produção de pescado no mundo e no Brasil.....	11
2.2 Políticas públicas.....	12
2.3 A difusão dos pesque-pague.....	14
2.4 Produção e consumo da tilápia	17
2.5 Qualidade microbiológica dos peixes	19
2.5.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	22
2.5.2 <i>Salmonella</i> spp.	25
2.5.3 Coliformes.....	27
2.5.4 <i>Listeria</i> spp.	28
2.6 Utilização de antimicrobianos na atividade aquícola.....	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Escolha dos estabelecimentos e colheita das amostras	35
4.2 Análises microbiológicas	39
4.2.1 Contagem da população de <i>Staphylococcus</i> spp.	39
4.2.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	40
4.2.3 Número mais provável de coliformes termotolerantes.....	42
4.2.4 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	44
4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Contagem da população de <i>Staphylococcus</i> spp.	48
5.1.1 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de ECP.	51

5.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	52
5.2.1 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Salmonella</i> spp.	54
5.3 Número mais provável de coliformes termotolerantes	56
5.3.1 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	59
5.4 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	62
5.4.1 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Listeria</i> spp.	63
6 CONCLUSÃO.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	66
8 IMPLICAÇÕES.....	83
ANEXO.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavras/Termos	Abreviatura
Agência Nacional de Vigilância Sanitária	ANVISA
Associação Brasileira dos Criadores de Organismos	
Aquáticos.....	ABRACOA
Boas Práticas	BP
Número Mais Provável	NMP
Conselho de Desenvolvimento da Pesca.....	CODEPE
Conselho Nacional de Segurança Alimentar	CONSEA
Conselho Nacional do Meio Ambiente	CONAMA
Departamento de Água e Energia Elétrica.	DAEE
Departamento Estadual de Proteção aos Recursos Naturais	DEPRN
Departamento Nacional de Obras Contra a Seca	DNOCS
Doenças Transmitidas por Alimentos.....	DTAs
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.....	IBGE
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos	
Renováveis.....	IBAMA
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	MAPA
Ministério da Pesca e Aquicultura	MPA
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e	
Comércio Exterior.....	MDIC
Organização Mundial da Saúde	OMS
Produção da Pecuária Municipal.....	PPM
Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos	PNSAA
Resolução da Diretoria Colegiada.....	RDC
Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca.....	SEAP
Serviço Brasileiro de Apoio à Micro e Pequenas Empresas	SEBRAE
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	ECN
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	ECP
Unidade formadora de colônia	UFC

LISTA DE TABELAS

	Página
01. Bactérias patogênicas amplamente presentes no pescado.....	22
02. Taxa de metabolismo no animal dos principais antimicrobianos usados na aquicultura.....	32
03. Agentes antimicrobianos comumente utilizados em aquicultura e a sua relevância na medicina humana.....	32
04. Antimicrobianos que foram testados de acordo com o micro-organismo isolado.....	47
05. Média dos resultados da contagem da população de <i>Staphylococcus</i> spp. (UFC.g ⁻¹ ou mL ⁻¹) em amostras de filés e peixes inteiros, colhidos em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.....	48
06. Número total e porcentagem (%) de isolados de ECP e ECN em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.....	49
07. Comportamento dos 24 isolados de ECP obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.	51
08. Total de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas nos pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, seguidas das temperaturas (°C) verificadas nos dias das respectivas colheitas, ocorridas durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.....	53
09. Comportamento dos 21 isolados de <i>Salmonella</i> spp. obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.....	55
10. Número mais provável de coliformes termotolerantes (NMP.g ⁻¹ ou mL ⁻¹) em amostras de filés e peixes inteiros,	

	colhidas nos pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, seguidas das temperaturas (°C) verificadas nos dias das respectivas colheitas, ocorridas durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.....	57
11.	Isolamento de <i>E. coli</i> em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.....	59
12.	Comportamento dos 30 isolados de <i>E. coli</i> obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.	60
13.	Isolamento de <i>Listeria</i> spp. em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.....	62
14.	Comportamento dos 13 isolados de <i>Listeria</i> spp. obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados....	63
15.	Temperatura ambiente verificada nos dois estabelecimentos, nos dias das colheitas, ocorridas durante o período de setembro de 2014 a fevereiro de 2015.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
01. Variabilidade de espécies criadas na aquicultura por regiões brasileiras.....	12
02. Progresso da criação das principais espécies na aquicultura brasileira (1996-2004)..	18
03. Mapa da localização de Pirassununga - SP.	35
04. Fotos do pesque-pague Azul (A, B) e pesque-pague Vermelho (C, D).....	36
05. Foto do tanque de tilápias do pesque-pague Azul (A) e evisceração das tilápias para os clientes na mesma propriedade (B).....	37
06. Foto aérea do pesque-pague Vermelho. As setas vermelhas indicam local de pesca ao público, seta amarela é para pesca esportiva e as setas brancas indicam os tanques de criação e quarentena..	38
07. Foto da captura da tilápia por meio do uso de tarrafa (A) e amostras sendo analisadas no laboratório (B).	38
08. Método esquemático para contagem da população de <i>Staphylococcus</i> spp.....	40
09. Método esquemático para pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	42
10. Método esquemático para número mais provável (NMP) de coliformes e <i>Escherichia coli</i>	43
11. Método esquemático para pesquisa de <i>Listeria</i> spp.....	46
12. Gráfico contendo as temperaturas apuradas durante as colheitas das amostras. Pontos azuis representam as temperaturas no pesque-pague Azul, pontos vermelhos representam a temperatura no pesque-pague Vermelho. A linha preta representa a tendência geral dos dados apurados.....	85

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE TILÁPIAS (*Oreochromis* spp.) DE
PESQUE-PAGUE DA MICRORREGIÃO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

RESUMO - A criação racional de peixes desempenha um importante papel na economia brasileira e a existência de áreas de lazer para a população acaba promovendo a pesca como uma atividade esportiva, recreativa ou de caráter cultural para a região. Porém, as negligências sanitárias nos pesque-pague aumenta a possibilidade de veiculação de doenças transmitidas pela ingestão desses peixes. Há ainda a preocupação quanto aos antimicrobianos, pois o uso indiscriminado e/ou errôneo destes favorece a seleção de micro-organismos resistentes. Com base nos fatos mencionados o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e verificar o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de tilápias (*Oreochromis* spp.) oriundas de pesqueiros da microrregião centro-leste do Estado de São Paulo, Brasil. Para tanto, verificou-se o atendimento as exigências microbiológicas da legislação vigente - RDC nº12/ANVISA - para pescado fresco (peixe inteiro e filés), além da enumeração de coliformes termotolerantes e verificação da presença de *Listeria* spp., bem como avaliar a sensibilidade antimicrobiana dos isolados. Foram realizadas nove colheitas, quinzenalmente, em dois pesque-pague (Azul e Vermelho) e após o abate e filetagem no próprio estabelecimento, os 18 peixes inteiros e os 18 filés foram transportados para o laboratório para análises, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015. Os resultados mostraram que, de acordo com a legislação vigente, apenas 11 (30,55%) amostras atendem ao estabelecido, sendo as amostras de filé apenas 4 (22,23%) obtidas do pesque-pague Azul e 3 (16,67%) do Vermelho seriam consideradas próprias para o consumo; já para amostras de peixe inteiro, nenhuma do pesque pague Azul estava apta para o consumo e do pesque-pague Vermelho 4 (22,23%) estariam aptas. O número mais provável de coliformes termotolerantes variou de $<0,3 \times 10^0$ a $1,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ nos filés e $0,9 \times 10^0$ a $>1,1 \times 10^3$ NMP.mL⁻¹ nos peixes inteiros. Foram encontrados nas amostras 13 (36,12%) isolados de *Listeria* spp., sendo 6 (46,15%) dos filés e 7 (53,85%) dos peixes inteiros; e a confirmação da presença de *Listeria monocytogenes* ocorreu em 2 (15,38%) filés e 3 (23,07%) peixes inteiros. Dos cinco antibióticos testados em comum com o grupo de isolados estudados, a ciprofloxacina e a gentamicina se destacaram no controle dos Gram-negativos, enquanto que a ciprofloxacina, o florfenicol e a tetraciclina se destacaram nos Gram-positivos. Os dados levantados servem de alerta às autoridades, visto que houve a presença de micro-organismos cotados pela legislação e presença de patógenos nas amostras, além de resistência a antimicrobianos usados tanto na veterinária quanto na medicina humana, demonstrando necessidade de fiscalização nos locais.

Palavras-chave: Antibióticos, coliformes termotolerante, *Listeria* spp., peixe, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva

**MICROBIOLOGICAL QUALITY AND ANTIMICROBIAL SENSITIVITY
PROFILE OF ISOLATES OF TILAPIAS (*Oreochromis* spp.) OF FISH-PAY
IN THE MICROREGION OF THE STATE OF SÃO PAULO**

ABSTRACT - The creation of fish plays an important role in the Brazilian economy and the existence of recreational areas for the population ends up promoting fishing as a sport activity, recreational or cultural character to the region. However, health oversights in fish-pay increases the possibility of airing of diseases transmitted by ingestion of these fish. On the basis of the facts mentioned, this study aimed to assess the microbiological quality and check the profile of antimicrobial sensitivity of isolated from tilapia (*Oreochromis* spp.) from fishing grounds of east-central microregion of the State of São Paulo in Brazil. For both, it was found the microbiological requirements of care legislation - RDC nº 12 ANVISA - for fresh fish (whole fish and fillets), in addition to the enumeration of coliforms termotolerantes and checking for the presence of *Listeria* spp., as well as assess the antimicrobial sensitivity of isolated. Nine crops were held, biweekly, in two fish-pay (Blue and Red) and after slaughter and filleting at the establishment, the 18 whole fish and fillets 18 were transported to the laboratory for analysis during the period of setembro/2014 since fevereiro/2015. The results showed that, in accordance with the current legislation, only 11 (30.55%) samples meet the established, being the only fillet samples 4 (22.23%) obtained from Blue fish-pay and 3 (16.67%) of Red would be considered fit for consumption; to whole fish samples, none of the net pay was fit for consumption Blue and the Red fish-pay 4 (22.23%) would be suitable. The most probable number of coliform termotolerantes ranged from $<0,3 \times 10^0$ to $1,1 \times 10^3$ MNP.g⁻¹ in fillets and $0,9 \times 10^0$ to $>1,1 \times 10^3$ NMP.mL⁻¹ in the whole fish. Were found in samples 13 (36.12%) isolates of *Listeria* spp., being 6 (46.15%) of fillets and 7 (53.85%) of whole fish; and the confirmation of the presence of *Listeria monocytogenes* occurred in 2 (15.38%) fillets and whole fish 3 (23.07%). Of the five antibiotics tested in common with the group of isolates studied, ciprofloxacin and gentamicin stood out in the control of Gram-negative, while the ciprofloxacin, florfenicol and tetracycline have excelled in Gram-positives. The data collected serve to alert the authorities, since the presence of micro-organisms listed by the law, and the presence of pathogens in samples, in addition to antimicrobial resistance used in veterinary medicine as in human medicine, demonstrating the need for monitoring in places.

Keywords: Antibiotics, fecal coliforms, *Listeria* spp., fish, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positive

1 INTRODUÇÃO

O consumidor já constatou que o pescado destaca-se no quesito nutricional em comparação a outros alimentos de origem animal. Com isso, a procura por este tipo de alimento, como alternativa ou em substituição a outras fontes de proteínas, aumentou consideravelmente nos últimos anos, alavancando a produção aquícola e gerando volumes significativos de renda no setor.

O Brasil possui condições hidrográficas e climáticas favoráveis para o desenvolvimento das atividades aquícolas, principalmente as relacionadas à piscicultura. E no Estado de São Paulo tem-se observado um aumento no número de propriedades que se dedicam a essa atividade. Destacam-se os polos de produção comercial e as áreas de lazer, pesque-pague, para a população em geral. Estas promovem a atividade pesqueira como uma atividade esportiva, recreativa ou de caráter cultural para a população da região. Como exemplo disso há, nas cidades interioranas, a difusão dos pesque-pague que atraem um público variado, incluindo turistas de outras nacionalidades, que proporcionam o entretenimento e alimento para a comunidade.

Segundo dados de associações nacionais voltadas à piscicultura são apontados que no Estado de São Paulo existem mais de 1.500 pesque-pague, e os mesmos indicam que pelo menos 95% da produção nacional de peixes em cativeiro já está sendo destinada a esses estabelecimentos. O problema é a ausência do controle higiênico-sanitário e fiscalização destes produtos de origem animal, havendo a possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos à população.

Por ser um alimento altamente perecível e por viver num ambiente diferenciado, o peixe exige muitos cuidados em relação ao manuseio, desde a captura até o consumo. Quando o peixe é despescado, ou seja, retirado do seu habitat, até chegar à mesa do consumidor, diversos fatores podem vir a afetar a qualidade do alimento. Portanto é essencial que um médico veterinário

garanta tanto a qualidade zootécnica dos peixes como a segurança alimentar dos produtos originários da produção.

É necessário destacar a problemática quanto aos antimicrobianos, pois o uso indiscriminado e errôneo de antibióticos na produção tem favorecido a seleção de micro-organismos cada vez mais resistentes, tendo assim na literatura relatos de “superbactérias”, além da constatação na dificuldade do tratamento médico.

Com base nos fatos mencionados, o presente estudo verificou o atendimento as exigências microbiológicas da legislação vigente para pescado fresco (filé e tilápias inteiras) em pesque-pague situados na microrregião centro-leste interiorana do Estado de São Paulo, bem como realizou a enumeração de coliformes termotolerantes e verificou a presença de *Listeria* spp., além de realizar o teste de suscetibilidade a antimicrobianos dos micro-organismos isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de pescado no mundo e no Brasil

O pescado é considerado uma das proteínas de origem animal mais consumidas no mundo. O cultivo e produção desses animais se deram, principalmente, devido à demanda alimentar gerada com o aumento populacional das últimas décadas. Assim, diferentes espécies de peixes foram inseridas em todo mundo para a criação de novas áreas pesqueiras, visando o aumento dos rendimentos comerciais e instituição da aquicultura (GOZLAN et al., 2010).

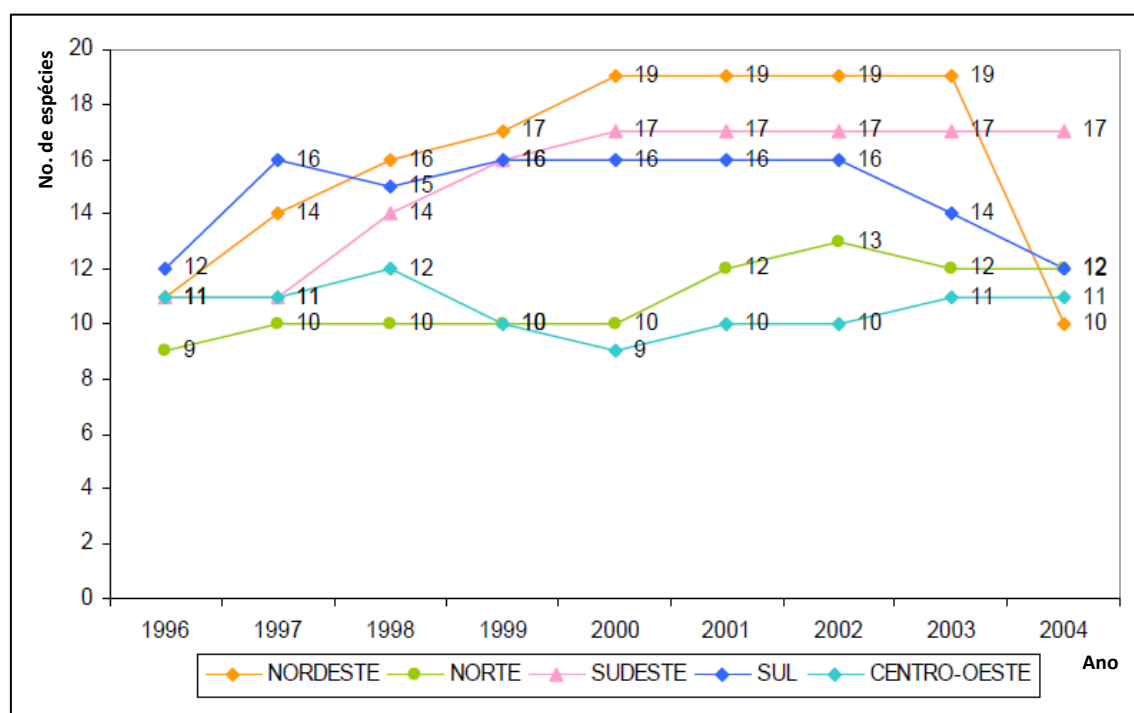
A China, maior mercado consumidor e importador de pescado, em 2009 foi o país com a maior produção do mundo no setor (com cerca de 60,5 milhões de toneladas), seguida pela Indonésia (com 9,8 milhões), Índia (7,9 milhões) e Peru (aproximadamente 7 milhões de toneladas). O Brasil no mesmo ano produziu pouco mais de 1 milhão de toneladas, o que, comparado com a produção mundial, representou 0,86%. Devido a este aumento da produção pesqueira, o país passou então a ocupar o 18º lugar entre os maiores produtores mundiais de pescado (BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010).

Comparando a outros países da América do Sul, no quesito produção pesqueira, tem-se o seguinte quadro: Peru com uma produção em torno de 7 milhões de toneladas, Chile com 4,7 milhões, Brasil e Argentina com cerca de 862 mil toneladas de pescado (BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010).

Para o Ministério da Pesca e Aquicultura, até o ano de 2030 a demanda internacional de pescado aumentará em mais de 100 milhões de toneladas. A produção mundial em 2010 foi de 126 milhões de toneladas e o Brasil é um dos poucos países que possui condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo advinda da pesca (BRASIL, 2012).

O Brasil possui um enorme potencial para desenvolver o setor produtivo do pescado, principalmente na produção de peixes, tanto em virtude de suas características geográficas - já que há vasta extensão de costa marítima e a maior reserva de água doce do mundo - quanto por considerar o setor promissor economicamente para o país, visto que desde 2009 iniciou-se forte política de incentivo de desenvolvimento tecnológico e produtivo do setor, através de ações do Ministério da Pesca e Aquicultura (LEVENHAGEN, 2014).

O Estado de São Paulo contribui com mais de 45% da produção de peixes de água doce do Brasil (CASTAGNOLLI, 1995). A região citada também conta com a maior variabilidade de espécies criadas na aquicultura por regiões brasileiras, como mostrado na Figura 1.



FONTE: IBAMA, 2007 (dados trabalhados).

Figura 1. Variabilidade de espécies criadas na aquicultura por regiões brasileiras.

2.2 Políticas públicas

Com a criação do CODEPE – Conselho de Desenvolvimento da Pesca, no ano de 1961, iniciou então um real suporte direcionado ao desenvolvimento

da pesca, com isenções fiscais para estímulo da criação de novas indústrias, construção de novos barcos pesqueiros, bem como para o desenvolvimento das indústrias já existentes e com isso houve um estímulo por parte dos produtores e dos acadêmicos aos estudos sobre a distribuição, comercialização e consumo do pescado (BRASIL, 2012; LEVENHAGEN, 2014).

