

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E
OCORRÊNCIA DE *Aeromonas* sp. E
Escherichia coli EM TILÁPIAS
COMERCIALIZADAS NO VAREJO**

Mayhara Martins Cordeiro Barbosa

Jaboticabal, São Paulo

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E
OCORRÊNCIA DE *Aeromonas* sp. E
Escherichia coli EM TILÁPIAS
COMERCIALIZADAS NO VAREJO**

Mayhara Martins Cordeiro Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo

2013

B238q Barbosa, Mayhara Martins Cordeiro
Qualidade higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas* sp. e
Escherichia coli em tilápias comercializadas no varejo / Mayhara Martins
Cordeiro Barbosa. -- Jaboticabal, 2013
xix, 91 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2013

Orientador: Luiz Augusto do Amaral

Banca examinadora: Fernanda de Rezende Pinto, Fabiana Pilarski,
Karina Paes Bürger, Manoel Victor Franco Lemos

Bibliografia

1. Pescado. 2. PCR multiplex. 3. *Staphylococcus* sp. 4. Coliformes.
5. Resistência antimicrobiana. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de
Aquicultura.

CDU 639:31:614.31

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 higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli* em tilápias comercializadas no varejo

AUTORA: MAYHARA MARTINS CORDEIRO BARBOSA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

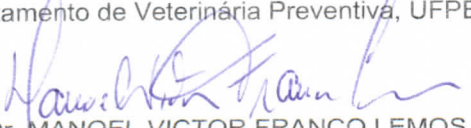
Laboratório de Patologia de Peixes / CAUNESP, Jaboticabal-SP


Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. FERNANDA DE REZENDE PINTO

Departamento de Veterinária Preventiva, UFPEL, Pelotas-RS


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 25 de novembro de 2013.

Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei
como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar, e conheça todos os mistérios e toda a
ciência, e ainda que tenha tamanha fé, a ponto de transportar os montes, se não tiver
amor, nada serei.

E ainda que distribua todos os meus bens entre os pobres, e ainda que entregue o
meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará.

O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se
ensoberbece,
não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se exaspera,
não se ressentido do mal.

não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade;
tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais acaba; mas havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas,
cessarão; havendo ciência, passará,

porque, em parte conhecemos e, em parte profetizamos;

Quando, porém, vier o que é perfeito, então o que é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino; sentia como menino, pensava como menino;
quando cheguei a ser homem, desisti das coisas próprias de menino.

Porque, agora, vemos como em espelho, obscuramente, então veremos face a face.

Agora, conheço em parte, então conhecerei também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é
o amor.

(I Coríntios 13:1,2)

DEDICATÓRIA

Esta etapa da minha vida é parte da dedicação de uma mulher em educar. Por isso, dedico minha formação à minha tia Ivone Cordeiro Barbosa.

Aos meus pais, *in memoriam*, por me proporcionarem o dom da vida e o do amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, Deus, por me guiar e proteger.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral pela oportunidade dada e pela compreensão. Um verdadeiro mestre, sempre com sua simplicidade em ensinar a essência da vida, mas com palavras e atitudes que construíram, em mim, uma pessoa melhor.

Aos professores Fernanda Pinto, Manoel Victor, Fabiana Pilarski e Karina Bürger pelas sugestões dadas para a melhoria deste trabalho.

À minha família. Ao meu irmão Valter por me ajudar na leitura desse trabalho e por suas sugestões para a estatística. Aos meus irmãos Jonathan e Liz por me fazerem feliz e à minha mãe Gal por tudo. Cada um, de sua maneira, me ajudou na construção desta etapa.

À família Cordeiro Barbosa. Minha vó, tio, tias e primos por tanta energia boa e orações que me fortaleceram. Agradeço à minha tia Socorro pela torcida e carinho que sempre demonstrou por mim.

À minha tia Ivone por ser meu porto seguro.

Aos primos Marcelo e Michelly por todo apoio em Jaboticabal.

Aos meus tios Martins e Clevandi pelo apoio e amor.

À amiga Helen pelo companheirismo. Sua presença no dia a dia tornou tudo mais fácil. Agradeço sua ajuda nas coletas e análises, mas, acima de tudo, sou grata por sua amizade incondicional e por em diversos momentos ser minha família em Jaboticabal.

À amiga Fernanda que desde o início foi essencial para a ideia e execução desse trabalho com suas sugestões e força de vontade em ajudar. A amizade construída durante todo esse tempo me fez melhor em todos os sentidos e me fortaleceu para seguir em frente.

À amiga Laryssa por fazer tudo por mim. Agradeço sua disposição em fazer o que era necessário para a execução desse trabalho e por sempre ser a pessoa que eu podia aperrear sem limites. Seu coração me mostrou como ser melhor.

Às amigas Josi e Iara, companheiras de moradia, por dividirem comigo o dia a dia, pela ajuda nos momentos difíceis e por toda acolhida.

Às meninas do Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água, Juliana, Natália, Susana e Letícia pela ajuda nas coletas e análises.

Às meninas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Viviane, Sandrinha, Rejeana, Bruna e Thais por toda ajuda na elaboração do projeto.

Ao técnico Luizinho do Departamento de Engenharia Rural pelo apoio.

Aos técnicos Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Jr. (Diba), do Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal, pelo suporte dado.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp e aos funcionários da seção de Pós-Graduação, pela ajuda e esclarecimentos fornecidos.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Engenharia Rural por todo apoio.

Ao Zé Renato Zanini por toda acolhida e pela ajuda.

Ao amigo Sr. Zé por todos os momentos vividos.

À dona Lenita, dona Silvia e sr. Vicente por todo carinho e por tantas vezes se demonstrarem preocupados e participativos na minha jornada.

Ao Instituto Federal do Ceará pela oportunidade de poder cumprir essa fase.

A todos que de alguma forma se fizeram presente na minha vida durante esta jornada. Na realidade, não teria sido capaz de exercer esse trabalho sem a ajuda de tantos que com pequenos gestos se fizeram importantes.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral	1
Revisão Bibliográfica	3
Produção aquícola.....	3
Consumo do pescado.....	4
Higiene, conservação e manipulação do pescado.....	5
Deterioração do pescado.....	8
Doenças Transmitidas por Alimentos.....	9
O pescado e os microrganismos.....	11
<i>Salmonella</i> sp.....	14
<i>Staphylococcus</i> sp.....	16
<i>Aeromonas</i> sp.....	17
Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	19
Utilização de antimicrobianos na atividade aquícola	23
Objetivo Geral	26
Objetivos Específicos	26
Referências Bibliográficas	27
Manuscrito I	42
Resumo	43
Abstract.....	43
Resumen.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos	47

Resultados e Discussão.....	49
Referências Bibliográficas.....	61
Manuscrito II.....	67
Resumo	68
Abstract.....	69
Introdução.....	70
Material e Métodos	72
Resultados e Discussão.....	74
Referências Bibliográficas.....	83
Consideração Final.....	90

LISTA DE TABELAS

Introdução

	Página
Tabela 1. Bactérias patogênicas presentes no pescado.....	13

Manuscrito I

	Página
Tabela 2. Populações de Coliformes Totais (CT), Coliformes Termotolerantes (CTT), <i>Staphylococcus</i> sp. (STA), <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos (STA C+), <i>Aeromonas</i> sp. (AERO) e <i>Escherichia coli</i> nas amostras de tilápia in natura e em filé dos dez estabelecimentos pesquisados.....	57
Tabela 3. Média Logarítmica das concentrações encontrados para Coliformes Totais (CT), Coliformes Termotolerantes (CTT), <i>Staphylococcus</i> sp. (STA), <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos (STA C+) e <i>Aeromonas</i> sp. (AERO) nas amostras de tilápia in natura e em filé dos dez estabelecimentos pesquisados.	58

Manuscrito II

	Página
Tabela 1. Número (N) das espécies de <i>Aeromonas</i> sp. isoladas das amostras das tilápias comercializadas no varejo em forma de filé e in natura.....	78
Tabela 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos pesquisados das espécies de <i>Aeromonas</i> sp. isoladas das tilápias comercializadas no varejo.....	79
Tabela 3. Índice MAR encontrado nas espécies de <i>Aeromonas</i> sp. isoladas das tilápias comercializadas no varejo.....	82

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito I

	Página
Figura 1. PCR Multiplex para a detecção dos genes patogênicos de <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 2. Isolados de <i>Escherichia coli</i> em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.	59

RESUMO

O desenvolvimento da aquicultura ocasionou o aumento da oferta do pescado em comércios varejistas. Entretanto, esse produto requer atenção para que não ocorra contaminação por microrganismos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi identificar microrganismos indicadores de qualidade sanitária (*Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* sp.) e qualidade higiênica (coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* sp.) em tilápias comercializadas no varejo, além de verificar a ocorrência de *Escherichia coli* patogênica e *Aeromonas* sp. Para isso, a colheita da tilápia, na forma de filé e *in natura*, foi realizada em dez estabelecimentos de municípios da região Nordeste do Estado de São Paulo. Para a caracterização da *Escherichia coli* patogênica, os genes pesquisados foram: *stx1*, *stx2*, *eae*, *eltB*, *estA*, *estB*, *aggR* e *aafl* por PCR multiplex. Além disso, os isolados obtidos de *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli* foram submetidos ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Os resultados para *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positivos estiveram de acordo com a legislação brasileira. Entretanto, foram encontradas altas populações de *Aeromonas* sp., coliformes totais e termotolerantes. A partir das amostras, foi possível obter 216 isolados de *Escherichia coli* e 96 isolados de *Aeromonas* sp. Cinco isolados de *Escherichia coli* apresentaram genes codificadores de fatores de virulência (*estA* e *eae*). Em relação aos isolados de *Aeromonas* sp., as espécies mais frequentes foram *Aeromonas trota* (50%), *Aeromonas veronii biovar sobria* (28%) e *Aeromonas schubertii* (17%). De forma geral, as maiores frequências de isolados resistentes foram observadas para os antimicrobianos ampicilina 10µg, amoxicilina + ácido clavulânico 20µg, cefalotina 30µg, cefoxitina 30µg, cefuroxima 30µg e cotrimoxazol 25µg. Além disso, foi possível observar múltipla resistência entre os isolados. Assim, esta pesquisa alerta para a manutenção das práticas sanitárias e higiênicas na produção aquícola e venda do pescado devido à presença de microrganismos patogênicos e com múltipla resistência aos antimicrobianos avaliados.

Palavras chave: Pescado, PCR multiplex, *Staphylococcus* sp., coliformes, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Aquaculture development contributed to increase the fish supply at retail. However, this product requires attention to avoid contamination by microorganisms. The objective of this research was to identify microorganisms that indicate hygienic (*Staphylococcus* coagulase positive and *Salmonella* sp.) and sanitary (total coliforms, fecal coliforms and *Staphylococcus* sp.) quality in tilapia that were sold at retail. In addition, it was verified the occurrence of pathogenic *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp. the sample included tilapia fillets and *in natura* that was obtained from ten establishments in São Paulo State, Brazil. For the characterization of pathogenic *Escherichia coli*, the genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *eltB*, *estB*, *estA*, *aggR* and *aafI* were studied. In addition, the isolates obtained from *Aeromonas* sp. and *Escherichia coli* were tested for antimicrobial susceptibility. The results for *Salmonella* sp. and *Staphylococcus* coagulase positive were in accordance with Brazilian regulation. However, we found high populations of *Aeromonas* sp., total and fecal coliforms. The sample allowed to obtain 216 *Escherichia coli* strains and 96 *Aeromonas* sp. strains. Five *Escherichia coli* strains presented genes that were virulence factors coders (*eae* and *estA*). Compared to isolates of *Aeromonas* spp., the most frequent species were *Aeromonas trota* (50%), *Aeromonas veronii biovar sobria* (28%) and *Aeromonas schubertii* (17%). In general, higher frequency of resistant isolates was observed in antimicrobials ampicillin 10µg, amoxicillin + clavulanic acid 20µg, cephalothin 30µg, cefoxitin 30µg, cefuroxime 30µg and cotrimoxazol 25µg. Moreover, it was possible to observe multiple resistance among isolates. In conclusion, the maintenance of health and hygiene practices both in aquaculture and fish sales is necessary because the presence of pathogenic microorganisms with multiple resistances to antimicrobials tested.

Keywords: Fish, multiplex PCR, *Staphylococcus* sp., coliforms, antimicrobial resistance.

Introdução Geral

Os peixes e os produtos obtidos por meio da atividade pesqueira destacam-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal (GIOVANINI et al., 2012). Assim, a procura por este tipo de alimento como alternativa ou em substituição a outras fontes de proteínas aumentou consideravelmente nos últimos anos, o que levou a ampliação da produção aquícola, principalmente em países em desenvolvimento (SILVA et al., 2008).

Com isso, o consumo de pescado pode ser influenciado por diversos fatores, dos quais se destacam os socioeconômicos, os padrões de consumo alimentar, características pessoais e estado de saúde (TRONDSEN et al., 2003). Registra-se que o consumo mundial de pescado aumentou de 9,9 kg/per capita/ano em 1960 para 18,4 kg/per capita/ano em 2009 (FAO, 2012).

O pescado pode ser adquirido em diversas formas de comércio, especializados ou não, como peixarias, sacolões, supermercados e feiras livres. Em geral, pode ser vendido inteiro ou na forma de filé e pode estar in natura, (“peixe fresco”) refrigerado ou congelado (RODRIGUES et al., 2004).

Entretanto, semelhantes aos demais produtos alimentícios, o pescado cuja a presença está sujeito à contaminação pelos mais variados microrganismos. A presença desses microrganismos evidencia falhas em alguma das etapas da cadeia do pescado, pois podem ser adquiridos já no ambiente aquático ou durante as diferentes etapas de captura, transporte e distribuição (VALLANDRO et al., 2011).

Além disso, por ser um alimento de fácil decomposição, o pescado exige cuidado especial, notadamente os relacionados com a conservação pelo frio. Além do mais, o conceito de qualidade engloba o fator inocuidade, ou seja, o alimento deve ser sadio, sem causar danos à saúde do consumidor final. Este aspecto é uma condição essencial para a “boa qualidade” dos produtos da pesca e aquicultura (GONÇALVES, 2011).

No entanto, esses alimentos têm sido associados a doenças humanas e são veículo de transmissão de microrganismos patogênicos e intoxicações, constituindo-se num problema de saúde pública (LORENZON et al., 2010).

Alguns desses microrganismos contaminantes do alimento são patogênicos, enquanto outros não causam enfermidades nos seres humanos, mas são indicadores de condições higiênicas inadequadas, sendo sua presença sugestiva da existência de microrganismos patogênicos (BASTI et al., 2006).

A contaminação com patógenos de reservatórios animal/humano, como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, pode ocorrer na pré ou pós-captura do pescado, enquanto a manipulação inadequada durante o preparo pode introduzir no alimento *Staphylococcus aureus* de origem humana, dentre outros (MILLARD e ROCKLIFF, 2003).

Portanto, os problemas de saúde ocasionados pelo consumo de pescado se devem, principalmente, a prática deficiente na produção, transporte e armazenamento, razão pela qual a segurança alimentar vem ganhando espaço e atenção global, devido à ocorrência de doenças transmitidas pelos alimentos (DTA's). No Brasil, a ocorrência de DTA's é bastante comum, embora não seja dada a devida importância pela população dos diversos níveis socioeconômicos (BARRETO et al., 2012).

De forma diferente, em países onde se mantém o registro das doenças veiculadas por alimentos, o pescado contribui significativamente para os casos de surtos relatados, variando de um país para outro, dependendo do clima, costume alimentar e outras diferenças sociais (JANDA e ABBOTT, 2011).

Assim, devido à identificação de diversos microrganismos indicadores e patogênicos nos peixes e demais produtos de origem aquática, essa pesquisa teve como objetivo estudar a qualidade sanitária (*Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* sp.) e qualidade higiênica (coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli*) em tilápias oriundas de cultivo, comercializadas no varejo da região nordeste do Estado de São Paulo, bem como verificar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli* a antimicrobianos.

Revisão Bibliográfica

Produção Aquícola

O cultivo de peixes no mundo intensificou-se, principalmente, para suprir a demanda alimentar devido ao aumento populacional nas últimas décadas. Assim, diversas espécies de peixes foram introduzidas em todo mundo para a criação de novas áreas pesqueiras, o aumento dos rendimentos comerciais e instituição da aquicultura (GOZLAN et al., 2010).

A produção mundial do pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 146 milhões de toneladas em 2009 e 148 milhões de toneladas em 2010 (FAO, 2013a). Os maiores produtores aquícolas em 2010, foram a China com aproximadamente 36,7 milhões de toneladas, a Índia com 4,65 milhões de toneladas e o Vietnã com 2,67 milhões de toneladas (FAO, 2012).

Segundo dados obtidos pelo Ministério da Pesca e Aquicultura em 2010, o Brasil produziu aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados. Além disso, o crescimento da produção aquícola entre os anos de 2008 e 2010 foi cerca de 40%, quando a produção passou de 282.008t para 394.340t, sendo a tilápia a espécie mais cultivada, representando aproximadamente 40% da produção nacional (BRASIL, 2012).

Entre os peixes mais produzidos, a tilápia teve origem na África e as pesquisas para a criação desta espécie tiveram início no Congo Belga (atual Zaire), no 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).

Consumo do pescado

Peixe e produtos da pesca representam fontes de nutrientes de fundamental importância para uma dieta diversificada e saudável. Com algumas exceções, o peixe, geralmente, apresenta baixo teor de gorduras saturadas, carboidratos e colesterol (BENÉ et al., 2010).

Assim, mesmo pequenas quantidades de peixe pode ter um impacto significativamente positivo em relação à nutrição por fornecer aminoácidos essenciais, gorduras e micronutrientes que são escassos em dietas à base de vegetais (BENÉ et al., 2009). Além disso, diversas evidências dos efeitos benéficos do consumo de peixes foram descobertas, principalmente, na prevenção de muitas doenças (GARCIA e ROSENBERG, 2010).

Com isso, de acordo com Bostock et al. (2010), a aquicultura foi o setor da indústria alimentícia com maior crescimento nos últimos anos, e se a produção pesqueira continuar aumentando em resposta à demanda global, essa atividade poderá tornar-se responsável por mais de 50% do consumo alimentar até 2015.

Outros fatores, como a forte expansão da produção pesqueira e o desenvolvimento tecnológico de distribuição, favoreceram o abastecimento mundial de peixes que cresceu a uma taxa média de 3,2% ao ano no período 1961-2009, superando o aumento populacional mundial de 1,7% ao ano. Portanto, a disponibilidade média do pescado *per capita* aumentou consideravelmente. O consumo mundial *per capita* de peixe aumentou de 9,9 kg em 1960 para 11,5 kg em 1970, 12,6 kg em 1980, 14,4 kg na década de 1990, 17,0 kg na década de 2000 e atingiu 18,4 kg em 2009 (FAO, 2012).

Em 2010, dos 148 milhões de toneladas de peixes, crustáceos e moluscos produzidos mundialmente, 128 milhões de toneladas foram utilizadas como alimento humano, proporcionando uma oferta de alimentos *per capita* estimado de cerca de 19 kg (peso vivo). Dessa forma, os produtos oriundos da pesca desempenham um importante papel no fornecimento mundial de alimentos, diretamente por representar 17% da proteína animal consumida pelos seres humanos e, indiretamente pelo apoio à produção de alimentos pela aquicultura (FAO, 2013a). No Brasil, o consumo *per capita* do pescado no país em 2010 foi

de 9,75 Kg/hab./ano, com crescimento de 8% em relação ao ano anterior. Desse total, 66% do pescado consumido são produzidos no país (BRASIL, 2012).

O peixe para consumo pode ser encontrado em diversos tipos de varejo, como supermercados, estabelecimentos especializados na venda do pescado (peixarias), mercados municipais e feiras-livre. O pescado, ainda, pode ser encontrado em variadas formas: inteiro *in natura* com ou sem vísceras, filetado ou processado. Além disso, o pescado pode ser encontrado fresco, resfriado ou congelado.

Higiene, conservação e manipulação do pescado

O pescado, apesar de seu excelente valor nutritivo, é bastante perecível, necessitando de condições sanitárias adequadas desde sua captura, manipulação e comercialização a fim de que seja oferecido ao consumidor um produto seguro e de boa qualidade microbiológica (ABREU et al., 2008).

Assim, além de sua microbiota saprófita, inerente ao ambiente, os peixes podem ser contaminados por bactérias patogênicas oriundas não apenas do ambiente aquático, mas também do processamento e da estocagem inadequados (LANZARIM, 2011).

