



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ISADORA FONTENELLE CARNEIRO DE CASTRO

VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* EM AMOSTRAS DE PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*) COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA

SÃO LUÍS
2017

ISADORA FONTENELLE CARNEIRO DE CASTRO

VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* EM AMOSTRAS DE PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*) COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Isabel Azevedo Carvalho

SÃO LUÍS

2017

ISADORA FONTENELLE CARNEIRO DE CASTRO

VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* EM AMOSTRAS DE PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*) COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária como parte das exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Isabel Azevedo Carvalho

Orientadora

Prof. Dra. Nancyleni Pinto Chaves

1º membro

Mestranda Fabiana Borralho Frazão

2º membro

Castro, Isadora Fontenelle Carneiro de.
Verificação da presença de *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializadas em São Luís – MA. / Isadora Fontenelle Carneiro de Castro. – São Luís, 2017.
48 f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Profa. Dra. Isabel Azevedo.

1. *Cynoscion acoupa*. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. *Vibrio parahaemolyticus*. 4. Pescado. 5. Saúde Pública. I. Título.
CDU 579.67:597.556.33(812.1)

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, acreditando,
me apoiando e sustentando em todos os projetos da minha vida,
com dedicação, muito amor, paciência, incentivo e compreensão.
E principalmente a Deus, por me propiciar todas as oportunidades
que tive na vida, pois sem Ele não sou nada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmão e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Dedico este trabalho aos meus avós paternos “In Memoriam”, e maternos, pela existência de meus pais, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

Ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, e as pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos.

Aos meus professores, que sempre me apoiaram durante o curso e não me deixaram desistir deste curso maravilhoso.

Aos meus amigos, pelo incentivo e grande ajuda para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos, pela disponibilização do material necessário para as pesquisas técnicas.

“O homem em sua arrogância pensa em si próprio
como uma grande obra, digna da intervenção
de uma divindade. É mais humildade e verdadeiro,
creio eu, considerá-lo criado a partir dos animais.”

Charles Darwin, 1809 - 1882

RESUMO

O aumento no consumo de pescados devido a mudanças nas dietas alimentares, fez com que a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), se tornasse uma das espécies mais consumidas no Maranhão. Apesar dos benefícios nutricionais, traz consigo riscos a saúde pública, quando contaminada por agentes patogênicos a seres humanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em filés de pescada amarela (*C. acoupa*) vendidos nas feiras e supermercados de São Luís (MA). Foram coletadas 30 amostras de pescada amarela e o processamento dessas amostras foi feito no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão. As análises microbiológicas foram realizadas segundo o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Constatou-se a ausência de *V. parahaemolyticus* e ausência de *L. monocytogenes* em 100% das amostras. Pode-se concluir, assim, que os resultados são satisfatórios, concordando com os parâmetros da RDC nº 12, de 2001, do Ministério da Saúde, e que, apesar das amostras não apresentarem os patógenos, faz-se necessária a criação de parâmetros para essas bactérias, como forma de prevenção dos riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *Cynoscion acoupa*. *Listeria* sp. *Vibrio* sp. Pescado. Saúde Pública.

ABSTRACT

The increase in the consumption of fish due to changes in the dietary demands caused the yellow hake (*Cynoscion acoupa*) to become one of the most consumed species in Maranhão. Despite the nutritional benefits, it poses risks to public health, when contaminated by pathogens to humans. The objective of this work was to evaluate the presence of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* in samples of yellow hake (*C. acoupa*) sold at the fairs and supermarkets of São Luís (MA). Thirty samples of yellow hake were collected at fairs and supermarkets and the processing of these samples was done at the Food and Water Microbiology Laboratory of the Veterinary Medicine course of the State University of Maranhão. The microbiological analyzes were carried out according to the Manual of Methods of Microbiological Analysis of Foods (SILVA, 2007), and led to the finding of absence of *V. parahaemolyticus* and absence of *L. monocytogenes* in 100% of the samples. It can be concluded, therefore, that the results are in agreement with the RDC nº 12, of 2001, of ANVISA, and that, although the samples do not present the pathogens, it is necessary to create parameters for these bacteria, as a form of Prevention of risks to public health.

Keywords: *Cynoscion acoupa*. *Listeria sp.* *Vibrio sp.* Fish. Public Health.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA – Food and Drug Administration

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura e Pecuária de Abastecimento

SNC – Sistema Nervoso Central

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão

UVM – Universidade de Vermont

VP – Voges-Proskauer

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO II: REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Produção e consumo de pescado no mundo e no Brasil	17
2. Pescada Amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>)	17
3. Características nutricionais do pescado	18
4. Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)	17
5. Gênero <i>Listeria</i>	19
5.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	19
5.1.1. Características e epidemiologia	20
5.1.2. Manifestações clínicas de <i>L. monocytogenes</i>	20
5.1.3. Legislação e parâmetros para <i>L. monocytogenes</i> no mundo e no Brasil	21
5.1.4. Incidência de <i>L. monocytogenes</i> em pescados	21
5.1.5. Métodos de diagnóstico	22
5.1.6. Tratamento e prevenção	23
6. Gênero <i>Vibrio</i>	24
6.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24
6.1.1. Características e epidemiologia	25
6.1.2. Manifestações clínicas de <i>V. parahaemolyticus</i>	26
6.1.3. Legislação e parâmetros para <i>V. parahaemolyticus</i> no mundo e no Brasil	26
6.1.4. Incidência de <i>V. parahaemolyticus</i> em pescado	26
6.1.5. Métodos de diagnóstico	27
6.1.6. Tratamento e prevenção	28
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO III: ARTIGO	38
CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO	47

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura e Pecuária de Abastecimento (RIISPOA) compreendem-se por pescado os peixes, os crustáceos, os moluscos, os anfíbios, os répteis, os equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana (BRASIL, 2017). O consumo de pescados tem aumentado nas últimas décadas a uma taxa anual de 3,2%; o consumo *per capita* chegou a ser de 19,2kg por ano em 2012 (FAO, 2014a). Esse aumento é propiciado não só pelas mudanças de hábito alimentar, mas também pelo aumento demográfico e de renda, o que provocou uma demanda de aumento na produção e no comércio mundial para suprir a demanda da população (FAO, 2014b; FAO, 2014a; PIENIAK et al., 2010).

O Brasil ocupa o vigésimo terceiro lugar como produtor mundial de pescado, com 803,2 mil toneladas (BRASIL, 2011). O Nordeste, por sua vez, é considerado o maior fornecedor brasileiro de pescado, alcançando uma produção de 411 mil toneladas/ano (VIDAL; PINHO, 2010). A família Sciaenidae possui inúmeras espécies que são vendidas no Brasil, entre elas a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), que é amplamente encontrada ao longo da costa brasileira (SZPILMAN, 2000).

Os pescados possuem excelentes características nutricionais, como por exemplo, a pescada amarela. Sua excelente composição e valor nutritivo, sua fácil digestibilidade, com valores elevados de vitaminas A e D, cálcio, ômega-3 e fósforo, possui lipídeos com altos níveis de ácidos graxos insaturados, além da presença de elevados teores de proteínas com um valor biológico elevado (DOMINGO, 2007; HUNTER e ROBERTS, 2000; LEDERER, 1991; NEIVA, 2010).

Embora o pescado possua todas essas qualidades nutritivas, segundo Constantinido (1994), este também apresenta maior taxa de perecibilidade, e, devido a isso, são necessários alguns cuidados no acondicionamento e transporte dos mesmos. Sabe-se que, após a captura do pescado, a contaminação pode ocorrer não só nos porões dos barcos que não possuem a condição adequada para o transporte, quando o pescado é colocado sobre o gelo feito a partir de água com sujidades, mas também na refrigeração dos pontos de distribuição até as feiras e supermercados. Um bom acondicionamento do pescado, higiene do local e do

vendedor são condições essenciais para que o frescor permaneça ideal (GERMANO et al, 1993).

Vieira e Sampaio (2004) enfatizam que para o pescado possuir qualidade adequada para o consumo humano, três fatores devem ser bem observados: o tempo, temperatura e higiene. O fator tempo é importante, pois as reações autolíticas e microbianas que ocorrem no pescado são rápidas, entretanto, é importante destacar que, utilizar baixas temperaturas e higiene adequada, contribui para que essas reações aconteçam mais lentamente.