Devido às pressões por parte dos pescadores e aquicultores brasileiros, no dia 1º de Janeiro de 2003 o Governo Federal editou a Medida Provisória nº 103, representada pela lei 10.683, instaurando assim a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP). O objetivo primordial da secretaria em questão era assessorar direta e prontamente o Presidente da República no que dizia respeito à produção aquícola e pesqueira do país (BRASIL, 2012).

Seis anos depois, no dia 29 de Junho de 2009 (exatamente no dia do Pescador), o Presidente Luiz Inácio Lula da Silva aprovou a Lei nº 11.958, nomeando o Ministério da Pesca e Aquicultura do Brasil (MPA), que é responsável pela implantação de uma política nacional pesqueira e aquícola, transformando esta atividade econômica em uma fonte sustentável de trabalho, renda e riqueza (BRASIL, 2012). Observando a importância do tema, diversos governos estaduais passaram a dar mais importância ao assunto e criaram secretarias de pesca e aquicultura (BNDES, 2014).

No Brasil, poucos são os estudos sobre qualidade da água na aquicultura, se comparados àqueles em ambientes aquáticos naturais e em reservatórios. Sabe-se que a atividade de piscicultura gera processos de intensa eutrofização (enriquecimento da água através da carga excessiva de nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo), que promovem crescimento descontrolado de algas na água do próprio viveiro e, conseqüentemente, seu efluente também estará carregado de grande quantidade de algas (BRASIL, 2005a; PAL; DASGUPTA, 1992). Com isso, foi criada a Resolução nº357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), de março de 2005, que estabelece parâmetros para as principais características físicas, químicas e biológicas da água.

É importante que a produção desses animais seja feita de forma correta do ponto de vista sanitário, pois peixes criados ou capturados em ambientes poluídos, que contenham dejetos e fezes, podem albergar não só micro-organismos patogênicos (GUZMÁN et al., 2004), mas também podem estar contaminados por substâncias químicas, como os piretróides, organofosforados, avermectinas, inibidores da quitina, dioxina, metais pesados, como o mercúrio e o cobre, e uma gama de antibióticos (BURRIDGE et al., 2010; COLE et al., 2009).

Como são muitos os possíveis impactos decorrentes da aquicultura na saúde pública e no meio ambiente, é necessária maior atenção dos órgãos responsáveis pelo controle e fiscalização dessa cadeia produtiva, por isso o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da portaria nº 573 de junho de 2003 criou o Programa Nacional de Sanidade dos Animais Aquáticos (BRASIL, 2003).

O Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA) foi instituído pelo MAPA, regulamentando, assim, a produção de animais aquáticos no país. No entanto, o Regulamento Técnico do PNSAA foi aprovado pela Instrução Normativa Nº 53, de 2 de julho de 2003, padronizando as ações profiláticas, métodos de diagnósticos e o saneamento dos estabelecimentos de aquicultura (BRASIL, 2003). A PNSAA também estabelece que os estabelecimentos cadastrados estarão sujeitos a fiscalização do serviço veterinário oficial, tendo a suspensão da autorização de comercialização, importação/exportação, caso o estabelecimento não esteja cumprindo as exigências do regulamento (BRASIL, 2003).

2.3 A difusão dos pesque-pague

Sobre a legislação vigente, cita-se a Portaria 136/98 do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) que estabelece normas para o registro de aquicultor e para os estabelecimentos (pesque-pague). Segundo a mesma, tem-se por definição aquicultor sendo a pessoa física ou jurídica que se dedique ao cultivo ou a criação de organismos

com ciclo de vida estritamente em meio aquático. Já pesque-pague é descrito como sendo a pessoa física ou jurídica, que mantém o local constituído de tanques ou viveiros com peixes para exploração comercial da pesca amadora (IBAMA, 1998).

O Instituto ainda ressalta que para obter a legalidade do pesqueiro o proprietário deve preencher um formulário anexando a planta do projeto, documentar a compra de peixes dos fornecedores e disponibilizá-los ao IBAMA. No Estado de São Paulo, o DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica) que autoriza o uso de água para o pesqueiro e o DEPRN (Departamento Estadual de Proteção aos Recursos Naturais), são os outros dois órgãos que completam a documentação legal para o funcionamento (IBAMA, 1998).

Além dos recursos naturais, outro ponto importante é a mão de obra. Segundo dados oficiais da SEAP, o setor produtivo envolve mais de 150.000 pessoas, direta ou indiretamente. A questão da mão de obra é ainda crucial para pequenas cidades e comunidades, na qual a melhoria de renda, por meio da maior inserção das pessoas neste segmento econômico, proporcionaria melhores desenvolvimentos em pontos como educação e urbanismo (ROCHA; SILVA; FREITAS, 2012).

O surgimento e expansão dos pesque-pague no Estado de São Paulo ocorreram paralelamente ao crescente desenvolvimento da piscicultura no Brasil, por volta dos anos 90, trazendo uma nova oportunidade de negócio e também lazer. Além disso, estimam-se que existam mais de 1000 pesque-pague no Estado, sendo apenas 750 destes estabelecimentos devidamente registrados de forma legal, que contribuem na produção de peixes de água doce no Brasil (VENTURIERI, 2002; DOWBOR; SACHS; LOPES, 2010; OLIVEIRA; FUKUSHIMA, 1998).

De acordo literatura, a pesca é apontada como sendo o esporte com o segundo maior número de praticantes no Brasil e já foi constatado que no Brasil existem 30 milhões de pescadores amadores, que tem como hábito praticar a atividade semanalmente (DOWBOR; SACHS; LOPES, 2010; OLIVEIRA; FUKUSHIMA, 1998). Vale destacar que na região Sudeste esses

estabelecimentos são importantes canais de comercialização de peixes produzidos em cativeiro, armazenados em viveiros espécies consideradas esportivas, nativas e exóticas, sendo a pesca o principal atrativo (PEZZATO; SCORVO-FILHO, 2002).

Sabe-se que a pesca trouxe o desenvolvimento de um negócio diversificado (pesque-pague, pague-pesque e pesque-solte) e trata-se de um mercado promissor, pois configura um misto de lazer e comercialização de peixes e materiais. Alguns locais chegam a comercializar materiais para pesca, contando com setores de suporte e suprimentos já bem organizados. Existem ainda, três programas de televisão em rede nacional, nove revistas e dois programas de rádio onde a pesca é assunto principal. Tal panorama faz com que a pesca esportiva no país movimente cerca de US\$ 350 milhões por ano (JIMENEZ, 1998; OLIVEIRA; FUKUSHIMA, 1998).

Também foi notado que os proprietários de pesqueiros da região de São Paulo admitem que as maiores oportunidades de melhorias no estabelecimento estão diretamente relacionadas com a ambientação familiar, ou seja, se o pesqueiro conciliar a atividade de pesca com a opção de levar toda a família os negócios acabam gerando mais lucro e sendo amplamente divulgados. Assim, começam a surgir pesqueiros equipados com chalés, quadras de esportes, sofisticados playground, área de camping, trilhas para *cooper*, quiosques e lanchonetes. Para atender melhor ao público há ainda os pesqueiros do estilo 24 Horas, para clientes que preferem pescar de madrugada, peixes de hábitos noturnos (OLIVEIRA; FUKUSHIMA, 1998).

Além de ser uma atividade que propicia novas fontes de renda e de trabalho, a combinação entre aquicultura e outras práticas agrícolas são vistas como sendo positivas (ELER et al., 2006).

Em virtude disso, estudos são importantes para conhecimento dos padrões de qualidade microbiológica nesses estabelecimentos, uma vez que estes determinam o sucesso do empreendimento. É preocupante nos pesque-pague a crescente urbanização e industrialização local, como também a presença de residências (do proprietário ou então de alojamentos) próximas aos tanques, que levam ao aumento do volume de dejetos lançados no curso

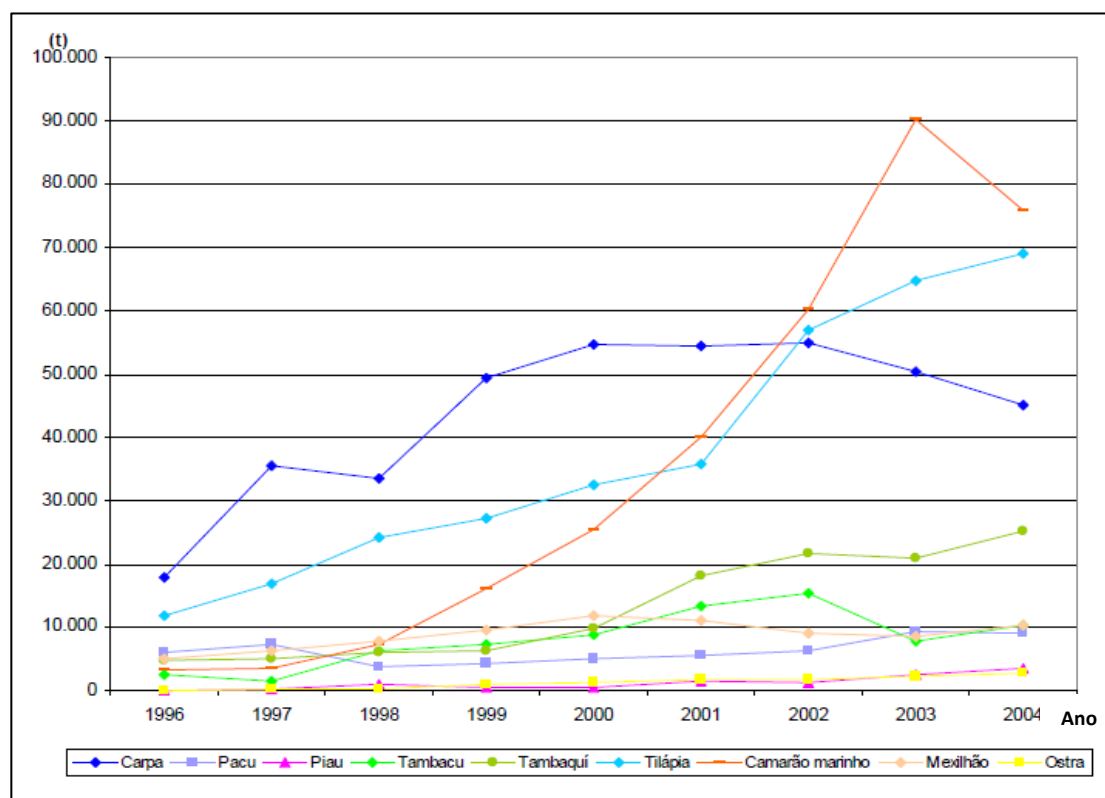
d'água, muitas vezes sem tratamento adequado, resultando na elevação do teor de cargas orgânicas e proliferação de micro-organismos, por vezes, prejudiciais à micro e macrobiota do meio e, conseqüentemente, dos peixes (BASTOS et al., 2006).

É necessário aos profissionais na área traçar estratégias para minimizar tais impactos na aquicultura, exemplo disso: manipular dietas, recomendar a implantação de biofiltros para retenção dos nutrientes, monitorar a qualidade do local (o que inclui a água, o controle populacional de peixes, animais externos – patos, galinhas, garças, tartarugas, sapos), adotar tecnologias adequadas para cada local específico, remover sólidos, entre outros (PIEDRAHITA, 2003).

A avaliação e o controle sanitário dos animais utilizados nos pesque-pague são vitais para o sucesso do empreendimento, visto que os locais podem aumentar a rentabilidade a médio e longo prazo, além de fornecer subsídios seguros para cultivo das mais variadas espécies, não comprometendo a saúde dos clientes (pescadores e família) e consumidores (CABIANCA, 2005).

2.4 Produção e consumo da tilápia

O valor da produção da aquicultura foi de R\$ 3,055 bilhões em 2013, sendo que a criação de peixes representou 66,1% do total, seguida pela carcinicultura (cultivo de camarão), com 25%. A espécie que ganhou maior destaque foi a tilápia, como mostra a Figura 2, em anos anteriores, revelando sua importância na produção e consumo brasileiro.



FONTE: IBAMA, 2007 (dados trabalhados).

Figura 2. Progresso da criação das principais espécies na aquicultura brasileira (1996-2004).

Dentre as espécies de peixes de água doce mais produzido no Estado de São Paulo estão as tilápias, pertencentes da família Cichlidae, que teve origem na África e hoje são amplamente encontradas no mundo (SEYOUUM; KORNFIELD, 1992; DEY; GUPTA, 2000).

As tilápias de maior importância estão divididas em três principais gêneros: *Tilapia*, *Oreochromis* e *Sarotherdon* (POPMA; LOVSHIN, 1995; KUBTIZA, 2000). A espécie de maior destaque é a *Oreochromis niloticus* por apresentar várias qualidades zootécnicas (FITZSIMMONS, 2000).

As pesquisas para a criação desta espécie tiveram início no Congo Belga (atual Zaire), por volta do começo do século XIX. A partir de 1924, a criação foi intensificada no Quênia e a expansão para outras partes do mundo ocorreu a partir da Malásia (CAMPO, 2008). No Brasil, foi introduzida em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (CASTAGNOLLI,

1996). Sabe-se que, nacionalmente, o crescimento da produção aquícola entre os anos de 2008 e 2010 foi cerca de 40%, quando a produção passou de 282.008 para 394.340 toneladas, sendo a tilápia a espécie mais cultivada, representando aproximadamente 40% da produção nacional (IBAMA, 2007).

2.5 Qualidade microbiológica dos peixes

O conceito “qualidade de alimentos” na visão do consumidor muitas vezes está associado à satisfação do consumidor com relação aos aspectos visuais, sensoriais e financeiros do produto. O fato é que a segurança alimentar está intrinsecamente relacionada aos programas de autocontrole, como as Boas Práticas (BP), com especial atenção a qualificação dos manipuladores, que atuam diretamente na produção (CAVALLI, 2001; CAVALLI; SALAY, 2004). A equipe é a principal preocupação em todas as etapas envolvendo o processo de produção de alimentos. É através deles que pode advir a disseminação de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos, carregados por funcionários com maus hábitos higiênicos ou até mesmo injuriados por alguma doença assintomática/desconhecida (BENEVIDES; LOVATTI, 2004; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005).

Para os manipuladores e demais funcionários que circulam no ambiente onde estão sendo processados os alimentos, destacam-se o aprendizado e a implantação da correta higienização das mãos, antes de qualquer procedimento, aliada também à higienização e/ou desinfecção adequadas de seus instrumentos de trabalho, como os utensílios e equipamentos (MIRANDA; DAMASCENO; CARDONHA, 2002; ALCÂNTARA; GERMANO; GERMANO, 2003). A manipulação imprópria e a carência de procedimentos operacionais adequados, como a não sanitização dos equipamentos utilizados na produção, levam a uma multiplicação microbiana, comprometendo a qualidade e segurança dos alimentos (MAISTRO, 2001).

É direito de todo cidadão ter acesso aos alimentos básicos necessários à vida, com quantidade e qualidade, sendo assim para Spers e Kassof (1996), entende-se por segurança alimentar a aquisição, pelo consumidor, de alimentos de boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química

(pesticidas), biológica (micro-organismos patogênicos), física (vidros, pedras ou outros materiais estranhos ao produto), ou quaisquer outras substâncias que acarretem dano à saúde.

A definição de doença transmitidas por alimentos (DTAs) nada mais é que a generalização de sintomas clínicos, geralmente constituídos pelos sinais clínicos contendo: anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre (PINTO,1996). Sintomas oriundos de problemas digestivos não são as únicas manifestações dessas doenças, podendo também apresentar afecções extraintestinais em diferentes órgãos e sistemas, como: inflamação nas meninges, rins, fígado, sistema nervoso central e outros, logicamente de acordo com o agente envolvido. Analisando sob o aspecto etiológico, podem ser causadas por diversos fatores e dentre eles estão: toxinas, bactérias, vírus, parasitas e substâncias tóxicas (BRASIL, 2005b).

Para se uniformizar o conceito a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu as DTAs como sendo aquelas patologias de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que são introduzidos no organismo por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados (WHO, 2010).

Existem basicamente três maneiras dos micro-organismos provocarem doença ao consumidor: através de intoxicação, quando há ingestão da toxina previamente formada pelo micro-organismo; por infecção, que é a ingestão do micro-organismo no alimento e, por fim, a toxinfecção alimentar, que é a ingestão de alimento com micro-organismos patogênicos, que produzirá toxinas no intestino (exemplo: *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* – diarréica) (VIEIRA, 2004). Além disso, já é sabido que a causa de muitos dos recentes problemas de segurança do alimento está no setor de produção primária, embora os problemas manifestem-se a fase final da cadeia produtiva.

A ocorrência de DTAs aumentou a nível mundial e existem vários relatos de que a causa esta intrinsecamente relacionada ao crescente aumento das populações; o fato de determinadas populações estarem vulneráveis ou mais expostos; o desenfreado processo de urbanização e a necessidade de produção de alimentos a níveis nunca antes vistos (BRASIL, 2010).

Ainda hoje o perfil epidemiológico das DTAs é pouco notório, somente alguns poucos Estados e/ou municípios brasileiros dispõem de estatísticas sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (BRASIL, 2010). Para agravamento do quadro há um deficiente controle dos órgãos públicos e privados quanto à qualidade dos alimentos ofertados no comércio (BRASIL, 2010).

É primordial destacar a segurança dos alimentos no setor produtivo, já que anualmente cerca de 7 milhões de pessoas são afetadas por DTAs, tornando a fiscalização na cadeia produtiva e a pesquisa científica essencial no mundo inteiro (REGATTIERI; GAMBIERI; MANZINI, 2007).

Considerado um alimento altamente perecível, o pescado exige cuidados em demasia quanto ao seu manuseio, tanto durante o processo de captura quanto o período da estocagem nas urnas isotérmicas ou câmaras frigoríficas dos barcos pesqueiros (VIEIRA, 2004). Quando o peixe é capturado e/ou colhido, até ser consumido, a qualidade final do produto em questão será o resultado de todos os fatores que o afetaram anteriormente (SANTOS; RAJADURAI, 1992).

É relevante destacar a existência de estabelecimentos voltados para a atividade pesqueira que não têm o aporte tecnológico adequado e apresentam ausência de técnicos/consultores/especialista na área, ocasionando diversos problemas notadamente ambientais e até mesmo de saúde pública (ALENCAR et al., 2011). De acordo com a FAO (2011), na Tabela 1 estão apresentadas as principais bactérias patogênicas relatadas no pescado.

Tabela 1. Bactérias patogênicas amplamente presentes no pescado.

BACTÉRIAS		MODO DE ATUAÇÃO		ESTABILIDADE DE TÉRMICA DA TOXINA	DOSE INFECTANTE MÍNIMA
		Infecção	Toxina pré-formada		
Bactérias indígenas (Grupo 1)	<i>Clostridium botulinum</i>	-	+	Baixa	-
	<i>Vibrio</i> sp.	+	-	-	Alta
	<i>V. cholerae</i>	-	-	-	-
	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	(>10 ⁶ /g)
	outros vibrios *	-	-	-	-
	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	+	-	-	Não conhecida
	<i>Plesiomonas Shigelloides</i>	+	-	-	Não conhecida
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	-	Não Conhecida/ Variável
Bactérias não indígenas (Grupo 2)	<i>Salmonella</i> spp.	+	-	-	Desde <10 ² até >10 ⁶
	<i>Shigella</i>	+	-	-	10 ¹ -10 ²
	<i>E. coli</i>	+	-	-	10 ¹ -10 ³ **
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	Alta	-

* Outros vibrios são: *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. furnsii*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*.