Geralmente, a lavagem com água hiperclorada a cinco ppm de cloro residual livre auxilia na conservação do pescado. Além disso, a evisceração é importante na eliminação das bactérias contidas no intestino animal, como também na redução da autólise causada pela enzima digestiva e a lavagem após a evisceração tem como finalidade remover restos de sangue e vísceras (GERMANO et al., 2001). Outro fator que também auxilia na conservação do peixe por um tempo maior é o descabeçamento, pois assim são eliminadas as brânquias, um dos principais focos de putrefação do pescado (ORDÓÑEZ, 2005).

Outros fatores de importância fundamental são as práticas de higiene adequadas por parte dos manipuladores para auxiliar na conservação e preservação da qualidade do pescado, pois apesar da contaminação dos alimentos terem várias origens, as principais causas são a falta de higiene

peçoal e higienização dos utensílios, dos equipamentos e superfícies que entram em contato com os alimentos (AZEVEDO et al., 2008).

Além disso, segundo Reij e Den Aantreker (2004), a recontaminação, ou seja, contaminação após preparo é uma importante causa de surtos de doenças alimentares causadas por pescados. Em seu estudo, afirmam que equipamentos e utensílios não limpos ou inadequadamente limpos são fontes de numerosos patógenos. Ainda, os manipuladores de alimentos e veículos de transmissão, como insetos, pássaros e roedores, são importantes transmissores de microrganismos (REIJ e DEN AANTREKER, 2004).

Com isso, o efeito da higiene na conservação e deterioração do pescado varia e depende do tipo de contaminação que pode ocorrer. Pois apenas uma fração da contaminação geral é provocada por bactérias específicas da deterioração. Entretanto, as medidas de higiene contribuem de forma positiva para o tempo de conservação, evitando que bactérias específicas de deterioração contaminem peixes e produtos derivados (HUSS et al., 2000).

Para evitar o aumento da população de microrganismos, principalmente, dos responsáveis pela decomposição excessivamente rápida, existem três formas importantes de prevenção segundo Graham et al. (1993): cuidado, limpeza e refrigeração. O cuidado durante a manipulação é essencial, visto que os danos podem facilitar, através de cortes e feridas, o acesso de bactérias deteriorantes, acelerando, deste modo, seu efeito sobre a carne. A limpeza é importante sob dois pontos de vista: (1) as fontes naturais de bactérias podem ser eliminadas; e (2) a probabilidade de contaminação pode ser reduzida ao mínimo, assegurando que o pescado seja sempre manipulado de forma higiênica. Porém, o mais importante é resfriar o pescado o mais rápido possível e mantê-lo assim. Quanto maior a contaminação, menor o tempo de conservação, a uma dada temperatura (PEIXOTO e TOLEDO, 1998).

Em estudo realizado por Vicente (2005) sobre a qualidade do pescado comercializado em Niterói (RJ), o autor constatou uma baixa qualidade sanitária e de conservação de tal produto, fato que é observado em várias outras localidades do território brasileiro. Essa circunstância justifica trabalhos qualitativos sobre o levantamento dos grupos de peixes encontrados no varejo como também sobre o

estado de conservação dos produtos aquícolas comercializados, uma vez que esses produtos podem estar relacionados às doenças de origem alimentar. Pois a ocorrência de toxinfecções alimentares possui correlação elevada com a manipulação e conservação inadequada dos alimentos (CHESCA et al., 2001).

Por exemplo, no Rio Grande do Sul, em pesquisa realizada por Pinto (1999), foram constatados 1.187 surtos de toxinfecções alimentares entre os anos de 1988 a 1997. Entretanto, Franco e Landgraf (2008) afirmaram que mesmo em países desenvolvidos, nos quais o fornecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista higiênico e de saúde pública, a ocorrência de doenças dessa natureza é significativa e crescente.

De acordo com Silva (2002), diversos fatores relacionados à manipulação e ao estado de conservação e higiene do pescado podem influenciar na ocorrência de enfermidades, entre eles: tratamento térmico inadequado, ingredientes contaminados e a forma de manipulação dos alimentos. Deve-se levar em conta que mais de um desses fatores podem ocorrer concomitantemente e possibilitar a ocorrências de infecções. Em pesquisa realizada em Curitiba, a conservação inadequada dos alimentos foi responsável por 46,5% dos surtos das toxinfecções encontradas (SILVA, 2002), enquanto Pinto (1999), no Rio Grande do Sul, encontrou uma porcentagem de 30,7%.

Frequentemente, a presença de microrganismos responsáveis pela ocorrência de doenças, evidencia falhas em alguma das etapas da cadeia produtiva do pescado, o que compromete a qualidade e o grau de frescor do produto final. Além disso, a contaminação com patógenos como *Salmonella* e *Escherichia coli*, que pode ocorrer na pré ou pós-captura, oferece risco ao consumidor, pois em alguns casos uma pequena população é suficiente para provocar a doença. Também pode ocorrer a contaminação por *Staphylococcus aureus*, encontrado nas mucosas e superfícies da pele de humanos como consequência direta da manipulação inadequada (BARRETO, 2012).

Deterioração do pescado

O pescado é um produto de origem animal muito suscetível à deterioração, devido ao pH próximo da neutralidade, à elevada atividade de água nos tecidos e aos altos teores de nutrientes. Além disso, os métodos de captura, que provocam morte lenta, contribuem para a rápida decomposição, ocasionando diversos problemas relacionados à conservação (SOUSA et al., 2011).

A deterioração do pescado instala-se logo após a morte e avança com o tempo. As alterações mais comuns são: as enzimáticas, as físico-químicas e as microbiológicas. A rápida morte do músculo, a fadiga ocasionada pelo esforço que o pescado faz na tentativa de livrar-se da captura, provoca um consumo considerável das reservas energéticas, esgotando desta forma, as substâncias necessárias para a contração muscular que são a Adenosina Trifosfato (ATP) e o Glicogênio. Depois da morte e sem o glicogênio necessário para a resíntese do ATP, cessa a contração muscular e inicia-se o chamado “Rigor Mortis” (GERMANO et al., 2001).

No período pós-morte imediato, as principais alterações que afetam a qualidade do pescado são aquelas relacionada à degradação dos nucleotídeos, através de enzimas que desdobram o ATP até Hipoxantina (Hx), caracterizada pelo odor azedo do pescado. Na deterioração, essas enzimas tissulares, enzimas naturalmente presentes na pele e nos tecidos, passam a atuar na carne, causando a desintegração e amolecimento (BARROS, 2003).

Outro grupo de enzimas, denominadas autolíticas (digestivas) é associado aos processos normais de digestão no pescado vivo. No pescado morto, a parede intestinal não impede a passagem dos sucos digestivos, de natureza ácida, que atuam sobre os tecidos musculares, causando decomposição e facilitando a disseminação de microrganismos restritos ao trato intestinal o que acelera o processo de deterioração, através da putrefação das vísceras, caso o pescado tenha sido capturado e armazenado sem evisceração (SAAID et al., 2009).

Apesar de pouco tecido conjuntivo, o músculo do pescado possui pouco colágeno, isto facilita a digestão, porém torna o músculo mais vulnerável à invasão e atividade microbiana. A fraca ligação dos anéis protéicos e a grande

quantidade de água são características dos componentes do pescado que favorecem a sua digestibilidade, porém disponibilizam, de forma mais fácil e em quantidades adequadas, os nutrientes necessários para a multiplicação e intensa atividade microbiana (MEIRA et al., 1999).

A velocidade de decomposição depende de fatores endógenos e exógenos. Os fatores exógenos são a temperatura, microrganismos presentes, processamento e manipulação. Os fatores endógenos são a composição química e a textura dos tecidos (BARROS, 2003).

Assim, um dos fatores mais importantes ao início da deterioração é a presença dos inúmeros microrganismos presentes na água, bem como na microbiota natural, localizada principalmente nos intestinos, brânquias e muco superficial do pescado (FELDHUSEN, 2000).

Doenças Transmitidas por Alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) configuram um termo genérico, aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre. Sintomas digestivos, no entanto, não são as únicas manifestações dessas doenças, podendo ocorrer, ainda, afecções extraintestinais em diferentes órgãos e sistemas, como: meninges, rins, fígado, sistema nervoso central e outros, de acordo com o agente envolvido. Sob o aspecto etiológico, podem ser causadas por toxinas, bactérias, vírus, parasitas e substâncias tóxicas (BRASIL, 2005).

Portanto, segundo a Organização Mundial da Saúde, as DTAs podem ser definidas como aquelas doenças, de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que são introduzidos no organismo através da ingestão de alimentos ou água contaminados (WHO, 2010).

A ocorrência de DTA aumentou consideravelmente em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais se destacam: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala.

Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos ainda é pouco conhecido. Somente alguns estados e/ou municípios brasileiros dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (BRASIL, 2010).

O número de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no âmbito do pescado é geralmente baixo quando comparado ao dos causados por aves, laticínios e outras carnes. Entretanto, a importância do pescado como veiculador de patógenos depende de fatores como a dieta e a forma de preparo para consumo (HUSS et al., 2000).

No Brasil, a obtenção de dados coletados entre os anos de 1999 a 2004, constatou-se que dos 3.737 surtos notificados 1% foram relacionados ao consumo de pescado e 0,37% aos frutos do mar, acarretando em custos com hospitalizações, ao redor de 280 milhões de reais e média de 46 milhões de reais por ano (SILVA et al., 2008). Assim, a ocorrência de DTA's é bastante comum, embora não seja dada a devida importância pela população dos diversos níveis socioeconômicos (BARRETO et al., 2012).

Em países onde se mantem o registro das doenças veiculadas por alimentos, as características que influenciam os números de surtos relatados variam de um país para outro, dependendo do clima, costumes da dieta e outras diferenças sociais (JANDA e ABBOTT, 2011). Por exemplo, na Coreia e Japão, onde o peixe é importante parte da dieta, peixes e frutos do mar são os principais veículos de transmissão de doenças de origem alimentar (HUSS et al., 2000).

Outro exemplo, nos Estados Unidos, no período de 1999 a 2006, o pescado foi responsável por 1.140 casos de surtos alimentares. Peixes como o atum, a garoupa e o salmão, estiveram envolvidos em 694 casos, enquanto os moluscos, incluindo ostras, mariscos e mexilhões em 175 surtos (CSPI, 2008). De acordo com o Center for Science in the Public Intesres (CSPI) um quilo de peixe e

marisco tem 29 vezes mais probabilidade de causar DTA's do que a categoria de alimento considerada mais segura, os alimentos lácteos (CSPI, 2008).

O pescado e os microrganismos

Os músculos, órgãos e líquido corporal do peixe sadio e recentemente capturado são estéreis uma vez que o sistema imunológico deste previne a multiplicação microbiana no músculo. Entretanto, a pele, brânquias e escamas, que têm contato direto com a água, apresentam um razoável nível de contaminação, especialmente por bactérias. Assim, após a morte, o sistema de defesa cessa e a proliferação bacteriana ocorre livremente, sendo muito intensa na superfície da pele (GERMANO et al., 2001).

Segundo Germano e Germano (2003), o pescado, capturado recentemente, apresenta uma microbiota natural com características peculiares e é influenciada pela natureza do ambiente aquático, onde a temperatura é um dos fatores seletivos. O muco, que recobre a superfície externa do peixe e brânquias, contém bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Escherichia coli*. Estes e outros microrganismos, como os patogênicos, podem estar presentes no pescado principalmente devido à sua extensa cadeia produtiva – beneficiamento, conservação, distribuição, transporte, armazenamento – até alcançar o consumidor final, comprometendo a qualidade do produto disponível.

De forma geral, dependendo das variações de fatores como época de captura, métodos e área da pesca, podem-se encontrar nos peixes de 10^2 a 10^6 bactérias/cm² de escama e 10^3 a 10^7 bactérias/g nas brânquias. Além disso, pode-se observar nos peixes, um aumento de 10 a 100 vezes no número de bactérias em capturas por arrasto em relação aos capturados com vara. O número de bactérias intestinais do pescado pode variar entre 10^3 e 10^8 /g do conteúdo e esta variação pode ser relacionada ao volume da dieta do animal, pois peixes não alimentados apresentam menor número de bactérias (OGAWA e MAIA, 1999).

Prevenir a contaminação do pescado na pré-captura é muito difícil ou impossível. O ambiente natural não pode ser modificado facilmente e os agentes causadores de doenças que ocorrem naturalmente (algumas bactérias patogênicas, parasitas, biotoxinas) estarão sempre presentes. Já a contaminação química e poluição fecal podem ser prevenidas, com o monitoramento das áreas de pesca, pela verificação de presença de algas tóxicas e de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* (REIJ et al., 2004).

Alguns microrganismos 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 microrganismos patogênicos. Entre os microrganismos indicadores de qualidade higiênica estão os coliformes totais e coliformes termotolerantes. 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).

Em relação aos microrganismos patogênicos encontrados no pescado, a FAO (2013b) classifica os patógenos em dois grupos bacterianos (Tabela 1). No Grupo 1 estão relacionadas as bactérias mais frequentes e que se encontram amplamente distribuídas nos ambientes aquáticos de várias partes do mundo. Entretanto, as bactérias do Grupo 2 são menos frequentes em peixes e podem estar relacionadas aos processos inadequados de cultivo e processamento (FAO, 2013b).

Assim, microrganismos patogênicos como *Vibrio sp.*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*, encontrados nos produtos da pesca, dependendo da sua dose infectante e do seu modo de atuação, causam nos seres humanos gastroenterite aguda caracterizada por quadro disentérico, principalmente após consumo de peixe *in natura*, mariscos, camarões e ostras (FELDHUSEN, 2000).

Com isso, todos os produtos da atividade aquícola precisam estar com sua microbiota contaminante dentro dos limites impostos pela legislação, sob pena de não poder ser comercializado e/ou exportado. Os microrganismos sobre os quais

a legislação estabelece limites são aqueles que quase sempre não alteram a aparência do pescado, logo a razão de suas limitações decorre do fato de serem patogênicos para o homem e não deteriorantes do alimento (VIEIRA et al., 2004).

Tabela 1. Bactérias patogênicas presentes no pescado.

Bactérias		Modo de atuação		Estabilidade térmica da toxina	Dose infectante mínima
		Infecção	Toxina pré-formada		
Bactérias indígenas (Grupo 1)	<i>Clostridium botulinum</i>		+	Baixa	-
	<i>Vibrio sp.</i>	+			Alta
	<i>V. cholerae</i>				-
	<i>V. parahaemolyticus</i>				(>10 ⁶ /g)
	outros vibrios ¹				-
	<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 sp.</i>	+			Desde <10 ² até >10 ⁶
	<i>Shigella</i>	+			10 ¹ -10 ²
	<i>E. coli</i>	+			10 ¹ -10 ³ ²
	<i>Staphylococcus aureus</i>		+	Alta	-

¹ Outros vibrios são: *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. furnsii*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*.

² Para a estirpe 0157:H7 produtora de verotoxina.

Fonte: FAO (2013b)

Assim, no Brasil, a Resolução RDC nº 012, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, consta a definição dos critérios microbiológicos para alimentos expostos à venda e à exportação (BRASIL, 2001). Entre os parâmetros a serem observados no pescado à venda, estão: *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella sp.* (BRASIL, 2001). Entretanto, para o pescado comercializado *in natura*, resfriados ou congelados

não é necessária a determinação de microrganismos indicadores de higiene como os coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli*.

Salmonella sp.

O gênero *Salmonella* é constituído por bactérias Gram-negativas em forma de bastonete pertencentes à família Enterobacteriaceae. São microrganismos aeróbios, em sua maioria móveis com flagelos peritríquios, não esporulados e não capsulados, oxidase negativa e catalase positiva. O pH ótimo para a multiplicação é próximo de 7,0 e a temperatura ideal encontra-se na faixa de 35 a 37°C. Sua taxonomia é baseada na composição dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Os antígenos H são de natureza protéica, também são espécies-específicos e são termolábeis. Enquanto, os antígenos O e Vi são termorresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100°C por duas horas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

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 contaminam - se após a captura e durante a manipulação. A penetração no organismo humano ou animal ocorre mediante o consumo de alimento ou água contaminados, 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).

Assim, esta bactéria é frequentemente utilizada no estudo da qualidade higiênica do pescado por indicar a qualidade da água no local de captura. As pessoas mais susceptíveis a salmonelose são aquelas que estão no grupo de risco, ou seja, idosos, mulheres grávidas e imunocomprometidos. A salmonelose é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública, estando a *Salmonella* entre os principais agentes envolvidos nos surtos de toxinfecções alimentares (PUI et al., 2011).

Em experimento realizado no Egito, das 101 tilápias do Nilo investigadas para organismos patogênicos, em 7,9% das amostras foi detectada a *E. coli* e em 3,9% *Salmonella* (YOUSSEF et al., 1992).

No mercado de peixes em Cochin, na Índia, foi detectada a presença de *Salmonella* em 5,76% das amostras de peixes frescos e em 8,66% dos congelados, tendo sido isoladas 32 cepas (NAMBIAR e MAHADEVAIYER, 1991). Além disso, a presença de *Salmonella* foi relatada na piscicultura em todo mundo, e as pesquisas mostraram que 21% das culturas de enguias no Japão (SAHEKI et al., 1989), 5% das culturas do bagre do canal nos E.U.A. (WYATT et al., 1979) e 22% das culturas de camarão da Ásia (REILLY e TWIDDY, 1992) estavam contaminadas com o microrganismo.

Na região Nordeste do Brasil, foi detectada a presença de *Salmonella* nos ambientes de fazendas de carcinicultura costeira e nas águas dos rios da referida região (FIGUEIREDO et al. 2005; PARENTE, 2005; CARVALHO, 2006). Sua presença está relacionada principalmente aos despejos de efluentes sanitários sem tratamento nos corpos aquáticos, situação comumente encontrada no país (VIEIRA et al. 2003).

Em outro estudo realizado em um sistema de consórcio suíno-piscicultura da região metropolitana de Belo Horizonte-MG, foi isolado *Salmonella* 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).

De acordo com Bhaskar et al. (1995), a presença de *Salmonella* em amostras de sedimento, água, peixe e camarão, ocorre pelo fato desse microrganismo sobreviver bem no sedimento, sendo transferido posteriormente para a coluna de água e para o animal com facilidade.

Assim, para o controle das doenças relacionadas à presença desses microrganismos em peixes encontrados no varejo, a legislação impõe ausência de *Salmonela* para qualquer amostra aleatória de 25g do alimento (BRASIL, 2001). Pois a *Salmonella* quando em pequeno número em pescado já é capaz de causar danos ao consumidor, bem antes de causar odor amoniacal no alimento, razão pela qual se investiga apenas sua presença ou ausência em qualquer alimento (MOHAMEDHATHA e LAKHMANAPERUMALSAMY, 1997).

Staphylococcus sp.

O Gênero *Staphylococcus* (Família Micrococcaceae) é composto por 19 espécies de cocos Gram positivos, imóveis, de forma esférica, medindo 0,5 a 1,0µm agrupadas em massas irregulares em forma de “cachos”. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias ou anaeróbias facultativas. Podem crescer em temperaturas de 7 a 48°C, com um ótimo de 30 a 37°C (BERGEYS, 1994).

Dentre as espécies que compõem o gênero, as coagulase positivas 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 e LANDGRAF, 2008).

O *Staphylococcus. aureus* é uma bactéria patogênica que não faz parte da microbiota normal dos peixes. Geralmente, este microrganismo é transmitido aos alimentos por seus manipuladores e são responsáveis por aproximadamente 45% das toxinfecções do mundo, sendo um dos agentes patogênicos mais comuns em surtos de origem alimentar (GONÇALVES et al., 2011).

Os estafilococos são organismos que podem ser encontrados em diferentes regiões do corpo como as mãos, garganta, faringe, glândulas mamárias, trato intestinal, e urinário, dos quais por contaminação cruzada contamina o pescado, pois encontram no pescado um ambiente favorável para sua multiplicação. Assim, o *Staphylococcus* coagulase positivos são utilizados como indicadores de manipulação inadequada, pois sua presença indica que o manuseio foi realizado com as mãos e, dependendo do número encontrado, que o produto permaneceu em condições inadequadas para a sua conservação (EVANGELISTA-BARRETO, 2001).

A intoxicação alimentar provocada por este microrganismo é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para a saúde pública. A

enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando, desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar (MILLER e KAPLAN, 2009).