De acordo com Amagliani et al (2012), o pescado pode ser contaminado por diferentes agentes patogênicos como bactérias, vírus, fungos, entre outros, que podem causar desde problemas leves de saúde até casos mais graves. Esses patógenos podem estar presentes no meio onde esse pescado foi capturado, em decorrência da poluição lá existente. Pesquisas realizadas com diversos alimentos normalmente mostram bactérias patogênicas clássicas, tais como *Salmonella*, *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus* e, em alguns casos, *Aeromonas* sp. (COSTA, 2006). Vieira (2004) chega a relatar alguns casos de infecções alimentares causadas pelo gênero *Vibrio* sp.

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica gram-positiva, distribuída por todo e qualquer ambiente, podendo ser isolada da água, do solo, da vegetação, sendo possível encontrá-la também na microbiota natural de alguns animais (SCHUCHAT et al, 1991). A contaminação acontece não somente por meio da ingestão de alimentos crus ou mal cozidos, como pescados, mas também pela água, sendo esta bactéria um importante patógeno causador de doenças para seres humanos e alguns animais (GONÇALVES, 2011).

Scallan et al (2011) descrevem que a listeriose é causadora de cerca de 1600 casos, 1500 hospitalizações e 260 mortes por ano nos Estados Unidos da América (EUA). Desse ponto, parte a preocupação com a *L. monocytogenes* e aumenta a importância atribuída à segurança dos alimentos tanto em países desenvolvidos quanto naqueles subdesenvolvidos (CASTRO et al, 2012). Segundo Fretz et al (2010), existem inúmeros sinais clínicos para a listeriose, entre os quais podem ser incluídos septicemia, meningite, gastroenterite e abortamento, com taxas de letalidade que podem alcançar 75%, quando de sua ocorrência em pacientes imunocomprometidos e mulheres grávidas.

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria patogênica, gram-negativa, que se distribui por regiões estuarinas, costeiras e ambientes marinhos, mas não está relacionada com a contaminação fecal (YU et al, 2013). É um patógeno que pode ser frequentemente encontrado e isolado de uma ampla variedade de pescados, como, por exemplo, bacalhau, sardinha, cavala e também a pescada amarela (MAHMUD et al, 2007).

Esses patógenos podem deixar sua condição de grande ameaça para saúde pública, caso sejam intensificados os programas voltados para a melhoria da qualidade e segurança do pescado comercializados para consumo humano, no que concerne tanto à legislação vigente quanto à fiscalização e controle desse processo. Além da cobrança por parte dos programas de inspeção, é necessário que boas práticas de fabricação (BPF) de alimentos sejam exigidas pela própria indústria de pescado (BUTT et al, 2004).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializados na cidade de São Luís (MA).

CAPÍTULO II: REVISÃO DE LITERATURA

1. Produção e consumo de pescado no mundo e no Brasil

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a produção de pescado no âmbito mundial tem apresentado um crescimento médio anual de 3,2% nas últimas cinco décadas e o consumo *per capita* aumentou, nesse período, de 9,9kg anuais para 19,2kg. (FAO, 2014b). A produção de pescado chegou a 158 milhões de toneladas em 2012, sendo 91,3 milhões de toneladas advindas da pesca, total que equivale a aproximadamente 58% da produção do ano de 2012 (FAO, 2014b). O continente responsável pela maior produção de pescados no ano de 2012 foi a Ásia, com 103,6 milhões de toneladas, seguido, à distância, pela América, que produziu 25,5 milhões de toneladas (FAO, 2014a; FAO, 2014b).

A produção brasileira de pescados tem como seus principais itens, a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), a tainha (*Mugil spp.*) e a sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) (BRASIL, 2011). Em meio às espécies citadas, a pescada amarela colabora com o maior volume de produção (BRASIL, 2010). De acordo com Almeida et al (2007), a região Nordeste tem o Maranhão sobressaindo-se como o maior produtor de pescado. No ano de 2010, a pesca marinha capturou 43.780,1 toneladas de pescado, o que o tornou o segundo maior produtor da região.

2. Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*)

A pescada amarela, *Cynoscion acoupa*, é uma espécie demersal, ou seja, apesar de possuir habilidade para natação, é encontrada próxima a substratos no assoalho marinho. Pertencente à família Sciaenidae distribui-se em águas tropicais e subtropicais da costa leste da América do Sul, exibindo tolerância para as águas salobras (SZPILMAN, 2000).

Segundo Matos e Lucena (2017), a pescada amarela pode medir de 50 cm a 1,25 m de comprimento. Essa espécie possui alto valor comercial, não só pela qualidade de sua carne, mas também pela bexiga natatória, usada para a preparação de emulsificantes e clarificantes (CERVIGÓN, 1993; WOLFF et al, 2000).

3. Características nutricionais do pescado

Os produtos de pescados destacam-se por possuírem excelentes níveis de proteína de alta qualidade e apresentam altos níveis de ácidos graxos insaturados, tornando-os, assim, a proteína de origem animal mais consumida na Ásia e Europa (GERMANO; GERMANO, 2008; GAMBARIN et al, 2012).

O pescado possui os aminoácidos essenciais e alto teor de lisina, um aminoácido que participa do processo digestivo. Possui, ainda, pouco tecido conjuntivo em sua constituição, o que ajuda a aumentar o valor de digestibilidade, acima de 95% (OETTERER et al, 2006).

A presença de colesterol é baixa nessa categoria de alimento e os ácidos graxos insaturados presentes apresentam efeito cardioprotetor, reduzindo os riscos de doenças cardíacas (GONÇALVES, 2011). Os peixes de ambientes marinhos também possuem elevadas taxas de minerais, como iodo e cálcio, apresentando uma concentração de cálcio quatro vezes maior que as carnes bovinas (ORNELLAS, 2001).

4. Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

Estima-se que, anualmente, ocorram 1,2 bilhões de casos de diarreia e 2,2 milhões de óbitos associados às infecções alimentares e, que 43% das zoonoses sejam advindas de alimentos, o que torna relevante e imprescindível o estudo das doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (OMS, 2009; OPAS, 2008). De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), em 2014 ocorreram, no Brasil, 800 surtos de DTAs, afetando um total de 2.950 pessoas. Atualmente, não é conhecida a amplitude desses surtos, como resultado da subnotificação (BRASIL, 2014).

Segundo Franco e Landgraf (1996), a suscetibilidade do pescado à deterioração está relacionada aos seguintes fatores: atividade de água elevada, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, pH próximo da neutralidade. Devido a essas características, os pescados são susceptíveis às ações de agentes patogênicos e são consideradas possíveis fontes de DTAs em seres humanos (ABABOUC et al., 2005).

De acordo com Norhana et al (2010), existem três tipos de bactérias patogênicas associadas aos alimentos: as que fazem parte da microbiota natural do ambiente (*Vibrio* spp; *L. monocytogenes* e *Clostridium botulinum*); as entéricas, que

se encontram no meio devido à contaminação fecal; e aquelas que contaminam os alimentos durante o processamento.

5. Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* é formado por bactérias anaeróbias facultativas, gram-positivas, com formato de bastonete e não formadoras de esporos, com 0,5µm de diâmetro e 1 a 2µm de comprimento. Tais bactérias podem estar isoladas ou em cadeias pequenas, fermentam a glicose com produção de ácido láctico, mas sem a produção de gás (FIEDLER, 1988; HOLT et al, 1994). Possuem flagelos e apresentam motilidade apenas quando estão em temperaturas entre 20°C a 25°C, tornando-se imóveis a 37°C (HOLT et al, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 1996). Garrido et al (2010) descrevem que a temperatura ótima de crescimento desse gênero fica entre 30°C a 37°C.

Esse gênero é composto por sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murray*. Dentre essas, as consideradas não virulentas estão: *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murray* e *L. seeligeri*, enquanto *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são classificadas como patogênicas para humanos e animais (TRABULSI, 1999; PAGADALA et al, 2012).