** Para a estirpe 0157:H7 produtora de verotoxina.

Fonte: FAO, 2013.

No Brasil, segundo a RDC nº 12 da ANVISA, consta entre os micro-organismos a serem pesquisados nos peixes comercializados *in natura*, resfriados ou congelados: *Staphylococcus* coagulase positiva (10³ UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹) e ausência de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2001), não sendo necessária a determinação de micro-organismos como os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Listeria* spp., entre outros. Tal fato é preocupante, visto que há presença de algumas bactérias patogênicas advindas do pescado que são consideradas notoriamente emergentes e não constam na legislação brasileira. As mais relatadas cientificamente são: *Aeromonas* spp., *Listeria* spp., *Vibrio vulnificus* e *V. cholerae*, todas patogênicas (VIEIRA, 2004).

2.5.1 *Staphylococcus* spp.

São bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae*, caracterizados por possuírem células esféricas, Gram-positivos que podem ser encontrados isolados, aos pares e em grupamentos por vezes irregulares. São imóveis e

não esporulados, anaeróbios facultativos com metabolismo fermentativo e respiratório. Importante ressaltar que a temperatura ótima de crescimento é de 30 – 37°C e estão agregadas à pele/membranas mucosas de animais vertebrados homeotérmicos, podendo ser isolados de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para o ser humano e animais, uma vez que produzem toxinas extracelulares, dentre elas: *Staphylococcus intermedius*, *S. hyicus*, *S. chleiferi subsp. coagulans*, *S. delphhini* (HOLT et al., 1994).

Dentre as espécies que compõem o gênero, as coagulase positivas (ECP) são apontadas como patogênicas aos seres humanos. Nesta categoria enquadram-se *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. aureus*. Esta última espécie tem sido implicada, com frequência, como agente causal em surtos de doenças estafilocócicas. Adicionalmente, a sua detecção em certos níveis é utilizada pela indústria de alimentos como bioindicadora da qualidade sanitária de um produto (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais relatados em pesquisas voltadas a micro-organismos alimentares, em parte por ser responsável por surtos de intoxicação. Seu habitat é extenso tornando a sua presença amplamente distribuída na natureza. É comum ser isolado na superfície da pele e mucosa do ser humano, sendo que sob condições apropriadas podem ser causa de infecções oportunistas (CASTRO; IARIA, 1984).

A intoxicação alimentar provocada por este agente é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento. A enterotoxina estafilocócica é distinta por ser termoestável e permanece presente no alimento mesmo após o cozimento, permitindo desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Já foi levantado que é o agente responsável por cerca de 45% das toxinfecções no mundo, representando um sério risco a saúde pública (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; MURATORI et al., 2004).

O *S. aureus* é rotineiramente isolado em pescado, indicando inadequado manuseio pelo ser humano (ALOR, 1994). Tal fato, é afirmado pela presença

do gênero já ter sido diretamente relacionado com a higiene pessoal dos manipuladores e dos utensílios utilizados por estes (VIEIRA, 2004).

Em relação aos estafilococos coagulase negativa (ECN) em alimentos pode-se concluir que pouco se sabe sobre sua patogenicidade, já que por produzirem muito pouca enterotoxina, raramente foram implicadas em DTAs. Apesar disso, estafilococos coagulase negativa podem contaminar o alimento uma vez que os seres humanos são portadores desses micro-organismos e alguns destes podem estar relacionados a determinadas infecções humanas (PEREIRA; PEREIRA, 2005; CUNHA et al., 2006). As espécies coagulase negativa podem produzir quantidades menores de enterotoxinas quando comparados com *S. aureus* (ECP), mas não devem ser excluídos quando presentes em alimentos envolvidos em surtos de intoxicações alimentares (PEREIRA; PEREIRA, 2005; SANTANA et al., 2006).

De modo geral, a intoxicação estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, e por curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento responsável (PASSOS; KUAYE, 1996). As boas condições sanitárias e o controle de temperatura são necessários para evitar a contaminação, a proliferação e a produção de toxinas particularmente em peixes pré-cozidos (GERMANO; OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Outro ponto a ser relatado sobre o gênero nos peixes é que pode ser encontrado nas superfícies de trabalho dos manipuladores, já que nos pontos de comercialização há utilização de panos de limpeza confeccionados em algodão, lavados e secos nas próprias áreas de comercialização. Embora sejam reconhecidas fontes de contaminação cruzada, os panos de limpeza são extensivamente utilizados nos serviços de alimentação. Bartz (2008) detectou neste tipo de material a presença de *S. aureus*, uma das mais importantes espécies de ECP, de até $2,8 \times 10^6$ UFC/cm². Em experimento de dispersão bacteriana, o mesmo autor determinou que panos de limpeza experimentalmente contaminados com cargas microbianas correspondentes a 10^4 UFC/cm², podem transferir aproximadamente 10^2 UFC/cm² de bactérias para superfícies de aço inox, contaminando assim o peixe.

Também foram observadas inadequações higiênicas e sanitárias nos pontos de comercialização como: acesso livre de insetos e poeiras/terra aos filés durante o seu preparo, acúmulo de restos de peixes (escamas, sangue, tecidos) na área de trabalho, uso de madeira no revestimento das superfícies onde o processamento de limpeza e filetagem ocorria, podendo este ser mais um fator para multiplicação do micro-organismo. Tais fatores também foram relatados por Rocha et al. (2013) em sua pesquisa por detecção de ECP em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados na região do Rio Grande do Norte.

2.5.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* inclui diversas espécies, sendo subdividida em subespécies e sorotipos. Este gênero pertence à família *Enterobacteriaceae* e as principais fontes de infecção são fezes humanas e de animais (TESSARI et al., 2003).

A *Salmonella* é um micro-organismo largamente difundido no ambiente, sendo o homem e animais seus principais reservatórios naturais. Os principais fatores que levaram ao aumento da salmonelose, doença causada pelo patógeno, veiculada por alimentos são: os inadequados procedimentos de armazenamento, o costume do consumo de produtos crus ou insuficientemente aquecidos, aumento do comércio tanto nacional quanto internacional e a diminuição de resistência às infecções (BARROS; PAVIA; PANETTA, 2002).

Possui ampla distribuição na natureza, sendo o principal reservatório destas bactérias o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos e pecilotérmicos, exceto peixes, moluscos e crustáceos, os quais são contaminados – após a captura e durante a manipulação. A penetração no organismo humano ou animal ocorre mediante o consumo de alimento ou água contaminada, podendo persistir de 4 a 7 dias, os sintomas que caracterizam as salmoneloses de origem alimentar são: náuseas, vômito, febre, cólicas, cefaléia e diarreia (PINTO, 2001; TESSARI et al., 2003).

Na produção mundial de peixes e moluscos é comum o cultivo em tanques escavados na terra ou em reservatórios de água desprotegidos. Estes ficam expostos à contaminação ambiental, como esgotos urbanos e fezes de animais que são reservatórios naturais da *Salmonella* spp. Até pela introdução de alimentos e rações contaminadas, aliadas ao clima quente frequentemente associado à aquicultura, potencializando a proliferação da bactéria neste micro ambiente (PIEDRAHITA, 1990). Devido a sua prevalência em todos os ambientes de agricultura, é um importante patógeno aquático causador de zoonoses a ser estudado (D'AOUST, 1994).

O homem pode ser infectado por diferentes sorotipos de *Salmonella* spp., mas segundo relatos, nos EUA os sorotipos mais comumente isolados dos surtos de salmonelose humana são: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Newport* (EKPEREGIN; NAGAJARA, 1998). Embora na maior parte dos surtos a dose infectante tenha sido alta, sabe-se hoje que, em alguns casos, foram necessárias poucas células infectantes de *Salmonella* spp. para causar sintomas clínicos no homem. Sabe-se ainda que são necessárias menos que 10^1 UFC para causar infecção (KAPPERUD et al., 1990).

Os grupos predispostos para salmonelose incluem crianças, idosos, indivíduos mal nutridos, debilitados, transplantados, pacientes tratados com antibióticos por longo período e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (1994), a salmonelose atinge de um a cinco milhões de pessoas por ano, com 20.000 internações e 500 óbitos anuais. As perdas econômicas decorrentes desta enfermidade podem ser estimadas em cerca de US\$ 1,4 bilhões anuais (SILVA, 1995).

Ao analisar o ciclo de transmissão da *Salmonella* spp. ao homem, pode-se observar que os alimentos de origem animal têm papel muito importante. A contaminação desses alimentos pode ocorrer na própria fonte de produção, isto é, a partir dos animais criados nas granjas ou fazendas que podem ser os portadores do agente ou ainda ocorrer através da chamada contaminação cruzada, que se refere àquela ocorrida nas diversas fases do processamento industrial, na distribuição, comercialização e consumo final (BAIRD; PARKER,

1990). Em outro estudo realizado em um sistema de consórcio suíno-piscicultura da região metropolitana de Belo Horizonte - MG, foi isolada *Salmonella* spp., do sistema de drenagem do viveiro e foi observado que nesta propriedade havia a presença de aves e suas fezes nos sacos das rações de peixes (MURATORI, 2000).

Outro fator importante sobre a disseminação do agente ao redor do mundo é, devido ao fato do homem e dos animais de sangue quente, terem o trato intestinal como o principal reservatório das salmonelas. Sua presença indica que os despejos de efluentes sanitários sem tratamento estão nos corpos aquáticos, situação comumente encontrada no país (VIEIRA et al. 2004).

2.5.3 Coliformes

O grupo de coliformes totais inclui bactérias na forma de bacilos Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas e à temperatura de 35°C. O grupo de coliformes termotolerantes correspondem às bactérias pertencentes aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando a lactose com produção de gás, sob temperatura de 44 a 45°C. Nestas condições 90% dos coliformes termotolerantes encontrados são *Escherichia coli* (SILVA et al., 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Vale ressaltar que alguns micro-organismos que podem contaminar o pescado são patogênicos, enquanto outros não causam enfermidades nos seres humanos, mas são indicadores de condições higiênicas inadequadas, sendo sua presença sugestiva da existência de micro-organismos patogênicos. É importante destacar que o índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, enquanto que índices de coliformes termotolerantes é usado para avaliar a qualidade higiênico-sanitária, além disso, são geralmente usados também como indicadores de deficiência de saneamento (VIEIRA; OLIVEIRA, 2001). Apesar de alguns trabalhos relatarem a presença de coliformes no trato intestinal de peixes, estes não são considerados habitantes

naturais da sua microbiota intestinal, permitindo, assim, correlação com as condições microbiológicas da água onde o peixe se encontra (BASTI et al., 2006).

Segundo Agnese et al. (2001), a *E. coli* (principal bactéria do grupo) por não fazer parte da microbiota normal do pescado, pode estar associada à contaminação fecal do local onde esse pescado foi capturado, ao transporte e manuseio, incluindo vasilhame ou gelo utilizado que tenham entrado em contato com o pescado fresco. A *E. coli* é o micro-organismo aeróbio mais frequente no trato digestivo do homem e dos animais de sangue quente. Em geral, as estirpes que colonizam o trato gastrointestinal são comensais inofensivas ou desempenham um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal (HUSS, 1997).

O patógeno em questão pode ser isolado de ambientes poluídos por matéria fecal ou esgotos e também pode se multiplicar e sobreviver durante um longo período neste ambiente. No entanto, foi demonstrado, recentemente, que a *E. coli* pode ser igualmente encontrada em águas tropicais quentes não poluídas, onde pode sobreviver indefinidamente (HUSS, 1997).

A RDC nº12, da ANVISA (BRASIL, 2001) não estabelece padrão microbiológico para coliformes termotolerantes em peixes comercializados *in natura*, resfriado ou congelado. Tal fato, se torna alarmante, visto que a determinação da presença desses micro-organismos indica os padrões de higiene do pescado comercializados em estabelecimentos duvidosos ou que não possuem auditoria, além de indicar as condições de toda a cadeia produtiva em relação à contaminação microbiológica, segundo os dados relatados anteriormente.

2.5.4 *Listeria* spp.

As bactérias do gênero são classificadas como bastonetes Gram positivos, não produtoras de esporo e não ácido resistente, sendo que antigamente foram denominadas como *Listerella*. A denominação do gênero foi mudada em 1940 para *Listeria* e, em certo momento, acreditou-se que esses

micro-organismos estivessem relacionados a bactérias corineformes e, de fato, foram colocadas na família Corinebacteriaceae. Apesar disso, atualmente está claro que estão mais relacionadas a *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. (JAY, 2005).

São reconhecidas oito espécies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. denitrificans*, *L. murrayi* e *L. grayi*, no entanto, o grupo tem sofrido alterações taxonômicas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Esses micro-organismos crescem em temperatura de 1 a 45°C, sendo a faixa ótima de 30 a 37°C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008; LOVETT; TWEDT, 1988; SEELIGER; JONES, 1996). O gênero ainda é distinto dos demais por possuir características como a capacidade de formar biofilme, multiplicar em baixas temperaturas, tolerar estresse osmótico, contribuir para a sua persistência e ter boa adaptação ao ambiente (SAMELIS et al., 2002). Há evidências de que seja mais prevalente em ambientes e produtos resfriados, devido à sua capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração e pela microbiota competitiva ser reduzida a essa temperatura (CERUTTI, 2009).

A característica psicrótrófica, que se destaca na *Listeria* spp., depende da integridade celular e do sistema de transporte energético resistente ao frio, que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada em temperaturas de refrigeração (OLIVEIRA, 1993).

De acordo com a literatura das espécies de listeria a *L. monocytogenes* é o patógeno de maior importância para os humanos, ainda que a *L. ivanovii* possa multiplicar-se em ratos, o grau de crescimento de 10^6 células não causa infecção. *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* não ganharam ainda um destaque quanto a sua patogenicidade, embora se saiba que a última produza hemólise (JAY, 2005).

Sabe-se que a listeriose, principal doença do gênero, pode causar sérios problemas à saúde de pessoas imunodeprimidas, mulheres no período de

gestação (e seus fetos), crianças e idosos. A listeriose possui um longo período de incubação, sendo que as pessoas infectadas podem não apresentar sintomas, mas terem no quadro clínico sinais de gripe (acompanhada de diarreia e febre moderada), gastroenterite ou nos casos mais graves meningite, septicemia e outras infecções no sistema nervoso central (FRANCO; LANDGRAF, 2008; FARBER; PETERKIN, 1991). Em grávidas, a listeriose pode causar aborto espontâneo, nascimento prematuro ou morte fetal (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

A transmissão da *Listeria* spp. pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto com fontes contaminadas; por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital. O micro-organismo pode estar presente em secreções oculares, nasal e purulenta da epiderme e na urina, placenta de bovino infectado; outros tecidos contaminados, fezes e sangue. Porém, a transmissão por alimentos parece ser a forma mais importante (MARTH, 1988; SILVA, 1996).

Os estudos e procedimentos para isolamento e enumeração de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos, e isso devido: as mudanças nas características e nos hábitos alimentares, na forma em que os alimentos são produzidos, na habilidade da bactéria de sobreviver em condições adversas (sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração, aliado à sua resistência ao congelamento) e aos diversos antibióticos, que tornaram esse micro-organismo emergente e de grande importância entre os patógenos transmitidos por alimentos e atualmente representa um grande problema para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação (DONELLY et al., 1992; FARBER; PETERKIN, 1991; NAGHMOUCHI et al., 2007).

No pescado há maiores relatos do gênero relacionado aos produtos minimamente processados do que em produtos frescos (SONODA et al., 2000), entretanto já houve relato do envolvimento deste tipo de alimento na transmissão da *Listeria monocytogenes* (FARBER, 2000), incitando estudos sobre bacteriocinas com atividade antilisteriana para aplicação em pescado, como parte de estratégias de bioconservação, que consiste em explorar a

capacidade dos micro-organismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir micro-organismos que são indesejáveis, quer sejam deteriorantes, quer sejam patogênicos (DE MARTINS et al., 2003).

2.6 Utilizações de antimicrobianos na atividade aquícola

Com a multiplicidade e o crescente aumento da produção pesqueira pode-se notar uma incidência maior de agentes patogênicos no meio aquático, já que há troca de compostos químicos, biológicos e organismos no cultivo desses animais. Como medida preventiva, pesquisadores de diversas áreas desenvolvem e aprimoram modelos de avaliação de riscos com o intuito de identificar tais agentes patogênicos o mais cedo possível, pois o avanço da atividade depende da precisa implantação de boas práticas de manejo nos criadouros, principalmente no que concerne ao controle da qualidade da água; prática de quarentena na compra de novos lotes; fornecimento de ração com qualidade e balanceada; garantia da saúde dos animais e a prevenção/controle de enfermidades (PEELER et al. 2007; TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

As doenças infecciosas acabam sendo um dos problemas mais frequentes na piscicultura e com isso diversos produtores acabam fazendo o uso de produtos antimicrobianos e quimioterápicos. Logicamente, estes produtos representam uma importante ferramenta para evitar surtos infecciosos e para reduzir as perdas econômicas associadas às doenças (LAGANÀ et al., 2011).

Como na aquicultura os antimicrobianos são empregados diretamente nas águas superficiais, a elevada taxa de resíduos de antimicrobianos pode agregar-se nos sedimentos, com potencial de modificar negativamente o ecossistema aquático, principalmente levando a alterações nas espécies bacterianas encontradas em sedimentos e na coluna de água (ALEXY et al., 2004). Observa-se na Tabela 2, a taxa de metabolismo no animal dos principais antimicrobianos usados na aquicultura.

Tabela 2. Taxa de metabolismo no animal dos principais antimicrobianos usados na aquicultura.

Grupo farmacológico	Taxa de metabolismo no animal
Tetraciclínas	Baixa
Macrólidos	Baixa
Aminoglicosídeos	Baixa à elevada
Lincosamidas	Moderada
Fluoroquinolonas	Moderada a elevada
Sulfonamidas	Elevada

Baixa: < 20%; Moderada: de 20 a 80%; Elevada: > 80% da dose administrada.

Fonte: CEE, 1990.

A aplicação indevida de antibióticos na produção de pescado também acarreta no aumento considerável do número de bactérias resistentes aos antimicrobianos, inclusive resistentes a mais de um tipo (PIDDOCK, 2006). As consequências da resistência antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas nos seres humanos incluem: aumento no número de infecção, na frequência de tratamento sem sucesso e na severidade da infecção (BARZA; TRAVERS, 2002). Na Tabela 3 estão descritos os principais agentes antimicrobianos utilizados em aquicultura no mundo e a sua relevância na medicina humana.

Tabela 3. Agentes antimicrobianos comumente utilizados em aquicultura e a sua relevância na medicina humana.