Na avaliação da qualidade microbiológica do pescado, a contagem de *Staphylococcus* implica também na pesquisa da capacidade desse organismo produzir a enzima termonuclease e, quando necessário, de toxina estafilocócica a fim de estabelecer dados e informações de interesse à saúde pública (MURATORI et al., 2004). O limite descrito na legislação federal para esse microrganismo em pescado é de no máximo 10^3 UFC.g⁻¹ (BRASIL, 2001).

Aeromonas sp.

O gênero *Aeromonas* é formado por bactérias Gram-negativas, oxidase-positiva e são anaeróbias facultativas (JANDA e ABBOTT, 2010). A única fonte de carbono e energia é a D-glicose e os sais amoniacais são utilizados como fonte de nitrogênio. São quimiorganotróficas capazes de desenvolver metabolismo oxidativo ou fermentativo. A maioria é móvel, por meio de flagelo polar monotríquio. Normalmente encapsuladas e não esporuladas, fermentam a glicose com produção de ácido com ou sem gás, reduzem nitrato a nitrito, por meio da desnitrificação, e são resistentes ao agente vibriostático 2,4- diamino-6,7-diisopropilpteridine (O/129) (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Os membros do gênero *Aeromonas* são habitantes naturais de ecossistemas aquáticos e desempenham um importante papel como patógeno primário no trato gastrointestinal de alguns animais (BRAVO et al., 2011). Assim, por possuir ampla distribuição no meio aquático, principalmente dulcícola, é descrito por alguns autores como patógenos de peixes e, no caso de espécies como *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. sóbria* e *A. veronni*, por originar enfermidades de veiculação hídrica em seres humanos (MANUEL PABLOS et al., 2009; ABEROUN e JOOYANDEH, 2010).

Em relação aos patógenos de peixes, as doenças causadas por *Aeromonas* sp. podem atingir qualquer espécie por ser um agente tipicamente oportunista. Seu hábitat natural em viveiros é o material em decomposição na

água e no fundo dos tanques. Além disso, pode estar presente na microbiota intestinal de peixes sãos (POND et al., 2006).

Geralmente, o ser humano é exposto a essa bactéria através do consumo de peixes e derivados mal cozidos; ou pela contaminação cruzada entre alimentos, águas e matérias-primas; ou manipulação não higiênica de alimentos (LEAL et al. 2009). O mecanismo de patogenicidade de *Aeromonas* sp. é complexo, pois sua virulência é considerada multifatorial. As diversas espécies de *Aeromonas* produzem vários produtos extracelulares biologicamente ativos, tais como: hemolisinas (aerolisinas), citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidinas, fosfolipases, elastases, DNases, adesinas e, ainda, colinesterases e endotoxinas. Assim, essa capacidade de produção de fatores de virulência contribui para a patogênese da doença ocasionada por esse grupo bacteriano (TRABULSI e ALTERTHUM, 2002).

Com isso, a *Aeromonas* está relacionada a diferentes doenças no ser humano, principalmente diarreia autolimitante e mesmo severa semelhante a que ocorre em casos de cólera. Pois relatos afirmam a presença de isolados de *Aeromonas* spp. em surtos de gastroenterites colérica, disenterica ou diarreia crônica e colite ulcerativa em adultos e crianças, assim como de infecções extraintestinais em pacientes imunocomprometidos (KO et al., 2005).

Do mesmo modo, diversas pesquisas realizadas mundialmente tem relatado a presença de *Aeromonas* em peixes comercializados. Salgado-Miranda et al. (2010), analisaram truta de pisciculturas no México e observaram que as bactéria *Aeromonas* foram frequentemente isoladas; Vivekanandhan et al. (2005) em estudo realizado na Índia, isolaram *Aeromonas* em 33,58% de amostras de peixes comercializados no varejo; e Abrahim et al. (2007) isolaram *Aeromonas* em 65% das amostras analisadas de peixes encontrados no varejo da Grécia.

Em relação à presença do gênero *Aeromonas* em tilápia comercializada, Morales et al. (2004) detectaram a presença desse microrganismos em 98% das amostras analisadas na Costa Rica. Enquanto, Newaj-Fyzul et al. (2008) identificaram *Aeromonas* em 44% das amostras de tilápias comercializadas nas ilhas de Trinidad e Tobago, na América Central.

No Brasil, vários estudos apontam a ocorrência desses patógenos isolados de ecossistemas aquáticos. Em pesque-pague da região metropolitana de São Paulo, foram avaliadas amostras de água de viveiros e de peixes, sendo que 93% e 87%, respectivamente, apresentaram-se contaminados por *Aeromonas* (AZEVEDO, et al., 2003).

Em outro trabalho realizado por Silva et al. (2010) em um mercado municipal da Cidade de São Paulo, os autores isolaram *Aeromonas* em 50% das amostras do pescado comercializado no local.

Além disso, as espécies de *Aeromonas*, que podem ser identificadas no pescado, podem variar de acordo com o local estudado, como também entre as espécies de peixes analisadas. Por exemplo, na pesquisa realizada por Hatha et al. (2005), as espécies de *Aeromonas* spp. encontradas em intestino de várias espécies de peixes, revelou que 61% dos isolados foram de *A. hydrophila*, 30% de *A. caviae*, 7% de *A. sobria* e 2% considerados atípicos. A maioria dos isolados de *A. hydrophila* demonstrou atividade hemolítica, enquanto nas demais espécies essa atividade não foi verificada.

A legislação não faz referência em relação à pesquisa, identificação e/ou quantificação de bactérias do gênero *Aeromonas* em águas e alimentos, entretanto este patógeno já foi descrito como emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Assim, apesar do gênero *Aeromonas* não ser rotineiramente investigado nem ser preconizado pela legislação ambiental e sanitária vigente no país, o seu estudo em águas e peixes de cultivo é de indiscutível importância econômica e de saúde pública, uma vez que podem trazer grandes prejuízos à atividade piscícola e graves enfermidades ao ser humano e outros animais (MORITA et al., 2006).

Coliformes e *Escherichia coli*

Os coliformes totais são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporogênicos. Este grupo é composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, quando

incubadas à temperatura de 35-37°C, por 48 horas. São comensais e são importantes na manutenção da fisiologia intestinal (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Por ser um grupo formado por diversos gêneros encontrados naturalmente no meio ambiente, a presença de coliformes totais no alimento não indica necessariamente contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos, mas pode indicar as condições de higiene de alimentos frescos ou processados.

O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas à 44,5 a 45,5°, com produção de gás (JAY, 2005). Fazem parte desse grupo bactérias do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destas apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solos (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A pesquisa de coliformes termotolerantes ou de *Escherichia coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Assim, as bactérias do grupo coliformes são consideradas como microrganismos indicadores. A denominação de microrganismo indicador pode ser aplicada a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de microrganismos que quando presente em determinados alimentos proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra podendo ser indicador de condições sanitárias inadequadas de produção e manipulação de alimentos (GEUS e LIMA, 2008).

A resolução RDC nº12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) não estabelece padrão microbiológico para coliformes termotolerantes em peixes comercializados *in natura*, resfriado ou congelado. Entretanto, a determinação da presença desses microrganismos pode identificar os padrões de higiene do pescado comercializados, além de indicar as condições de toda a cadeia produtiva em relação à contaminação microbiológica.

Dentre os coliformes termotolerantes mais importantes para avaliar a presença de patógenos em ambientes aquícolas pode-se mencionar a espécie *Escherichia coli* que de acordo com AGNESE et al., (2001) esse microrganismo, por não fazer parte da microbiota normal do pescado, pode estar associada: à contaminação fecal do local onde o pescado foi capturado; ao transporte e manuseio, incluindo vasilhame e gelo utilizado; e aos outros processos e materiais que possam ter entrado em contato com o pescado fresco. Portanto, sua presença indica condições sanitárias insatisfatórias.

Desde 1945, quando foi verificado o primeiro caso de diarreia associada a uma linhagem de *Escherichia coli*, as pesquisas relacionadas ao conhecimento de como esta bactéria causa diarreia tem aumentado. Os mecanismos de patogenicidade de *E. coli* são complexos e envolvem um grande número de fatores de virulência, que variam entre suas diferentes categorias, muitos destes fatores podem ter sido adquiridos de outros patógenos entéricos, como *Vibrio cholerae* e *Shigella dysenteriae* (GILLIGAN, 1999). Toxinas e fímbrias são os fatores de virulência mais comumente encontrados em *E. coli* e algumas toxinas estão intimamente relacionadas com determinadas categorias (KUHNERT et al., 2000).

Atualmente existem seis categorias causadoras de diarreia: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998).

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) é causadora de uma variedade de doenças, que vão desde leve diarreia a doenças graves como a colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (NAKANISHI et al., 2009). O sorogrupo mais comum e conhecido é denominado O157. EHEC inclui uma diversa população de *E. coli* produtoras de shigatoxinas, sendo o bovino seu principal reservatório (MANNING et al., 2008). Porém, outras fontes como verduras, legumes, consumo ou uso recreativo de água também são associados a infecções esporádicas e a surtos de diarreias em seres humanos (RANGEL et al., 2007).

Segundo CLARKE (2001), as toxinas Shiga (*stx*) ou toxina “Shiga-like” (*slt*) são componentes de virulência similares aos produzidos pela *Shigella dysenteriae*. Dois principais grupos antigênicos distintos da toxina ocorrem e são identificados com *stx1*

que é similar a toxina tipo I de *S. dysenteriae*, e a *stx2* que apresenta 11 variantes distintas (WANI, 2007). Portanto, o subgrupo da espécie que comumente é denominado *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), é também conhecido por *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (GARCIA-ALJARO et al., 2005).

As bactérias do grupo ETEC são importantes causas de diarreia em países subdesenvolvidos onde as condições de saneamento são precárias. Além disso, ETEC é considerada um dos principais agentes etiológicos da chamada “diarreia dos viajantes”, acometendo indivíduos que se deslocam de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico, atingindo pessoas de todas as faixas etárias (MENG et al., 2001). Para Vicente et al. (2005), a virulência das linhagens de ETEC é devido a habilidade da bactéria de produzir enterotoxinas e expressar adesinas de superfície que permitem a colonização das células do epitélio intestinal. As enterotoxinas termoestáveis (*estA* e *estB*) são capazes de resistir ao tratamento térmico, a 100°C por 30 minutos, sendo que *estA* é solúvel em água e em solventes orgânicos, além de ser resistente à ação de enzimas proteolíticas (KAPER et al., 2004).

A categoria de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é reconhecida como um patógeno emergente que causa diarreia em crianças e adultos em todo o mundo (NGUYEN et al., 2006). Estudos envolvem EAEC em casos de diarreia persistente, principalmente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (BERNIER et al., 2002).

A principal característica da EAEC é sua capacidade de apresentar um padrão de aderência, em células HEp-2 e HeLa, caracterizado pela presença de agregados de células bacterianas que aderem à superfície celular bem como à superfície da lamínula, em um arranjo semelhante a tijolos empilhados – aderência agregativa (AA) (NATARO et al., 1987). Esta característica permite que se diferencie amostras EAEC de amostras EPEC ou DAEC. Cepas EAEC são heterogêneas tanto pelos sintomas desenvolvidos pelas pessoas infectadas, quanto pelos genes de virulência. Diversos tipos de fímbrias têm sido descritas para EAEC, embora apenas duas delas, denominadas “Aggregative adherence fimbriae I (*aafI*) e Aggregative adherence fimbriae II (*aafII*)” tenham sido mais bem caracterizadas (HUANG e DUPONT, 2004).

Utilização de antimicrobianos na atividade aquícola

O aumento da produção aquícola tem influenciado o desenvolvimento de doenças em organismos aquáticos cultivados na prática da aquícola. Assim, para o controle de doenças, diversos pesquisadores têm elaborados modelos de avaliação de risco para identificar patógenos em cenários aquícolas pré-estabelecidos (PEELER e TAYLOR, 2011). Pois, o sucesso na piscicultura depende da implantação de boas práticas de manejo nos viveiros, destacando-se: o controle da qualidade da água; a realização de quarentena na aquisição de novos lotes; fornecimento de alimentação de qualidade e balanceada; garantia da saúde dos animais; e a prevenção de doenças (TAVECHIO et al., 2009).

Portanto, as doenças infecciosas por serem reconhecidas como um dos problemas frequentes na aquicultura, o uso de agentes antimicrobianos e quimioterapêuticos são convencionalmente incluídos nas práticas aquícolas e representam uma importante ferramenta para evitar surtos infecciosos e para reduzir as perdas econômicas associadas às doenças (LAGANÀ et al., 2011).

De acordo com Aminov (2009), os usos extensivos de antimicrobianos na medicina veterinária, agricultura, aquicultura e outras atividades humanas conduzem à ocorrência emergente da resistência antimicrobiana em diversos ecossistemas e na ineficácia do tratamento antimicrobiano. Como na aquicultura, os antimicrobianos são utilizados diretamente nas águas superficiais, a carga elevada de resíduos de antimicrobianos pode acumular-se nos sedimentos, com potencial de alterar negativamente o ecossistema aquático (ALEXY et al., 2004).

Segundo Cabello (2006), este processo origina vários problemas: surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos em ambientes aquícolas; aumento da resistência a antimicrobianos em patógenos de peixes; transferência desses determinantes de resistência às bactérias de animais terrestres e aos patógenos humanos; e em alterações nas espécies bacterianas encontradas em sedimentos e na coluna de água.

Em relação ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, a ocorrência e disseminação de determinantes de resistência a antimicrobianos, se tornaram

graves problemas emergentes da atividade aquícola, desencadeada pela pressão seletiva sobre as populações bacterianas (SMITH, 2008).

De acordo com Sørum (2006), bactérias resistentes a antimicrobianos podem representar um potencial risco à saúde pública. Diretamente pela transmissão de patógenos aos seres humanos através do consumo de água contaminada e alimentos (DURAN e MARSHALL, 2005), ou indiretamente, por meio da transferência de genes de resistência entre bactérias presentes no peixe e patógenos humanos (GUGLIELMETTI et al, 2009).

A ampla troca genética provavelmente bidirecional entre bactérias dos ambientes aquáticos e terrestres é demonstrada pela ocorrência dos mesmos determinantes genéticos em bactérias aquáticas, patógenos de peixes e patógenos humanos (MACINTOSH, 2008). Isso demonstra que bactérias dos meios aquático e terrestre compartilham informações genéticas, provavelmente, através da transferência horizontal de genes mediada por diversos mecanismos que transferem elementos genéticos (MAZEL et al., 2006).

Além disso, bactérias com baixa patogenicidade para humanos, mas resistentes aos agentes antimicrobianos, podem transmitir essa característica para os patógenos humanos por meio de genes móveis, como os plasmídeos R (COSTA et al., 2009). Por exemplo, bactérias intestinais humanas são muitas vezes expostas à pressão seletiva de agentes antimicrobianos e podem constituir um reservatório de determinantes de resistência a antimicrobianos, com a capacidade não só de trocar essas características com bactérias do próprio grupo, mas também com patógenos transientes presentes no cólon (MITSOU et al., 2010).

Em estudo realizado na Austrália, bactérias isoladas de amostras de água de tanque e de espécimes animais empregadas na aquicultura mostraram resistência generalizada aos antimicrobianos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e eritromicina; resistência frequente aos antimicrobianos oxitetraciclina, tetraciclina, ácido nalidíxico e moléculas do grupo das sulfonamidas; e resistência pouco frequente aos antimicrobianos cloranfenicol, florfenicol, ceftiofur, ácido oxolínico, gentamicina e trimetoprina, além de outros (AKINBOWALE et al., 2006).

Estudos realizados por Silva (2010) em pisciculturas da Baixada Ocidental Maranhense, identificaram alto perfil de resistência em isolados de *Aeromonas* sp. aos antimicrobianos cefalotina, amoxicilina + clavulonato e ceftioxime. Em outro estudo realizado por Barbosa (2010), em pesque-pagues do Estado de São Paulo, isolados de *Escherichia coli* apresentaram resistência frequente aos antimicrobianos: eritromicina, estreptomicina e novobiocina, enquanto não se verificou resistência aos antimicrobianos: ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacin e norfloxacina.

Objetivo Geral

Avaliar a qualidade sanitária (*Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* sp.) e qualidade higiênica (coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* sp. e *Aeromonas* sp.) de tilápias oriundas de cultivo, comercializadas no varejo da região nordeste do Estado de São Paulo, bem como verificar as espécies de *Aeromonas* sp. isoladas e a presença de genes codificadores de virulência de isolados *Escherichia coli*. Além de verificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli*.

Objetivos Específicos

- Verificar a qualidade sanitária de amostras de tilápias, na forma de filé fresco e *in natura*, comercializadas no varejo através dos parâmetros microbiológicos estabelecidos pela resolução RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- Investigar a qualidade higiênica da tilápia comercializada através da determinação de *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp., coliformes totais e coliformes termotolerantes;
- Isolar *Escherichia coli* e detectar a presença dos genes codificadores de virulência *eae*, *stx1*, *stx2*, *eltB*, *estB*, *estA*, *aggR* e *aafII* pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase);
- Isolar e identificar as espécies de *Aeromonas* presentes nas amostras da tilápia *in natura* e filé fresco;
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. a 12 antimicrobianos por meio da técnica de difusão em disco.

Referências Bibliográficas

ABRAHIM A, SOULTOS N, STERIS V, PAPAGEORGIOU K. Incidence of *Aeromonas* spp. in marine fish and the environment of fish markets in northern Greece. Italian J Food Sci. 2007;19(1):111-6.

ABEROUM A, JOOYANDEH H. A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. World J Fish & Marine Sci. 2010;2(6):519-23.

ABREU MG, FREITAS MQ, JESUS EFO, CLEMENTE SC, FRANCO RM, BORGES A. Caracterização sensorial e análise bacteriológica do peixe-sapo (*Lophius gastrophysus*) refrigerado e irradiado. Revista Ciência Rural. 2008;38(2):

AGNESE AP, OLIVEIRA VM, SILVA PPO, OLIVEIRA GA. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais em peixes frescos comercializados no município de Seropédica–RJ. Hig Aliment. 2001;15(88)67-70.

AKINBOWALE OL, PENG H, BARTON MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J Applied Microbiol. 2006;100(5): 1103–13.

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, 2004. p.209- 221.

AZEVEDO VM, MORITA M, DROPA M, CABIANCA MAA, ESTEVES KE, MATTÉ GR, MATTÉ MH. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e *Vibrio cholerae* em pescapagues da Região Metropolitana de São Paulo. Revnet Dta. 2003;3(4): 114- 9.

BARBOSA, MMC. Identificação sorológica e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de peixes e água de Caunesp

pesque-pagues. Dissertação, Mestrado em Microbiologia Agropecuária. Universidade Estadual Paulista, Faculdade Júlio de Mesquita. 2010.

BARRETO NSE, MOURA FCM, TEIXEIRA JA, ASSIM DA, MIRANDA PC. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. Rev. Caat. 2012;25(3):86-95.

BHASKAR N, SETTY TMR, REDDY GVS, MANOJ YB, ANANTHA CS, RAGHUNATH BS, ANTONY JM. Incidence of *Salmonella* in cultured shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. 1995;138(1):257-66.

BARROS GC. Perda da qualidade do pescado, deterioração e putrefação. Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2003;30:59-64.

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

BÉNÉ C, HERSOUG B, ALLISON EH. Not by rent alone: analysing the proper functions of small-scale fisheries in developing countries. Development Policy Review. 2010;28(3):325–58.

BÉNÉ C, BELAL E, BABA MO, OVIE S, RAJI A, MALASHA I, NJAYA F, NA ANDI M, RUSSELL A, NEILAND A. Power struggle, dispute and alliance over local resources: analyzing 'democratic' decentralization of natural resources through the lenses of Africa inland fisheries. World Development. 2009;37(12):1935–50.

BERGEY S. Manual of determinative bacteriology. 9. ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994. 787 p.

BERNIER C, GOUNON P, BOUGUÉNEC CL. Identification of an Aggregative adhesion Fimbria (AAF) type III-encoding Operon in Enterοaggregative *Eschericia*

coli as a sensitive probe for detection the AAF-encoding operon family. Infectious Immunology. 2002;70(8):4302-11.