Hage et al (2014) explicam que as espécies de *Listeria* têm sido isoladas de produtos alimentícios, nos quais se incluem produtos prontos para o consumo, assim como destacam que estas espécies isoladas podem ser utilizadas como bioindicadores por indicarem as condições adequadas para crescimento destas espécies.

5.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um patógeno já conhecido desde 1924, quando Murray, Webb e Swann descreveram o primeiro isolamento de uma bactéria responsável por causar, em coelhos, uma leucocitose mononuclear, à qual deram o nome de *Bacterium monocytogenes* (MURRAY et al., 1926). De acordo com Breed et al (1957), o nome de *Listeria monocytogenes* foi definido em 1940, tendo sido adicionada ao Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey anos mais tarde, precisamente em 1948.

Essa espécie, por ser patogênica a humanos e causar uma enfermidade chamada listeriose, recebeu uma atenção maior como doença transmitida por alimentos em 1980, quando ocorreram inúmeros casos de aborto e septicemia em grupos cujas imunidades estavam comprometidas (FARBER; PETERKIN, 1991). Entre aqueles grupos mais atingidos por essa doença estão os de idosos, recém-nascidos e mulheres grávidas, que apresentam frequentemente meningoencefalite ou bacteremia (PAINTER; SLUTSKER, 2007).

5.1.1. Características e epidemiologia

L. monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo, móvel entre 20°C a 25°C devido aos flagelos peritríquios. Pode desenvolver-se em uma ampla faixa de temperatura de 1°C a 45°C e pH entre 4,5 e 9,6 (FRANCO; LANDGRAF, 1996; RYSER; MARTHA, 2006). É um micro-organismo que pode ser encontrado no meio ambiente - solo, vegetação e água - e dele isolado, além de fazer parte da microbiota natural de alguns animais (SCHUCHAT et al., 1991).

Por ser um micro-organismo encontrado na maioria dos alimentos, torna-se um risco em potencial para humanos que o ingerem com frequência, o que consequentemente leva alguns a se tornarem portadores dessa bactéria (MASCOLA et al., 1992). Estudos sugerem que até 21% dos humanos podem ser carreadores dessa bactéria no seu organismo (SKIDMORE, 1981; PAINTER; SLUTSKER, 2007).

A habilidade de sobreviver e desenvolver-se em macrófagos, enterócitos e outras células, leva *L. monocytogenes* a possuir alta patogenicidade para os seres humanos (TRABULSI, 1999; PAINTER; SLUTSKER, 2007).

5.1.2. Manifestações clínicas de *L. monocytogenes*

Segundo Trabulsi (1999), a listeriose é uma infecção alimentar rara em adultos saudáveis, mas potencialmente séria, com uma taxa de mortalidade que ultrapassa 20%. Como citado anteriormente, esse número de ocorrências está diretamente relacionado a pessoas imunocomprometidas. Existem condições que podem predispor um indivíduo à infecção por *L. monocytogenes*. São elas: neoplasias, cardiopatias, nefropatias e diabetes tipo 1 (JAY, 2005).

As manifestações clínicas podem ocorrer de duas maneiras: uma, não invasiva e outra, invasiva. A forma clínica não invasiva ocorre em qualquer pessoa, mesmo quando saudável, como resultado da ingestão de uma elevada quantidade de bactérias. A segunda forma, considerada invasiva, tem sua ocorrência vinculada a indivíduos imunocomprometidos (FDA, 2012).

Na fase dentro do trato gastrointestinal, a sintomatologia inclui tanto a diarreia, náuseas e vômitos quanto febre moderada. Ainda existem sintomas que aparecem quando há comprometimento do sistema nervoso central (SNC), tais como meningite, encefalite e abscessos. São consideradas como os sintomas mais comuns dentre aqueles encontrados no âmbito do grupo de risco, ambas a meningite e septicemia (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2005). Segundo Franco e Landgraf (1996), a taxa de letalidade é de, aproximadamente, 70%.

5.1.3. Legislação e parâmetros para *L. monocytogenes* no mundo e no Brasil

Segundo Jami et al. (2014), a legislação e os parâmetros para os níveis aceitáveis de *L. monocytogenes* não são universais, ou seja, variam de país para país. Nos EUA, a tolerância é zero para essa bactéria. Entretanto, China, Austrália e União Europeia possuem tolerâncias de até 100UFC/g para algumas categorias de produtos alimentares RTE (*ready to eat* – prontos para consumo).

No Brasil, o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (Resolução da Diretoria Colegiada nº 12, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), também não delibera parâmetro algum para a presença desta bactéria em produtos de pescado.

Todavia, há um parâmetro empregado pelo Ministério da Saúde que é o da ausência em 25g da *Salmonella* em produto de pescado, definição que advém do risco à saúde pública, utilizando-se como modelo para outras bactérias (BRASIL, 2001). São considerados produtos em condições sanitárias insatisfatórias quando os resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos (MANTILLA, 2007).

5.1.4. Incidência de *L. monocytogenes* em pescados

Nas últimas décadas, os surtos de listeriose que aconteceram, estão, em sua maioria, associados a produtos que podem ser refrigerados (BREMER et al.,

2003). Em pescados, há, normalmente, facilidade para a ocorrência de *L. monocytogenes*, devido à sua manipulação, que não só possibilita a transferência da bactéria presente na superfície para outros tecidos, mas também pode causar contaminação cruzada (GUDMUNDSDÓTTIR et al., 2006).

Segundo Aureli et al. (2000), na Itália ocorreu um grande surto de listeriose em 1999, devido ao consumo de uma salada de atum contaminada por *L. monocytogenes*, que resultou em 1566 casos, sem registro de uma fatalidade sequer. Destro et al. (1994), por sua vez, descrevem que a *L. monocytogenes* foi isolada em camarões processados nas indústrias brasileiras, ressaltando que, das 178 amostras obtidas, 18% apresentaram *L. monocytogenes* e 80% registraram a presença de bactérias do gênero *Listeria* sp.

Em 2010, na Alemanha, ocorreu um surto com oito casos e uma fatalidade, devido à infecção por *L. monocytogenes* em costelas de arenque marinados em azeite (AICHINGER, 2010).

Estudos realizados em Ribeirão Preto – Brasil demonstraram a presença de *L. monocytogenes* em surubim defumado a frio e embalado a vácuo (ALVES, 2005). Esse patógeno é considerado de alto risco de infecção em produtos defumados, apresentando-se em 28,8% das amostras avaliadas por Uyttendaele (2009), em concentrações que ultrapassavam 100UFC/ml, limite máximo tolerado por alguns países. Apesar da presença do patógeno em produtos de pescados, no Brasil até hoje, não houve relatos de surtos de listeriose em humanos em associação à ingestão de alimentos (CVE, 2017).

Cruz et al. (2008), entretanto, relatam casos ocorridos no Brasil: três casos de meningite bacteriana associada a *L. monocytogenes* em 1989. Além destes, Lemes-Marques et al. (2007) descrevem 12 casos clínicos de listeriose ocorridos no Brasil entre 1995 a 2005. Estes poucos casos relatados se devem ao fato de que existe subnotificação e/ou subdiagnóstico.

5.1.5. Métodos de diagnóstico

Os métodos de análise microbiológica e isolamento da *L. monocytogenes* em alimentos diferem dos métodos empregados em amostras clínicas humanas (HAYES et al., 1992).

A utilização de métodos convencionais possuem vantagens como, por exemplo, a cultura pura do organismo, que é adotada nos procedimentos de fiscalização e em casos de surtos. Métodos convencionais servem como parâmetros, sendo, assim, “mais confiáveis” exatamente por serem mais sensíveis (ANDREWS, 2002). A metodologia para alimentos envolve alíquotas das amostras que são inoculadas em caldos de enriquecimento, com repiques para vários tipos de meios seletivos (HAYES et al, 1992; TRABULSI, 1999).

O método de diagnóstico rápido utilizado é a da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, considerado um método que permite a detecção e quantificação dos produtos originados a cada ciclo de amplificação. Deve-se avaliar porém, alguns parâmetros neste método apesar, como a precisão e tempo de análise, tipo de operação (simples ou complexa), presença de profissionais capacitados para realizar o PCR, a dependência de assistência técnica dos fabricantes e a disponibilidade de espaço no laboratório (ZAHA, et al., 2012).