Agente antimicrobiano (classe de antibiótico)	Via de administração em aquicultura	Importância da classe em medicina humana
Amoxicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Ampicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Cloranfenicol (fenicol)	Oral/banho/injetável	Importante
Florfenicol (fenicol)	Oral	Importante
Eritromicina (macrólidos)	Oral/banho/injetável	Elevada
Estreptomicina, neomicina (aminoglicosídeos)	Banho	Elevada
Furazolidona (nitrofuranos)	Oral/banho	Importante
Nitrofurantoína (nitrofuranos)	Oral	Importante
Ácido oxolínico (quinolonas)	Oral	Elevada
Enrofloxacin (fluoroquinolonas)	Oral/banho	Elevada
Flumequina (fluoroquinolonas)	Oral	Elevada
Oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina (tetraciclínas)	Oral/banho/injetável	Muito importante
Sulfonamidas	Oral	Importante

Fonte: HEUER et al., 2009.

Além dessa problemática, há a preocupação da inadequada gestão dos medicamentos quanto à segurança alimentar e o livre comércio. Foi demonstrado que alguns medicamentos veterinários usados na piscicultura, apresentam efeitos potencialmente prejudiciais à saúde humana e foram proibidos (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

A especificidade da resposta do hospedeiro depende das espécies de micro-organismos que colonizam o animal. Eventuais modificações na microbiota, devido ao tratamento com antibióticos, podem transmutar a relação benéfica hospedeiro-parasita. Portanto, estudar e entender como os compostos antibacterianos modificam a microbiota encontrada nos peixes pode ajudar a melhorar a gestão dos sistemas de produção, a fim de reduzir o uso de excessivo de medicamentos (ROMERO; FEIJOÓ; NAVARRETE, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica e verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de filés e peixes inteiros (tilápias, *Oreochromis* spp.), oriundos de dois pesque-pague da microrregião centro-leste do Estado de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a qualidade microbiológica de filés e peixes inteiros (*Oreochromis* spp.) através da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (10^3 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹) e presença de *Salmonella* spp., como estabelecido para pescado *in natura* pela RDC nº 12, ANVISA (BRASIL, 2001);
- Enumerar coliformes termotolerantes e identificar *Escherichia coli*;
- Verificar a presença de *Listeria* spp.; e
- Verificar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos micro-organismos isolados: amicacina, ampicilina, cefalexina, cefalotina, cefoperazona, ceftiofur, ciprofloxacina, cotrimoxazol, florfenicol, gentamicina, neomicina, penicilina G, tetraciclina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha dos estabelecimentos e colheita das amostras

O período de colheita de amostras estendeu-se de setembro de 2014 a fevereiro de 2015. Para a pesquisa foram utilizados peixes da espécie tilápia (*Oreochromis* spp.), provenientes de dois pesque-pague, da cidade de Pirassununga, da microrregião centro-leste do Estado de São Paulo, como mostrado na Figura 5.



Fonte: GOOGLE MAPS, 2015.

Figura 3. Mapa da localização de Pirassununga – SP.

Primeiramente foram encontrados quatro estabelecimentos para realização das colheitas, mas apenas dois se submeteram a participar da pesquisa, pois os demais sofreram com as intempéries climáticas tendo comprometimentos sérios nos tanques, fazendo com que os locais ficassem fechados até reformas e melhorias futuras. Com isso, os locais selecionados foram diferenciados por cores, chamados de pesque-pague Azul e pesque-pague Vermelho, como mostrado na Figura 6.

As colheitas ocorreram no horário da abertura dos pesque-pague Azul e Vermelho, no período da manhã, sendo colhidas as amostras aos domingos, a cada 15 dias em semanas alternadas para cada um dos locais.

Foram realizadas 18 colheitas em cada local e em cada um deles foram colhidos nove filés e nove peixes inteiros, totalizando 36 amostras. As médias do comprimento dos peixes foram de $25,19 \pm 3,88\text{cm}$ e o peso teve como média $374,16 \pm 177,65\text{g}$.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2014.

Figura 4. Fotos do pesque-pague Azul (A, B) e pesque-pague Vermelho (C, D).

Para caracterização dos estabelecimentos, nas proximidades do pesque-pague Azul, como mostra a Figura 7 (A), havia cultivo de cana-de-açúcar, além de uma reserva de mata fechada emparelhado com os tanques dos animais. Um galinheiro com galinhas, galos e patos ficava no meio da propriedade, e ao chegar ao estabelecimento constatou-se, em todos os

momentos de colheita das amostras, a presença de urubus no entorno do pesqueiro. O local conta com seis tanques, mas apenas quatro estavam em atividade. Um dos tanques possuía apenas tilápias, nos demais não se estabelecia seletividade de peixes, havendo assim mistura de espécies. O local de limpeza das carcaças era próximo à cozinha, como mostra a Figura 7 (B), mas as escamas e vísceras descartadas em cesta de lixo aberto atraíam cães e moscas necessitando de limpeza constantemente.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2014.

Figura 5. Foto do tanque de tilápias do pesque-pague Azul (A) e evisceração das tilápias para os clientes na mesma propriedade (B).

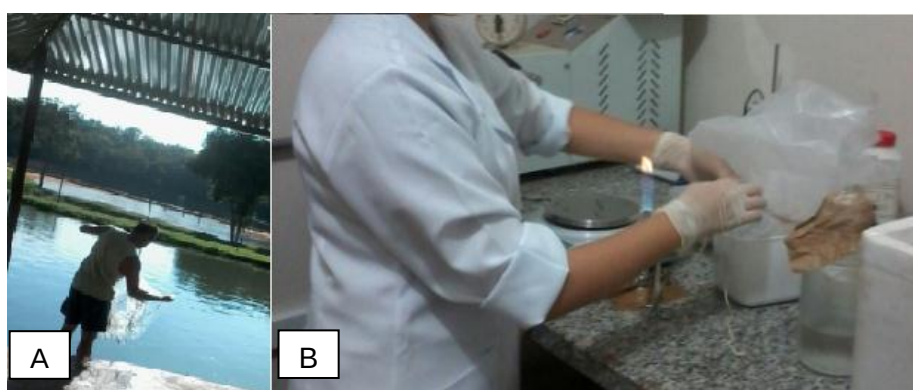
No pesque-pague Vermelho havia uma proximidade com o cultivo de cana-de-açúcar e mandioca, além disso, havia também um haras próximo aos tanques. O mesmo era um ambiente espaçoso, como mostrado na Figura 8, contendo 10 tanques escavados, incluindo um tanque de criação e engorda e um tanque de quarentena. Nos tanques abertos ao público havia mistura de espécies (tilápias, bagres, curimatás, pacus), mas havia exceção de um tanque para pesca esportiva, com peixes considerados mais desafiadores na pesca (cachara, tambaqui, piapara).



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 6. Foto aérea do pesque-pague Vermelho. As setas vermelhas indicam local de pesca ao público, seta amarela é para pesca esportiva e as setas brancas indicam os tanques de criação e quarentena.

Os peixes capturados, por meio de tarrafas e/ou varas de pescas, eram filetados de acordo com os manipuladores do próprio estabelecimento e então colocados em sacos estéreis dentro de caixa isotérmica contendo gelo reciclável. Os peixes inteiros eram insensibilizados (pelo método de destruição cerebral) e abatidos, mas não eviscerados, também no próprio estabelecimento e colocados em sacos estéreis em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. A Figura 9 detalha a colheita e o transporte até o laboratório.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 7. Foto da captura da tilápia por meio do uso de tarrafa (A) e amostras sendo analisadas no laboratório (B).

Todas as amostras foram transportados para o Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar, localizado no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga (USP-FZEA), para análises.

4.2 Análises microbiológicas

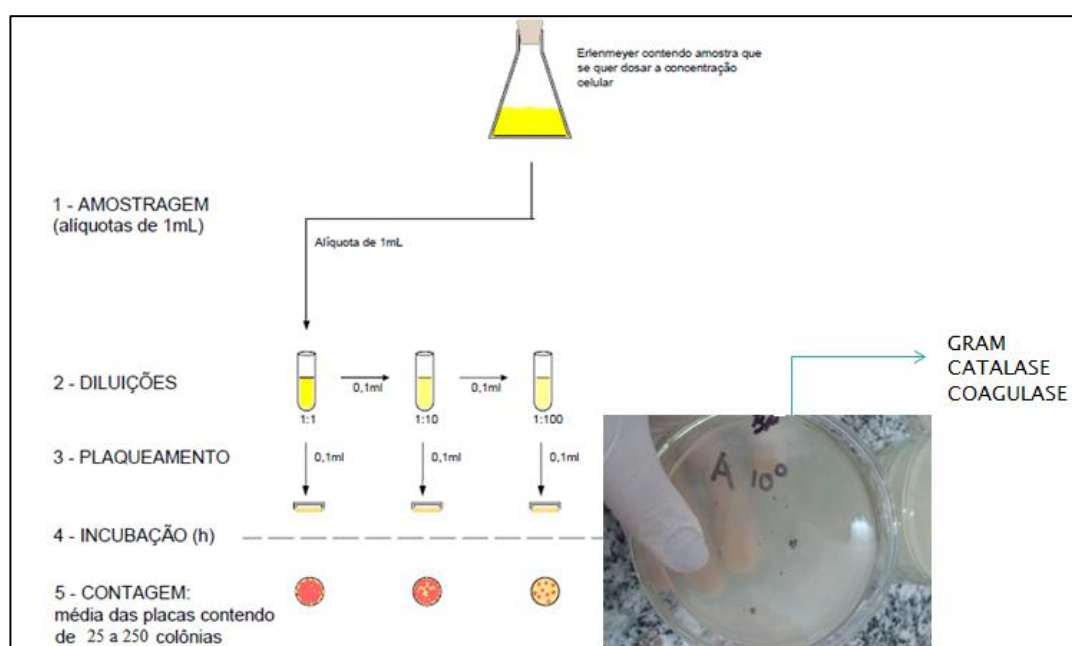
Na análise do peixe inteiro foi utilizada a técnica da enxaguadura. Para tal foram adicionados na proporção de 1:1, ou seja, para cada 1g de peixe 1 mL de água peptonada, em sacos plásticos estéreis, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Em seguida, o peixe foi massageado durante um minuto para transferir a carga microbiana da pele para a água peptonada (APHA, 2001). Para a análise dos filés foram utilizados 25 g de músculo de cada peixe, que foram pesados em placas de petri estéreis, procedendo então a diluição da mesma com a adição de 225 mL de água peptonada a 0,1% que foi homogeneizado por um minuto, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir dessa solução foram realizadas diluições até 10^{-3} e em seguida realizado as análises (APHA, 2001).

4.2.1 Contagem da população de *Staphylococcus* spp.

Primeiramente, foram transferidos 0,1 mL das diluições obtidas das amostras da água de enxaguadura e dos filés para placas de Petri, contendo Ágar Baird Parker (BP), previamente solidificado. O inóculo foi semeado em superfície com auxílio da alça de Drigalski e as placas, em duplicatas, foram incubadas a 35°C por 48 horas. As colônias características do gênero *Staphylococcus* (negras brilhantes com halo de lecitinase), foram contadas e submetidas a coloração de Gram, teste da catalase (APHA, 2001) e coagulase (MAC FADDIN, 1976). A figura 10 esquematiza a metodologia empregada.

Prova da catalase – de uma a três colônias foram transferidas para uma placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas indicou prova positiva (APHA, 2001).

Prova da coagulase - de uma a três colônias foram transferidas para tubos com 5 mL do caldo de Infusão de cérebro e coração (BHI, *Brain Heart Infusion*), e incubados a 36°C por 24 horas. Posteriormente, foram transferidos 0,3 mL do cultivo em BHI para tubos de 10x100mm e adicionados de 0,5 mL de plasma de coelho diluídos na proporção 1:5 em solução salina estéril (SPERBER; TATINI, 1975). Os tubos foram incubados em banho maria a 37°C e observada a formação de coágulo após 1, 2, 3, 4 e 24 horas de incubação. Foram considerados coagulase positivas os que coagularam o plasma de coelho dentro desse período.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 8. Método esquemático para contagem da população de *Staphylococcus* spp.

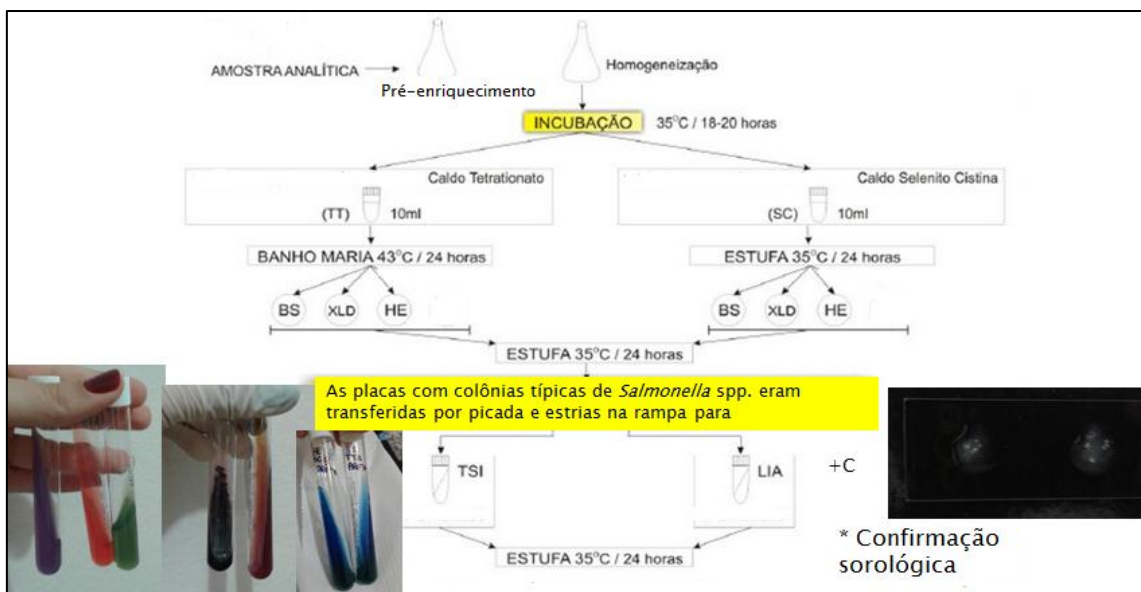
4.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foi feito um pré-enriquecimento primário das diluições 10^{-1} , tanto do filé quanto do peixe inteiro, em solução de água peptonada a 0,1%, sendo incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Seguindo para o enriquecimento seletivo, uma alíquota de 1 mL da cultura do pré-enriquecimento foi inoculada, respectivamente, em 10 mL de Caldo Selenito Cistina (SC) e em 10 mL de caldo Tetrationato (TT) (SILVA et al., 2007). O cultivo em TT foi incubado em banho maria à 43°C e o cultivo em SC incubado em estufa à 35°C, ambos

durante 24 horas. Com auxílio da alça de níquel-cromo cada cultura de caldo de enriquecimento foi semeada, pela técnica de esgotamento, para a superfície de placas contendo Ágar Bismuto Sulfito (BS), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Ágar Entérico de Hektoen (HE), seguido de incubação a 37°C por 24 horas (APHA, 2001).

A identificação presuntiva das culturas foi obtida por meio do plaqueamento seletivo. Com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, de cada uma das placas semeadas, três a cinco colônias, com características sugestivas do gênero *Salmonella* foram inoculadas em tubos contendo Ágar Triple Sugar Iron (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA) com incubação realizada a 37°C, por 24 horas, sendo que os tubos contendo o meio de cultura TSI foram incubados com a tampa ligeiramente frouxa. Posteriormente, foi realizado o teste em Citrato de Simmons (C), seguindo o mesmo procedimento descrito para LIA (DIFCO, 1978). Após a incubação, as colônias sugestivas foram semeadas, em superfície, nos tubos contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) inclinado, incubados a 37°C, por 24 horas, para futura confirmação sorológica.

Para realização da confirmação sorológica do gênero *Salmonella* foi transferida uma alçada (10µl) da cultura para lâminas de vidro contendo gotas de solução salina estéril. Após homogeneização, foi adicionada uma gota de soro antisalmonela polivalente somático - O, a lâmina foi movimentada e foi feita a leitura. Ocorrendo a aglutinação da mistura a prova foi considerada positiva. O mesmo procedimento foi realizado para o soro polivalente flagelar - H. Foi considerada como de *Salmonella* spp. a cultura que apresentou positividade em ambas as provas. A Figura 11 esquematiza a metodologia realizada.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 9. Método esquemático para pesquisa de *Salmonella* spp.

4.2.3 Número mais provável de coliformes termotolerantes

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos (série de 3 tubos). Para a avaliação dos coliformes como teste presuntivo, 1 mL de cada diluição (água de enxaguadura do peixe inteiro e filé) foram inoculadas, em triplicata, nos tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos. A incubação foi realizada a 35°C, durante 48 horas, com observações a cada 24 horas, para verificar a presença de gás e turvação dos tubos de Durham, quando isto ocorreu foi considerada prova positiva (SILVA et al., 2007).

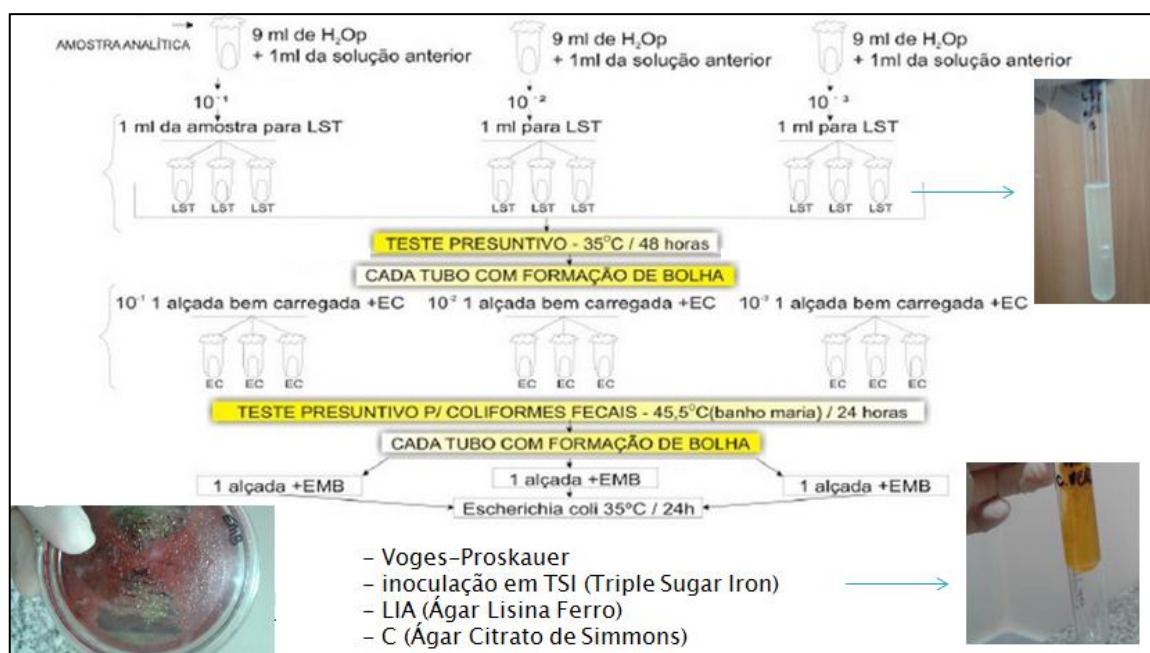
Dos tubos positivos de LST, foram transferidas uma alçada da cultura para tubos com caldo EC (*Escherichia coli*) contendo tubos de Durham. A incubação foi realizada em banho-maria a 44,5°C, com desnível de água superior a superfície do meio, por 24 horas observando a multiplicação microbiana. A observação de gás e turvação nos tubos de Durham indicou presença de coliformes termotolerantes. Por meio da tabela de NMP (número mais provável), baseada no número de tubos positivos foram obtidos os resultados (SILVA et al., 2007).