BOSTOCK J, MCANDREW B, RICHARDS R, JAUNCEY K, TELFER T, LORENZEN K, LITTLE D, ROSS L, HANDISYDE N, GATWARD I, CORNER R. Aquaculture: global status and trends. Phil Trans R Soc B. 2010;365:2897–2912.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Brasil. Resolução nº12, de 02 jan 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília: Diário Oficial da União, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6º ed. Brasília: 2005. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. Acesso em 17 de dez 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Aquicultura. Informações Estatísticas. Estatística da pesca e aquicultura. Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil 2008/2009. Disponível em: <
<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/dados/2010/Docs/Caderno%20Consolida%C3%A7%C3%A3o%20dos%20dados%20estatiscos%20final%20curvas%20completo.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2013.

BRAVO L, FERNÁNDEZ A, NÚÑEZ FA, RIVERO LA, RAMÍREZ M, ÁGUILA A, CRUZ YL, HERNÁNDEZ YJ. *Aeromonas* spp associada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. Rev Chil Infect. 2012;29(1):44-8.

CABELLO FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environment Microbiol. 2006;8(7):1137–44.

CAMPO LFC. La tilapia roja: una evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito. México, 2008. 147p.

CARMO GM, OLIVEIRA AA, DIMECM CP, SANTOS DA, ALMEIDA MG, BERTO LH, ALVES RMS, CARMO EH. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico. 2005;6(5):1-7

CARMO GMI, OLIVEIRA AA, DIMECH CP, SANTOS DA, ALMEIDA HG, BERTO LH, ALVES RMS, CARMO EH. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 - 2004. In: Boletim eletrônico epidemiológico. Ano 5, n. 06. Brasília: 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso em: 22 jan. 20011.

CARVALHO FCT. Influências exógenas na qualidade bacteriológica da água, solo e camarão (*Litopenaeus vannamei*) em quatro fazendas de camarão do Estado do Ceará. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

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

CLARKE SC. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* — an emerging problem? Diagnostic Microbiology Infectious Diseases. 2001;41(3):93–8.

COSTA MM, MABONI F, WEBER SS, FERRONATO AI, SCHRANK IS, VARGAS APC. Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. Arquivos do Instituto Biológico. 2009;76(3);509-16.

CSPI. CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTESRES – CSPI. Fish & shellfish top CSPI outbreak list. 2008. Disponível em: <[http://www.caunesp.org.br/CSPI/outbreaks/](#)>

file:///C:/Users/Barretos/Documents/_NORMA/Artigos%20em%20PDF/Pescado/Fish%20&%20Shellfish%20Top%20CSPI%20Outbreak%20List.htm>. Acesso em: 20 jan. 2013.

DURAN GM, MARSHALL DL. Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of antibiotic-resistant bacteria. J. Food Prot. 2005;68:2395-401.

EVANGELISTA-BARRETO NS. Investigação sobre possível portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2001 92p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture. World Food and Agriculture. Roma: FAO; 2012. 230p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Yearbook. World Food and Agriculture. Roma: FAO; 2013a. 307p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P03.htm>. Acesso em 05 de abril de 2013.

FELDHUSEN F. The role of seafood in 1. foodborne diseases. Microb Infect. 2000;2(13):1651-60.

FIGUEIREDO MCB, ARAÚJO LFP, GOMES RB, ROSA MF, PAULINO WD, MORAIS LFS. Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura em águas interiores. Eng San Amb. 2005;10(2)167-74.

FRANCO BDGM, LANDGRAF M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 182 p., 2008.

GARCIA-ALJARO C, MUNIESA M, BLANCO M, BLANCO J, JOFRE J, BLANCH AR. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. Fems Microbiology Letters. 2005;246(1):55-65

GARCIA SM, ROSENBERG AA. Food security and marine capture fisheries: characteristics, trends, drivers and future perspectives. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2010;365(1554):2869–80.

GERMANO PML, GERMANO MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Varela, 2003. 653 p.

GERMANO PML, GERMANO MIS, OLIVEIRA CAF. Qualidade do Pescado In: Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos. São Paulo:Varela, 2001. Cap. 8, p.120.

GEUS JAM, LIMA IA. Análise de Coliformes totais e fecais: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. In: Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais, 2, 2008.

GILLIGAN PH. *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. Clinics in Laboratory Medicine. 1999;19(3):505-21.

GIOVANINI A, SARTORI DO, AMANCIO RD. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. Organization, 2012;2(11):83–93.

GONÇALVES AA. Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação – 1ª ed, São Paulo: Atheneu, 2011. 608p.

GOZLAN RE, BRITTON JR, COWX I, COPP GH. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. J Fish Biology. 2010;76(4):751–86.

GRAHAM J, JOHNSTON WA, NICHOLSON FJ. El hielo en las pesquerías. FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Documento Caunesp

Técnico Pesca 331. Roma, 1993. 95p. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 28 de agosto de 2010.

GUZMÁN MC, BISTONI MDLA, TAMAGNINI LM, GONZÁLEZ RD. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. Water Research. 2004;38(9):2368-74.

GUGLIELMETTI E, KORHONEN JM, HEIKKINEN J, MORELLI L, VONWRIGHT A. Transfer of plasmid- mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. FEMS Microbiol Lett. 2009;293:28-34.

HATHA AAM, VIVEKANANDHAN AA, JOICE GJ, CHISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. International Journal of Food Microbiology. 2005;98:131-34.

HUANG DB, DUPONT HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. Pediatric Infectious Diseases. 2004;15(4):266-71.

HUSS HH, REILLY A, EMBAREK PKB. Prevention and control of hazards in seafood. Food Control. 2000;11(2):149-56.

JANDA JM, ABBOTT SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infaction. Clin Microbiol Ver. 2010;23:35-73.

JANDA JM, ABBOTT SL. Revisiting bacterial gastroenteritis, Part I: Issues, possible approaches, and an ever-expanding list of etiologic agents. Clin. Microbiol. Newsletter. 2011;33(10):71-6.

JAY MJ. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KAPER JB, NATARO JD, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Natural Review. 2004;2(2):123-39.

KO WC, CHIANG SR, YAN JJ, CHUANG YC. Comparative pathogenicity of bacteraemic isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae*. Clinical Microbiology and Infection. 2005;11(7):

KUHNERT P, BOERLIN P, FREY J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. FEMS Microbiology Reviews. 2000;24(1):107-17.

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. 2011;34:53-63.

LANZARIN M, ALMEIDA FILHO ES, RITTER DO, MELLO CA, CORRÊA GSS, IGNÁCIO CMS. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrótrófos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011;63:1541-46.

LEAL Y, REYES M, ÁLVAREZ J, OBREGÓN J, VIÑA X. Enteropatogenicidad de bacterias aisladas de peces, del agua y plancton de su entorno en Venezuela. FCV-LUZ. 2009;19(5):446-54.

LORENZON CS, GATTI JUNIOR P, NUNES AP, PINTO FR, SCHOLTEN C, HONDA SN, AMARAL LA. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo. Revista Arquivos do Instituto Biológico. 2010;77(4):617-624.

MACINTOSH D, CUNNINGHAM M, JI B, FEKETE FA, PARRY EM, CLARK SE, ZALINGER ZB, GILG IC, DANNER GR, JOHNSON KA, BEATTIE M, RITCHIE R. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella* enterica plasmid pSN254. J Antimicrob Chemother. 2008;61:1221-28.

MAZEL D. Integrans: agents of bacterial evolution. *Nature Rev Microbiol* 2006;4:608-20.

MARTIN-CARNAHAN AM, JOSEPH SW. Aeromonadaceae. In: BENNER DJ, KRIEG NR, STALEY JT, GARRITY GM. *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ed. New York: Springer Verlag. 2005.v.2.

MANNING SD, MOTIWALA AS, SPRINGMAN AC, QI W, LACHER DW, OUELLETTE LM, MLADONICKY JM, SOMSEL P, RUDRIK JT, DIETRICH SE, ZHANG W, SWAMINATHAN B, ALLAND D, WHITTAM TS. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *PNAS*. 2008;105(12):4868-73

MANUEL PABLOS JM, RODRÍGUEZ-CALLEJA JA, SANTOS AO, GARCÍA-LOPES ML. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factor. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; n 35, p.158-164,

MEIRA DR, MARTINS AO, OLIVEIRA FS, MEIRA JT. Características Físico – Químicas do Pescado Fresco Analisado no serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) –UNESP- Botucatu. *Revista Higiene Alimentar*. 1999;13(61):70-73.

MENG J, FENG P, DOYLE P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES FP, ITO K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington, APHA, 2001. p. 331-341.

MILLER LG, KAPLAN SL. *Staphylococcus aureus*: A Community Pathogen. *Infect Dis Clin*. 2009;23:35-52.

MILLARD G, ROCKLIFF S. Microbiological quality of sushi. In: *Health Services – Food Survey Reports 2000-2003*. Austrália, 2003. Disponível em: Caunesp

[<http://www.health.act.gov.au/c/health?a=da&did=10060511&pid=1094601516>]. Acesso 20 abr de 2012.

MOHAMEDHATHA AA, LAKSHMANAPERUMALSAMY P. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. Food Microbiol. 1997;14:111-6.

MORALES G, BLANCO L, ARIAS ML, CHAVES C. Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. ALAN, 2004;54(4):433-37.

MORITA M, MATTÉ GR, DROPA M, MARQUES-AZEVEDO V, MATTÉ MH. Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella* spp na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiros. In: ESTEVES KE, SANT'ANNA CL. Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2006, p. 91-104.

MURATORI MCS, COSTA APR, VIANA CM, RODRIGUES PC, PODESTA-JUNIOR RL. Qualidade sanitária de pescado "in natura". Higiene Alimentar. 2004;8:50-54.

NAKANISHI N, TASHIRO K, KUHARA S, HAYASHI T, SUGIMOTO N, TOBE T. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiology. 2009;155(2):521–30.

NAMBIAR VN, MAHADEVAIYER, K. Distribution of *Salmonella* serotypes in fish in retail trade in Kochi. Fishery Tech. 1991;28(1):33-7.

NATARO JP, KAPER JB, BROWNE RR, PRADO V, VIAL P, LEVINE MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatric Infectious Diseases Journal. 1987;6(9):829-831.

NATARO JP, KAPER JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 1998;11(1):142- 201.

NEWAJ-FYZUL A, MUTANI A, RAMSUBHAG A, ADESIYUN A. Prevalence of bacterial pathogens and their anti-microbial resistance in tilapia and their pond water in Trinidad. Zoon Public Health. 2008;55:206-13.

NGUYEN RN, TAYLOR LS, TAUSCHEK M, ROBINS-BROWNE RM. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. Emerging Infectious Diseases. 2006;12(1):597-603.

OGAWA M, MAIA E. Manual da Pesca. São Paulo: Varela., p: 173-200, 1999.

ORDÓÑEZ A.O. *Tecnologia de Alimentos*. São Paulo:2005, ed.Artmed, v.2,cap.12, p.299-228.

PARENTE LS. Condições higiênico- sanitárias da água e do camarão em duas fazendas de cultivo de pequeno e médio portes, no Estado do Ceará. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

PEIXOTO AM, TOLEDO FF. Enciclopédia agrícola brasileira: CD-ROOM, Volumen 2. Ed. USP, 1998.

PINTO PSA. Aspectos sanitários da Salmonelose como uma Zoonose. Revista Higiene Alimentar. 2001;14(73):39-43.

PINTO AT. Ocorrência de Enfermidades bacterianas transmitidas por alimento no Estado do Rio Grande do Sul. 1999. 1251. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

POND MJ, STONE DM, ALDERMAN DJ. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2006;261:194-203.

PUI CF, WONG WC, CHAI LC, TUNUNG R, JEYALETCHUMI P, NOOR HMS, UBONG A, FARINAZLEEN MG, CHEAH YK, SON R. *Salmonella*: a foodborne pathogen. *Int Food Res J*. 2011;18:465-73.

RANGEL PM. Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

RODRIGUES MSM, RODRIGUES LB, CARMO JL, JÚNIOR WBA, PATEZ C. Aproveitamento integral do pescado com ênfase na higiene, manuseio, cortes, salga e defumação. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte. 2004.

REIJ MW, DEN AANTREKKER ED. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Microbiology*. 2004;91:1-11.

REILLY PJA, TWIDDY DR. *Salmonella* and *Vibrio cholerae* in brackish water tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*. 1992;16: 293-301.

SAHEKI K, KABAYSHI S, HABANISHI T. *Salmonella* contamination of eel culture ponds. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1989;55:675-679.

SAAID M, SAAD B, HASHIM NH, ALI ASM, SALEH MI. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*. n. 113, p. 1356-1362, 2009.

SALGADO-MIRANDA C, PALOMARES E, JURADO M, MARÍN A, VEGA F, SORIANO-VARGAS E. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health*. 2010;22:244-47.

SILVA ML, MATTÉ GR, MATTÉ MH. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. Revista do Instituto Adolfo Lutz 2008;67(3):208-14.

SILVA ML, MATTÉ GR, GERMANO PML, MATTÉ MH. Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil J Food Saf. 2010;30:94–110.

SILVA JR, EA. Manual de controle higiênico sanitário em alimentos. 4ªed. São Paulo: Varela. 2002. 626p.

SILVA RML. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense. Tese (doutorado) – Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista, Faculdade Júlio de Mesquita, Jaboticabal/SP. 2010.

SØRUM H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup F, ed. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington DC: ASM Press, 2006.

SMITH P. Antimicrobial resistance in aquaculture. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2008; 27: 243-64.

SOUSA CL, FREITAS JA, LOURENÇO LFH, ARAUJO EAF, SOUZA JNS. Avaliação da qualidade microbiológica no processamento de pescados. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011;70(2):151-7.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia, 3ª. ed., Editora Atheneu, Rio de Janeiro, p.586, 2002.

TRONDSEN T, SCHOLDERER J, LUND E, EGGEN AE. Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women. *Appetite*. 2003;41(3):301-14.

VICENTE CP. Avaliação da Qualidade do pescado fresco comercializado no comércio varejista no município de São Gonçalo – RJ. 2005. Dissertação. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense - UFF; Rio de Janeiro.

VICENTE LCP, TEIXEIRA LMF, NIGUEZ-ROJAS L, LUNA MG, SILVA L, ANDRADE JRC, GUTH BEC. Outbreaks of cholera-like diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon Rainforest. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99(9):669-674.

VIEIRA RHSF, RODRIGUES DP, BARRETO NSE, SOUSA OV, TORRES RCO, RIBEIRO RV, SAKER-SAMPAIO S, NASCIMENTO SMM. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 388 p.

VALLANDRO MJ, KINDLEIN L, CAMPOS T, PAIM D, CARDOSO M. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(2):144-50.

VIVEKANANDHAN G, HATHA AAM, LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore. *Food Microbiol*. 2005;22:133-137.

VIEIRA RHSF, RODRIGUES DP, BARRETO NSE, SOUZA OV, TORRES RCO, RIBEIRO RV. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado; teoria e prática. São Paulo: Varela; 2004.

YOUSSEF H, EL-TIMAWI AK, AHMED. Role of pathogens of freshwater fish in transmission of humans diseases. *J Food Prot*. 1992;55(9):739-40.

WANI SA, HUSSAIN I, NABI A, FAYAZ I, NISHIKAWA Y. Variants of eae and stx genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxinproducing *Escherichia coli* from calves. Letters in Applied Microbiology. 2007;161(6):145–148.

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

WYATT LE, NICKELSON R, CARL VANDERZANT C. Occurence and control of *Salmonella* in freshwater catfish. J Food Science. 1979;44:1067-1069.

MANUSCRITO

I

Qualidade microbiológica e detecção de *Escherichia coli* patogênica por PCR multiplex em tilápias comercializadas no varejo¹

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi identificar microrganismos indicadores de qualidade sanitária e higiênica em tilápias (*Oreochromis niloticus*) comercializadas no varejo, além de verificar a presença dos genes de virulência *stx 1*, *stx 2*, *eae*, *eltB*, *estA*, *estB*, *aggR* e *aafII* e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli*. A colheita da tilápia em forma de filé e *in natura* foi realizada em dez estabelecimentos de municípios do Estado de São Paulo. Os resultados para *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positivos estiveram de acordo com a legislação brasileira. Entretanto, foram encontradas altas populações de *Aeromonas* sp., coliformes totais e termotolerantes. *Escherichia coli* patogênica foi isolada em amostras de dois estabelecimentos, com a presença dos genes *estA* e *eae*. Ainda, todos os antimicrobianos testados apresentaram isolados resistentes. Assim, esta pesquisa alerta para a manutenção das práticas sanitárias e higiênicas tanto na produção aquícola quanto na venda do pescado, já que a presença de patógenos em peixes pode oferecer risco à saúde pública.

Palavras chave: Virulência, coliformes, *Staphylococcus* sp., *Aeromonas* sp., Antimicrobianos.

Microbiological quality and detection of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR in tilapia sold in retail

ABSTRACT

The objective of this study was to identify microorganisms indicators of hygienic and sanitary quality in marketed tilapia (*Oreochromis niloticus*) and to verify the presence of virulence genes *stx 1*, *stx 2*, *eae*, *eltB*, *estA*, *estB*, *aggR* and *aafII* and the profile of antimicrobial susceptibility of strain *Escherichia coli*. The sample included tilapia fillets and *in natura* that was collected from ten establishments in cities of the São Paulo, Brazil. The results for *Salmonella* sp. and coagulase positive *Staphylococcus* were in accordance

¹ Artigo nas normas da revista Cadernos de Saúde Pública
Caunesp

with the Brazilian resolution. However, we found high concentrations of *Aeromonas sp.* and total and fecal coliforms. Pathogenic *Escherichia coli* was isolated in two establishments, where was observed the presence of *estA* and *eae* genes. All antimicrobials tested were resistant isolates. In conclusion, this study points to the maintenance of health and hygiene practices both in aquaculture and in fish sales, since the presence of fish pathogens can be a public health risk factor.

Keywords: Virulence, coliforms, *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas sp.*, Antimicrobial.

Calidad microbiológica y detección de *Escherichia coli* patógena por PCR multiplex de tilapia en la venta en el comercio

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar microorganismos indicadores de la calidad sanitaria e higiénica en pescados (tilapias) (*Oreochromis niloticus*) comercializadas, además de verificar la presencia de los genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *eae*, *eltB*, *estA*, *estB*, *aggR* y *aafII* y el perfil de susceptibilidad por antimicrobianos del aislado de *Escherichia coli*. La coleta de tilapia en forma de filete e in natura fue realizada en diez establecimientos en los municipios del Estado de São Paulo, Brasil. Los resultados para *Salmonella sp.* Y *Staphylococcus coagulase* estuvieron positiva de acuerdo con la Resolución Brasileña. Sin embargo, fueran encontradas altas concentraciones de *Aeromonas sp.*, coliformes totales y termo tolerantes. *Escherichia coli* patógena fue aislada en dos establecimientos, con la presencia de los genes *estA* e *eae*. Todavía, todos los antimicrobianos testados presentaran resistentes aislados. Así, este estudio alerta para la manutención de las prácticas sanitarias y higiénicas en la producción acuícola cuanto en la venta del pescado, ya que la presencia de patógenos en el pescado puede ofrecer risco para la salud pública.

Palabras clave: Virulencia, coliformes, *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas sp.*, Antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado, proveniente tanto da pesca extrativista quanto da aquicultura, atingiu aproximadamente 148 milhões de toneladas em 2010. Assim, nesse mesmo ano, a aquicultura brasileira foi responsável por 18% da produção mundial, gerando aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados ¹. Além disso, o crescimento da produção pesqueira entre os anos de 2008 e 2010 foi cerca de 40%, quando a produção passou de 282.008t para 394.340t, estando a tilápia como a espécie mais cultivada, representando próximo de 40% da produção nacional ².

Em geral, para consumo, o pescado pode ser adquirido em diversas formas de comércio, especializados ou não, pode ser vendido inteiro ou em forma de filé e estar *in natura*, refrigerado ou congelado. Entretanto, semelhantes aos demais produtos alimentícios, o pescado está sujeito à contaminação por diversos microrganismos o que pode evidenciar falhas em alguma das etapas da cadeia produtiva ³. Ainda, por ser um alimento de fácil decomposição, o pescado comercializado exige cuidado especial para manter-se seguros e livres de agentes causadores de danos à saúde do consumidor final. Já que o consumo do pescado pode originar surtos de doenças transmitidas pelos alimentos (DTA's)⁴.