Contudo, segundo Feng (1995), os métodos devem ser aprovados por órgãos oficiais para que possam ser empregados. Os métodos rápidos servem como controle, sendo que quando há resultados negativos, estes são considerados definitivos, mas resultados positivos são aceitáveis, mas devem ser confirmados através do método convencional.

5.1.6. Tratamento e prevenção

O tratamento da listeriose pode ser feito com ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina, uma vez que a sensibilidade da bactéria a estes antimicrobianos é uniforme entre eles. É importante ressaltar que a utilização de antimicrobianos em pessoas imunodeprimidas pode reduzir o risco de consequências mais graves quando a presença do micro-organismo é diagnosticada no início, o que não corre normalmente (TRABULSI, 1999).

Em recém-nascidos, o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) (2008) afirma que, mesmo utilizando os antimicrobianos para o tratamento, essas infecções podem resultar em morte dos indivíduos infectados, o que também é particularmente comum em idosos e outros pacientes que apresentam alguma outra doença concomitante.

A prevenção dessa doença é feita tanto através da higienização correta do manipulador dos alimentos quanto da conscientização do consumidor no que concerne aos padrões de limpeza adotados em casa. Os alimentos devem ser bem cozidos e faz-se necessário evitar o consumo de vegetais crus sem a lavagem adequada (TRABULSI, 1999). Por conta de o micro-organismo *L. monocytogenes* desenvolver-se em temperaturas de refrigeração, é fundamental e imprescindível que o alimento passe pelo cozimento ou aquecimento adequado antes do consumo (FRANCO; LANDGRAF, 1996; TRABULSI, 1999).

De acordo com Franco e Landgraf (1996), além de a prevenção ser feita durante o processamento dos alimentos e depois de chegar ao destino final, no caso, o consumidor, é indispensável o controle do micro-organismo nos pontos de origem dos alimentos por meio de medidas que minimizem as chances de contaminação.

6. Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio* sp. pertencente à família Vibrionaceae, possui várias espécies patogênicas para o homem, como por exemplo o *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*, que podem ocasionar desde gastroenterites auto limitadas até quadros sérios de septicemia (BIER, 1994).

De acordo com Huss et al. (2004), essas bactérias, por serem encontradas em ambientes marinhos, podendo ser isoladas de produtos de pescados. Todas as bactérias do gênero *Vibrio* spp. podem fermentar glicose sem produção de gás, produzem oxidase e reduzem nitrato (MURRAY et al., 1999), além de possuírem nutrição saprófita e não precisarem de hospedeiros para seu desenvolvimento e multiplicação (LIMA, 1997).

Trabulsi et al. (1999) comentam que uma das espécies que têm tido um reconhecimento crescente nos últimos anos é o *Vibrio parahaemolyticus*, responsável por toxinfecções alimentares.

6.1. *Vibrio parahaemolyticus*

A espécie *V. parahaemolyticus* foi primeiramente identificada no Japão por Fujino et al. (1953), após um surto de intoxicação alimentar por ingestão de

sardinhas que não passaram pelo cozimento adequado que ocorreu na província de Osaka, com 272 pessoas afetadas e 20 mortes, todas com sintomas de gastroenterite (DANIELS et al., 2000; PEREIRA et al., 2004; MANCILLA, 2005). No Brasil, esse agente patológico foi isolado pela primeira vez em 1983, durante um caso de gastroenterite em humano (HOFER, 1983).

Esse patógeno tem sido associado com doença causada pelo consumo de produtos de pescado, como peixes crus e camarões. A presença de *V. parahaemolyticus* nos alimentos pode causar, por via cruzada, a contaminação de outros alimentos, tornando-os veículos (JAY, 2005).

6.1.1. Características e epidemiologia de *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, descritas como bastonetes com um único flagelo polar que apresentam motilidade em meio líquido. Sua temperatura para crescimento normalmente fica entre 10°C a 48°C, mas a temperatura considerada ideal é de 35°C a 37°C. O halofilismo dessa espécie exige uma concentração ideal de 2 a 4% de NaCl, embora também possa se desenvolver em uma concentração mínima de 1% de NaCl e máxima de 8% (NAIR e OPAZO, 2005; VIEIRA, 2004; WONG et al., 1992; ZAMORA-PANTOJA et al., 2013).

Essa espécie possui distribuição cosmopolita, sendo encontrada em ambientes marinhos de regiões tropicais e subtropicais. Podendo ser de produtos de pescados, esse patógeno multiplica-se em meses mais quentes, pois a temperatura da água torna-se mais elevada, o que justifica ser a época durante a qual mais ocorrem os surtos registrados (ICMSF, 1978; MAGALHÃES et al., 1991; MAHMUD et al., 2007). É interessante frisar que a presença dessa bactéria não é indicativa de contaminação fecal no ambiente, segundo Yu et al. (2013).

Essa espécie de *Vibrio*, segundo Sakazaki (1983), não é produtora de H₂S em meio ágar triplice açúcar ferro, é positiva para oxidase e gelatinase; reduz o nitrato em nitrito; fermenta os seguintes carboidratos: galactose, glicose, manose, trealose, manitol e não fermenta lactose, sacarose, xilose; além de apresentar Voges-Proskauer (VP) positivo e hidrolisar a esculina, amido e caseína.

6.1.2. Manifestações clínicas de *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus produz uma enterotoxina que se assemelha àquela produzida pelo *V. cholerae* que é responsável por inflamação na mucosa do trato gastrointestinal. Possui ainda um tempo de incubação de 17 horas e seus sintomas podem continuar por um período de 2 a 10 dias. Seu tempo de multiplicação varia de nove a onze minutos (GIL-RECASES et al., 1974; GARCÍA-LÁZARO et al., 2010).

As manifestações clínicas mais frequentes resultantes da toxinfecção por *V. parahaemolyticus* são: diarreia aquosa ou sanguinolenta, cefaleia, cólicas abdominais, náuseas, vômitos, febre e calafrios (APUN et al., 1999; KAYSNER; DEPAOLA, 2004; VONGXAY et al., 2008; YANG et al., 2008).

A doença normalmente dura apenas dois a três dias, contudo, existem registros de infecções extraintestinais por *V. parahaemolyticus*, como por exemplo, em feridas que tiveram contato com ambientes marinhos (MORRIS JR, 2003). Os surtos de gastroenterite causados por *V. parahaemolyticus*, em Recife - PE, relatam, como principais manifestações clínicas, cólicas abdominais (78,6%), náuseas (64,2%), vômitos (42,8%), entre outras (MAGALHÃES et al., 1991).

6.1.3. Legislação e parâmetros para *V. parahaemolyticus* no mundo e no Brasil

A legislação e os parâmetros para padrões microbiológicos do pescado e de produtos derivados de pescado no Brasil são definidos pela ANVISA, na RDC n°12, de 02 de janeiro de 2001. Em relação à presença de *Vibrio* spp., o item 22 dessa resolução estabelece um limite de 10^3 NPM/g de *V. parahaemolyticus*/g para produtos prontos para o consumo que sejam à base de pescado (BRASIL, 2001).

Nos EUA, após um surto envolvendo produtos de pescados, a *Food and Drug Administration* (FDA) (2009), órgão responsável pelo controle de alimentos e medicamentos similar à ANVISA brasileira, estabeleceu um limite de precaução para a presença de *V. parahaemolyticus*, sendo esse grau de contaminação igual ou superior a $1,0 \times 10^4$ NMP/g ($4,0 \log$ NMP/g), Kanagawa positivo ou negativo.

6.1.4. Incidência de *V. parahaemolyticus* em pescado

Segundo Franco e Landgraf (1996), para que ocorra uma infecção, o alimento deve possuir uma carga bacteriológica de 10^5 a 10^7 UFC/g de alimento.

Na Europa, houve oito casos de gastroenterite causada por *V. parahaemolyticus*, relacionada ao consumo de peixe e ostras na Espanha no ano de 1989 (MOLERO et al., 1989). Um surto na Galícia, uma nacionalidade histórica organizada sob a forma de comunidade autônoma espanhola, situada na região noroeste da Espanha, na península Ibérica, afetou 64 pessoas, todas apresentando os sintomas de infecção por essa bactéria, em decorrência do consumo de produtos de pescados (LOZANO-LEON et al., 2003). Houve outro surto da infecção por *V. parahaemolyticus*, na Espanha em julho de 2004, envolvendo 80 pessoas e a comida por eles ingerida em um mesmo restaurante (FOURNIER et al., 2005).