De cada tubo de EC positivo, estriou-se uma alçada em placa contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) sendo as mesmas incubadas a 35° C por 24 horas, e posteriormente foi observado se houve desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico (ICMSF, 2000). A Figura 12 resume a metodologia empregada. Posteriormente, para confirmação de *Escherichia coli* foram realizadas provas bioquímicas:

Voges-Proskauer – foi inoculado nos tubos de ensaio contendo 5 mL do meio MR-VP a cultura do micro-organismo e incubou-se na estufa por 37°C durante 24 horas. Posteriormente, foi misturado as soluções de hidróxido de potássio 40% mais alfa-naftol em etanol absoluto a 5%, observando a formação do anel vermelho

Indol - utilizou-se tubos de ensaio contendo 5 mL do meio Sulfeto-Indol-Motilidade, semeado com picada até o fundo e incubando por 24 horas, posteriormente pingou-se 3-4 gotas do reativo de Kovacs para realização da prova, cuja confirmação da presença da *E. coli* é determinada pelo surgimento de um anel vermelho

Inoculação em TSI, LIA e C - descritos no item 4.2.2.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 10. Método esquemático para número mais provável (NMP) de coliformes e *Escherichia coli*.

4.2.4 Pesquisa de *Listeria* spp.

A técnica utilizada foi baseada na metodologia revisada do USDA – FSIS (MCCLAIN; LEE, 1988), usada tradicionalmente em produtos cárneos, que inclui: enriquecimento seletivo primário, enriquecimento seletivo secundário, plaqueamento, isolamento e, por fim, identificação bioquímica. A Figura 13 representa a metodologia aplicada.

Enriquecimento seletivo primário - para as amostras de filés, foi realizado retirando alíquotas de 25g e adicionadas em frasco contendo 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* spp., Listeria Enrichment Broth (LEB) (BD Difco®), sendo homogeneizadas durante 60 segundos. Para as amostras de peixes inteiros, foi retirado da água de enxaguadura 25mL e adicionadas a 225 mL de LEB. Todos os frascos foram identificados e incubados a 30°C por 24 horas.

Enriquecimento seletivo secundário - Após este período, 0,1 mL do Caldo LEB foi transferido para tubos contendo 10 mL de Caldo Half Fraser, suplementado com citrato férrico amoniacal (BD Difco®) e novamente incubados por 24-48h a 30°C.

Plaqueamento e isolamento - A partir dos tubos positivos foram inoculados, com auxílio de alça de platina, uma alçada da cultura pela técnica de esgotamento em Ágar Oxford Modificado (MOX), suplementado também com produto possuindo em sua formulação esculina e citrato férrico amoniacal, que atuam como indicadores no isolamento e diferenciação da *Listeria* spp. As placas de Ágar MOX foram incubadas a 35°C por 24 e 48 horas, para posterior observação das colônias típicas, que são esféricas e rodeadas por halo preto.

Foram selecionados de três a cinco colônias características, para as provas bioquímicas, em placas de Ágar soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSA–YE), incubadas a 37°C por 24 horas, sendo então examinadas sob luz transmitida a 45° (método de Henry). As colônias suspeitas com características de aspecto de vidro moído e coloração azulada foram submetidas à identificação bioquímica.

A identificação bioquímica foi realizada selecionando de três a cinco colônias características (aspecto de vidro moído e coloração azulada) de cada placa de TSA-YE e submetidas à:

Gram - a partir de uma colônia isolada foram feitos esfregaços e submetidos à coloração de Gram. O micro-organismo sugestivo para *Listeria* spp. era bastonete curto, Gram-positivo, isolado ou em cadeia, não esporulado

Reação da catalase - com auxílio de alça de platina, foram transferidas uma pequena quantidade de colônias do TSA-YE, da mesma colônia utilizada para coloração de Gram, para uma lâmina e adicionados três gotas de solução de peróxido de hidrogênio (3%) sobre as colônias. O borbulhamento imediato era indicativo de positividade. As espécies do gênero de *Listeria* são catalase positiva.

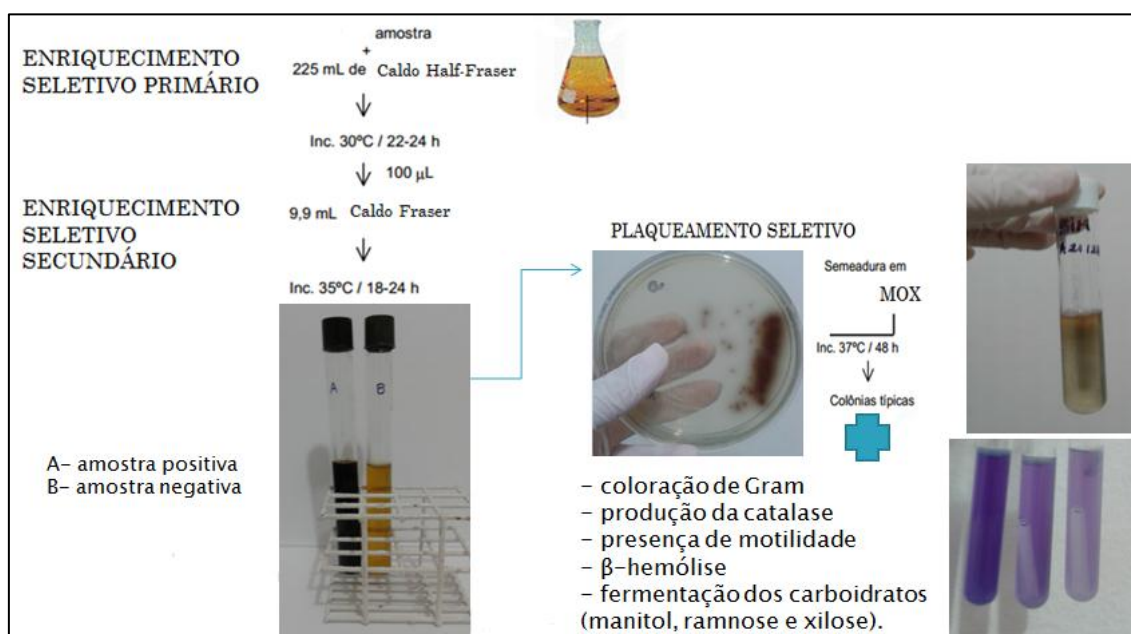
Presença de motilidade - inoculou-se nos tubos de ensaio, contendo 5 mL de meio SIM (Sulfeto-Indol-Motilidade), a bactéria oriunda da cultura anterior, por meio de uma picada de até dois terços no ágar, incubando por 25°C durante 7 dias, no intuito de observar se bactéria móvel cresce além da linha de picada (com aspecto de “guarda-chuva” no terço superior do ágar), como descrito por Holt et al. (1994). O gênero *Listeria* apresenta motilidade, desenvolvendo-se na parte superior do meio.

Prova de sulfeto - inoculou-se nos tubos de ensaio, contendo 5 mL de meio SIM, a bactéria oriunda da cultura anterior, por meio de uma picada profunda no ágar, incubando por 25°C durante 7 dias, no intuito de observar a presença de sulfeto (H₂S) caracterizada pela coloração preta do meio de cultura.

β-hemólise - utilizando uma caneta vidrográfica, foram demarcadas 20 a 25 setores no fundo de uma placa de Ágar Sangue de carneiro a 5%; e a partir das colônias do TSA-YE, foram inoculadas colônias sugestivas em um dos setores demarcados, com alça de platina, fazendo a inoculação, tocando levemente na superfície do meio, sem picar. Incubadas a 35°C por 24 a 48 horas e observado zonas de hemólise ao redor das colônias. A *Listeria*

monocytogenes forma halo discreto, que não se estende muito para fora da região da colônia.

Fermentação dos carboidratos (manitol, ramnose e xilose) - do TSA-YE, foram transferidas com alça de platina uma alçada das colônias para os tubos com caldo púrpura base, contendo separadamente 0,5% de cada um dos três açúcares. Incubados a 35°C por 7 dias e observados diariamente se haveria produção de ácido, por meio da alteração da cor do meio de púrpura para amarelo e produção de gás (tubos de Durham). Nenhuma cepa de *Listeria* produz gás a partir desses compostos de carbono. *L. monocytogenes* fermenta a ramnose, mas não fermenta a xilose e o manitol.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 11. Método esquemático para pesquisa de *Listeria* spp.

4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

Foi utilizado o método de Kirby e Bauer (BAUER et al., 1966) baseado em disco difusão em ágar segundo os critérios estabelecidos pelo NCCLS (2003). A pesquisa foi feita conforme dados mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Antimicrobianos que foram testados de acordo com o micro-organismo isolado.

Bactéria estudada	Antimicrobiano testado	Concentração
<i>Staphylococcus coagulase positivo</i>	Ampicilina	10µg
	Ciprofloxacina	5µg
	Cotrimoxazol	25µg
	Florfenicol	30µg
	Gentamicina	10µg
	Penicilina G	10UI
	Tetraciclina	30µg
<i>Salmonella spp.</i>	Amicacina	30 µg
	Ampicilina	10µg
	Cefalotina	30µg
	Ciprofloxacina	5µg
	Cotrimoxazol	25µg
	Florfenicol	30µg
	Gentamicina	10µg
	Tetraciclina	30µg
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina	10µg
	Cefalotina	30µg
	Cefepima	30µg
	Ciprofloxacina	5µg
	Florfenicol	30µg
	Gentamicina	10µg
	Neomicina	30µg
	Sulfazotrin	25 µg
	Tetraciclina	30µg
<i>Listeria spp.</i>	Ampicilina	10µg
	Cefalotina	30µg
	Cefoperazona	75µg
	Ciprofloxacina	5µg
	Florfenicol	30µg
	Gentamicina	10µg
	Neomicina	30µg
	Tetraciclina	30µg

Os inóculos dos isolados foram transferidos para tubos contendo 5 mL de TBS e depois incubados a 28°C por 18 a 24 horas. Em seguida, foram semeados, em superfície, nas placas de Ágar Müller Hinton, por meio de suabes estéreis. Os discos com os princípios ativos (Sensifar®) foram então colocados na superfície do ágar e as placas foram incubadas, à temperatura de 28°C, por 18-24 horas. Após esse período, foi efetuada a leitura e interpretação dos diâmetros dos halos formados, segundo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) e classificados como resistentes, intermediários ou sensíveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem da população de *Staphylococcus* spp.

Na Tabela 5 podem ser observadas as médias dos resultados da contagem da população de *Staphylococcus* spp. encontradas nas amostras pesquisadas. Nos filés as médias variaram de 1×10^0 a $4,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ e nas amostras de peixe inteiro as médias variaram de $2,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Na Tabela 5 também é possível observar, comparando os estabelecimentos, que houve maior população do micro-organismo nos peixes inteiros do que nos filés. O mesmo pode ser explicado com base no fato de que ambos os pesqueiros passaram por um período longo de estiagem de chuva. Suspeita-se que com um menor volume de água no tanque e, conseqüentemente, menor espaço na circulação dos peixes (gerando estresse e conflito territorial no plantel), associado a um maior trânsito de substâncias na água (ração, dejetos), fizeram com que a concentração desse micro-organismo aumentasse.

Tabela 5. Média dos resultados da contagem da população de *Staphylococcus* spp. (UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹) em amostras de filés e peixes inteiros, colhidos em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.

Colheitas	Pesque-pague Azul		Pesque-pague Vermelho	
	UFC.g ⁻¹ nos filés	UFC.mL ⁻¹ nos peixes inteiros	UFC.g ⁻¹ nos filés	UFC.mL ⁻¹ nos peixes inteiros
1	$2,0 \times 10^0$	$3,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^0$	$2,0 \times 10^2$
2	$4,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^0$	$2,5 \times 10^3$
3	$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^0$	$2,0 \times 10^3$
4	$1,5 \times 10^0$	$1,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^0$	$8,0 \times 10^2$
5	$1,5 \times 10^0$	$2,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^0$	$2,5 \times 10^2$
6	$4,5 \times 10^0$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
7	0	$4,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^0$	$4,0 \times 10^2$
8	$1,5 \times 10^0$	$3,0 \times 10^2$	0	$4,0 \times 10^2$
9	$1,0 \times 10^0$	$4,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^0$	$2,0 \times 10^3$

Na pesquisa realizada por Lorenzon et al. (2010) foram encontradas mais especificações sobre esse micro-organismo, na mesma espécie de peixe aqui estudada, constatando na água de enxaguadura variação de $1,0 \times 10^2$ a $3,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹; no músculo de $1,0 \times 10^2$ a $6,7 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e no trato gastrointestinal de $1,0 \times 10^3$ a $2,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Tais valores ressaltam os

resultados encontrados nessa pesquisa, constatando maior contagem de *Staphylococcus* spp. na superfície da tilápia que no músculo.

Sobre os locais de colheita, pode-se dizer que o pesque-pague Azul apresentou maior contagem de *Staphylococcus* spp. nas amostras de filé e peixe inteiro. Talvez o excesso de animais locais e a mata próxima aos tanques tenham contribuído para a circulação desse micro-organismo, vindos através das fezes, desejos, sujidades, entre outros.

Na Tabela 6 verifica-se que dos 18 filés colhidos, 16 tiveram a presença do gênero *Staphylococcus*, sendo 13 (81,25%) estafilococos coagulase positiva (ECP) e 3 (18,75%) foram estafilococos coagulase negativa (ECN). A presença elevada de ECP em filés pode ser explicada pelo manuseio excessivo dos manipuladores na carne e dos utensílios não higienizado utilizados na filetagem. Observou-se que os manipuladores usavam facas, luvas e tábuas, por vezes não limpando tais instrumentos, havendo possibilidade de transmissão do agente. Sobre os peixes inteiros foi verificada a presença ECP em 17 (94,44%) das 18 amostras, o que possivelmente ocorreu devido a inadequações higiênico-sanitárias nos estabelecimentos, como acesso livre de insetos e poeiras/terra aos peixes na bancada e na balança, acúmulo de restos de tilápia (escamas, sangue, tecidos) e outras espécies na área de trabalho, podendo estes serem possíveis fatores para multiplicação do micro-organismo. Tais fatores também foram relatados por Rocha et al. (2013) em pesquisa de ECP em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados na região do Rio Grande do Norte.

Tabela 6. Número total e porcentagem (%) de isolados de ECP e ECN em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.

Amostras	Número de ECP (%)	Número de ECN (%)	Total de <i>Staphylococcus</i> spp. (%) isolados
Filés	11 (68,75)	5 (31,25)	16 (100)
Peixes inteiros	13 (72,22)	5 (27,78)	18 (100)
Total	24	10	34

A presença elevada de ECP em filés (81,25%) pode ser explicada pelo fato de que essas bactérias geralmente são encontradas no corpo humano (trato respiratório, mucosas nasais e pele) e transferidas ao alimento por pessoas com precários hábitos de higiene durante o manuseio e/ou utensílios utilizados. No presente estudo, os peixes foram colhidos com tarrafas ou cestos nos viveiros e, posteriormente, o manipulador colocava as amostras inteiras nos sacos estéreis, podendo assim transmitir o agente ao peixe ou às amostras. Quanto aos filés, pode-se dizer que os manipuladores usavam facas, luvas e tábuas, por vezes não limpando tais instrumentos, havendo assim, possibilidade de transmissão do agente.

Outro ponto a ser relatado sobre o resultado encontrado é que foi observada nas superfícies de manipulação e nos pontos de comercialização, a utilização de panos de limpeza confeccionados em algodão, lavados e secos nas próprias áreas. Embora sejam reconhecidas fontes de contaminação cruzada, os panos de limpeza são extensivamente utilizados nos serviços de alimentação. Bartz (2008) detectou neste tipo de material a presença de *S. aureus*, uma das mais importantes espécies de ECP, de até $2,8 \times 10^6$ UFC.cm². Em experimento de dispersão bacteriana, o mesmo autor determinou que panos de limpeza experimentalmente contaminados com cargas microbianas correspondentes a 10^4 UFC.cm², podem transferir aproximadamente 10^2 UFC.cm² bactérias para superfícies de aço inox.

De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001), para pescado *in natura*, é estabelecido até 10^3 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ para ECP, sendo assim, para as amostras de filés todas, tanto do pesque-pague Azul quanto do Vermelho, seriam consideradas próprias para o consumo e para amostras de peixe inteiro, 5 do pesque pague Azul e 6 do Vermelho estavam aptas para o consumo.

Sobre as amostras de ECN pode-se dizer que ainda são tradicionalmente considerados patógenos menores, e exemplo disso é que na Legislação não há imposição de padrão aos coagulase negativa. Até o momento, sabe-se que as enterotoxinas produzidas por esse grupo também contribuem para a intoxicação alimentar. A esse respeito Cunha et al. (2006) verificaram a capacidade toxigênica de linhagens de ECN e identificaram por

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas; dentre os alimentos analisados 22,7% foram ECN com crescimento entre 10^2 a 10^6 UFC.g⁻¹, sendo esses alimentos processados e, portanto, sujeitos à contaminação pelos manipuladores. O mesmo foi observado nas amostras de filé onde 18,75% eram ECN, podendo representar risco aos consumidores.

5.1.2 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de ECP

Dos 24 isolados de ECP oriundos das amostras de filés e do peixe inteiro foi realizado o antibiograma com os princípios relatados na Tabela 7. Observou-se que houve maior sensibilidade a ciprofloxacina (91,66%) e cotrimoxazol (91,66%), como também florfenicol (79,17%), tetraciclina (66,67%) e penicilina G(62,5%); enquanto que frente à ampicilina e gentamicina apresentaram resistência de 58,34% e 54,17%, respectivamente.

Tabela 7. Comportamento dos 24 isolados de ECP obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Nº de isolados resistentes	Nº de isolados sensíveis
Ampicilina	14 (58,34%)	10 (41,66%)
Ciprofloxacina	2 (8,34%)	22 (91,66%)
Cotrimoxazol	2 (8,34%)	22 (91,66%)
Florfenicol	5 (20,83%)	19 (79,17%)
Gentamicina	13 (54,17%)	11 (45,83%)
Penicilina G	9 (37,5%)	15 (62,5%)
Tetraciclina	8 (33,33%)	16 (66,67%)

A produção de enzimas β -lactamases relatada como um importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, como as ampicilinas e penicilinas testadas nesse trabalho, hidrolisam o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999). A produção dessa enzima pelos micro-organismos explica o porquê da sua sobrevivência em um possível foco infeccioso, apesar do uso de um antibiótico β -lactâmico. Além disso, a presença de isolados aqui testados produtores de β -lactamase podem

favorecer a sobrevivência de outros agentes sensíveis ao antibiótico em um processo infeccioso, como elucidado por Tavares (2001).