No Brasil, a ocorrência de DTA's é bastante comum, embora não seja dada a devida importância pela população dos diversos níveis socioeconômicos ⁵. De forma diferente, em países onde se mantém o registro rigoroso das doenças veiculadas por alimentos, o pescado contribui significativamente para os casos dos surtos relatados, variando de um país para outro, dependendo de diversos fatores, como clima, costumes da dieta e outras diferenças sociais ⁶.

Para o controle da qualidade sanitária do pescado vendido fresco ou congelado no Brasil, as populações de *Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* sp. têm que estar de acordo com a Resolução RDC 12/2001 ⁷. Entretanto, não é necessária a determinação de microrganismos indicadores de higiene, como coliformes termotolerantes, ou a identificação e quantificação de possíveis patógenos, como as bactérias do gênero *Aeromonas* e *Escherichia coli*. Porém, a determinação da presença desses microrganismos pode identificar os padrões de higiene do pescado comercializado, além de indicar as condições de toda a cadeia produtiva em relação à contaminação microbiológica.

Apesar de não pertencer a microbiota natural do pescado, a presença de *Escherichia coli* em ambientes aquícolas é comum. E, geralmente, pode estar relacionada à diversos fatores, como: contaminação fecal do local onde o pescado foi capturado; transporte e manuseio, incluindo vasilhame e gelo utilizado; e outros processos e materiais que possam ter entrado em contato com o pescado fresco ⁸. Algumas estirpes de *Escherichia coli* podem causar diarreia, tanto em países em desenvolvimento como desenvolvidos, os surtos causados por *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) são comuns e importantes problemas relacionados à saúde pública ⁹. Existem seis categorias de DEC com diversas propriedades de virulência ¹⁰. As estirpes produtoras de shigatoxinas (*stx1* e *stx2*) do sorogrupo da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) estão entre as mais pesquisadas em surtos alimentares no mundo ¹¹. Além disso, outros sorogrupos são comuns em casos de diarreia no Brasil, como a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) ¹² e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) ¹³.

Outro fator que pode favorecer a ocorrência de estirpes de *Escherichia coli* patogênicas no ambiente aquícola ou no pescado comercializado é a utilização inadequada de antimicrobianos, pois estas podem adquirir genes de resistência e aumentar a possibilidade de infecção aos consumidores do produto final ¹⁴. A presença de *Escherichia coli* multirresistente tem sido relatada tanto em ambientes aquáticos ¹⁵ como em fontes animais ¹⁶.

Assim, essa pesquisa teve como objetivo identificar e quantificar microrganismos indicadores de qualidade sanitária e higiênica em tilápias (*Oreochromis niloticus*) comercializadas no varejo na forma de filé e *in natura*, além de verificar a presença de genes de virulência STEC (*stx 1*, *stx 2* e *eae*), ETEC (*eltB*, *estA* e *estB*) e EAEC (*aggR* e *aaflI*) por PCR multiplex e o perfil de susceptibilidade de isolados de *Escherichia coli* a antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e colheita das amostras

A região escolhida para pesquisa abrangeu os municípios de Ribeirão Preto/SP (n=5), São José do Rio Preto/SP (n=3), Araraquara/SP (n=1) e Franca/SP (n=1), localizados na região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Oito supermercados e duas

peixarias foram visitados para colheita das amostras entre outubro e dezembro de 2010. Para avaliação microbiológica em cada estabelecimento, foram colhidas cinco embalagens de filés e cinco peixes *in natura* de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Assim, as amostras foram colocadas, individualmente, em sacos plásticos esterilizados e hermeticamente fechados para transporte em caixa isotérmicas com gelo reciclável. Ao final, foram obtidas 50 amostras de tilápia *in natura* e 50 amostras de filé.

Preparo das amostras

Tilápia *in natura*

A pesquisa de microrganismos do peixe *in natura* foi analisada em três partes distintas: pele (água de enxaguadura), tecido muscular e trato gastrointestinal. Para a obtenção da água de enxaguadura da pele, foram adicionados 200mL de água peptonada 0,1% estéril ao saco que continha o peixe *in natura*. Posteriormente, o peixe foi massageado por um minuto, e a água foi transferida para recipiente estéril.

Para análise do tecido muscular, o peixe foi dissecado com o auxílio de instrumentos esterilizados e pesados 25 g de músculo de cada peixe em frascos estéreis contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%.

Para a obtenção da amostra do trato gastrintestinal do peixe, todo o seu conteúdo foi retirado e pesado para adição de um volume proporcional de água peptonada 0,1% para se obter a diluição 10^{-1} .

Tilápia em forma de filé

De cada embalagem, foram pesados 25g de filé em frascos estéreis contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1% para a obtenção da diluição 10^{-1} .

Para todas as amostras de tilápia *in natura* e filé, as demais diluições decimais foram realizadas de acordo com APHA¹⁷. Todas as amostragens tiveram cinco repetições.

Análises higiênicas e sanitárias

Para a análise das condições sanitárias das amostras, foi determinada a população de *Staphylococcus* coagulase positivos e a presença do gênero *Salmonella*¹⁷. Assim, para avaliação dos resultados, os mesmos foram comparados com a Resolução RDC 12/2001⁷. Para avaliação da qualidade higiênica do pescado, foram pesquisadas as populações de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* sp. e *Aeromonas* sp.¹⁷.

O isolamento de *Escherichia coli* foi realizado com a utilização do meio Ágar MacConkey¹⁸ e para cada amostra foram selecionadas cerca de cinco colônias para posterior confirmação bioquímica pelos testes de indol, citrato, vermelho de metila e Voges Proskauer¹⁹. Os isolados positivos para *Escherichia coli* foram preservados em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) com 40% de glicerol a -70°C até o momento da extração do DNA bacteriano.

Pesquisa de *Escherichia coli* patogênica

A partir dos isolados de *Escherichia coli* obtidos, a extração do DNA bacteriano foi realizada pela técnica proposta por Keskimaki et al.²⁰ com algumas modificações. Cada colônia de *Escherichia coli* foi semeada em um tubo de ensaio contendo 2mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), e incubada em estufa a 37°C por 18 horas. Em seguida, cada cultura foi transferida para um microtubo e centrifugada a 17226g (12.000 rpm) por 2 min para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspendidas em 1000µL de PBS (Tampão Fosfato Salino) estéril e agitadas em vórtex até completa diluição do precipitado. A cultura bacteriana foi novamente precipitada e foi descartado o sobrenadante conforme descrito anteriormente. Em seguida, 500µL de água ultrapura (Milli-Q) estéril foi adicionada e o tubo foi agitado em vórtex até dissolver o precipitado. O microtubo contendo cada cultura foi colocado por 10 min em água fervente. Após esse período, as células foram precipitadas por centrifugação a 17226g (12000 rpm) durante 2 minutos e uma alíquota de 400µL foi retirada do sobrenadante e transferida para outro microtubo. Esse material foi estocado em freezer a -20°C até da realização da PCR.

O DNA das amostras foi submetido às reações da PCR multiplex para a detecção dos genes EHEC (*stx1*, *stx2* e *eae*)²¹, EAEC (*aggR*²² e *aafII*²³) e ETEC (*eltB*²⁴, *estA*²⁵ e *estB*²⁶). Foram utilizadas como padrões, as cepas *Escherichia coli* edl933 e *Escherichia coli* O42 para EHEC (*stx1*, *stx2* e *eae*) e EAEC (*aggR* e *aafII*), respectivamente, cedidas pelo Laboratório de Epidemiologia e Patogenicidade de *Escherichia coli* Diarreio gênica da Unifesp (Universidade Federal de São Paulo), São Paulo, Brasil. Para o sorogrupo ETEC (*eltB*, *estA* e *estB*), foi utilizada a cepa padrão *Escherichia coli* EcL7805, cedida pelo Laboratório de *Escherichia coli* da Universidade de Montreal, cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Para a realização desse teste, os isolados de *Escherichia coli* foram repicados em tubos contendo ágar TSA e incubados a 37°C por 20 horas. Após incubação, cada cultura foi diluída em solução salina na concentração 1/2 da escala de MacFarland e semeada em ágar Mueller-Hinton. Posteriormente, os multidiscos com os seguintes agentes antimicrobianos foram adicionados às placas: Ampicilina 10µg (AMP), Meropenem 10µg (MER), Ceftazidima 30 µg (CAZ), Cefepima 30µg (CPM), Cefoxitina 30µg (CFO), Amoxicilina + Ac. clavulânico 20µg (AMC), Cefuroxima 30µg (CRX), Cefalotina 30µg (CFL), Cotrimoxazol 25µg (SUT), Amicacina 30µg (AMI), Gentamicina 10µg (GEN) e Ciprofloxacino 5µg (CIP). Após incubação a 37°C por 24 horas, o halo de inibição foi medido ²⁷ e cada isolado de *Escherichia coli* foi classificado como sensível, resistente intermediário e resistente de acordo com o padrão estabelecido para cada antimicrobiano ²⁸.

Análise dos dados

Diferença entre as peças nos resultados das populações (em logaritmos) coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva foram testadas usando a Análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do *post-hoc* de Tukey. As análises foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 15.0), considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados encontrados para todos os microrganismos pesquisados nas amostras dos dez estabelecimentos. Em relação aos parâmetros sanitários, os resultados encontrados para *Salmonella* sp. demonstraram que todas as amostras estiveram de acordo com a legislação vigente, pois o que é preconizado pela Resolução RDC 12/2001 é ausência em 25 gramas do pescado *in natura* ou refrigerado ⁷. Assim, todas as amostras de tilápia em filé e *in natura* apresentaram ausência dessa bactéria. Outras pesquisas apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho em pescado comercializado no varejo ^{29 30}. Entretanto, Bartolomeu et al. ³¹ detectaram a presença de *Salmonella* sp. em filés de tilápias de uma indústria de processamento, enquanto Santos et al. ³² encontraram em filé de piramutaba proveniente de supermercados.

Além disso, a presença de *Salmonella* em ambientes aquícolas também foi diagnosticada em diferentes países ^{33 34}. Assim, apesar da baixa frequência em pescado comercializado, a pesquisa de *Salmonella* deve ser frequente, pois as infecções causadas por esse microrganismo está entre as principais DTAs mundiais ³⁵. Apesar de sua ocorrência em ambientes aquícolas estar relacionada à contaminação da água por fezes humanas e/ou de animais, evidências apontam a presença de sorotipos em ambientes aquáticos tropicais ³⁶.

As populações de *Staphylococcus* coagulase positivos estiveram de acordo com a legislação vigente que determina valor máximo de 10^3 UFC.g⁻¹ para amostra indicativa ⁷. Os estabelecimentos seis e nove apresentaram contagem para esse grupo com valores inferiores ao preconizado, $3,6 \times 10^1$ UFC.g⁻¹ no filé e $0,4 \times 10$ UFC.ml⁻¹ na pele do peixe *in natura*, respectivamente (Tabela 2). Outras pesquisadas com tilápia provenientes do comércio varejista também apresentaram resultados de acordo com a legislação ^{31 37 38}. Porém, mesmo com o cumprimento dos padrões, a presença desses microrganismos nas amostras de filé e pele demonstra que pode ter ocorrido contaminação durante a manipulação ou beneficiamento do pescado nos estabelecimentos. Pois esses microrganismos estão presentes em diferentes partes do corpo humano que, por contaminação cruzada, chegam ao pescado, encontrando ambiente favorável para sua multiplicação.

Entre as espécies coagulase positivas mais pesquisadas, o *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns em surtos de origem alimentar ³⁹. No Brasil, a presença *Staphylococcus aureus* foi detectada por Rocha et al. ⁴⁰ em 100% das amostras de filés de tilápia colhidas no mercado municipal de Currais Novos/RN e por Boari et al. ⁴¹ em 30% das amostras da cadeia produtiva de filés de tilápia na cidade de Lavras/MG. Essa presença representa um risco à saúde pública, pois a intoxicação alimentar ocorre com a ingestão de enterotoxinas termoestáveis produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento ⁴².

Em pesquisa realizada com pescado adquiridos em supermercados no Japão, Saito et al. ⁴³, identificaram que aproximadamente 26% dos 173 isolados pertenciam a espécie *Staphylococcus aureus*. Entretanto, Romero-Janero e Negrete-Redondo ⁴⁴ não encontraram essa espécie no músculo do pescado comercializado na região do Caribe Mexicano. Porém, um fator de importância deve ser considerado, a produção de enterotoxinas por isolados

coagulase negativos já foi relatada ⁴⁵. Assim, as elevadas populações de *Staphylococcus* sp. nas amostras requer atenção às condições sanitárias e higiênicas da tilápia comercializada. Além disso, as duas maiores populações de *Staphylococcus* sp. em filé foram encontradas nas duas únicas peixarias estudadas, estabelecimentos 3 e 4, com valores de $4,5 \times 10^3$ e $3,5 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, respectivamente, demonstrando a fragilidade higiênica desses locais. Ainda, foi constatado que o filé e a pele do peixe *in natura* foram significativamente semelhantes em relação a esse parâmetro, ratificando o tipo de contaminação ocorrida pela manipulação (Tabela 3).

Entre os microrganismos pesquisados, *Aeromonas* sp. foi uma das mais frequentes, com aproximadamente 98% de presença nas amostras colhidas. A contagem desse microrganismo no filé variou entre $2,4 \times 10$ e $9,1 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ (Tabela 2). Na tilápia *in natura*, os resultados foram ≤ 2 UFC.g⁻¹ na musculatura do peixe e variaram entre $0,6 \times 10$ e $1,2 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ na água de enxaguadura da pele. Do mesmo modo, Morales et al. ⁴⁶ detectaram a presença do gênero *Aeromonas* em 98% das amostras de tilápia comercializadas na Costa Rica. Enquanto, Newaj-Fyzul et al. ⁴⁷ identificaram *Aeromonas* em 44% das tilápias comercializadas nas ilhas de Trinidad e Tobago, na América Central. Além disso, Vivekanandhan et al. ⁴⁸ em estudo realizado na Índia, isolaram *Aeromonas* em 33,58% de amostras de peixes comercializados no varejo e Abrahim et al. ⁴⁹ isolaram *Aeromonas* em 65% das amostras analisadas de peixes encontrados no varejo da Grécia.

As populações de *Aeromonas* sp. encontradas no filé enfatizam que pode ter ocorrido contaminação da carne pelas bactérias que estavam presentes na pele do peixe por ocasião do beneficiamento, pois analisando o teste estatístico, as populações do filé e da pele não tiveram diferença significativa (Tabela 3). Como esse gênero é comum em ambientes aquáticos, o pescado pode albergar microrganismos oriundos do seu habitat natural, na pele, nas brânquias e no trato gastrointestinal. Esse fato pode ser observado pelas populações de *Aeromonas* sp. no trato gastrointestinal (1×10 a $9,1 \times 10^2$ UFC.g⁻¹) e na pele do peixe *in natura* ($0,6 \times 10$ a $1,2 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹). Além disso, a presença de *Aeromonas* spp. pode estar relacionada à deterioração do pescado, pois a multiplicação desse microrganismo ocasiona o aumento da sua população durante a estocagem ⁵⁰. Assim, a ampla disseminação desses microrganismos nas amostras de tilápia em forma de filé e *in natura* representa risco de infecção microbiológica ao consumidor, visto que as mesmas espécies podem ser patogênicas para peixes e seres humanos ⁵³.

De forma geral, as maiores populações para coliformes totais foram no trato gastrointestinal da tilápia *in natura*, com valores entre $1,9 \times 10^3$ e $1,6 \times 10^5$ NMP.g⁻¹. Esses resultados apontam que o pescado pode ter sido cultivado em ambiente com alta carga orgânica, uma vez que os coliformes totais não pertencem a microbiota natural do peixe, representando, assim, a qualidade da água de cultivo. Além disso, a presença de *Escherichia coli* no trato gastrointestinal foi detectada em oito amostras dos dez estabelecimentos pesquisados, confirmando a contaminação do ambiente por fezes animais e/ou humanas durante a produção aquícola (Tabela 2).

Outro fator importante em relação a esse grupo microbiano foi a alta concentração na tilápia em forma de filé, com valores entre $2,6 \times 10^2$ e $1,6 \times 10^5$ NMP.g⁻¹. Pesquisas semelhantes foram realizadas com tilápias comercializadas em supermercados de diversos locais. Por exemplo, em Kolkata na Índia, Manna et al.⁴ determinaram concentrações entre 2×10^2 e $2,6 \times 10^3$ UFC.cm². Begum et al.⁵², também encontraram coliformes totais e termotolerantes com valores entre 2,1 e $2,4 \times 10^2$ e 0,4 e $1,1 \times 10^2$ NMP.g⁻¹, respectivamente, na cidade Bangladesh. Além disso, Fontes et al.⁵³ quando analisaram diversas espécies de peixes comercializadas em supermercados da cidade de Vila Real, Portugal, encontraram coliformes totais entre $0,9 \times 10^2$ e $1,1 \times 10^2$ NMP.mL⁻¹. Com esses resultados foi possível presumir que o grau de poluição microbiana a que foi exposto o alimento pesquisado foi elevado, sinalizando que é necessário rever os procedimentos operacionais realizados para a identificação das causas de contaminação do produto final. Uma vez que a determinação do grupo coliforme para controle das práticas higiênicas do beneficiamento do pescado fresco é recomendada.

Em relação às populações de coliformes termotolerantes, os valores encontrados nesta pesquisa variaram entre <2,0 e $1,9 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ no filé, $1,2 \times 10$ e $1,6 \times 10^4$ NMP.mL⁻¹ na água de enxaguadura da pele, <2,0 e $9,2 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ no trato gastrointestinal e <2,0 NMP.g⁻¹ na musculatura. A concentração de coliformes termotolerantes foi significativamente maior na pele do peixe *in natura* em comparação ao filé (Tabela 3). No peixe *in natura*, resultados próximos também foram observados por Silva et al.³⁰ em feiras-livres da cidade de São Paulo, Brasil, com valores entre <3,0 e $4,3 \times 10^3$ NMP.g⁻¹. Enquanto na cidade de Botucatu, Brasil, Rall et al.⁵⁴ encontraram valores entre <3,0 a $9,3 \times 10$ NMP.g⁻¹.

Em amostras de filés de tilápia colhidas em supermercados do estado da Virginia, Estados Unidos, Pao et al.⁵⁵ encontraram uma média de $5,2 \times 10 \text{ NMP.g}^{-1}$ de coliformes termotolerantes, tendo sido isolada *Escherichia coli* em 8,3% das amostras. Enquanto, Polimetla e Kunda⁵⁶ encontraram *Escherichia coli* em 95,83% das amostras de peixes da família ciprinídeos comercializadas na cidade de Guntur, Índia. Esse resultado é semelhante ao encontrado nesta pesquisa, pois foi possível isolar *Escherichia coli* do filé e da pele do peixe *in natura* em 90% e 100% das amostras dos estabelecimentos pesquisados, respectivamente (Tabela 2).

De forma geral, a discrepância observada entre os resultados das análises higiênicas e sanitárias, denota que embora os manipuladores da cadeia produtiva pareçam não ter sido as principais fontes dos microrganismos pesquisados, podem ter ocorrido falhas operacionais durante o beneficiamento do pescado, principalmente nas etapas de descamação e evisceração por expor a carne à contaminação bacteriana. Esse fato pode explicar as concentrações estatisticamente semelhantes de coliformes termotolerantes no trato gastrointestinal e no filé ($P > 0,05$) (Tabela 3).

Para a pesquisa de genes relacionados à patogenicidade das estirpes, foram avaliados 216 isolados de *Escherichia coli* provenientes da pele ($n=121$) e do trato gastrointestinal ($n=33$) do peixe *in natura*; e da tilápia em forma de filé ($n=62$). Assim, para os genes *aggR* e *aafl* do sorogrupo EAEC não foi encontrado nenhum isolado positivo. Esse patógeno também não foi encontrado em frutos do mar da cidade de Casablanca, Marrocos⁵⁷ e peixes da Coreia do Sul⁵⁸.

De forma geral, a ocorrência de *Escherichia coli* patogênica em ambientes aquícolas e produtos da pesca ainda possui pouca atenção. Porém a pesquisa por esse patógeno neste ambiente pode ser uma forma fácil para o controle de contaminantes e garantia da qualidade do produto final. Neste estudo, entre as cepas patogênicas pesquisadas, ETEC foi a mais frequente, encontrada em amostras de dois estabelecimentos, tendo sido isolada da pele ($n=4$) e trato gastrointestinal ($n=1$) do peixe *in natura* (Figura 1). Nestes isolados, foi identificado o gene *estA* e resultados semelhantes foram encontrados por Alagarsamy et al.⁵⁹ quando detectaram o gene *est* em sete isolados de diversos sistemas de produção aquícola em Cochim, Índia.