Com base nos seus dados, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) nos EUA estima que ocorram 5100 casos de infecções por *V. parahaemolyticus* por ano (DANIELS et al., 2000). No Japão, que possui um elevado consumo de peixes crus e mariscos, 75% dos casos de infecção alimentar durante os meses mais quentes são causados por esse agente etiológico. Em um período de nove anos, registraram-se 860 surtos com mais de 17 mil infectados, todos com sintomas de gastroenterite (OKABE, 1974; CATO, 1998).

No Brasil, entretanto, não existem muitos registros de surtos causados por contaminação de alimentos por *V. parahaemolyticus*. Magalhães et al. (1991) esclarecem que, em Recife - PE, há relatos de surtos de gastroenterite e que suas principais manifestações clínicas são: cólicas abdominais (78,6%), náuseas (64,2%), vômitos (42,8%), dentre outras. Todos os pacientes, nesses casos, tinham ingerido mariscos e peixes em um período de seis a trinta e seis horas antes da apresentação dos sintomas.

No município da Raposa, na Ilha de São Luís, no Maranhão, Rodrigues et al. (2001) isolaram, em 18% dos pescadores, o agente *V. parahaemolyticus* que se encontrava nas lesões cutâneas existentes nos seus membros inferiores.

6.1.5. Métodos de diagnóstico

Normalmente, o método mais utilizado é o convencional, que inclui o pré-enriquecimento, o enriquecimento seletivo, e o plaqueamento do micro-organismo

alvo em meio de cultura apropriado e a confirmação por meio de testes sorológicos, bioquímicos e morfológicos (GANDRA et al., 2008; LI et al., 2009; FDA, 2012).

Existe o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, considerado um método de diagnóstico rápido que permite a detecção e quantificação dos produtos originados a cada ciclo de amplificação. Por este método requerer equipamentos mais específicos para a leitura, seu custo aumenta consideravelmente, mas deve-se considerar que o tempo para confirmação é mais curto, uma vez que esse tempo é extremamente importante, indiscutivelmente essencial durante um surto epidemiológico (ZAHA et al., 2012).

6.1.6. Tratamento e prevenção

Molitoris et al. (1985) testaram a resistência de *V. parahaemolyticus* a antimicrobianos e constataram que esta bactéria é sensível ao cloranfenicol, mas resistente à penicilina, ampicilina e lincomicina. Estudos feitos por Magalhães et al. (1991) demonstraram que todas as culturas obtidas foram resistentes à ampicilina, mas sensíveis à tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, gentamicina, cefalotina e estreptomicina.

Para prevenir e controlar a presença deste agente, faz-se necessário utilizar uma refrigeração ideal com temperaturas abaixo de 5°C, assim como realizar o congelamento, e cozimento com temperatura acima ou igual a 75°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

REFERÊNCIAS

- ABABOUC, L.; GANDINI, G.; RYDER, J. **Causes of detentions and rejections in international fish trade**. Rome: FAO Fisheries Technical Paper 473, 2005.
- AICHINGER, E. *Listeria* infections in Baden-Württemberg and Bavaria, October-November 2010. Robert Koch-Institut: **Epidemiologisches Bulletin**, n. 47, 2010.
- ALMEIDA, Z. S.; COELHO G.K.; MORAIS G.C.; NAHUM V.J.I. **Inventário e Diagnóstico das espécies ícticas comerciais marinhas e estuarinas maranhense**. In: SILVA A.C.; FORTES J.L.O. **Diversidade biológica, uso e conservação de recursos naturais no Maranhão**. Projetos e ações em Biologia e Química. São Luís: UEMA, 2006. p. 13-66 v. 2.
- ALVES, V. F. **Ocorrência e controle de *Listeria monocytogenes* em pescado minimamente processado**. 104f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, Brasil, 2005.
- AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 780-788, 2012.
- ANDREWS, W. Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. **Microorganisms in Foods: Now What**, Washington: American Society for Microbiology, p. 102-115, 2002.
- APUN, K.; YUSOF, A. M.; JUGANG, K. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 9, n. 4, p. 285-292, 1999.
- AURELI, P., FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D. et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1236-1241, 2000.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1994, p. 149-170.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: República Federativa do Brasil, 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2017.
- _____. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: República Federativa do Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2017.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Resolução. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e

seus anexos I, II e III. **DOU**, Brasília, 1 jan. 2001. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Morbidade hospitalar do SUS, Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/mi>>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

_____. Decreto 30.691 de 29 de março de 1952 alterado pelo Decreto 1.255 de 25 de junho de 1962. Regulamento da Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal (Riispoa). Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1962. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm>. Acesso em: 21 maio de 2017.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D; HITCHENS, A. P. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 7 Ed. Baltimore: The William and Wilkins Co., 1957.

BREMER P.; FLETCHER G.; OSBORNE C. *Listeria monocytogenes* in seafood. **New Zealand Institute for Crop and Food Research**. Auckland, New Zealand. P. 1–13, 2003.

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

CASTRO, V.; ESCUDERO, J. M.; RODRIGUEZ, J. L. et al. Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. **Euro Surveillance**, v. 17, n. 42, p. 20298, 2012.

CATO, J. C. **Seafood safety: Economics of hazard analysis and critical control point (HACCP) programmes**. FAO Fisheries Technical Paper 381, 1998.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachusetts, 2007**. Atlanta: Morbidity and Mortality Weekly Reports, v. 57, n. 40, p.1097-1100, 2008.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Doenças Transmitidas por Alimentos – Dados Estatísticos de 1998-2006**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/ddtha_sh9805.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinhos de Venezuela**. Vol. II. 2 Ed. Venezuela: Editora ExLibris, p.497, 1993.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. São Paulo: Revista Higiene Alimentar, v. 8, n. 32, p. 5-6, 1994.

COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará**. Tese de Doutorado. – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.ufc.br/>>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2008.

DANIELS, N. A.; MACKINNON, L.; BISHOP, R. et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1661-1666, 2000.

DESTRO, M. T.; PIVA, F. C.; LEITÃO, M. F. F. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in shrimp (*Penaeus brasiliensis*) from a Brazilian processing plant. In: **3RD INTERNATIONAL ASEPT CONFERENCE, Food Safety**, p. 330, 1994.

DOMINGO, J. L. Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: is all that glitters gold? **Environment International**, v. 33, n. 7, p. 993-998, 2007.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fishery and aquaculture statistics 2012**. Roma: FAO yearbook, 2014a.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO, 2014b.

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

FDA - Food and Drug Administration - National Shellfish Sanitation Program. **Guide for the control of molluscan shellfish**. Washington, 2009, 504 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm046353.htm>>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

FDA - Food and Drug Administration. **Bad Bug Book** (Second Edition). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook - Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), U.S. Department of Health and Human Services, 2012.

FENG, P. Rapid methods for detecting food borne pathogens. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8 Ed. Gaithersburg: AOAC International, v.1, 1995.

FIEDLER, F. Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. **Infection**: 1988, p. 92-97, v. 16, n. 2,.

FOURNIER, P. E.; OGATA, H. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1317-20, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. 1 Ed. São Paulo: Atheneu, p. 46-50, 1996.

FRETZ, R.; SAGEL, U.; RUPPITSCH, W. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009. **Euro Surveillance**, 15, 2010.

FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D. et al. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. **Medical Journal of Osaka University**, v. 4, n. 2/3, p. 299-304, 1953.

GAMBARIN, P.; MAGNABOSCO, C., LOSIO, M. N. et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V., DE MELLO, W. S. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos.. **Acta Scientiarum. Technology**. 3245, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GARCÍA-LÁZARO, M.; PULIDO, M.C.A.; RIVERO, A. & TORRE-CISNEROS, J. Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. **Medicine -Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 10, n. 52, p. 3489-3496, 2010.

GARRIDO, V.; GARCÍA-JALÓN, I.; VITAS, A. I. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 896-901, 2010.

GERMANO P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 Ed. São Paulo: Manole; 2008.

GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, J. C. F.; GERMANO, M. I. S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. **Revista Higiene alimentar**, v. 7, n. 28, p. 40-5, 1993.

GIL-RECASES, M. E.; PERAL-LOPEZ, A. M.; RUIZ-REYES, G. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en casos de gastroenteritis y en mariscos crudos en la ciudad de Puebla. **Revista Latino-americana de microbiologia**, 1974.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011.

GUDMUNDSDÓTTIR, S.; GUDBJORNSDOTTIR, B.; EINARSSON, H. et al. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. **Journal of food protection**, v. 69, n. 6, p. 1304-1311, 2006.

HAGE, E.; MPAMUGO, O.; OHAI, C. et al. Identification of six *Listeria* species by real-time PCR assay. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 6, p. 535-540, 2014.

HAYES, P. S.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B. et al. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of food protection**, v. 55, n. 12, p. 952-959, 1992.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, v. 14, n. 3, p. 174-5, 1983.

HOLT, J. K.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, P. 566-570, 1994.

HUNTER, B. J.; ROBERTS, D. C. K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. **Nutrition Research**, v. 20, n. 7, p. 1047-1058, 2000.

HUSS, H.H.; ABABOUC L.; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. **Fisheries technical paper N°44**. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Rome, 2004.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganisms in food: 1. Their significance and methods of enumerations. **Toronto: University of Toronto Press**, p. 201-207, 287-350, 1978.

JAMI, M.; GHANBARI, M.; ZUNABOVIC, M. et al. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products - a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 798-813, 2014.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 Ed. Porto Alegre: Artmed, p.517-542, 2005.

KAYSNER, C.; DEPAOLA, A. J. U.S. Food and Drug Administration; **Bacteriological Analytical Manual**. Methods for specific pathogens; Chapter 9 *Vibrio*. 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/scienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2017

LEDERER, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar**. São Paulo: Manole, 1991.

LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.287-292, 2007.

LI, Y.; ZHENG, B., QU, L. et al. Determination of foodborne pathogenic bacteria by multiplex PCR-microchip capillary electrophoresis with genetic algorithm-support vector regression optimization. **Analytica chimica acta**, v. 643, n. 1, p. 100-107, 2009.

LIMA, F. C. Víbrios marinhos. II. Víbrios não coléricos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 49, p. 8-13, 1997.

LOZANO-LEON, A.; TORRES, J.; OSORIO, C.R. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. **FEMS microbiology letters**, v. 226, n. 2, p. 281-284, 2003.

MAGALHAES, V.; LIMA, R.A.; TATENO, S. & MAGALHÃES, M. Gastroenterites humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 64-68, 1991.

MAHMUD, Z. H.; KASSU, A.; MOHAMMAD, A. et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. **Microbiological research**, v. 161, n. 1, p. 25-37, 2006.

MAHMUD, Z. H.; NEOGI, S.B.; KASSU, A. et al. Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan. **International journal of food microbiology**, v. 118, n. 1, p. 92-96, 2007.

MANCILLA, E. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. **Cuadernos Médico Sociales**, Chile, v. 45, p. 43-47, 2005.

MANTILLA, S. P. S. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, 2007.

MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; GOULET, V. et al. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes* – observations during a community-wide, common-source outbreak. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 557-558, 1992.

MATOS, I. P.; LUCENA, F. Descrição da pesca da pescada-amarela, *Cynoscion acoupa*, da costa do Pará. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 39, n. 1-2, p. 66-73, 2017.

MOLERO, X.; BARTOLOME, R.M.; VINUESA, T. et al. Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases. **Medicina clinica**, v. 92, n. 1, p. 1-4, 1989.

MOLITORIS, E.; JOSEPH, S.W.; KRICHEVSKY, M.I. et al. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1388-1394, 1985.

MORRIS JR, J. G. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 272-280, 2003.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, n. 4, p. 407-439, 1926.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, 1999.

NAIR, G. B.; OPAZO, J. C. H. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. **Revista chilena de infectología**, v. 22, n. 2, p. 125-130, 2005.

NEIVA, C. R. P. **Cresce interesse pelos aspectos nutricionais do pescado**. Unidade Laboratorial de Referência em Tecnologia do Pescado, Instituto de Pesca, p. 7, Santos, 2010.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C. et al. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 343-361, 2010.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Editora Manole Ltda., 2006.

OKABE, S. Statistical review of food poisoning in Japan especially that by *Vibrio parahaemolyticus*. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS**. Saikon Publishing Co., Ltd. Tokyo, p. 5-8, 1974.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Zoonoses and veterinary public health - Fact sheets**. Programmes and projects, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/en/>>. Acesso em: 21 de maio de 2017

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos: Curso de sensibilização**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças – OPAS/OMS, 2008. 160p. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/File/Apostila_Final_12_08_2008.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2017

ORNELLAS, L. H.. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos**. Atheneu, 2001.

PAGADALA, S.; PARVEEN, S.; RIPPEN, T. et al. Prevalence, characterization and sources of *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and blue crab processing plants. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 263-270, 2012.

PAINTER, J.; SLUTSKER, L. Listeriosis in humans. **Food Science and Technology - New York - Marcel Dekker**, v. 161, p. 85, 2007.

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

PIENIAK, Z.; VERBEKE, W.; OLSEN, S.O. et al. Health-related attitudes as a basis for segmenting European fish consumers. **Food Policy**, v. 35, n. 5, p. 448-455, 2010.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E.G.R.; MELLO, D.M. et al. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa - MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 407-411, 2001.

RYSER, E. T.; MARTHA, E. H. E. **Listeria, listeriosis and food safety**. Florida: Taylor and Francis, 2006.

SAKAZAKI, R. *Vibrio parahaemolyticus* as a food-spoilage organism. **Economic microbiology**, p. 225-241, 1983.

SCALLAN, E. R. M.; HOEKSTRA, F. J.; ANGULO, R. V. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**. V. 17, p. 7-15, 2011.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, n. 2, p. 169-183, 1991.

SKIDMORE, A. G. Listeriosis at Vancouver General Hospital, 1965-79. **Canadian Medical Association Journal**, v. 125, n. 11, p. 1217, 1981.

SVS - **Secretaria de Vigilância em Saúde** (Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net) Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis). Brasília, 2014.

SZPILMAN, M. **Peixes marinhos do Brasil: guia prático de identificação**. Rio de Janeiro: Mauad, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. et al. **Microbiologia**. 3 Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999, p.187-190.

UYTTENDAELE, M. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 94-104, 2009.

VIDAL, M. de F.; PINHO, H. J. **Informe Rural ETENE, Produção e Venda de Produtos da Aquicultura no Nordeste – Banco do Nordeste**. Ano 4 – Nº 11; 2010.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. 1 Ed. São Paulo: Varela, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F. & SAMPAIO, S.S. **Emprego de gelo nos barcos de pesca**, p.37-44. In: VIEIRA, R. H. S. F. (org.), Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela, 2004, p. 380.

VONGXAY, K.; WANG, S., ZHANG, X. et al. Pathogenetic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 71-75, 2008.

WOLFF, M.; KOCH, V.; ISAAC, V. A trophic flow model of the Caeté mangrove estuary (North Brazil) with considerations for the sustainable use of its resources. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 50, n. 6, p. 789-803, London, 2000.

WONG, H. C.; TING, S. H., SHIEH, W. R. Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 3, p. 197-202, 1992.

YANG, Z. Q.; JIAO, X., ZHOU, X. et al. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 279-285, 2008.

YU, W. T.; JONG, K.; LIN, Y. et al. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 185-192, 2013.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.(Org.). **Biologia Molecular Básica**. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, p. 403.

ZAMORA-PANTOJA, D. R.; QUINONES-RAMIREZ, E. I.; FERNÁNDEZ, F.J. et al. Virulence factors involved in the pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 41-47, 2013.

CAPÍTULO III: ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista Higiene Alimentar

Ausência de *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de filés de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializados na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil.

Isadora Fontenelle Carneiro de Castro (isadorafontenelleccastro@gmail.com)¹

Fabiana Borralho Frazão (frazaoep@gmail.com)¹

Isabel Azevedo Carvalho (isabel.azevedo@gmail.com)¹

Francisca Neide Costa (francisca.cca.uema@gmail.com)¹

¹Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água (São Luís, Maranhão, Brasil).