Segundo Melo et al. (2012) aminoglicosídeos (exemplo: gentamicina) e penicilinas são fisicamente e/ou quimicamente incompatíveis e podem inativar um ao outro quando testadas *in vitro*. Na pesquisa feita foi constatado resistência à gentamicina de 54,17% e penicilina G 37,5%. Também no trabalho de Costa et al. (2008) com jundiás (*Rhamdia quelen*) foi constatado menor percentual de sensibilidade à penicilina G, o que pode indicar que isolados de *Staphylococcus* spp. em diferentes espécies de peixes se mostram resistentes frente a um dos medicamento mais comuns em medicina veterinária, justificada em razão do uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) na criação desses animais.

Sobre a sensibilidade encontrada, ressaltam-se os dados sobre florfenicol, amplamente usado na piscicultura. No trabalho houve uma taxa significativa de 79,17%, o que comprova que o medicamento amplamente usado na aquicultura brasileira ainda tem eficácia. Porém, a resistência de 20,83% faz com que haja determinada preocupação e necessidade de mais estudos, pois o fármaco é usado em demasia, sendo um dos medicamentos mais amplamente difundidos nas rações para peixes e um dos poucos capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica quando o plantel apresenta contaminação por estreptococose, por exemplo (KEHRENBURG; SCHWARZ, 2004; KEHRENBURG; SCHWARZ, 2006).

5.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

O trabalho confirmou a presença do gênero *Salmonella*, como mostrado na Tabela 8. Das 36 amostras foram encontrados 21 (58,34%) isolados do gênero, sendo 11 (61,12%) isolados presentes nas amostras de filés e 10 (55,56%) nos peixes inteiros. A taxa encontrada desse agente nas tilápias se torna preocupante, pois a *Salmonella* spp. é frequentemente citada no estudo da qualidade higiênica do pescado por indicar a condição da água no local de captura, já que é associada ao trato intestinal de diversos animais, com

capacidade de sobreviver e multiplicar no intestino, muco e tecidos (AMPOFO; CLERK, 2003; ROSSI; ANDREAZZI, 2005). A água de baixa qualidade e a circulação de aves (patos e galinhas), principalmente no pesque-pague Azul onde ocorreu a maior presença do micro-organismo, podem estar carreando e disseminando a bactéria no ambiente aquático, contaminando os peixes. Portanto, pode-se afirmar que a *Salmonella* spp. encontrada nos peixes os tornam um possível veículo de transmissão de doenças à seres humanos.

Tabela 8. Total de isolados de *Salmonella* spp. em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas nos pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, seguidas das temperaturas (°C) verificadas nos dias das respectivas colheitas, ocorridas durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.

Colheitas	Pesque-pague Azul			Pesque-pague Vermelho		
	Temperatura local (°C)	<i>Salmonella</i> spp. nos filés	<i>Salmonella</i> spp. nos peixes inteiros	Temperatura local (°C)	<i>Salmonella</i> spp. nos filés	<i>Salmonella</i> spp. nos peixes inteiros
1	23	ausência	presença	23	presença	ausência
2	23	ausência	presença	26	ausência	ausência
3	26	ausência	ausência	24	ausência	ausência
4	23	ausência	ausência	24	presença	ausência
5	23	presença	presença	24	presença	presença
6	23	presença	presença	23	presença	ausência
7	25	presença	presença	30	presença	ausência
8	24	presença	presença	26	presença	presença
9	25	presença	presença	23	ausência	presença

Outra observação feita foi a presença constante do micro-organismo nas últimas colheitas, quando comparados ambos os pesque-pague. Santos et al. (2000) apontaram que as *Salmonella* spp. não são boas competidoras quando comparadas a outras bactérias, mas o fator temperatura pode vir a ser um contribuinte na seleção e multiplicação do gênero, como observado na Tabela 8. Aliado as falhas no processo de criação dos peixes e a falta de controle nos processos operacionais de manipulação, observou-se assim uma possível contaminação cruzada, especialmente com relação aos resultados de filés.

As pesquisas têm apontado a salmonelose como uma das bactérias mais importantes relacionadas a problemas de saúde pública, estando a *Salmonella* spp. entre os principais agentes envolvidos nos surtos de infecções alimentares (PUI et al., 2011). Novos veículos de infecção estão sendo descobertos, mas sabe-se que os principais são os de origem alimentar e

devido a sua prevalência em todos os ambientes de agricultura, se torna importante estudá-la em animais que habitam o meio aquático (D'AOUST, 1995). Vale ainda destacar que na produção mundial de peixes é comum o cultivo em tanques escavados na terra ou em reservatórios de água desprotegidos, expostos assim à contaminação ambiental via várias fontes, como a de esgotos urbanos e fezes de animais que são reservatórios naturais da *Salmonella* spp., e até pela introdução de alimentos e rações contaminadas, aliadas ao clima quente frequentemente associado à aquicultura, potencializando a multiplicação da bactéria neste micro ambiente (PIEDRAHITA, 1990).

5.2.2 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Salmonella* spp.

Sobre o comportamento das *Salmonella* spp. isoladas no presente trabalho frente aos antimicrobianos testados, constatou-se, na Tabela 9, maiores taxas de sensibilidade frente a gentamicina (95,24%), amicacina (66,67%) e ciprofloxacina (66,67%), resultados semelhantes foram encontrados por Kluczynek et al. (2010) que tinham como um dos focos determinar o perfil de sensibilidade de *Salmonella* spp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais. Em pesquisas realizadas por Peresi et al. (1998) com *Salmonella* spp. isoladas a partir de alimentos envolvidos em surtos relatados na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de 1990 a 2003, não foram detectados isolados resistentes a gentamicina, coincidindo também com resultados observados por Fernandes et al. (2003) que estudaram, dentre outros pontos, o efeito da mesma em *S. enteritidis* isoladas de alimentos no período de 1975 e 1995.

Tabela 9. Comportamento dos 21 isolados de *Salmonella* spp. obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Nº de isolados resistentes	Nº de isolados intermediários	Nº de isolados sensíveis
Amicacina	7 (33,33%)	-	14 (66,67%)
Ampicilina	13 (61,90%)	5 (23,80%)	3 (14,30%)
Cefalotina	11 (52,38%)	5 (23,81%)	5 (23,81%)
Ciprofloxacina	2 (9,52%)	5 (23,81%)	14 (66,67%)
Cotrimoxazol	15 (71,43%)	-	6 (28,57%)
Florfenicol	17 (80,95%)	-	4 (19,05%)
Gentamicina	-	1 (4,76%)	20 (95,24%)
Tetraciclina	14 (66,67%)	-	7 (33,33%)

- não houve crescimento.

As amostras demonstraram resistência frente ao florfenicol (80,95%), sendo que Ribeiro et al. (2010) levantaram resultados de baixa efetividade frente às 53 linhagens de *Salmonella* spp., o que surpreendeu pesquisadores já que são de uso relativamente recente em medicina veterinária no Brasil e amplamente usadas na aquicultura.

A associação de sulfametoxazol mais trimetoprim é denominada cotrimoxazol e já foi comprovado que tal medicamento apresenta maior atividade antimicrobiana quando comparado com os fármacos que o compõe, e usados individualmente, além disso, a associação foi selecionada devido à sua atividade sinérgica e pela similaridade das meias vidas dos dois fármacos (MASTERS et al., 2003). Entretanto, nas últimas décadas tem-se verificado um aumento da resistência bacteriana a este antimicrobiano, possivelmente devido ao uso indiscriminado e errôneo (TAVARES, 2009; MACEDO; TAVARES, 2010). Os resultados encontrados mostraram resistência (71,43%) frente aos isolados encontrados.

A resistência antimicrobiana observada para os β -lactâmicos, principalmente ampicilina (61,90%) e cefalotina (52,38%) é preocupante, uma vez que essa classe é amplamente utilizada no controle de doenças infecciosas (LOURENÇO, 2007). Outro fato preocupante com os resultados é que, no Brasil, as tetraciclinas foram banidas em 1998 como aditivos alimentares em rações de animais, mas segundo levantamentos feitos anteriormente estas ainda continuam sendo utilizadas, podendo assim agravar mais a disseminação de micro-organismos resistentes (ROSSI; ANDREAZZI,

2005), como ocorrido nesta pesquisa onde se observou uma alta resistência ao fármaco (66,67%).

5.3 Número mais provável de coliformes termotolerantes

A Tabela 10 refere-se ao número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes das amostras de filé e peixe inteiro adquiridas nos dois pesque-pague onde foi realizado o estudo. Os dados mostraram que a população de coliformes termotolerantes variaram de $<0,3 \times 10^0$ a $1,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ nos filés e $1,1 \times 10^1$ a $>1,1 \times 10^3$ NMP.mL⁻¹ nos peixes inteiros, demonstrando maior presença desse grupo de micro-organismos em peixes inteiros comparados aos filés. Valores inferiores a $0,3 \times 10^0$ foram observados na maioria das amostras de filé do pesque-pague Vermelho.

No pesque-pague Azul, o NMP de coliformes termotolerantes foi maior tanto nas amostras de filés quanto dos peixes inteiros. Vale citar que no pesque-pague Azul havia um galinheiro (com galinhas, galos e patos) que ficava no meio da propriedade, e quando chovia a água desse ambiente escorria para os tanques que eram escavados, além disso, havia uma reserva de mata fechada emparelhada com os tanques dos peixes, o que indica que há chances de outros animais se aproximarem e fazerem a troca de substâncias indesejáveis (fezes, saliva, urina) na água.

O local de limpeza das carcaças era próximo à cozinha, mas as escamas e vísceras eram descartadas em cesto de lixo aberto atraindo cães e moscas, podendo assim causar uma contaminação cruzada. Esse fato também é embasado por Gatti-Junior (2011), que demonstrou em seu trabalho que o NMP de coliformes na água de enxaguadura de tilápias variou de $1,1 \times 10^1$ a $>1,1 \times 10^3$, apontando que quanto maior o grau de exposição da pele com o ambiente, maior chance de ocorrer contaminações cruzadas, como possivelmente ocorreu neste trabalho.

Tabela 10. Número mais provável de coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹ ou mL⁻¹) em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas nos pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, seguidas das temperaturas (°C) verificadas nos dias das respectivas colheitas, ocorridas durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.

Colheitas	Pesque-pague Azul			Pesque-pague Vermelho		
	Temperatura local (°C)	NMP. g ⁻¹ nos filés	NMP.mL ⁻¹ nos peixes inteiros	Temperatura local (°C)	NMP. g ⁻¹ nos filés	NMP.mL ⁻¹ no peixes inteiros
1	23	2,3x10 ¹	>1,1x10 ³	23	<0,3x10 ⁰	4,6x10 ²
2	23	2,3x10 ¹	>1,1x10 ³	26	2,3x10 ¹	>1,1x10 ³
3	26	<0,3x10 ⁰	>1,1x10 ³	24	<0,3x10 ⁰	>1,1x10 ³
4	23	0,9x10 ⁰	3,6x10 ¹	24	<0,3x10 ⁰	>1,1x10 ³
5	23	0,9x10 ⁰	>1,1x10 ³	24	3x10 ⁰	3,5x10 ¹
6	23	1,1x10 ³	>1,1x10 ³	23	0,9x10 ⁰	1,1x10 ¹
7	25	2,4x10 ²	3,8x10 ¹	30	9,3x10 ¹	2,3x10 ¹
8	24	2,1x10 ²	2,8x10 ¹	26	<0,3x10 ⁰	2,3x10 ¹
9	25	2,4x10 ²	>1,1x10 ³	23	<0,3x10 ⁰	>1,1x10 ³

Lorenzon et al. (2010) fizeram um estudo sobre o assunto e encontraram coliformes termotolerantes na água de enxaguadura da pele a uma taxa de 1.100 NMP.mL⁻¹, no trato gastrintestinal de < 3,0 até 9,5 x 10² NMP.100mL⁻¹, para água de enxaguadura da pele no músculo de < 3 até 6 NMP.g⁻¹ e de 1,2 x 10³ até 5,1 x 10³ NMP.g⁻¹ no trato gastrintestinal. Mas outros autores verificaram resultados diferentes, por exemplo, Almeida et al. (2002), não obtiveram confirmação para coliformes termotolerantes em pintados (*Pseudoplastystoma fasciatum*) comercializados em supermercados; e Vieira et al. (2000), verificaram um aumento de 3,0 até 4,3 x 10³ NMP.g⁻¹ coliformes termotolerantes ao longo da cadeia produtiva do pescado onde observaram precárias condições higiênicas e sanitárias na manipulação.

A pesquisa desse grupo de micro-organismos em alimentos fornece informações sobre as condições sanitárias do produto e é a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A RDC nº 12/2001 da ANVISA, não contempla limites para coliformes a 45°C em pescado *in natura* refrigerados ou congelados, não consumidos crus, preocupação aqui ressaltada, já que a população muitas vezes leva o peixe para sua residência em caixas com gelo no intuito de preparar o prato posteriormente. No entanto, para pescado consumido cru a legislação estabelece valores 10² NMP.g⁻¹ (BRASIL, 2001). Portanto, segundo a

legislação das 18 amostras de filés, 4 estavam impróprias para o consumo cru, sendo todas do pesque-pague Azul.

Outro levantamento feito foi se a temperatura influenciava na multiplicação do micro-organismo, como mostra a Tabela 10 contendo as temperaturas aferidas durante as colheitas das amostras. No Anexo II se encontram mais detalhes das temperaturas aferidas durante a pesquisa. Constatou-se que conforme o aumento de temperatura nos dias das colheitas, havia maior multiplicação de coliformes termotolerantes, principalmente nos filés, enquanto na superfície dos peixes havia o decréscimo da população isolada. Apesar de não ter sido encontrado trabalhos sobre tal grupo de micro-organismos, em pesque-pague com tilápias relacionando ao fator clima local, Fang et al. (2003) pesquisando frutos do mar e Nespolo (2012) pesquisando salmão (*Salmo salar*) constataram que temperaturas baixas como refrigeração e congelamento são fundamentais para a inibir a multiplicação de coliformes e até mesmo presença de *E. coli*, sendo que o congelamento o melhor dos tratamentos térmicos. Isso indica que quanto menor a temperatura, menor serão as chances de multiplicação do agente.

Sobre a presença de *Escherichia coli*, pode-se observar na Tabela 11 que 30 (83,33%) amostras apresentaram positividade para a espécie, sendo 12 (40%) amostras de filés e em 18 (60%) tilápias inteiras, ou seja, em todos os peixes inteiros foram encontrados *E. coli*, indicando que há um maior risco de ser encontrado o micro-organismo na pele do peixe que no filé. Comparando os estabelecimentos, houve maior presença de *E. coli* no pesque-pague Azul, apresentando presença do micro-organismo em 8 filés e todas as amostras de peixes inteiros, comparando com o pesque-pague Vermelho, onde houve presença de 4 isolados do gênero em filés e em todos os peixes inteiros.

Tabela 11. Isolamento de *E. coli* em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.

Colheitas	Pesque-pague Azul		Pesque-pague Vermelho	
	<i>E. coli</i> nos filés	<i>E. coli</i> nos peixes inteiros	<i>E. coli</i> nos filés	<i>E. coli</i> nos peixes inteiros
1	presença	presença	ausência	presença
2	presença	presença	presença	presença
3	ausência	presença	ausência	presença
4	presença	presença	ausência	presença
5	presença	presença	presença	presença
6	presença	presença	presença	presença
7	presença	presença	presença	presença
8	presença	presença	ausência	presença
9	presença	presença	ausência	presença

Há relatos de Pal e Dasgupta (1992) e Guzmán et al. (2004) que verificaram a concentração de *E. coli* nos diferentes órgãos do peixe, relacionando em seus estudos com a concentração presente dessa mesma bactéria na água. Concluíram que a água dos viveiros influencia diretamente na qualidade microbiológica do peixe e de seus produtos. Assim como Antonioli (1993), ao realizar trabalho sobre a qualidade da carne de carpa comum (*Cyprinus carpio*) alimentadas com dejetos e Easa et al. (1996), ao estudarem tilápias do Nilo tratadas com efluentes domésticos, observaram que a água influencia na condição microbiológica dos peixes. No entanto, Pilarski et al. (2004), ao analisarem amostras de músculo de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e água de viveiros fertilizados com dejetos de suíno, não verificaram relação entre a qualidade microbiológica da água e o músculo do peixe.

5.3.2 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Escherichia coli*

Sobre o antibiograma realizado, pode-se observar na Tabela 12 isolados resistentes a todos os antimicrobianos testados, porém também foi verificada suscetibilidade frente a alguns deles, sendo os mais eficazes em ordem decrescente foram cefepima (86,67%), ciprofloxacina (76,66%), ampicilina (73,33%), sulfazotrin (70%), neomicina (66,66%), tetraciclina (63,33%), cefalotina (60%), florfenicol (56,66%) e gentamicina (53,34%).

Tabela 12. Comportamento dos 30 isolados de *E. coli* obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Nº de isolados resistentes	Nº de isolados intermediários	Nº de isolados sensíveis
Ampicilina	5 (16,67%)	3 (10%)	22 (73,33%)
Cefalotina	4 (13,33%)	8 (26,67%)	18 (60%)
Cefepima	4 (13,33%)	-	26 (86,67%)
Ciprofloxacina	7 (23,34%)	-	23 (76,66%)
Florfenicol	8 (26,67%)	5 (16,67%)	17 (56,66%)
Gentamicina	12 (40%)	2 (6,66%)	16 (53,34%)
Neomicina	9 (30%)	1 (3,34%)	20 (66,66%)
Sulfazotrin	5 (16,67%)	4 (13,33%)	21 (70%)
Tetraciclina	8 (26,67%)	3 (10%)	19 (63,33%)

- não houve crescimento.

O florfenicol, a oxitetraciclina e a neomicina (este último é destinado a peixes ornamentais, que mesmo assim apresentou 30% de isolados resistentes) são as opções de antibióticos liberados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso na aquicultura. No entanto, na prática são empregadas muitas outras moléculas de forma indiscriminada e sem conhecimento dos potenciais riscos à saúde humana, dos peixes e de toda a biota aquática (PÁDUA et al., 2012), tanto que houve resistência a todos os antimicrobianos testados como já relatado.

Vasconcelos et al. (2010) em sua pesquisa com perfil de resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, relataram que a ampicilina apresentou eficiência de 100% sobre os isolados, contrariando a pesquisa aqui relatada onde houve resistência de 16,67%. Resultados semelhantes ao autor citado foram encontrados por Martinhago et al. (2008), ao avaliarem o perfil de suscetibilidade de *E. coli* isoladas do Lago Municipal em Cascavel, Paraná, porém Melo (2006) relatou também resistência a ampicilina de 20% em *E. coli* isoladas da lagoa do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. Essa diferença de relatos demonstra que a presença de organismos resistentes ou mais especificamente genes-resistentes na água doce varia de acordo com alguns parâmetros como, por exemplo, proximidade com áreas que utilizam antibióticos, como áreas de cultivo ou esgotos hospitalares, águas poluídas com esgotos industriais, devido aos metais contribuírem no aumento da resistência antimicrobiana ou, ainda, as diferentes estações do ano, sendo mais frequente o aumento da resistência no período chuvoso (PEAK et al., 2007).