Entre os genes do sorogrupo EHEC (*stx1*, *stx2* e *eae*) pesquisados, somente se obteve resultado positivo em uma amostra da pele do peixe *in natura* para o gene *eae*

(Figura 1). De forma diferente, Manna et al.⁴ encontraram o gene *stx2* em peixes, crustáceos e mariscos comercializados em supermercados de Kolkata na Índia. Kumar et al.⁶⁰ também realizou pesquisa semelhante em supermercados de Mangalore, Índia, e encontraram o gene *stx* em dois dos sessenta isolados de *Escherichia coli* de peixes. Esses resultados evidenciam a importância do cuidado higiênico que deve ser dado ao pescado exposto em comércio varejistas, pois a presença de genes que dão características de patogenicidade às estirpes de *Escherichia coli* na pele do peixe *in natura* pode, por contaminação cruzada, ocasionar a contaminação de outros tipos de apresentação da tilápia ou outro pescado exposto. Isto pode originar surtos de enfermidades por *Escherichia coli* patogênica já que estão presentes no pescado comercializado.

A infecção por *Escherichia coli* patogênica geralmente é tratada com antimicrobianos específicos. Entretanto, dependendo da origem da estirpe, o tratamento pode torna-se mais complicado, pois, geralmente, isolados de origem ambiental são mais resistentes. Além disso, o uso desse tipo de droga é recomendado para o tratamento da doença diarreica quando considerada severa. O uso de antimicrobianos, na aquicultura, é realizado como medida de profilaxia, porém quando realizado de forma inadequada pode gerar bactérias resistentes através da pressão seletiva estabelecida no ambiente. Os antimicrobianos utilizados nesta pesquisa são importantes para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas na medicina humana e veterinária.

Os padrões de sensível, intermediário e resistente dos 216 isolados *Escherichia coli* contra os 12 antimicrobianos testados estão apresentados na Figura 2. Assim, os antimicrobianos com maior número de isolados resistentes, foram: cefalotina (n=126/61%), cefoxitina (n=106/51%), ampicilina (n=107/52%) e amoxicilina + ácido clavulânico (n=91/44%). E entre os antimicrobianos com menos de 20 isolados resistentes, foram: meropenem (n=5/2%), cefepima (n=8/4%), ciprofloxacina (n=12/6%), ceftazidima (n=14/7%), amicacina (n=16/8%) e gentamicina (n=19/9%).

Jeyasanta et al.⁶¹ quando avaliaram 92 isolados de *Escherichia coli* de frutos do mar comercializados na Costa de Tuticorin, Índia, encontraram 47% e 34% de resistência para amoxicilina e ampicilina, respectivamente. Em isolados de *Escherichia coli* de estuários da cidade de Cochin, Índia, Sukumaram et al.⁶² também observaram 65% de resistência para ampicilina entre os 75 isolados avaliados. No Brasil, Dias et al.⁶³, encontraram aproximadamente 60% de resistência para ampicilina e cefoxitina em 44

isolados de *Escherichia coli* de mexilhões capturados em áreas de extrativismo na cidade de Niterói/RJ. Por fim, Lima et al.⁶⁴, em Lavras/MG, observaram a presença de isolados microbianos resistentes a todos os antimicrobianos testados de filé de tilápia e de ambientes de criação da tilápia, com maiores percentuais de resistência para eritromicina e ampicilina.

Com base nos resultados encontrados nesta pesquisa e nas demais citadas, é possível considerar uma alta frequência de resistência a ampicilina em isolados microbianos de ambientes aquícolas. A resistência a antimicrobianos, como a ampicilina, por microrganismos presentes na aquicultura sugere que outros fatores, além das suas utilizações, favorecem a manutenção de bactérias resistentes no ambiente aquático⁶⁵. Do mesmo modo, Alagarsamy et al.⁶⁶, não encontraram diferenças entre isolados patogênicos clínicos e ambientais de *Escherichia coli* em relação ao padrão de resistência antimicrobiana.

Embora tenha ocorrido variação entre os padrões de resistência nos isolados estudados, aproximadamente 67% do total de isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos com diversas combinações. Entre as partes analisadas, 62% e 70% dos isolados da pele e trato gastrointestinal do peixe *in natura*, respectivamente, apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos. Enquanto 76% dos isolados da tilápia em forma de filé apresentaram multirresistência. Além disso, foi possível observar isolados resistentes a todos os antimicrobianos testados. O aumento do aparecimento de bactérias resistentes às múltiplas drogas é preocupante e diminui as opções de uso de antimicrobianos. Limitando, assim, a terapêutica para casos clínicos. Outros autores também relataram a ocorrência de resistência múltipla em pesquisas com *Escherichia coli* provenientes de ambientes aquícolas^{59 61}.

Outros problemas também podem surgir a partir do uso intensivo dos antimicrobianos na aquicultura. Bactérias, como a *Escherichia coli*, podem ser patogênicas aos seres humanos e podem ocorrer em viveiros de peixes e no ambiente aquático. Assim, à medida que o peixe é utilizado para consumo humano, a presença nesse alimento de microrganismos com resistência a antimicrobianos pode representar um risco à saúde do consumidor, pois as DTAs são responsáveis por altas taxas de mortalidade em diversos países. Assim, a segurança alimentar deve ser mantida em toda a cadeia de produção até

sua fase final, já que é possível a troca de genes de resistência entre os patógenos de peixes e seres humanos ⁶⁶.

Assim, a alta frequência de isolados de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos em pescado, alerta para os efeitos que a utilização dessas drogas pode causar entre patógenos humanos encontrados em ambientes aquáticos. Desta forma, as informações apresentadas neste trabalho são úteis para estimular a busca pelo uso seguro e eficiente de antimicrobianos nas atividades antrópicas. Além disso, esta pesquisa corrobora que as práticas sanitárias e higiênicas devem ser mantidas tanto na produção aquícola quanto na etapa de beneficiamento do pescado até sua disponibilização final no varejo, já que a presença de patógenos em peixes pode oferecer risco à saúde pública por contribuir para o surgimento de DTAs em seres humanos.

Tabela 2. Populações de Coliformes Totais (CT), Coliformes Termotolerantes (CTT), *Staphylococcus* sp. (STA), *Staphylococcus* coagulase positivos (STA C+), *Aeromonas* sp. (AERO) e *Escherichia coli* nas amostras de tilápia *in natura* e em filé dos dez estabelecimentos pesquisados.

Estab.	Amostra	CT	CTT	STA	STA C+	AERO	<i>E. coli</i>	Genes <i>E. coli</i>
1	Tilápia em filé	2,6x10	4x10	1,5x10 ²	<1,0	1,2 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	0,2 x10	<2,0	<1,0	<1,0	1,7 x10 ²	-	-
	Tilápia in Trato	3,6 x10 ³	1,2 x10 ²	<1,0	<1,0	1,2 x10 ²	+	-
	Tilápia in Pele	1,3 x10 ⁴	4,1 x10 ²	0,5 x10	<1,0	2,5 x10 ³	+	estA
2	Tilápia em filé	1,3 x10 ⁵	1,8 x10 ³	2,9 x10 ²	<1,0	1,1 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	4,2 x10	-	-
	Tilápia in Trato	1,6 x10 ⁵	<2,0	<1,0	<1,0	1,7 x10	+	-
	Tilápia in Pele	1,6 x10 ⁴	1,2 x10 ²	0,5 x10	<1,0	1,6 x10	+	-
3	Tilápia em filé	6,8 x10 ³	4,0 x10	4,6 x10 ³	<1,0	2,6 x10	+	-
	Tilápia Musc.	0,8	<2,0	<1,0	<1,0	0,4 x10	-	-
	Tilápia in Trato	1,8 x10 ³	<2,0	<1,0	<1,0	1,9 x10 ²	+	-
	Tilápia in Pele	1,2 x10 ⁴	2,1 x10 ²	8,5 x10 ³	<1,0	3,6 x10	+	-
4	Tilápia em filé	2,3 x10 ³	2,8 x10	3,5 x10 ³	<1,0	1,5 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	0,2 x10	<2,0	<1,0	<1,0	<1,0	-	-
	Tilápia in Trato	6,6 x10 ³	<2,0	<1,0	<1,0	2,5 x10	-	-
	Tilápia in Pele	5,1 x10 ³	2,6 x10	5,7 x10 ³	<1,0	0,6 x10	+	-
5	Tilápia em filé	3,4 x10 ³	1,3 x10 ²	3,8 x10 ²	<1,0	2,6 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	<1,0	-	-
	Tilápia in Trato	1,2 x10 ³	<2,0	<1,0	<1,0	1,0 x10	+	-
	Tilápia in Pele	1,2 x10 ⁴	<2,0	2,3 x10 ²	<1,0	1,3 x10	+	-
6	Tilápia em filé	1,6 x10 ⁶	3,3 x10	3,6 x10	3,6 x10	8,3 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	<1,0	-	-
	Tilápia in Trato	3,9 x10 ⁴	9,2 x10 ²	<1,0	<1,0	8,7 x10	+	-
	Tilápia in Pele	1,4 x10 ³	0,4 x10	9,1 x10	<1,0	3,4 x10	+	-
7	Tilápia em filé	1,1 x10 ⁵	1,9 x10 ²	2,7 x10	<1,0	5,4 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	3,0 x10	-	-
	Tilápia in Trato	2,3 x10 ³	<2,0	<1,0	<1,0	3,0 x10	+	-
	Tilápia in Pele	1,4 x10 ⁴	7 x10 ²	1,9 x10	<1,0	6,3 x10 ³	+	-
8	Tilápia em filé	1,5 x10 ⁴	<2,0	2,2 x10	<1,0	1,1 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	<1,0	-	-
	Tilápia in Trato	3,7 x10 ⁴	4,6 x10 ²	<1,0	<1,0	9,1 x10 ²	+	estA
	Tilápia in Pele	1,6 x10 ⁴	1,6 x10 ⁴	0,7 x10	<1,0	3,3 x10	+	eae, estA
9	Tilápia em filé	1,1 x10 ⁵	<2,0	6,2 x10	<1,0	2,4 x10	-	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	3,4 x10	-	-
	Tilápia in Trato	2,3 x10 ³	<2,0	<1,0	<1,0	2,6 x10	-	-
	Tilápia in Pele	1,3 x10 ⁴	1,2 x10	0,4 x10	0,4 x10	9,9 x10 ³	+	-
10	Tilápia em filé	4,9 x10 ⁴	3,3 x10	3,6 x10	<1,0	9,1 x10 ²	+	-
	Tilápia Musc.	<2,0	<2,0	<1,0	<1,0	<1,0	-	-
	Tilápia in Trato	1,1 x10 ⁴	<2,0	<1,0	<1,0	4,3 x10	+	-
	Tilápia in Pele	1,4 x10 ⁴	7,2 x10	2,5 x10 ²	<1,0	1,2 x10 ⁴	+	-

Legenda: Estab. – Estabelecimento; CT – coliformes totais (NMP.g⁻¹ ou NMP.mL⁻¹); CTT – coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹ ou NMP.mL⁻¹); STA – *Staphylococcus* spp. (NMP.g⁻¹ ou NMP.mL⁻¹); STA C+ – *Staphylococcus* coagulase positivos (NMP.g⁻¹ ou NMP.mL⁻¹); AERO – *Aeromonas* sp. (NMP.g⁻¹ ou NMP.mL⁻¹); *E. coli* – *Escherichia coli* presença (+) e ausência (-)

Tabela 3. Média Logarítmica das concentrações encontrados para Coliformes Totais (CT), Coliformes Termotolerantes (CTT), *Staphylococcus* sp. (STA), *Staphylococcus* coagulase positivos (STA C+) e *Aeromonas* sp. (AERO) nas amostras de tilápia *in natura* e em filé dos dez estabelecimentos pesquisados.

Amostra	CT (log ₁₀)	CTT (log ₁₀)	STA (log ₁₀)	STA C+ (log ₁₀)	AERO (log ₁₀)
Tilápia em Filé	4,1 ±0,9 ^a	0,6 ±1,3 ^a	1,8 ±1,2 ^a	0,1 ±0,3 ^a	1,6 ±1,2 ^a
Tilápia <i>in natura</i>	Musc	0,87 ±1,6 ^b	0,5 ±0,3 ^b	0,0 ±0,0 ^a	0,4 ±0,6 ^b
	Trato	3,5 ±1,1 ^c	0,3 ±0,9 ^{ab}	0,0 ±0,0 ^a	0,8 ±1,0 ^b
	Pele	4,0 ±0,3 ^{ac}	1,5 ±1,3 ^c	1,8 ±1,2 ^a	0,02 ±1,0 ^a

Legenda: Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem estatisticamente, com p<0,05 (Anova one-way com post hoc de Tukey).

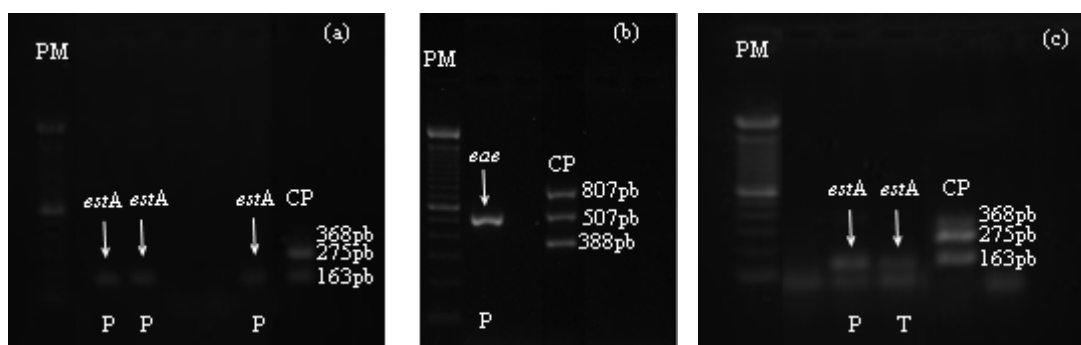


Figura 1. PCR Multiplex para a detecção dos genes patogênicos de *Escherichia coli*. (a) isolados positivos da pele (P) do estabelecimento 1 para o gene *estA*; (b) isolados positivos da pele (P) do estabelecimento 8 para o gene *eae*; (c) isolados positivos da pele (P) e trato gastrointestinal (T) do estabelecimento 8 para o gene *estA*. PM - Marcador Molecular de Peso Molecular conhecido, 100 pb DNA (Ladder - Invitrogen®). CP – Controle positivo para os genes *estA* (163pb), *eltB* (275pb) e *estB* (368) e genes *stx1* (388pb), *eae* (507pb) e *stx2* (807).

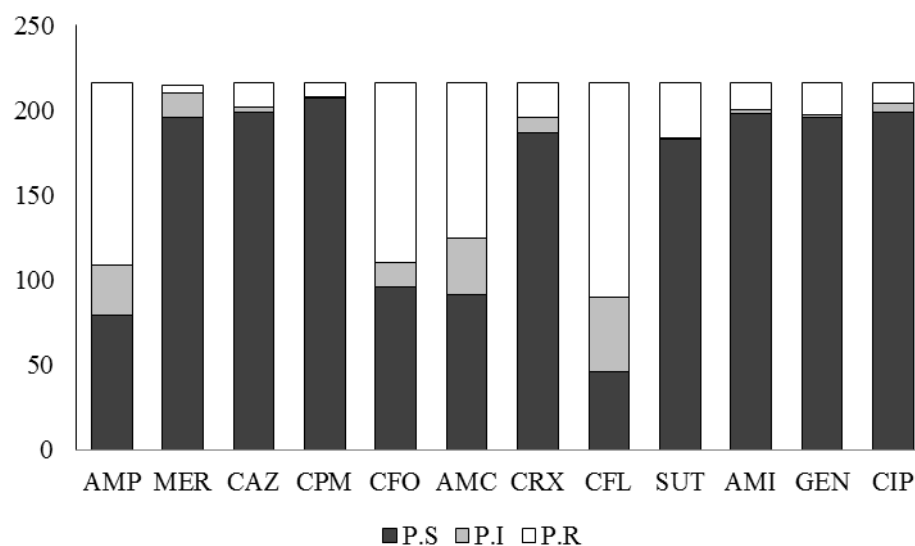


Figura 2. Isolados de *Escherichia coli* em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos: Ampicilina (AMP), Meropenem (MER), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (CPM), Cefoxitina (CFO), Amoxicilina + Ac. clavulânico (AMC), Cefuroxima (CRX), Cefalotina (CFL), Cotrimoxazol (SUT), Amicacina (AMI), Gentamicina (GEN) e Ciprofloxacino (CIP). P.S: Sensibilidade; P.I: Resistência Intermediária; P.R: Resistente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Yearbook. World Food and Agriculture. Roma: FAO; 2013. 307p.
- ² Ministério da Pesca e Aquicultura - Brasil. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil - 2010. Brasília: MPA; 2012. 129p.
- ³ Vallandro MJ, Kindlein L, Campos T, Paim D, Cardoso M. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011;70(2):144-50.
- ⁴ Manna SK, Das R, Manna C. Microbiological Quality of Finfish and Shellfish with Special Reference to Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157. J. Food Science. 2008;73(6):283-6.
- ⁵ Barreto NSE, Moura FCM, Teixeira JA, Assim DA, Miranda PC. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. Rev. Caat. 2012;25(3)86-95.
- ⁶ Janda JM, Abbott SL. Revisiting bacterial gastroenteritis, Part I: Issues, possible approaches, and an ever-expanding list of etiologic agents. Clin. Microbiol. Newsletter. 2011;33(10):71-6.
- ⁷ Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Brasil. Resolução nº12, de 02 jan 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília: Diário Oficial da União, 2001.
- ⁸ Agnese AP, Oliveira VM, Silva PPO, Oliveira GA. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais em peixes frescos comercializados no município de Seropédica-RJ. Hig. Aliment. 2001;15(88)67-70.
- ⁹ Bouzari S, Aslani MM, Oloomi M, Jafari A, Dashti A. Comparison of multiplex PCR with serogrouping and PCR-RFLP of *fliC* gene for the detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Braz J Infect Dis. 2011;15(4):365-369.
- ¹⁰ Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. J Clin Microbiol. 1998;36:598-602.
- ¹¹ Coombes BK, Gilmour MW, Goodman CD. The evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Front Microbio. 2011; 2(90)1-3.
- ¹² Moreno ACR, Fernandes-Filho A, Gomes TAT, Ramos STS, Montemor LPG, Tavares VC, Santos Filho L, Irino K, Martinez MB. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;66:50-57.

- ¹³ Regua-Mangia AH, Bezerra RMP, Esparis CM, Teixeira LM. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. Rev. Patol. Trop. 2009;38(1):27-34.
- ¹⁴ Millanao AB, Barrientos MH, Gómez CC, Tomova A, Buschmann A, Dölz H, Cabello FC. Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. Rev. Méd. Chile. 2011;139(1):107-18.
- ¹⁵ Rahman S, Parvez AK, Islam R, Khan MH. Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water, Bangladesh. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2011;10(10):1-4.
- ¹⁶ Fernández-Alarcón C, Singer RS, Johnson TJ. Comparative genomics of multidrug resistance encoding *inca/c* plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. PLoS One. 2011;6(8):1-9.
- ¹⁷ American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ed. 2001. 676 p.
- ¹⁸ Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. 8ed. Revision A. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998.
- ¹⁹ MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1976, 312 p.
- ²⁰ Keskimäki M, Eklund M, Pesonen H, Heiskanen T, Siitonen A. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001;40(4):151-156.
- ²¹ China B, Pirson, V, Mainil J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. Appl Environ Microbiol. 1996;62(9):3462-65.
- ²² Furrer B, Candrian U, Luthy J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. Lett Appl Microbiol. 1990;10(1):31-4.
- ²³ Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton DM, Fairbrother JM. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. J Vet Diagn Invest. 2003;15:242-52.
- ²⁴ Lortie LA, Dubreuil JD, Harel J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. J Clin Microbiol. 1991;29(3):656-59.
- ²⁵ Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2003;41(5):2138-40.