RESUMO

O aumento no consumo de pescados devido a mudanças nas dietas alimentares, fez com que a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), se tornasse uma das espécies mais consumidas no Maranhão. Apesar dos benefícios nutricionais, traz consigo riscos a saúde pública, quando contaminada por agentes patogênicos a seres humanos. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de pescada amarela (*C. acoupa*) vendidos nas feiras e supermercados de São Luís - MA. Foram coletadas 30 amostras de filés de pescada amarela e o processamento dessas amostras foi feito no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão. As análises microbiológicas foram realizadas segundo o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Constatou-se a ausência de *V. parahaemolyticus* e ausência de *L. monocytogenes* em 100% das amostras. Pode-se concluir, assim, que os resultados estão de acordo com a RDC nº 12 de 2001, da ANVISA, e que, apesar das amostras não apresentarem os patógenos, faz-se necessária a criação de parâmetros para essas bactérias, como forma de prevenção dos riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *Cynoscion acoupa*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, pescado, Saúde Pública.

ABSTRACT

The increase in the consumption of fish due to changes in the dietary demands caused the yellow hake (*Cynoscion acoupa*) to become one of the most consumed species in Maranhão. Despite the nutritional benefits, it poses risks to public health, when contaminated by pathogens to humans. The objective of this work was to evaluate the presence of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* in samples of yellow hake (*C. acoupa*) sold at the fairs and supermarkets of São Luís (MA). Thirty samples of yellow hake were collected at fairs and supermarkets and the processing of these samples was done at the Food and Water Microbiology Laboratory of the Veterinary Medicine course of the State University of Maranhão. The microbiological analyzes were carried out according to the Manual of Methods of Microbiological Analysis of Foods (SILVA, 2007), and led to the finding of absence of *V. parahaemolyticus* and absence of *L. monocytogenes* in 100% of the samples. It

can be concluded, therefore, that the results are in agreement with the RDC nº 12, of 2001, of ANVISA, and that, although the samples do not present the pathogens, it is necessary to create parameters for these bacteria, as a form of Prevention of risks to public health.

Keywords: *Cynoscion acoupa*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, fish and Public health.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de pescados tem aumentado nas últimas décadas a uma taxa anual de 3,2%; o consumo *per capita* chegou a 19,2kg por ano em 2012 (FAO, 2014a). Esse aumento é propiciado não só pelas mudanças de hábito alimentar, mas também pelo aumento demográfico e de renda, o que provocou uma demanda de aumento na produção e no comércio mundial para suprir a demanda da população (PIENIAK et al, 2010; FAO, 2014b; FAO, 2014a).

O Brasil ocupa o vigésimo terceiro lugar como produtor mundial de pescado, com 803,2 mil toneladas (BRASIL, 2011). O Nordeste, por sua vez, é considerado o maior fornecedor brasileiro de pescado, alcançando uma produção de 411 mil toneladas/ano (VIDAL; PINHO, 2010). A família Sciaenidae possui inúmeras espécies que são vendidas no Brasil, entre elas a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), que é amplamente encontrada ao longo da costa brasileira (SZPILMAN, 2000).

O pescado possui excelentes características nutricionais e é bastante procurado pela população que quer uma alimentação balanceada, por isso torna-se uma das primeiras opções de alimentos, por sua excelente composição e valor nutritivo, sua fácil digestibilidade, com valores elevados de vitaminas A e D, cálcio, ômega-3 e fósforo, lipídeos com altos níveis de ácidos graxos insaturados, além da presença de elevados teores de proteínas com valor biológico elevado (LEDERER, 1991; HUNTER e ROBERTS, 2000; DOMINGO, 2007; NEIVA, 2010). De acordo com Amagliani et al (2012), o pescado pode ser contaminado por diferentes agentes patogênicos como bactérias, vírus, fungos, entre outros, que podem causar desde problemas leves de saúde até casos mais graves.

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica gram-positiva, distribuída por todo e qualquer ambiente, podendo ser isolada da água, do solo, da vegetação, sendo possível encontrá-la também na microbiota natural de alguns animais (SCHUCHAT et al, 1991). A contaminação acontece não somente por meio da ingestão de alimentos crus ou mal cozidos, como pescados, mas também pela água, sendo esta bactéria, um importante patógeno causador de doenças para seres humanos e alguns animais (GONÇALVES, 2011).

Scallan et al (2011) descrevem que a listeriose é causadora de cerca de 1600 casos, 1500 hospitalizações e 260 mortes por ano nos Estados Unidos da América (EUA). Segundo Fretz et al (2010), existem inúmeros sinais clínicos para a listeriose, entre os quais podem ser incluídos septicemia, meningite, gastroenterite e aborto, com taxas de letalidade que podem alcançar 75%, quando de sua ocorrência em pacientes imunocomprometidos e mulheres grávidas.

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria patogênica, gram-negativa, que se distribui por regiões estuarinas, costeiras e ambientes marinhos, mas não está relacionada com a contaminação fecal (YU et al, 2013). É um patógeno que pode ser frequentemente encontrado e isolado de uma ampla variedade de pescados, como, por exemplo, bacalhau, sardinha, cavala e também a pescada amarela (MAHMUD et al, 2007).

Esses patógenos podem deixar sua condição de grande ameaça para saúde pública, caso sejam intensificados os programas voltados para a melhoria da qualidade e segurança do pescado e de frutos do mar comercializados para consumo humano, no que concerne tanto à legislação vigente quanto à fiscalização e controle desse processo. Além da cobrança por parte dos programas de inspeção, é necessário que boas práticas de fabricação (BPF) de alimentos sejam exigidas pela própria indústria de pescado (BUTT et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *L. monocytogenes* e *V. parahaemolyticus* em filés de pescada amarela (*C. acoupa*) vendidos nas feiras e supermercados de São Luís (MA).

2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de pescada amarela (*C. acoupa*) foram coletadas durante janeiro e fevereiro de 2017 em feiras e supermercados da cidade de São Luís, Maranhão. Ao todo, coletaram-se 30 (trinta) amostras, quinze de supermercados e quinze de feiras, que foram divididas em dez amostras para cada coleta. Foram então, acondicionadas em caixas isotérmicas para transporte até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde as mesmas foram processadas. As análises microbiológicas foram realizadas segundo o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA, 2001).

Brevemente, para o processamento de amostras para a detecção de *L. monocytogenes*, foram pesados de maneira asséptica, 25g de cada uma das amostras e inoculadas em frasco estéril com 225ml de Caldo UVM (Universidade de Vermont). Depois de homogeneizadas, as mesmas foram colocadas incubadas em estufa a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelo

período de 24 horas. Após a incubação, foi transferido 0,1mL da cultura de cada frasco para um tubo de ensaio com 10mL de caldo Fraser com suplemento (citrato de amônio e ferro III) e, incubou-se por 24 horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para etapa bioquímica, foram realizados os testes de motilidade, Camp-test *S. aureus*, catalase, oxidase, uréase, crescimento em TSI, H_2S em TSI, oxidação e fermentação da glicose, crescimento ágar bile esculina, teste de Voges-Proskauer e teste de Vermelho de Metila.

Para a detecção de *V. parahaemolyticus*, pesaram-se 25g de cada uma das amostras de maneira asséptica, que foram inoculadas em frasco estéril com 225ml de água peptonada salina 3%, equivalendo a diluição 10^{-1} . Prepararam-se diluições decimais (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) a partir desta e incubaram-se todos os tubos em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento, a partir de cada tubo com crescimento, no qual coletou-se a massa de células da superfície e estriou-se em placa de Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) e incubou-se a 37°C por 24 horas.