Resistência às quinolonas, como a ciprofloxacina (23,34%) não tem sido associada à transferência gênica, como apontado por Vasconcelos et al. (2010), mas à expressão de uma capacidade intrínseca da *E. coli* em desenvolver resistência quando exposta a um ambiente com pressão seletiva. Essa pressão pode ser exercida por qualquer uma das quinolonas ou fluoroquinolonas, resultando em resistência a todo o grupo (WEBBER; PIDDOCK, 2001; SILVA et al., 2008). A ciprofloxacina é uma quinolona de segunda geração e a menor resistência observada ocorre porque essa droga se equivale às quinolonas de terceira geração e à sua potência mais diferenciada, principalmente contra enterobactérias e *Pseudomonas* spp. (TAVARES et al., 2009).

Quanto ao perfil de sensibilidade frente ao florfenicol (23,34%), acredita-se que este resultado está relacionado com a exposição dos isolados nas propriedades de onde os peixes foram colhidos. O florfenicol (D-(threo)-1-(methylsulfonylphenyl)-2-dichloroacetamide-3-fluoro-1-propanol) é caracterizado por ter alta disponibilidade em peixes, boa penetração nos tecidos e rápida eliminação (CARRASCHI, 2010). Ele apresenta amplo espectro, inibindo o metabolismo bacteriano através da interferência no processo da síntese de proteína, além disso, possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (o que não ocorre com a tetraciclina), sendo indicado para o tratamento de doenças bacterianas que acometem o cérebro (FIGUEIREDO et al., 2007). Mas o antimicrobiano é usado em demasia em ambientes aquícolas, o que leva à seletividade de cepas resistentes ao mesmo.

Resistência à tetraciclina e ao sulfazotrin foi observada em 26,67% e 16,67%, respectivamente, dos isolados. A tetraciclina é comumente utilizada como um antimicrobiano de primeira linha sendo, frequentemente, utilizada previamente à determinação do perfil de resistência do patógeno (SAYAH et al., 2005). A resistência a esse antimicrobiano é mediada por plasmídeos, que apresentam uma ampla variedade de determinantes genéticos. Estudos demonstraram que bactérias do solo ao adquirir resistência à tetraciclina quando exposta ao ambiente atua como reservatório de resistência aos animais hospedeiros (RYSZ; ALVAREZ, 2004; SAYAH et al., 2005).

5.4 Pesquisa de *Listeria* spp.

Foram encontrados 13 (36,12%) isolados de *Listeria* spp. a partir de 18 filés e 18 peixes inteiros. Dos filés foram 6 (46,15%) isolados de *Listeria* spp., já nos peixes inteiros foram 7 (53,85%). A Tabela 13 mostra os dados relatados. Do total encontrado do gênero foram confirmados 5 (38,46%) isolados de *Listeria monocytogenes*, em 2 (15,38%) filés e 3 (23,07%) peixes inteiros. É importante destacar que no pesque-pague Vermelho houve maior presença numérica do gênero, tanto nos filés quanto nos peixes inteiros, principalmente nas colheitas que não constatarem a presença de *Salmonella* spp., indicando assim que pode haver uma competição no meio.

Tabela 13. Isolamento de *Listeria* spp. em amostras de filés e peixes inteiros, colhidas em dois pesque-pague da microrregião interiorana do Estado de São Paulo, durante o período de setembro/2014 a fevereiro/2015.

Colheitas	Pesque-pague Azul		Pesque-pague Vermelho	
	<i>Listeria</i> spp. nos filés	<i>Listeria</i> spp. nos peixes inteiros	<i>Listeria</i> spp. nos filés	<i>Listeria</i> spp. nos peixes inteiros
1	ausência	ausência	ausência	ausência
2	ausência	ausência	ausência	ausência
3	ausência	ausência	ausência	ausência
4	presença	presença	ausência	presença
5	ausência	presença	ausência	presença
6	ausência	ausência	presença	presença
7	ausência	ausência	presença	presença
8	presença	presença	presença	ausência
9	ausência	ausência	presença	ausência

No pescado há maiores relatos do gênero relacionado aos produtos minimamente processados do que em produtos frescos (SONODA et al., 2000), entretanto, já houve relato do envolvimento deste tipo de alimento na transmissão da *Listeria monocytogenes* (FARBER, 2000). Mantilla et al. (2007) em uma pesquisa com diversos alimentos de origem animal, dentre eles o peixe, também observaram contaminação por *L. monocytogenes*, constatando que alimentos, especialmente os peixes livres de cocção, são veiculadores e transmissores de DTAs. Farber (2000) ainda cita em seus estudos sobre bacteriocinas com atividade antilisteriana para aplicação em pescado, como parte de estratégias de bioconservação, que consiste em explorar a capacidade dos micro-organismos inócuos, naturalmente presentes nos

alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir micro-organismos que são indesejáveis, quer sejam deteriorantes, quer sejam patogênicos (DE MARTINS et al., 2003).

O pescado na natureza encontra-se, teoricamente, livre dos micro-organismos patogênicos, sendo contaminado pelo homem através da poluição ambiental ou por meio da manipulação em condições higiênicas sanitárias ineficientes. Alguns micro-organismos patogênicos advêm do próprio local da pesca, como: *Clostridium botulinum*, *Vibrio* spp. e *Listeria* spp. (SANTOS; RAJADURAI, 1992).

5.4.2 Suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Listeria* spp.

Quanto aos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* em *Listeria* spp., pode-se afirmar que os antimicrobianos mais recomendados seguiram a ordem: gentamicina > ampicilina/neomicina > florfenicol > tetraciclina > cefoperazona, como demonstrado na Tabela 14, e os menos eficientes foram a ciprofloxacina e a cefalotina.

Tabela 14. Comportamento dos 13 isolados de *Listeria* spp. obtidos no trabalho frente aos antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Nº de isolados resistentes	Nº de isolados intermediários	Nº de isolados sensíveis
Ampicilina	3 (23,07%)	-	10 (76,93%)
Cefalotina	9 (69,24%)	1 (7,69%)	3 (23,07%)
Cefoperazona	4 (30,76%)	3 (23,07%)	6 (46,17%)
Ciprofloxacina	3 (23,07%)	6 (46,17%)	4 (30,76%)
Florfenicol	2 (15,38%)	2 (15,38%)	9 (69,24%)
Gentamicina	-	-	13 (100%)
Neomicina	3 (23,07%)	-	10 (76,93%)
Tetraciclina	5 (38,47%)	-	8 (61,53%)

- não houve crescimento.

Já fora citado que a *Listeria* spp. pode ser resistente aos mecanismos bactericidas de determinados antibióticos, por ser intracelular e usar essa mecânica para multiplicar-se e blindar-se, visto que os antimicrobianos se encontram no fluido extracelular e poucos são os agentes que podem penetrar, acumular e alcançar o citosol das células (CRESPO et al., 2003).

O tratamento das infecções causadas por *L. monocytogenes* é realizado a base de antibióticos como: penicilina, ampicilina, aminoglicosídeos, eritromicina, tetraciclina e trimetopim-sulfametaxazol (LABACVET, 2007; CRUZ et al., 2008). Os dados deste trabalho confirmam que o uso da ampicilina, da tetraciclina e dos aminoglicosídeos (neomicina e gentamicina) *in vitro* se mostraram eficazes no tratamento da *Listeria* spp., sendo a maior sensibilidade (100%) observada na gentamicina.

Considerando o perfil de resistência antimicrobiana, Yücel, Citak e Onder (2005) também isolaram espécies de *Listeria*, oriundas de produtos cárneos, evidenciando a multirresistência a mais de um agente antimicrobiano, principalmente frente à cefalotina. Por já serem utilizadas desde as décadas de 60, acredita-se que estes antibióticos estão perdendo a eficácia no combate ao micro-organismo evidenciando a resistência encontrada nesta pesquisa (69,24%).

Na pesquisa foi constatado também que as cefalosporinas de 3ª geração, cefoperazona no caso, utilizadas em grande parte para tratamento de meningites bacterianas (sendo a *Listeria* spp. uma das causadoras) em crianças (MAKWANA, RIORDAN, 2007), parece ter mostrado significativo resultado frente ao agente (46,17%), porém há ressalvas quanto ao seu uso já que demonstra isolados com relativa resistência (23,07%).

A ciprofloxacina é um antibiótico classificado como sendo do grupo das quinolonas e no trabalho constatou-se que houve sensibilidade moderada da *Listeria* (46,17%) frente a este antimicrobiano, o que corrobora com dados de Hansen et al. (2005), onde foi examinado a suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de *L. monocytogenes*, porém isoladas de pacientes em Denmark que apresentavam sintomatologia clínica da doença.

Na pesquisa foi relatado que houve sensibilidade de 69,24% das amostras frente ao uso de florfenicol, dados correspondentes também foram encontrados por Aarestrup, Knöchel e Hasman (2007) que pesquisaram, dentre outros antibióticos e produtos de origem alimentares, o efeito do florfenicol sobre o pescado.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

- De acordo com a legislação vigente para pescado *in natura*, das 36 amostras de filés e peixes inteiros, apenas 11 (30,55%) atendem ao estabelecido, destas 7 eram de filé e 4 de peixes inteiros, demonstrando que as amostras de filé apresentaram melhor qualidade microbiológica.

- As populações de coliformes termotolerantes foram verificadas em menores números nas amostras de filés, independente do pesque-pague, e a presença de *E. coli* foi mais verificada nas amostras de peixes inteiros.

- A *Listeria* spp. foi verificada em 13 (36,12%) amostras, sendo 6 (46,15%) dos filés e 7 (53,85%) dos peixes inteiros e a confirmação da presença de *Listeria monocytogenes*, ocorreu em 2 e 3, respectivamente.

- Através das análises microbiológicas realizadas foi possível concluir que as amostras de filé, independente do pesque-pague, apresentaram qualidade superior quando comparadas as amostras de peixes inteiros, sendo assim é possível afirmar que o ambiente onde as tilápias estão sendo criadas pode ser um agravante sobre qualidade microbiológica.

- A maioria dos antibióticos testados se mostrou eficaz perante cada um dos grupos de micro-organismos estudados, apesar de haverem isolados resistentes. Dos cinco antibióticos testados em comum com o grupo de isolados estudados, a ciprofloxacina e a gentamicina se destacaram no controle dos Gram-negativos, enquanto que a ciprofloxacina, o florfenicol e a tetraciclina se destacaram nos Gram-positivos.

Sabendo que o consumo desses animais se faz muitas vezes no próprio estabelecimento deve-se ter maior atenção quanto ao controle sanitário e inspeção veterinária, com especial atenção as DTAs carregadas pelo pescado como é o caso do gênero *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* e coliformes termotolerante, em especial *Escherichia coli*.

7 REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; KNÖCHEL, S.; HASMAN, H. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from food products. In: **Foodborne Pathogens and Disease**, Vol. 4, No. 2, 2007, p. 216-221.

AGNESE, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; SILVA, P. P. O., OLIVEIRA, G. A. Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Enumeração de Coliformes Totais e Fecais, em Peixes Frescos Comercializados no Município de Seropédica, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, vol. 15, nº88, setembro, p. 67-70. 2001.

ALCÂNTARA, E. C.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em luvas e máscaras descartáveis, em unidades de refeições transportadas, tipo marmitex. **Hig. Aliment.**, v.17, p.95-8, 2003.

ALEXY R, SCHÖLL A, KÜMPEL T, KÜMMERER K. **What do we know about antibiotics in the environment?** In: KÜMMERER, K., ed. Pharmaceuticals in the environment. 2.ed. Berlin, Springer-Verlag, p.209- 221. 2004.

ALMEIDA, E. S.; SIGARINI, C. O.; RIBEIRO, J. N.; DELMONDES, E. C.; STELATTO, E; ARAUJO JR., A. Características microbiológicas de "Pintado" (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuiabá - MT. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 84-88, ago. 2002.

ALOR, F. A. R. Controle microbiológico do pescado e derivados. **Simpósio sobre controle de qualidade, microbiológico, químico, físico e organoleptico de pescado e derivados**. Coordenador Felix Alejandro Ruiz Alor, ITAL Santos, 28 a 30 de novembro/1994, p. 5-10. 1994.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676 p. 2001.

AMPOFO, J. A.; CLERK, G. C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 667-675, 2003.

ANTONIOLLI, M. A. **Perfil microbiológico da carpa comum (*Cyprinus carpio*) in natura e da água dos viveiros procedentes de cultivo integrado com suínos**. 1993. 32 p. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Relatório de estágio supervisionado para habilitação em tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

BAIRD-PARKER, A. C. **Foodborne salmonellosis**. *Lancet*, London, v.336, n.8725, p.1231-1235, 1990.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES). **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. (2014). Disponível em: <http://www.bndespar.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3512.pdf> Acesso em: 20 de Jun. 2014.

BARROS, V.R.M.; PAVIA, P.C.; PANETTA, J.C. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. **Hig. Aliment.**, v.16, n.94, p.15-19, mar. 2002.

BARTZ, S. **Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação**. 2008. Dissertação. Curso de Nutrição. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BARZA, M.; TRAVERS, K. Excess infections due to antimicrobial resistance: the "Attributable fraction". **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n.3, p. 126–130, 2002.

BASTI, A.A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T.Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoke and salted Iranian fish. **Food Control**.17:183-8., 2006.

BASTOS, I. C. O.; LOVO, I. C.; ESTANISLAU, C. A. M.; SCOSS, L. M. Utilização de bioindicadores em diferentes hidrossistemas de uma indústria de papéis reciclados em Governador Valadares-MG. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 203- 211, 2006.

BENEVIDES, C.M.J.; LOVATTI, R.C.C. Segurança alimentar em estabelecimentos processadores de alimentos. **Higiene Alimentar**. v. 18, n. 125, p. 24-27, 2004.

BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA, Brasília. 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf> Acesso em: 9 de Jun. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº12, 2 jan. 2001. Aprova o **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária de Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Oficializado pela Instrução Normativa DAS nº62 de 26 de agosto de 2003. Brasília-DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - Brasil. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura** - Brasil - 2010. Brasília: MPA; 2012. 129p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura do Brasil. **Histórico**. 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gos.br/index.php/ministeriomp/historico1>>. Acesso em: 29 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6º ed. Brasília: 2005b. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf>. Acesso em 17 de dez 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. 2005a. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Diário Oficial da União,

Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/>. Acesso em 05 de jan. de 2015.

BURRIDGE, L.; WEIS, J. S.; CABELLO, F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, p. 7-23, 2010.

CABIANCA, M.A.A. **A comunidade zooplancônica de lagos de pesca da Região Metropolitana de São Paulo: aspectos ecológicos e sanitários**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2005.

CAMPO, L. F. C. **La Tilapia Roja**: una evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito. México, 147 p., 2008.

CARRASCHI, S. P. **Ecotoxicidade e eficácia da oxitetraciclina e do florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2010. 62f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal. 2010.

CASTAGNOLLI, N. **Aqüicultura para o ano 2000**. Brasília: CNPq, 95 p., 1996.

CASTAGNOLLI, N. Status of Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v.26, n.4, p.35- 39, 1995.

CASTRO, M.M.V.; IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 235-245, 1984.

CAVALLI, S. B. Segurança Alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 14. 2001.

CAVALLI, S. B.; SALAY, E. Segurança do alimento e recursos humanos: estudo exploratório em restaurantes comerciais dos municípios de Campinas, SP e Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**. V.18, n.126, p. 29-35, 2004.

CERUTTI, M. Programa de qualidade higiênica na produção avícola. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANASE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. cap. 1.4, p. 53-74.

COLE, D. W.; COLE, R.; GAYDOS, S. J.; GRAY, J.; HYLAND, G.; JACQUES, M. L.; DUNFORD, N. P.; SAWHNEY, C.; AU, W. W. Aquaculture: environmental, toxicological, and health issues. **International Journal Enviromental Health**, v. 212, p. 369-377, 2009.

COSTA, et al . Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 28, n. 10, p. 477-480, Oct. 2008.

CRESPO, M.P. et al. **Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un Hospital de tercer nivel.** Disponível em:<<http://simef.univalle.edu.co/colombiamed/VOL30NO2/listeria.html>>. Acessado em 12 de dez 2015.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alim. Nutr.**, v. 19, n. 2, p. 195-206, abr./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 de Alimentos**, v. 22, n. 3, 2002.

CUNHA, M.R.L.S.; PERESI, P.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO Jr., J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 70-74, 2006.

D'AOUST, J. Y. Methods for the detection of foodborne *Salmonella* spp: a review. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.26, Suppl. 2, p.195-208, 1995.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, n.1, p.11-31, 1994.

DEY, M.M.; GUPTA, M.V. Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction. **Aquac. Econ. Manag.**, Oxford, v.4, n.1, p. 5-11, 2000.

DIFCO. **Manual de bacteriologia: recopilación de técnicas**. Madrid: Valdemoro, 1978. p.340.

DONNELLY, C.W. et. al. *Listeria* spp. In: VANDERZANT, C. SPLITTSTOESSER, D.F. **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3 ed. Washington: APHA, 1992. 1912 p., cap.38, p. 637-664.

DOWBOR, L.; SACHS, I.; LOPES, C. **Riscos e oportunidades em tempos de mudanças**. São Paulo, Ed. e Livraria Instituto Paulo Freire; Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, 2010.

EASA, M.E.S.; SHEREIF, M.M.; SHAABAN, A.I. et al. Public health implications of waste water reuse for fish production. **Water Science Technology**, v.22, n.11, p.145-152, 1996.

EKPERIGIN, H. E.; NAGAJARA, K. U. *Salmonella*. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 17-29, 1998.

ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Avaliação dos impactos de pesque-pague: uma análise da atividade na Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu**. São Carlos: RIMA Editora, 2006. cap. 1, p. 9-16.

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.

FARBER, J.M. FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p.71, 2000.

FARBER, M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**. v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C. R.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella Enteritidis* strains isolated in São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FIGUEIREDO, H. C. P.. Columnariose: Doença da piscicultura moderna. **Panorama da aquicultura**, v. 17, n. 101, p. 32-37, mai./jun. 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.. Antibióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v.18, n.105, p.42-49, jan./fev. 2008.

FITZSIMMONS, K. 2000. **TILAPIA : The most important aquaculture species of the 21st Century**. Pp. 3-8. In: *Tilapia in the 21st Century: Proceedings of the Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Editor, Fitzsimmons, K. 2000. Ministry of Agriculture, Brazil. Rio de Janeiro.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Garantia da qualidade dos produtos da pesca. **Fisheries and Aquaculture Department**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P03.htm>. Acesso em 20 de abril de 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008, 182 p.

GANDHI, M.; CHIKINDA, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p.1-15, 2007.

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, Fernando. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GATTI-JUNIOR, P. **Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo**. 2011. 47 p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura, UNESP, Jaboticabal.

GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, J. C. F.; GERMANO, M. I. S. **Vigilância Sanitária dos Alimentos**, FSP/USP, 1997.