- ²⁶ Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1995;33(3):701-705.
- ²⁷ Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1996;45(4):493-6.
- ²⁸ Nccls. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 8º ed., v.23, n.1, 2003.
- ²⁹ Farias MCA, Freitas JA. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias Paraenses. Rev Inst Adolfo Lutz. 2008;67(2):113-7.
- ³⁰ Silva ML, Matté GR, Germano PML, Matté MH. Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil. J Food Saf. 2010;30:94-110.
- ³¹ Bartolomeu DAFS, Dallabona BR, Macedo REF, Kirschnik PG. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Arch Vet Sci. 2011;16(1):21-30.
- ³² Santos TM, Martins RT, Santos WLM, Martins NE. Inspeção visual e avaliações bacteriológica e físico-química da carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*) congelada. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2008;60(6):1538-45.
- ³³ Onyango DM, Wandili S, Kakai R, Waindi EN. Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. J Infect Devel Count. 2009;3(2):99-104.
- ³⁴ Figueiredo MCB, Araújo LFP, Gomes RB, Rosa MF, Paulino WD, Moraes LFS. Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura em águas interiores. Eng San Amb. 2005;10(2):167-74.
- ³⁵ Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor HMS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Son R. *Salmonella*: a foodborne pathogen. Int Food Res J. 2011;18:465-73.
- ³⁶ Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. Food Control. 2000;11(2):149-56.
- ³⁷ Soares VM, Pereira JG, Izidoro TB, Martins AO, Pinto JPAN, Biondi GF. Qualidade microbiológica de filés de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu – SP. Cient. Ciênc. Biol. Saúde. 2011;13(2):85-8.
- ³⁸ Soares KMP, Gonçalves AA, Souza LB, Silva JBA. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) armazenada em gelo. Acta Vet Brasil. 2012;6(3):239-42.
- ³⁹ Gonçalves AA. Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação – 1ª ed, São Paulo: Atheneu, 2011. 608p.

- ⁴⁰ 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. 2013;1:84-91.
- ⁴¹ Boari CA, Pereira GI, Valeriano C, Silva, BC, Moraes VM, Figueiredo HCP, Picolli RH. Bacterial ecology of tilapia fresh fillets and some factors that can influence their microbial quality. Ciênc Tecnol Alim. 2008;28(4):863-7.
- ⁴² Miller LG, Kaplan SL. *Staphylococcus aureus*: A Community Pathogen. Infec Dis Clin. 2009;23:35-52.
- ⁴³ Saito E, Yoshida N, Kawano J, Shimizu A, Igimi S. Isolation of *Staphylococcus aureus* from Raw Fish in Relation to Culture Methods. J. Vet. Med. Sci. 2011;73(3):287-92.
- ⁴⁴ Romero-Jarero JM, Negrete-Redondo MP. Presencia de bacterias Gram positivas en músculo de pescado con importancia comercial en la zona del Caribe mexicano. Rev Mex Biodiv. 2011;82:599-606.
- ⁴⁵ Santana EHW, Beloti V, Aragon-Alegro LC, Mendonça MBOC. Estafilococos em alimentos. Arq. Inst. Biol. 2010;77(3):545-54.
- ⁴⁶ Morales, G. Blanco L, Arias ML, Chaves C. Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. ALAN, 2004;54(4):433-37.
- ⁴⁷ Newaj-Fyzul A, Mutani A, Ramsubhag A, Adesiyun A. Prevalence of Bacterial Pathogens and their Anti-microbial Resistance in Tilapia and their Pond Water in Trinidad. Zoon Public Health. 2008;55:206-13.
- ⁴⁸ Vivekanandhan G, Hatha AAM, Lakshmanaperumalsamy, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore. Food Microbiol. 2005;22:133-137.
- ⁴⁹ Abraham A, Soutos N, Steris V, Papageorgiou K. Incidence of *Aeromonas* spp. in marine fish and the environment of fish markets in northern Greece. Italian J Food Sci. 2007; 19(1):111-6.
- ⁵⁰ Rall VLM, Pedroso DMM, Heidtmann S. *Aeromonas* species isolated from fish (*Pseudoplatystoma* sp.), virulence factors and drug susceptibility. Rev Microbiol. 1998;29:222-7.
- ⁵¹ Bravo L, Fernández A, Núñez FA, Rivero LA, Ramírez M, Águila A, Cruz YL, Hernández YJ. *Aeromonas* spp asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. Rev Chil Infect. 2012;29(1):44-8.
- ⁵² Begum M, Ahmed ATA, Das M, Parveen S. A Comparative microbiological assessment of five types of selected fishes collected from two different Market. Adv Biol Res. 2010;4(5):259-65.

- ⁵³ Fontes MC, Esteves A, Caldeira F, Saraiva C, Vieira-Pinto M, Martins C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2007;59(5):1308-15.
- ⁵⁴ Rall VLM, Cardoso KFG, Xavier C. Enumeração de coliformes termotolerantes em pescados frescos e congelados. PUBVET [On Line]. 2008;2(39):1-8.
- ⁵⁵ Pao S, Ettinger MR, Khalid MF, Reid AO, Nerrie BL. Microbial quality of raw aquacultured fish fillets procured from internet and local retail markets. J Food Protect. 2008;71(8):1544-9.
- ⁵⁶ Polimetla B, Kunda SK. Prevalence of *Escherichia coli* in food fishes assessed from domestic retail fish market, Guntur city, Andhra Pradesh, India: a case study. Internat J Eng Sci Tech. 2013;5(7):1545-52.
- ⁵⁷ Badria S, Filliolb I, Carleb I, Hassara M, Fassouanec A, Cohena N. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from food in Casablanca (Morocco). Food Control. 2009;20(6):560-64.
- ⁵⁸ Koo HJ, Kwak HS, Yoon SH, Woo GJ. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28(4):1813-6.
- ⁵⁹ Alagarsamy S, Thampuran N, Joseph TC. Virulence genes, serotypes and antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* strains isolated from aquaculture and other sources. Aquac Res. 2009;41(7):1-12.
- ⁶⁰ Kumar HS, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. Lett Appl Microbiol. 2001;33:334-8.
- ⁶¹ Jeyasanta KI, Aiyamperumal V, Patterson J. Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in Sea Foods of Tuticorin Coast, Southeastern India. Adv Biol Res. 2012;6(2):70-77.
- ⁶² Sukumaran DP, Durairaj S, Abdulla MH. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* serotypes from cochin estuary. Interd Persp Infect Dis. 2012;2012:1-7.
- ⁶³ Dias MT, Santos PCRF, Oliveira LAT, Marin, VA. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* linnaeus, 1758) à antimicrobianos. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2010;30(2):319-24.
- ⁶⁴ Lima RMS, Figueiredo HCP, Faria FC, Picolli RH, Bueno-Filho JS, Logato PVR. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ciênc Agrot. 2006;30(1):126-32.
- ⁶⁵ Carneiro DO, Figueiredo HC, Pereira-Júnior DJ, Leal CAG, Logato PVR. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Arq Bras Med Vet Zoot. 2007;59(4):869-76.

⁶⁶ Noorlis A, Ghazali FM, Cheah YK, Tuan Zainazor TC, Wong WC, Tunung R, Pui CF, Nishibuchi M, Nakaguchi Y, Son R. Antibiotic resistance and biosafety of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater fish at retail level. Internat Food Res J. 2011;18(4):1523-30.

MANUSCRITO

II

***Aeromonas* sp. em tilápias comercializadas no varejo na forma de filé fresco e *in natura*¹**

RESUMO

A pesquisa teve como objetivo avaliar a ocorrência de espécies de *Aeromonas* sp. em tilápias comercializadas na forma de filé e *in natura*, bem como verificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das espécies encontradas. A pesquisa foi realizada em dez estabelecimentos (supermercados e/ou peixarias) em municípios do interior de São Paulo, Brasil. Um total de 96 isolados de *Aeromonas* sp. foram obtidos das amostras de tilápia em forma de filé (n=36) e *in natura* (n=60). As espécies mais frequentes foram *Aeromonas* *trota* (50%), *Aeromonas* *veronii* *biovar sobria* (28%) e *Aeromonas* *schubertii* (17%). De forma geral, as maiores frequências de isolados resistentes foram observadas para os antimicrobianos ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalotina, cefoxitina, cefuroxima e cotrimoxazol. A maioria dos isolados (34%) apresentou múltipla resistência, com índice MAR 0,50 (resistência a seis antimicrobianos), o que pode representar um risco à saúde pública. Assim, impedir a disseminação da múltipla resistência antimicrobiana na aquicultura é necessário, já que microrganismos autóctones desse ambiente podem oferecer riscos à saúde dos consumidores do pescado uma vez que estas espécies de *Aeromonas* sp. podem causar doenças em peixes e em seres humanos.

Palavras chave: Peixe; *Aeromonas* *trota*; Atimicrobianos; Índice MAR.

¹ Artigo nas normas da revista Brazilian Journal of Microbiology

***Aeromonas* sp. in tilapia sold at retail in the form of fresh fillet and fresh fish**

ABSTRACT

The research aimed to evaluate the occurrence of species of *Aeromonas* sp. in tilapia fillet and *in natura* as well as checking the profile of antimicrobial susceptibility of the microorganism species. The sample was collected in ten establishments (supermarkets and fish markets) from São Paulo, Brazil. A total of 96 strains of *Aeromonas* sp. were obtained from samples tilapia fillet (n=36) and *in natura* (n=60). The most frequent species were *Aeromonas trota* (50%), *Aeromonas veronii biovar sobria* (28%) and *Aeromonas schubertii* (17%). In general, the highest frequencies of resistant isolates were observed to antimicrobials ampicillin 10µg, amoxicillin + clavulanic acid 20µg, cephalothin 30µg, cefoxitin 30µg, cefuroxime 30µg and cotrimoxazol 25µg. Most isolates (34%) showed multiple resistance, with the MAR index of 0.50 (resistance to six antimicrobials), which may represent a risk to public health. In conclusion, preventing the spread of multiple antimicrobial resistance in aquaculture is necessary. Indigenous microorganisms found in this research offer consumer's health risks because *Aeromonas* sp. can cause disease in fish and humans.

Keywords: Fish; *Aeromonas trota*; Antimicrobials; Index MAR.

INTRODUÇÃO

A criação de peixes iniciou-se, principalmente, para suprir a demanda alimentar devido ao aumento populacional ocorrido. Assim, diversas espécies de peixes foram introduzidas, em todo mundo, para a criação de novas áreas pesqueiras e o aumento dos rendimentos comerciais.

Consequentemente, o pescado tornou-se uma das principais fontes de proteínas de origem animal. Em 2010, dos 148 milhões de toneladas de peixes, crustáceos e moluscos produzidos mundialmente, 128 milhões de toneladas foram utilizadas como alimento humano, proporcionando uma oferta de alimentos per capita estimada em cerca de 20 kg (peso vivo). Dessa forma, os produtos oriundos da pesca desempenham um importante papel no fornecimento mundial de alimentos, diretamente por representar 17% da proteína animal consumida pelos seres humanos e, indiretamente, pelo apoio à produção de alimentos pela aquicultura (Fao, 2013).

Apesar dos benefícios relacionados ao consumo desse produto, o risco da contaminação microbiana é considerável nesta atividade e, representando uma preocupação à saúde pública. Isso decorre pelo fato dos peixes poderem apresentar bactérias patogênicas oriundas tanto do ambiente aquático quanto do tipo de processamento e estocagem (Lanzarim, 2011).

Entre os microrganismos presentes na atividade aquícola, o gênero *Aeromonas* sp. é habitante natural de ecossistemas aquáticos e também desempenha um importante papel como patógeno primário no trato

gastrointestinal de alguns animais (Bravo et al., 2012). Assim, por possuir ampla distribuição no meio aquático, principalmente dulcícola, é descrito por alguns autores como patógenos de peixes e, no caso de espécies como *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. sobria* e *A. veronni*, por originar enfermidades veiculadas pela água e alimentos (Manuel Pablos et al., 2009; Aberoun e Jooyandeh, 2010). Geralmente, o ser humano é exposto a esse grupo bacteriano pelo consumo de peixes e derivados mal cozidos; ou pela contaminação cruzada entre alimentos, águas e matérias-primas; ou manipulação não higiênica dos alimentos (Leal et al., 2009).

Outro aspecto importante relacionado à intensificação da criação de peixes é o uso crescente de antimicrobianos, o que pode ocasionar, entre os microrganismos presentes, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana e a disseminação desses determinantes, desencadeada pela pressão seletiva sobre populações bacterianas (Smith, 2008). A troca genética desses genes de resistência pode ocorrer entre os diversos grupos bacterianos, sendo demonstrada pela ocorrência dos mesmos determinantes em bactérias aquáticas, patógenos de peixes e humanos (Macintosh et al., 2008).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência de espécies de *Aeromonas* sp. em tilápias comercializadas na forma de filé e *in natura* e avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados encontrados.

MATERIAL E MÉTODOS

A região escolhida para pesquisa abrangeu os municípios de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto, Araraquara e Franca, com um total de dez estabelecimentos, sendo oito supermercados e duas peixarias, localizados na região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Em cada estabelecimento foram colhidas cinco unidades amostrais de filés frescos (n=50) e cinco peixes comercializados *in natura* (n=50). As amostras foram colocadas em sacos plásticos esterilizados hermeticamente fechados e transportadas em caixa isotérmica com gelo reciclável.

O peixe *in natura* foi avaliado em três partes distintas: pele (água de enxaguadura), tecido muscular e trato gastrointestinal. Para cada peixe, foram realizados os procedimentos descritos a seguir. A água de enxaguadura da pele foi obtida ao adicionar 200mL de água peptonada 0,1% ao saco plástico contendo o peixe *in natura*, para transferência dos microrganismos da pele para a água peptonada. Enquanto para a obtenção da amostra correspondente ao trato gastrintestinal do peixe, todo o conteúdo foi retirado e pesado em recipiente estéril para adição de água peptonada 0,1%. Assim, para o enriquecimento seletivo, 25mL das amostras da água de enxaguadura da pele e 25mL da mistura de água peptonada e trato gastrointestinal foram transferidas para recipientes contendo 225mL de caldo tripticase de soja (TSB) adicionado de ampicilina 30mg/L. Para análise do tecido muscular, o peixe *in natura* foi dissecado com o auxílio de instrumentos esterilizados, foram retirados 25g de músculo e colocados em frascos estéreis contendo 225mL de caldo tripticase de soja (TSB) adicionado de ampicilina 30mg.L⁻¹. Em relação à tilápia em forma de filé fresco, de cada embalagem, foram

pesados 25g em frascos estéreis contendo 225mL de caldo tripticase de soja (TSB) adicionado de ampicilina 30mg.L⁻¹. Todas as amostras foram incubadas a 28°C por 24 horas.

A partir das culturas de enriquecimento seletivo, as amostras foram semeadas, com auxílio de alça de níquel-cromo, em placas contendo ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina (Majeed et al., 1990) e ágar dextrina-ampicilina (Havelaar e Vonk, 1988), ambos os meios de cultura continham ampicilina a 10mg.L⁻¹, e a incubação foi realizada por 24 horas a 28°C. De cada cultura, foram escolhidas cinco colônias com características sugestivas do gênero *Aeromonas* e semeadas em ágar tripticase-soja (TSA) e incubadas a 28°C por 24 horas. Cada isolado foi caracterizado em relação ao gênero pelos testes: coloração de Gram, consumo de açúcares em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (Saad et al., 1995), provas da motilidade, oxidase, catalase (Mac Faddin, 1976) e resistência ao agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) (Pathak et al., 1988). A caracterização das espécies foi realizada seguindo a chave de classificação Aerokey II (Carnarhan et al., 1991).

Para a realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos das espécies de *Aeromonas* sp., os isolados foram semeados em ágar Mueller-Hinton e utilizado multidisco com os seguintes antimicrobianos: Ampicilina 10µg (AMP), Meropenem 10µg (MER), Ceftazidima 30 µg (CAZ), Cefepima 30µg (CPM), Cefoxitina 30µg (CFO), Amoxicilina + Ac. clavulânico 20µg (AMC), Cefuroxima 30µg (CRX), Cefalotina 30µg (CFL), Cotrimoxazol 25µg (SUT), Amicacina 30µg (AMI), Gentamicina 10µg (GEN) e Ciprofloxacino 5µg (CIP). Após incubação a 28°C por 24 horas, o halo de inibição foi medido segundo recomendações de

Bauer et al. (1966). Cada isolado de *Aeromonas* sp. foi classificado como sensível ou resistente de acordo com o padrão estabelecido para cada antimicrobiano (Nccls, 2012). Para determinação da multirresistência foi utilizado o índice Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR), segundo Krumperman (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 96 isolados de *Aeromonas* sp. foram obtidos das amostras de tilápia em forma de filé (n=36) e *in natura* (n=60). A espécie mais frequente foi *Aeromonas trota* (50%), seguida da *Aeromonas veronii biovar sobria* (28%) e *Aeromonas schubertii* (17%). Essas espécies foram isoladas de todas os tipos de amostras analisadas. Enquanto, *Aeromonas caviae* (2%) foi isolada da pele do peixe *in natura* e do filé de tilápia e *Aeromonas hydrophila* (1%) apenas da pele (Tabela 1).

Tabela 1. Número (N) de espécies de *Aeromonas* sp. isoladas das amostras das tilápias comercializadas no varejo em forma de filé e *in natura*.

Espécie	Tilápia em Filé N	Tilápia <i>in natura</i> N			Total N (%)
		Musculo	Trato	Pele	
<i>Aeromonas trota</i>	19	9	9	13	50 (52)
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	8	4	4	11	27 (28)
<i>Aeromonas schubertii</i>	8	1	5	2	16 (17)
<i>Aeromonas caviae</i>	1	0	0	1	2 (2)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	1	1 (1)
Total N (%)	36 (37)	14 (15)	18 (19)	28 (29)	96 (100)

Diversas pesquisas realizadas em mercados e supermercados demonstraram a frequência dessas espécies em pescados frescos ou congelados. Abrahim et al. (2007) identificaram 120 isolados classificados como *A. hydrophila* (28%), *A. caviae* (29%) e *A. sobria* (12%), em um estudo com amostras de peixes marinhos comercializados em mercados de peixes da cidade de Tessalônica, Grécia. Suárez e Herrera (2011) observaram maiores frequências das espécies *A. hydrophila* (29,7%), *A. veronii biovar sobria* (19%), *A. jandaei* (17%) e *A. veronii biovar veronii* (17%), em um estudo com amostras de diversas espécies de pescado fresco comercializado na cidade de Pamplona, Colômbia. Castro-Escarpulli et al. (2003) identificaram *A. hydrophila* (56%), *A. caviae* (30%) e *A. veronii* (13%), ao analisar em filés congelados de tilápia comercializados na Cidade do México.

Diferente deste trabalho, as pesquisas relatadas identificaram maior frequência da espécie *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, Yucel e Balci (2010) também obtiveram menor quantidade de isolados de *A. hydrophila* em peixes de água doce comercializados em mercados da cidade de Ancara, Turquia. O escasso isolamento dessa espécie nas amostras colhidas pode indicar baixo risco de infecções gastrointestinais pelo consumo do pescado amostrado. *A. hydrophila* representa a espécie de *Aeromonas* sp. com maior potencial patogênico em alimentos de origem da pesca e aquicultura, por apresentar diversos fatores de virulência frequentemente associados às infecções causadas pelo consumo de alimentos contaminados (Oliveira et al., 2012).

Também de forma diferente, outras pesquisas identificaram maior frequência da espécie *Aeromonas caviae* em pescado comercializado. Nespolo

et al. (2012) avaliaram filés de salmão de supermercados do Estado de São Paulo, Brasil, e verificaram maior presença dessa espécie em 44% e 20% dos isolados de amostras de filé fresco e congelado, respectivamente. Yucel et al. (2005) isolaram estirpes de *Aeromonas* em 82,8% em amostras de carpa *Cyprinus carpio*, sendo as espécies mais frequentes *A. caviae* (66%), seguida por *A. hydrophila* (22,6%) e *A. veronii biovar sobria* (11,6%).

Estudos com resultados semelhantes ao desse trabalho também foram relatados em pesquisas com pescados de água doce e salina. Lanzarim et al. (2011) isolaram 45 estirpes de *Aeromonas* sp. em filé de pintado (*Pseudoplastystoma coruscans*) fresco comercializado no varejo e observaram que *A. trota* foi a espécie dominante, representando 26,7% dos isolados. Enquanto, a dominância de *A. veronii biovar sobria* foi verificada em amostras de peixes frescos de supermercados de Selangor, Malásia (Radu et al., 2003) e de ostras de um estuário do Ceará, Brasil (Evangelista-Barreto et al., 2006).