Para etapa bioquímica, foram realizados os testes de motilidade 3% de NaCl, gram, oxidação e fermentação da glicose 3% de NaCl, glicose 3% de NaCl, triptona 3% de NaCl, Voges-Proskauer 3% de NaCl e Indol 3% de NaCl.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa de *L. monocytogenes*, 100% das amostras de pescada amarela foram negativas para esse patógeno. Este trabalho possui seus resultados semelhantes aos resultados da pesquisa de Santos (2016), que não encontraram *Listeria* sp. nas amostras avaliadas de tambaquis (*Colossoma macropomum*). Conclui-se ser este um resultado satisfatório, já que houve a ausência para *L. monocytogenes*. De acordo com a RDC nº 12 de 2001, não há um estabelecimento de parâmetros para o gênero *Listeria* sp. Todavia, há um parâmetro utilizado para *Salmonella* pelo Ministério da Saúde que é o da ausência em 25g do produto de pescado, mas que também pode ser utilizado para outras bactérias, essa definição advém do risco à saúde pública (BRASIL, 2001), o que mantém como satisfatório o resultado das amostras analisadas.

Estudo realizado por Gambarin et al (2012) mostra resultados opostos, de 28 amostras de produtos de pescado pronto para consumo, nove apresentaram *L. monocytogenes* em método de diagnóstico convencional. Os resultados obtidos podem estar correlacionados ao acondicionamento inadequado dos alimentos, pois a temperatura tem papel indispensável para prevenir o crescimento dessa bactéria.

O gênero *Listeria* pode ser encontrado no meio ambiente - solo, vegetação e água - e dele ser isolado, além de fazer parte da microbiota natural de alguns animais (SCHUCHAT et al, 1991). Hage et al (2014) explicam que espécies de *Listeria* têm sido isoladas de produtos alimentícios, nos quais se incluem produtos prontos para o consumo. De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE, 2017), no Brasil, até hoje, não houve relatos de surtos de listeriose em humanos com associação à ingestão de alimentos. Entretanto, Cruz et al (2008) relatam casos ocorridos no Brasil: três casos de meningite bacteriana associada a *L. monocytogenes* em 1989. Além destes, Lemes-Marques et al (2007) descrevem 12 casos clínicos de listeriose ocorridos no Brasil entre 1995 a 2005. Estes poucos casos relatados se devem ao fato de que existe subnotificação e/ou subdiagnóstico. Assim, é de extrema importância para a saúde pública a criação de parâmetros para esses micro-organismos.

Na pesquisa para detecção de *V. parahaemolyticus*, também foi verificada a ausência de colônias sugestivas em todas as 30 amostras (100%) de pescada amarela. Embora tenha sido observada a ausência desse patógeno, foi possível observar, no meio TCBS (Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose), a presença de colônias sugestivas para outras espécies do gênero *Vibrio*, já que esse ágar é específico para isolamento e identificação de espécies desse gênero.

Esse resultado está de acordo com a legislação vigente no Brasil, segundo a resolução da RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA), que determina a tolerância para *V. parahaemolyticus* em produtos à base de pescados *in natura* de até 10^3 UFC/g (BRASIL, 2001). Herrera et al (2006) apresentam resultados semelhantes em seu trabalho: 100% das amostras de peixes marinhos frescos comercializados na Espanha não apresentaram este patógeno. Chen (2004) observou, em pesquisa feita com atum em São Paulo, que, dentre as 112 amostras avaliadas, apenas três apresentaram o patógeno, embora em baixa concentração, o que também está de acordo com os limites estabelecidos pela resolução vigente (BRASIL, 2001). Já Galvão (2016), em estudo realizado recentemente, obteve em 64 amostras, 9 confirmações para *V. parahaemolyticus* em ostras em São Luís - MA.

V. parahaemolyticus é uma bactéria que possui exigências para seu desenvolvimento; apesar de ser encontrada naturalmente em ambientes aquáticos, depende de temperatura, salinidade e matéria orgânica (LOPES et al, 2012). Presume-se então, que estes resultados negativos podem ser em decorrências da ausência de *V. parahaemolyticus* na água de onde foi retirada.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que a pescada amarela (*C. acoupa*) comercializada em feiras e supermercados da cidade de São Luís – MA apresenta resultados satisfatórios para *L. monocytogenes* e *V. parahaemolyticus*.

REFERÊNCIAS

AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 780-788, 2012.

BRASIL. **RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. DOU, Brasília, 1 jan. 2001. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

_____. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: República Federativa do Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%A9stico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

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

CHEN, J. **Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus spp.*) comercializado na zona sul do município de São Paulo - SP**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2008.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Doenças Transmitidas por Alimentos – Dados Estatísticos de 1998-2006**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/ddtha_sh9805.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

DOMINGO, J. L. Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: is all that glitters gold? **Environment International**, v. 33, n. 7, p. 993-998, 2007.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2014a). **Fishery and aquaculture statistics 2012**. Roma: FAO yearbook.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2014b). **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO.

FRETZ, R.; SAGEL, U.; RUPPITSCH, W. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese ‘Quargel’, Austria and Germany 2009. **Euro Surveillance**, 15, 2010.

GALVÃO, E. B. **Análise Microbiológica de ostras (*Mollusca, Bivalvia*) obtidas de diferentes pontos de extração na Ilha de São Luís – MA**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2016.

GAMBARIN, P.; MAGNABOSCO, C., LOSIO, M. N. et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

GONÇALVES, A. A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. **São Paulo: Atheneu**, 2011.

HAGE, E.; MPAMUGO, O.; OHAI, C. et al. Identification of six *Listeria* species by real-time PCR assay. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 6, p. 535-540, 2014.

HERRERA, F.C.; SANTOS, J.A.; OTERO, A. et al. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of applied microbiology**, v. 100, n. 3, p. 527-536, 2006.

HUNTER, B. J.; ROBERTS, D. C. K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. **Nutrition Research**, v. 20, n. 7, p. 1047-1058, 2000.

LEDERER, J. Enciclopédia moderna de higiene alimentar. **São Paulo: Manole**, v. 2, 1991.

LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.287-292, 2007.

LOPES I. S.; MACHADO FERREIRA, E., PEREIRA, D. D. M. et al. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 677-84, São Paulo, 2012.

MAHMUD, Z. H.; NEOGI, S.B.; KASSU, A. et al. Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan. **International journal of food microbiology**, v. 118, n. 1, p. 92-96, 2007.

NEIVA, C. R. P. **Cresce interesse pelos aspectos nutricionais do pescado**. Unidade Laboratorial de Referência em Tecnologia do Pescado, Instituto de Pesca, p. 7, Santos, 2010.

PIENIAK, Z.; VERBEKE, W.; OLSEN, S.O. et al. Health-related attitudes as a basis for segmenting European fish consumers. **Food Policy**, v. 35, n. 5, p. 448-455, 2010.

SANTOS, E. J. R. **Avaliação microbiológica e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas de tambaqui (*Colossoma Macropomum*) comercializado na cidade de São Luís – MA**. 61f. Dissertação – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís. 2016.

SCALLAN, E. R. M.; HOEKSTRA, F. J.; ANGULO, R. V. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**. V. 17, p. 7-15, 2011.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, n. 2, p. 169-183, 1991.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. In: **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Varela, 2001.

SZPILMAN, M. **Peixes marinhos do Brasil: guia prático de identificação**. Rio de Janeiro: Mauad, 2000.

VIDAL, M. de F.; PINHO, H. J. **Informe Rural ETENE, Produção e Venda de Produtos da Aquicultura no Nordeste – Banco do Nordeste**. Ano 4 – Nº 11; 2010.

YU, W. T.; JONG, K.; LIN, Y. et al. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. **International Journal Food Microbiology**, v.160, p. 185-192, 2013.

CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Apesar dos resultados desse trabalho terem sido negativos para *L. monocytogenes* e *V. parahaemolyticus*, devido às mudanças de hábitos alimentares da população e ao crescimento da produção de pescados no Brasil, há a necessidade de mais estudos sobre a ocorrência de patógenos em pescados *in natura*, visto que esses alimentos possuem uma maior taxa de perecibilidade e de desenvolvimento de patógenos, sendo este um assunto de grande importância em saúde pública.

Portanto, verifica-se a necessidade de se intensificar e aprofundar a pesquisa de ambas as bactérias em alimentos no Brasil, para que se possa dimensionar a importância destes patógenos no país. Mais que isso, há a necessidade de se estabelecer a relação entre a ocorrência desses patógenos em alimentos e em amostras clínicas de pacientes, e da evolução no processo de notificação, buscando-se o controle de casos e surtos que possam vir a ocorrer.