GUZMÁN, M.C.; BISTONI, M.A.; TAMAGNINI, L.M.; GONZÁLEZ, R.D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v.38, p.2368-2374, 2004.

HANSEN, J. M. et al. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. **APMIS**, v. 113, p. 31-36, 2005.

HEUER, O.E.; KRUSE, H.; GRAVE, K.; COLLIGNON, P.; KARUNASAGAR, I.; ÂNGULO, F.J. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical infectious diseases**: an official publication of the Inf Dis. Soc. Am.; 49(8):1248–53. 2009.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p.,1994.

HUSS, H. H. **Garantia da Qualidade dos Produtos da Pesca: Documento Técnico sobre as Pescas**, nº334, FAO, Roma, 1997, 176p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Estatística da Pesca 2005: Grandes regiões e unidades da federação**, Brasília, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). PORTARIA Nº 136/98, de 14 de Outubro de 1998. **Estabelece normas para registro de Aquicultor e Pesque-pague no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.** Brasília, 1998. Disponível em: http://www.crmvgo.org.br/legislacao/2_AQUICULTURA/Portaria_136_14_10_1998.doc. Acesso em 20 de julho de 2015.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMFS). **Microorganismos de los alimentos: su significado y metodos de emuneración.** 2 ed. Zaragoza: Acribia, 367 p. 2000.

JAY, J.M. Listerioses de origem animal. In: **Microbiologia de alimentos.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 25, p. 517-542. 2005.

JIMENEZ, C. 1998. **Pesca amadora abre boas oportunidades.** <http://www.estado.com.br/jornal/suplem/pain/97/04/29/pain011.html>. 21/08/98. Acesso em: 5 de Jan. 2015.

KAPPERUD, G. et al. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60 megadalton virulence plasmid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.12, p.2579-2601, 1990.

KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50:1156-1163. 2006.

KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. **Antimicrob Agents Chemother**, 48: 615–8. 2004.

KLUCZYNIK, C.E; SOUZA, J.H.; PALMEIRA, J.D., et al. Perfil de sensibilidade de *Salmonella* sp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais. **Rev Bras Anal Clin.** 42(2):141–144. 2010.

KUBTIZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: F. Kubtiza, 2000, 289p.

LABACVET. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Gênero *Listeria* spp., 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/listeria.pdf>> Acesso em: 04 de out. 2015.

LAGANÀ, P.; CARUSO, G.; MINUTOLI, E.; ZACCONE, R.; DELIA, S. Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. piscicida strains isolated from Italian aquaculture farms. **New Microbiologica**. 34:53-63. 2011.

LEVENHAGEN, RENATA SAVARINO. **Produção científica no tema “pescado: alimento para consumo humano” – período de 2002 a 2012**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

LORENZON, C. S.; GATTI JÚNIOR, P.; NUNES, F. R.; SCHOLTEN, C.; HONDA, S. N.; AMARAL, L. A. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 617-624, 2010.

LOURENÇO, M. C. et al . Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella Minnesota* em frangos de corte. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 11-14, Jan. 2013 .

LOVETT, J.; TWEDT, R.M. Bacteria associated with foodborne diseases *Listeria*. **Food Technology**. v. 42, n. 2, p. 188-191, 1988.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312p.

MACEDO, C. F.; TAVARES, L. H. S. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n.2, p. 149 – 163, 2010.

MAISTRO, Liliane Correa. Alface minimamente processada: uma revisão. **Rev. Nutr.** São Paulo, v.14, n. 3, p. 219-224, set. /dez. 2001.

MAKWANA, N.; RIORDAN, F.A. Bacterial meningitis: the impact of vaccination. **CNS Drugs**.21:355---66. 2007

MARTH, E. H. Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, n. 51, p. 165-168, 1988.

MARTINHAGO, M.W.; BUZANELLO, E.B.; ALMEIDA, M.M.; PINTO, F.G.S. Avaliação do perfil de susceptibilidade das cepas de *Escherichia coli* isoladas da água do lago municipal de Cascavel, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, p.62-62, 2008. Suplemento 1.

MARTINHAGO, M.W.; BUZANELLO, E.B.; ALMEIDA, M.M.; PINTO, F.G.S. Avaliação do perfil de susceptibilidade das cepas de *Escherichia coli* isoladas da água do lago municipal de Cascavel, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, p.62-62, 2008. Suplemento 1.

MASTER, P. A.; O'BRIAN, T. A.; ZURLO, J.; MILLER, D. Q., JOSHI, N. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. **Archives of Internal Medicine**. 163:402-410. 2003.

MCCLAIN, D.; LEE, W. H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71:660-4. 1988.

MELO et al. **Guia Antimicrobianos**. 1.ed. - Goiânia, 2012. Disponível em: <https://farmacia.hc.ufg.br/up/734/o/Guia_de_Antimicrobianos_do_HC-UFG.pdf?1409055717>. Acesso em: 18 de out. 2015.

MELO, S.K. **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce – MG**. 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Curso de Engenharia Ambiental da Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2006.

MIRANDA, L. K.; DAMASCENO, K. S. F. S. C.; CARDONHA, A. M. S. Panos de prato e mãos de manipuladores: avaliação das condições higiênico-sanitárias. **Hig. Aliment.** v. 1, n. 102/103, p. 51-58, 2002.

MURATORI, M. C. S. 200. **Consórcio suíno e peixe: risco ambiental e sanitário: proposta alternativa para descontaminação**. Belo Horizonte, 71p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais. 2000.

MURATORI, M.C.S.; COSTA, A.P.R.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, P.C.; de PODESTE Jr. R.L. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116-117, p. 50-54, 2004.

NAGHMOUCHI, K.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Class I/Class II a bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, 24: 718–727. 2007.

NESPOLO, N. M.; MARTINELLI, T. M.; Y ROSSI JR, O. D. Microbiological quality of salmon (*Salmo salar*) sold in cities of the state of São Paulo, Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, pp. 1393-1400. 2012.

OLIVEIRA, A.N. 1993. **Bactérias do Gênero *Listeria* em Leite e derivados no Comércio Varejista de Goiânia – Goiás**. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte. 1993.

OLIVEIRA, L.H.; FUKUSHIMA, S.E. Sistema Integrado de Gestão: O Caso dos Pesqueiros na Região da Grande São Paulo. **R. Un. Alfenas**, 4: 217-224. 1998.

PÁDUA, S. B.; FILHO, R. N. M.; CRUZ, C.. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. **Panorama da Aquicultura**. p.30-37, nov./dez. 2012.

PAL, D.; DASGUPTA, C. Microbial pollution in water and its effect on fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 4, p. 32–39, 1992.

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*

importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1996.

PEAK, N.; KNAPP, C.W.; YANG, R.K.; HANFELT, M.M.; SMITH, M.S.; AGA, D.S.; GRAHAM, D.W. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. **Environmental Microbiology**, v.9, p.143-151, 2007.

PEELER, EJ; MURRAY, AG; THEBAULT, A; BRUN, E; GIOVANINNI, A; THRUSH, MA. The application of risk analysis in aquatic animal health management. **Prev Vet Med**. 2007, 81:3-20.

PEREIRA, K.S.; PEREIRA, J.L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n.129, p. 32-34, 2005.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella Enteritidis*. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

PEZZATO, L. E.; SCORVO FILHO, J. D. Situação atual da aquicultura na região sudeste. In: **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 203-323, 2000.

PIDDOCK, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps-not just resistance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, p.629-635, 2006.

PIEDRAHITA, R. H. Reducing of environment impacts of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. **Aquaculture**, v. 226, p. 35-44, 2003.

PILARSKI, F.; TOMAZELLI JÚNIOR, O.; CASACA, J.M.; GARCIA, F.R.M.; TOMAZELLI, I.B.; SANTOS, I. R. Consórcio suíno-peixe: aspectos ambientais e qualidade do pescado. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, n. 2, 2004.

PINTO, A. D. M. 1996. **Doenças de Origem Microbiana Transmitidas pelos Alimentos**. Disponível em: <http://ipv.pt/millennium/Millennium_4.htm>. Acesso em 23 de Mai. 2015.

POPMA, T.J.; LOVSHIN, L.L. Tilápia especial. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v.5, n.27, p. 7-13, 1995.

PUI, C.F.; WONG, W.C.; CHAI, L.C.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; NOOR, H.M.S.; UBONG, A.; FARINAZLEEN, M.G.; CHEAH, Y.K.; SON, R. *Salmonella*: a foodborne pathogen. **Int Food Res J.** 2011;18:465-73.

REGATTIERI, A.; GAMBERI, M.; MANZINI, R. Traceability of food products: General framework and experimental evidence. **Journal of Food Engineering**, London, v. 81, p. 347-356, 2007.

Regulamento da Comissão (CEE) n.o 2377/90 de 26 de Junho de 1990. 1-143. RIBEIRO, Márcio G. et al . Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 155-160, Feb. 2010.

ROCHA FAG, ARAÚJO LO, ALVES KS, DANTAS LIS, SILVA RP, ARAÚJO MFF. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **Holos.** 1:84-91. 2013.

ROCHA, K. S.; SILVA, R. V.; FREITAS, R. R. Uma análise da percepção ambiental e transformação socioeconômica de uma comunidade de pescadores artesanais em região estuarina no sudeste do Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 12, n. 4, p. 535-543, 2012.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C.; NAVARRETE P. Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives; In: Carvalho E, editor. **Health and Environment in Aquaculture.** 2012.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma.** São Paulo: Atheneu; 2005.

RYSZ, M.; ALVAREZ, P.J.J. Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. **Water Research**, v.38, p.3705-3712, 2004.

SAMELIS, J.; SOFOS, J.N., KAIN, M.L., SCANGA, J.A., BELK, K.E., & SMITH, G.C. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4 C in vacuum packages. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 299-307, 2002.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; TAMANINI, R.; SILVA, W.P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTOS, C. A. L.; RAJADURAI, N. R. The Need for Fish Inspection and Quality Assurance: **FAO/INFOFISH Technical Training Manual 1**, Malásia, 33p. 1992.

SANTOS, D. M. S. et al. *Salmonella* in broiler frozen carcasses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SAYAH, R.S.; KANEENE, J.B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.3, p.1394-1404, 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim eletrônica epidemiológico**: Vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999-2004. V. 5, n.6, 2005.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S. SHAPE, M.E. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians e Wilkins, 1996, v. 2, p. 1235- 1245.

SEYOUM, S.; KORNFIELD, I. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v.102, p. 29-42, 1992.

SILVA, D.G.; FAGLIARI, J.J.; GARCIA, T.B. Comparação da eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella Dublin*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.3, p.766-768, 2008.

SILVA, E. N. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9, p.7-13, 1995.

SILVA, F.F.P.; SANTOS, M.A.A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.762-765, 2008.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SONODA, D. Y.; FILHO, J. D. S.; SHIROTA, R.; CYRINO, J. E. P. **Situação atual e perspectivas da comercialização do pescado no Estado de São Paulo**. 2000. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/Socio/SONODA-021.pdf>>. Acesso em: 12 de mai. 2015.

SPERBER, W.H.; TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, v.29, p.502-505, 1975.

SPERS, E. E.; KASSOF, A. L. A segurança dos alimentos: uma preocupação crescente. **Hig. Aliment.** n. 44, p. 18-21, 1996.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 599p.

TAVARES, W. **Resistência bacteriana**. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos 3ª ed. Atheneu, São Paulo. p. 79, 2001.

TAVECHIO, M.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L.; alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 35(2): 335 - 341, 2009.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; ZANATTA, G.F. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. **Hig. Aliment.**, v. 17, n. 107, p. 52-55, abr. 2003.

VASCONCELOS, F.R.; REBOUÇAS, R.H.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; DE SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Inácio, Ceará, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.405-410, 2010.

VENTURIERI, R. **Pesque-pague no Estado de São Paulo: eco-associação para estudos do ambiente**, Ipsis Gráfica e Editora, 1 ed. 200p., 2002.

VIEIRA, K.V.M; MAIA, D.C.C.; JANEIRO, D.I.; VIEIRA, R.H.S.F.; CEBALLOS, B.S.O. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filé congelados. **Higiene Alimentar**, v.14, n.74, p.37-40, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. Livraria Varela, São Paulo, 2004, 380p.

VIEIRA, R.H.S.F.; OLIVEIRA, R.A. Avaliação do grau de contaminação fecal da água e do camarão sossego (*Macrobrachim jelskii*), na Lagoa de Parangaba (Fortaleza, Ceará). **Hig. Aliment.**, v. 15, n.80/81, p. 69-74, jan./fev. 2001.

WEBBER, M.; PIDDOCK, L.J.V. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. **Vet. Res.**, v.32, p.275-284, 2001.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, 12: 3-7, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): **Food safety and foodborne illness**. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>>. Acesso em 02 de out. 2015.

YUCEL, N.; CITAK, S.; ONDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v. 22, p. 2-3, 2005.

8 IMPLICAÇÕES

De forma geral, os resultados encontrados neste trabalho, para os parâmetros higiênicos-sanitários, demonstraram que esses aspectos durante o comércio da tilápia em filé e *in natura* não estão sendo cumpridos, aumentando os riscos de ocorrência de DTAs entre os consumidores. Com isso, os resultados alertam para um controle nas etapas de criação e comércio do peixe, assim como na fiscalização.

Critérios para a prevenção da ocorrência desses micro-organismos no peixe devem ser estabelecidos durante a criação, enfocando a qualidade da água utilizada nos tanques e o controle das cargas poluidoras presentes no seu ambiente de entorno (como os animais, lixo, plantações próximas aos tanques). Tais conceitos deveriam ser empregados por meio de uma assistência técnica terceirizada (empresa administrativa ligada ao assunto), fiscal sanitário do município ou por um profissional (veterinário ou zootecnista) especialista na área, orientando o produtor na administração local, instalação dos tanques e fiscalização da água.

Além disso, as populações microbianas encontradas no filé e na água de enxaguadura do peixe inteiro também demonstraram que a manipulação e utilização de equipamentos indevidamente higienizados podem estar sendo um veículo de transmissão de possíveis DTAs. Para isso, será necessário capacitar os manipuladores através de cartilhas e orientações dadas pelos profissionais no assunto, descritos anteriormente.

A presença de *Listeria* spp. nas amostras estudadas comprova que a higiene local deve ser reavaliada e uma fiscalização deveria ser exercida nesses estabelecimentos, no intuito de haver uma diminuição do risco de contaminação entre os consumidores desse produto, uma vez que os micro-organismos estudados no presente trabalho podem colocar em risco a saúde dos consumidores. Sugere-se também uma revisão na legislação vigente, enfocando a incorporação deste micro-organismo, visto sua importância e a presença nas amostras analisadas.

A ocorrência de resistência a antimicrobianos entre os isolados estabelecidos pela legislação vigente (ECP e *Salmonella* spp.) demonstra que o uso de compostos farmacológicos pode estar sendo realizado durante a criação das tilápias, ou então pode já haver pré-seleção e multiplicação de agentes resistentes oriundos de fatores externos (bactérias veiculadas pelas aves, pelos cães, pelos anfíbios que circulam próximo ou então dentro dos tanques). Para um controle desses fármacos na criação, sugere-se a elaboração de uma normativa que estabeleça parâmetros específicos para o uso desses compostos na criação das tilápias, assim como fiscalização da ração (que incorpora determinados fármacos como medida de profilaxia) e dos animais no entorno dos tanques.

Apesar das instruções normativas existente, planos governamentais e órgãos públicos voltados para os aquicultores e pescadores, pouco se viu ser cumprido nos estabelecimentos, que por vezes buscam auxílio de prefeituras e secretarias de vigilância ambiental e sanitária, mas não obtém retorno por falta de conhecimento da equipe ou por falta de profissionais devidamente qualificados e especializados no assunto. Isso prova que há necessidade de se implantar na base acadêmica (faculdades e universidades) cursos/tópicos específicos voltados para piscicultura. Além disso, a burocracia existente e a falta de uma fiscalização mais rigorosa deixam lapsos na cadeia produtiva desses locais, e a falha desse setor é sentida por toda a população, já que o consumo desse alimento se torna um risco à saúde pública.

ANEXO I

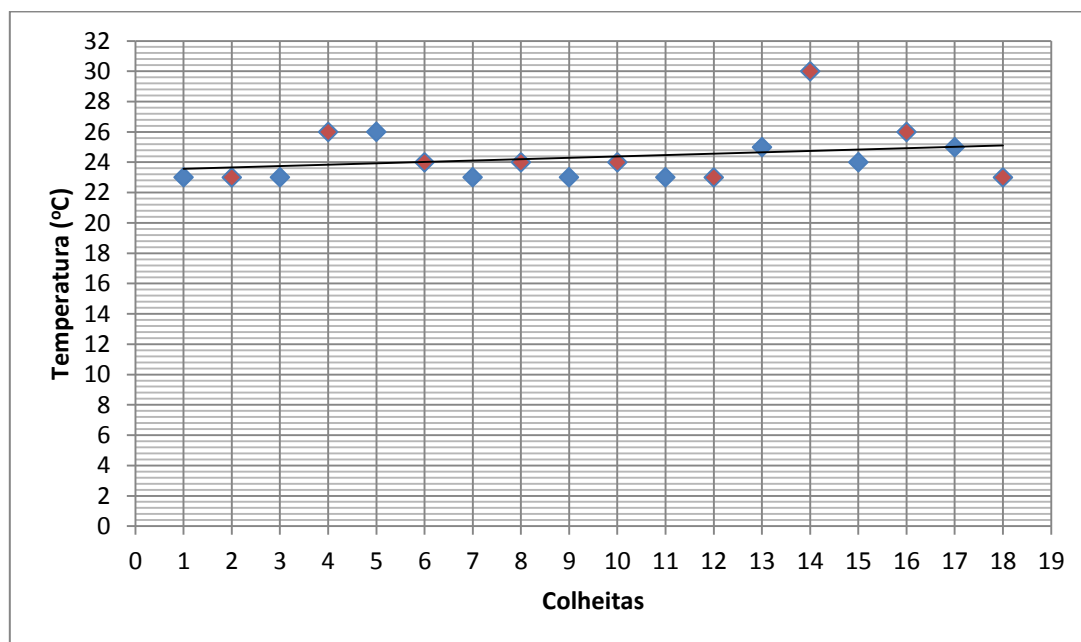


Figura 12. Gráfico contendo as temperaturas apuradas durante as colheitas das amostras. Pontos azuis representam as temperaturas no pesque-pague Azul, pontos vermelhos representam a temperatura no pesque-pague Vermelho. A linha preta representa a tendência geral dos dados apurados.

ANEXO II

Tabela 15. Temperatura ambiente verificada nos dois estabelecimentos, nos dias das colheitas, ocorridas durante o período de setembro de 2014 a fevereiro de 2015.

Pesque-pague	Colheitas	Temperatura ambiente (°C)	Média (°C)
Azul	1	23	23,88±1,16
	2	23	
	3	26	
	4	23	
	5	23	
	6	23	
	7	25	
	8	24	
	9	25	
Vermelho	1	23	24,77±2,27
	2	26	
	3	24	
	4	24	
	5	24	
	6	23	
	7	30	
	8	26	
	9	23	