A alta prevalência de *Aeromonas* em amostras de pescado pode estar associada aos diversos fatores que acarretam sua contaminação, como o grau de poluição da água de criação, a contaminação secundária pela manipulação e o armazenamento, transporte e distribuição. Como esta bactéria é psicrófila, ela consegue proliferar em temperaturas de refrigeração ou no gelo usado para preservar os peixes durante a venda (Newaj-Fyzul et al., 2008; Yucel e Balci, 2010). Deste modo, a presença dessa espécie nas amostras do peixe em forma de filé pode representar que as condições higiênicas não foram adequadas durante o beneficiamento do pescado para evitar a contaminação do filé pelas bactérias presentes no trato gastrointestinal e na pele do peixe *in*

natura. Embora o gênero *Aeromonas* não seja rotineiramente investigado nem preconizado pela legislação sanitária vigente no Brasil, o seu estudo em peixes de cultivo é de indiscutível importância econômica e de saúde pública.

A espécie *A. trota*, a mais frequente nesse estudo, não é considerada um patógeno humano comum em países em desenvolvimento (Hirsch et al., 2006; Ghenghesh et al., 2008). Contudo, algumas pesquisas já relataram a presença dessa espécie em isolados de infecções gastrointestinais. Um exemplo foi o estudo de Bravo et al. (2012), em Cuba, com 166 estirpes de *Aeromonas* sp. isoladas de 2.322 crianças com diarreia, nas quais identificaram *A. trota* e *A. veronii* biovar *sobria* em 4,2% e 21,6% dos isolados, respectivamente. Além disso, a *A. veronii* biovar *sobria*, a segunda mais frequente nesta pesquisa, é comumente relatada em casos de diarreia no Brasil (Hofer et al., 2006; Guerra et al., 2007).

Além disso, o mecanismo de patogenicidade da *Aeromonas* sp. é complexo, pois sua virulência é considerada multifatorial e dependerá das espécies envolvidas e dos produtos extracelulares produzidos. Ullmann et al. (2005) isolaram diversas espécies de *Aeromonas* sp. em amostras de frutos do mar crus e prontos para consumo encontrados no varejo de Berlim, Alemanha. Os autores detectaram que 63% dos isolados produziram citotoxinas a 37°C. Com isso, os frutos do mar foram considerados como importantes vias de transmissão para patógenos, como a *Aeromonas*, responsáveis por infecções humanas transmitidas por alimentos. Além disso, diversos fatores de virulência já foram detectados em pesquisas realizadas com *Aeromonas* sp. isoladas de peixes de água doce, como a tilápia (Oliveira et al., 2012) e o catfish (Nawaz et

al., 2010). Ainda, Ottaviani et al. (2011), encontraram estirpes citotóxicas de *Aeromonas* sp. isoladas a partir de fontes de alimentos e meio ambiente (solo e água). A presença de citotoxinas identificadas a partir de isolados ambientais e de peixes representa um risco à saúde dos consumidores dos produtos aquícolas. Espécies como *A. hydrophila*, *A. veronii biovar sobria*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. veronii* são produtoras de citotoxinas e quatro dessas espécies foram identificadas no presente estudo.

De forma geral, as maiores frequências de isolados resistentes foram encontradas para os antimicrobianos ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e cefalotina (Tabela 2). O gênero *Aeromonas* é rotineiramente considerado resistente à ampicilina. Além disso, a espécie *Aeromonas veronii biovar sobria* possui como característica específica a resistência à cefalotina (Abbott et al., 2003). Porém, foi possível verificar que a resistência a esse antimicrobiano foi observada entre a maioria dos isolados de todas as espécies. A resistência aos antimicrobianos cefoxitina, cefuroxima e cotrimoxazol também foi frequente entre os isolados. Entretanto, nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e apenas três isolados foram resistentes aos agentes antimicrobianos amicacina e gentamicina.

De acordo com Heuer et al. (2009), antimicrobianos como amoxicilina e ampicilina podem ser utilizados na aquicultura com rota de administração oral. Entretanto, os autores consideraram esses mesmos antimicrobianos como criticamente importante para o tratamento de doenças na medicina humana. Diversos pesquisadores avaliaram a presença de resistência antimicrobiana em *Aeromonas* sp. isoladas tanto da aquicultura (Belém-Costa e Cyrino, 2006;

Akinbowale et al., 2006; Suhet et al., 2011) como em pescado colhido de mercados varejistas (Radu et al., 2003; Castro-Escarpulli et al., 2003).

Tabela 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos pesquisados das espécies de *Aeromonas* sp. isoladas das tilápias comercializadas no varejo.

Espécie	AMP	MER	CAZ	COM	CFO	AMC	CRX	CFL	SUT	AMI	GEN	CIP
<i>Aeromonas trota</i>	50	23	13	12	42	46	42	50	39	1	2	0
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	27	8	4	5	22	27	23	26	24	1	1	0
<i>Aeromonas schubertii</i>	16	2	3	3	15	14	15	16	14	0	0	0
<i>Aeromonas caviae</i>	2	0	0	0	1	2	1	2	1	1	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Total N (%)	96 (100)	33 (34)	20 (21)	20 (21)	80 (83)	90 (94)	81 (84)	95 (99)	78 (81)	3 (3)	3 (3)	0 (0)

Legenda: Ampicilina (AMP), Meropenem (MER), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (CPM), Cefoxitina (CFO), Amoxicilina + Ac. clavulânico (AMC), Cefuroxima (CRX), Cefalotina (CFL), Cotrimoxazol (SUT), Amicacina (AMI), Gentamicina (GEN) e Ciprofloxacina (CIP).

Resultados diferentes aos encontrados nesta pesquisa foram relatados por Castro-Escarpulli et al. (2003), em estudos com *Aeromonas* sp. isoladas de filés congelados de tilápia, pois observaram 41,5% e 58,4% dos isolados resistentes a ciprofloxacina e a gentamicina, respectivamente. Ainda, não observaram resistência para os antimicrobianos cefoxitina e cefuroxima. Porém, os autores também observaram que todos os isolados foram resistentes aos antimicrobianos cefalotina e ampicilina. Esses dois últimos antimicrobianos citados foram referidos por Akinbowale et al. (2006) em estirpes de *Aeromonas* sp. resistentes isoladas de ambientes de criação de peixes. Além disso, os autores também não observaram isolados com resistência à gentamicina e à ciprofloxacina.

Yucel e Ergogam (2010) observaram a presença de altas porcentagens de resistência para amoxicilina-clavulanato e cefalotina em 73 estirpes de *Aeromonas* sp. isoladas de amostras de origem ambiental e fontes alimentares da Turquia. Suhet et al. (2011) isolaram 74 estirpes de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. salmonicida* e *A. jandaei* de amostras de água de criação e superfície e rim de tilápia e encontraram maior frequência de resistência à amoxicilina e eritromicina e resistência à gentamicina em apenas três isolados. Resultados semelhantes foram obtidos nesta pesquisa. Belém-Costa e Cyrino (2006), ao examinar a sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. hydrophila* isoladas de pacus e tilápias confinados, identificaram 100% de resistência a amoxicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, ampicilina e tetraciclina.

Do mesmo modo, os resultados desta pesquisa para os antimicrobianos foram semelhantes ao estudo de Guerra et al. (2007). Os autores analisaram estirpes de *Aeromonas* sp. isoladas de casos de diarreia e verificaram menores perfis de resistência das estirpes para os antimicrobianos amicacina, gentamicina e ciprofloxacina, enquanto maiores perfis foram encontrados para cefalotina. Esses resultados demonstram a ocorrência de características semelhantes entre isolados de *Aeromonas* sp. de produtos aquícolas e patógenos humanos. Além disso, essas características de resistência podem ser transferidas entre diferentes gêneros bacterianos. Rhodes et al. (2000) investigaram a transferência de plasmídeos de resistência à oxitetraciclina entre os isolados aquícolas e hospitalares, e observaram que plasmídeos de

resistência foram transferidos entre *Aeromonas* spp. (isolados de peixes) e *Escherichia coli* (isolados humanos) em localizações geográficas específicas.

A alta frequência de isolados com múltipla resistência foi outro fator de risco à saúde pública observado nesse trabalho. Conforme a Tabela 3, a maioria dos isolados de *Aeromonas trota*, *Aeromonas veronii biovar sobria* e *Aeromonas schubertii* apresentou um índice MAR de 0,50. De acordo com Sarter et al. (2007), em isolados microbianos de fontes animais, um valor do índice MAR menor ou igual a 0,2 é um indicador de que o uso de antimicrobianos é raro ou nunca foram utilizados durante a produção animal. Entretanto, valores acima de 0,2 indicam que a produção animal pode ter sido realizada com uso de antimicrobianos, representando alto risco. Assim, pode-se deduzir que o uso de antimicrobianos no cultivo da tilápia pode estar ocorrendo e causando multirresistência em espécies de *Aeromonas* sp., já que apenas três isolados apresentaram índice MAR abaixo de 0,2.

Entre as espécies estudadas, *Aeromonas trota* e *Aeromonas veronii biovar sobria* apresentaram isolados com perfis de resistência a onze dos doze antimicrobianos avaliados. Resultados semelhantes foram observados por Hirsch et al. (2006), em isolados de *Aeromonas trota* de tilápias e ambientes de criação, quando os isolados apresentaram resistência a sete dos oito antimicrobianos avaliados. Entretanto, no presente estudo, um isolado de *Aeromonas veronii biovar sobria* apresentou maior índice MAR, 0,92.

Tabela 3. Índice MAR encontrado nas espécies de *Aeromonas* sp. isoladas das tilápias comercializadas no varejo.

Espécie	0,08	0,16	0,25	0,33	0,42	0,50	0,58	0,67	0,75	0,92
<i>Aeromonas trota</i>	1	0	1	6	2	14	10	5	9	0
<i>Aeromonas veronii</i> <i>biovar sobria</i>	0	1	0	2	4	12	4	0	3	1
<i>Aeromonas schubertii</i>	0	0	0	3	2	8	0	1	2	0
<i>Aeromonas caviae</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total N (%)	1 (1)	2 (2)	2 (2)	11 (11)	8 (8)	34 (35)	15 (16)	6 (6)	14 (15)	1 (1)

Radu et al. (2003), em estudo realizado com peixes de varejo, isolaram *A. hydrophila*, *A. veronii biovar sobria* e *A. caviae* e determinaram que todos os isolados foram resistentes a três ou mais antibióticos testados. Schmidt et al. (2001) também consideraram um alto nível de multirresistência em 48% dos isolados de *Aeromonas* sp. de sistemas aquícolas. A multirresistência aos antimicrobianos entre espécies de *Aeromonas* sp. isoladas de ambientes aquícolas tem sido considerada como frequente (Hatha et al., 2005). Portanto, é possível deduzir que essa característica possa permanecer entre os isolados desse gênero no pescado comercializado.

Assim, considerando o rápido crescimento da aquicultura em diversas regiões e a difusão da produção intensiva, impedir a disseminação da múltipla resistência antimicrobiana na aquicultura é necessário, pois o risco de transferência horizontal de genes de patógenos de peixes aos patógenos humanos pode ocorrer. Além disso, são necessários esforços para o controle sanitário dessa atividade, já que microrganismos autóctones desse ambiente podem oferecer riscos à saúde dos consumidores de pescado já que as

mesmas espécies de *Aeromonas* sp. podem causar doenças em peixes e em seres humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol 41:2348–2357.

Aberoum A, Jooyandeh H (2010) A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. World J Fish Marine Sci 2:519-523.

Abraham A, Soultos N, Steris V, Papageorgiou K (2007) Incidence of *Aeromonas* spp. in marine fish and the environment of fish markets in northern Greece. Italian J Food Sci 19:111-116.

Akinbowale OL, Peng H, Barton MD (2006) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J Applied Microbiol 100:1103-1113.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45:493–496.

Bravo L, Fernández A, Núñez FA, Rivero LA, Ramírez M, Águila A, Ledo Y, Cruz Y, Hernández J (2012) *Aeromonas* spp asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. Rev Chil Infect 29: 44-48.

Belém-Costa A, Cyrino JEP (2006) Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Sci Agric 63:281-284.

Carnahan AM, Behram S, Joseph SW (1991) Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. J Clin Microbiol 29:2843-2849.

Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparicio GO, Guarro J, Chacon MR (2003) Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int J Food Microbiol 84:41–49.

Evangelista-Barreto NS, Vieira RHSF, Carvalho FCT, Torres RCO, Sant'anna E, Rodrigues DP, Reis CMF (2006) *Aeromonas* spp isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. Rev Inst Med Trop 48:129-133.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Yearbook. World Food and Agriculture. Roma: FAO; 2013. 307p.

Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A, Klena J (2008) *Aeromonas* associated infections in developing countries. J Infect Developing Count 2:81-98.

Guerra IMF, Fadanelli R, Figueiró M, Schreiner F, Delamare APL, Wollheim C, Costa SOP, Echeverrigaray S (2007) *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. Brazilian J Microbiol 38:638-643

Hatha AAM, Vivekanandhan AA, Chistol JGJ (2005) Antibiotic resistance pattern of motile *Aeromonads* from farm raised fresh water fish. Internat J Food Microbiol 98:131-134.

Havelaar AH, Vonk M (1988) The preparation of ampicilin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. Lett Appl Microbiol 7:169-171.

Heuer OE, Kruse AH, Grave BK, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ (2009) Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Food Safety* 49:1248-1253.

Hofer E, Reis CMF, Theophilo GND, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques MFCM (2006) Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Rev Soc Brasil Med Trop* 39:217-220.

Krumperman PH (1985) Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46:165–170.

Lanzarin M, Almeida Filho ES, Ritter DO, Mello CA, Corrêa GSS, Ignácio CMS (2011) Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrótróficos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. *Arq Bras Med Vet Zootec* 63:1541-1546.

Leal Y, Reyes M, Álvarez J, Obregón J, Viña, X (2009) Enteropatogenicidad de bacterias aisladas de peces, del agua y plancton de su entorno en Venezuela. *FCV-LUZ* 19:446-454.

MacFaddin JF (1976) Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams e Wikins Co, Baltimore, 312p.

Macintosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, Zalinger ZB, Gilg IC, Danner GR, Johnson KA, Beattie M, Ritchie R. (2008) Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with

carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. J Antimicrob Chemother 61:1221-1228.

Majeed KN, Egan AF, MacRae IC (1990) Production of exotoxins by *Aeromonas* spp at 5°C. J Appl Bacteriol 69:332-337.

Manuel Pablos JM, Rodríguez-Calleja JA, Santos AO, Garcia-Lopes ML (2009) Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factor. Int J Food Microbiol 135:158-164.

Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K, Steele R (2010) Detection and characterization os virulence and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. Food Microbiol 27:327-331.

Nccls. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 8º ed., v.23, n.1, 2003.

Nespolo NM, Martineli TM, Rossi-Junior OD (2012) Microbiological quality of salmon (*Salmo salar*) sold in cities of the state of São Paulo, Brazil. Brazilian J Microbiol 43:1393-1400.

Newaj-Fyzul A, Mutani A, Ramsubhag A, Adesiyun A (2008) Prevalence of bacterial pathogens and their anti-microbial resistance in tilapia and their pond water in Trinidad. Zoon Public Health 55:206-213.

Oliveira STL, Veneroni-Gouveia G, Costa MM (2012) Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. Pesq Vet Bras 32:701-706.

Ottaviani D, Parlani C, Citterio B, Masini L, Leoni F, Canonico C, Sabatini L, Bruscolini F, Pianetti A (2011) Putative virulence properties of *Aeromonas*

strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *Int J Food Microbiol* 144:538-545.

Pathak SP, Bhattacharjee JW, Kalra N, Chandra S (1988) Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. *J Applied Bacteriol* 65:347-352.

Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A (2003) Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *Int J Food Microbiol* 81:261–266.

Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smiyh P, Pickup RW (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied Environ Microbiol* 66: 3883-3890.

Saad SMI, Iaria ST, Furlanetto SMP (1995) Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from São Paulo, Brazil. *Rev Microbiol* 26:22-27.

Sarter S, Nguyen HNK, Hung LT, Lazard J, Montet D (2007) Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18:1391-1396.

Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL (2001) Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied Environ Microbiol* 67:5675-5692.

Smith P (2008) Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 27:243-64.

Suárez WQ, Herrera FA (2011) Aislamiento de *Aeromonas* spp. en muestras de pescado fresco comercializado en Pamplona (Norte de Santander). Rev UDCA Act & Div Cient 14:7-13.

Suhet MI, Schocken-Iturrino RP, Amaral LA (2011) Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). Ars Vet 27:036-044.

Ullmann D, Krause G, Knabner D, Weber H, Beutin L (2005) Isolation and characterization of potentially human pathogenic, cytotoxin producing *Aeromonas* strains from retailed seafood in Berlin, Germany. J Vet Med B 52:82-87.

Yucel N, Aslim B, Beyatli Y (2005) Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species isolated from retail fish in Turkey. J Food Quality 28:313-24.

Yucel N, Balci S (2010) Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. J Food Prot 73:380-384.

Yucel N, Erdogan S (2010) Virulence properties and characterization of *Aeromonads* isolated from foods of animal origin and environmental sources. J Food Protect 73:855-860.

Consideração Final

De forma geral, os resultados encontrados neste trabalho para os parâmetros sanitários demonstraram que esses aspectos durante a oferta da tilápia em filé e *in natura* estão sendo cumpridos, diminuindo os riscos de ocorrência de DTAs entre os consumidores. Entretanto, os resultados encontrados para os demais parâmetros higiênicos estudados indicaram altas populações de microrganismos. Com isso, os resultados alertam para o controle que deve ser realizado nas etapas de produção e oferta do pescado.

Primeiramente, em relação à etapa de criação, os resultados das amostras do trato gastrointestinal da tilápia *in natura* demonstraram que os microrganismos presentes no pescado comercializado podem advir do ambiente de produção. Portanto, microrganismos como os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp., podem permanecer no peixe *in natura* ou no pescado beneficiado e serem uma fonte de contaminação ao produto final.

Assim, critérios para a prevenção da ocorrência desses microrganismos no pescado devem ser estabelecidos durante a criação de peixes, enfocando a qualidade da água utilizada na produção aquícola e o controle das cargas poluidoras presentes no seu ambiente de entorno. Além disso, as populações microbianas encontradas na água de enxaguadura da pele do peixe *in natura* também demonstraram que a desinfecção realizada após a captura desse produto pode não estar sendo suficiente para a diminuição da carga microbiana presente no pescado.

Em relação à etapa de beneficiamento do pescado, as altas populações de *Staphylococcus* sp. nas amostras da tilápia em forma de filé e na água de enxaguadura da pele do peixe *in natura* evidenciaram que a manipulação do pescado pode estar sendo realizada de forma inadequada. Assim, esses resultados corroboram que as altas populações dos demais microrganismos pesquisados podem indicar que a higiene realizada nesse processo ainda deve ser reavaliada para a diminuição do risco de contaminação entre os consumidores desse produto, uma vez que os microrganismos estudados no presente trabalho

podem colocar em risco a saúde dos consumidores. Do mesmo modo, esse produto pode se tornar uma fonte de contaminação cruzada tanto durante a sua oferta no varejo quanto na sua utilização pelo consumidor final.

A presença de *Escherichia coli* patogênica e algumas espécies de *Aeromonas* sp. no pescado comercializado representa um risco à saúde pública. Pois, esses microrganismos são causadores de infecções em seres humanos e por diversas vezes podem se tornar mais resistentes, facilitando sua sobrevivência no pescado. Ainda, esses microrganismos, quando presentes no alimento, podem produzir toxinas resistentes ao calor, o que potencializa o risco de contaminação entre os seres humanos.

A ocorrência de resistência a antimicrobianos entre os isolados de *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. demonstrou que o uso desses compostos podem estar sendo realizado durante o cultivo de tilápias, pois os isolados apresentaram padrões semelhantes de resistência aos antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalotina e cefoxitina. Assim, esses microrganismos resistentes podem ser transferidos aos seres humanos, como também seus genes de resistência podem ser disseminados entre os patógenos humanos, limitando gravemente as opções terapêuticas em infecções humanas.

Portanto, considerando o crescimento da atividade aquícola são necessários esforços para impedir a disseminação da resistência antimicrobiana na aquicultura, já que o uso de agentes antimicrobianos nesta área de produção animal não é regulamentado. Assim, para eficácia da prevenção e controle da utilização de agentes antimicrobianos na aquicultura, atividades, como melhoria nas rotinas de gestão, aplicação das diretrizes de uso prudente e monitoramento do uso de antimicrobianos e resistência antimicrobiana, são indispensáveis.