



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LYGIA SILVA GALENO

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* ISOLADAS DE SASHIMI DE
SALMÃO (*SALMO SALAR*)**

São Luís - MA

2016

LYGIA SILVA GALENO

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* ISOLADAS DE SASHIMI DE
SALMÃO (*SALMO SALAR*)**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Francisca Neide Costa

São Luís - MA

2016

LYGIA SILVA GALENO

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Aeromonas* ISOLADAS DE SASHIMI DE
SALMÃO (*SALMO SALAR*)**

Monografia de Graduação defendida e aprovada em: ____/____/____ pela
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra - UEMA
Medicina Veterinária Preventiva
1º examinador

Msc. Arlene dos Santos da Silva
Ciência Animal
2º examinador

Prof^ª Dra. Francisca Neide Costa – UEMA
Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora

Aos meus pais, Janete Almeida Silva e Francisco Carlos Martins Galeno, pela força e incentivo, com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar condições físicas, mentais e emocionais para superar todos os obstáculos durante a graduação e por ter me permitindo atingir as metas que tracei e busquei, com muito esforço e dedicação.

Aos meus pais, Janete Almeida Silva e Francisco Carlos Martins Galeno por todo esforço em sempre me dá o melhor, pelo cuidado, incentivo e por sempre acreditarem que eu seria capaz.

As meus irmãos, Lycia Galeno, Joyce Galeno e Jardel Ribeiro pelo apoio, ajuda, carinho, atenção e por sempre torcerem pelo meu sucesso. Aos meus afilhados, João Victor, Henrique, Felipe e Júlia por serem presentes de Deus em minha vida.

Ao meu namorado, Paulo Henrique por todo amor e paciência a mim concedidos, por sempre estar ao meu lado e não medir esforços nunca para me ajudar, sem você nada disso seria possível, muito obrigada. Agradeço também aos meus sogros, Lucilene e Edivaldo por serem segundo pais para mim.

As minhas amigas de longa data Monica Yanne e Erlane Martins por toda amizade, carinho e amor.

A Monique Pinheiro por ter me apresentado a Microbiologia e ter me permitido entrar na Iniciação Científica desde o 2º período, onde eu cresci muito profissionalmente e conquistei grandes amigos.

A minha orientadora, Profa Neide, por todos os ensinamentos, força e carinho concedidos e principalmente por ter me ajudado a conquistar muitas coisas durante a graduação, muito obrigada.

Ao Prof Felício Garino, por todos os ensinamentos durante sua passagem pelo laboratório, por sempre estar disposto a ajudar e por ter aceitado participar da minha banca contribuindo muito na correção desse trabalho.

À Profa Nancy pelo carinho, ajuda e por ter aceitado participar da minha banca.

Aos meus anjinhos Brenda Fernanda e Andressa Mendes, pela amizade, parceria, risadas, por me atuarem durante esses anos de graduação e estarem sempre ao meu lado, compartilhando e se alegrando das minhas conquistas. Em especial Brenda por ter me ajudado na realização e correção desse trabalho, muito obrigada.

As minhas amigas queridas Arlene e Luciana por todo apoio, força, carinho, incentivo, risadas, por serem presentes de Deus em minha vida e sempre estarem dispostas a me ajudar, vocês foram essenciais nessa conquista, obrigada de coração.

A minha amiga Eliane Ribeiro, por ter me acompanhado desde a minha primeira bolsa de Iniciação Científica, por ser uma grande incentivadora e ter me ajudado na correção desse trabalho.

Aos colegas de turma, pelos momentos de risadas e descontração, meu respeito e gratidão a todos.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA, em especial a nossa mãezona Ruthe Cordeiro por todo cuidado e amor com todos, obrigada de modo especial a Thaliane, Rose, Osmar, Celia, Dona Socorro e os todos os estagiários que sempre estavam dispostos a ajudar.

Aos antigos e atuais membros do Grupo de Estudos em Medicina Veterinária Preventiva (GEMVESP) Rafael, Isabella, Ericka, Eldo, Fabiana, Hortência, Priscila, Caroline, Profa Isabel e especial Karina, por ter sido a idealizadora deste projeto e ter acompanhado todas as etapas da sua realização.

Obrigada ao meu amigos Victor Hugo e Altobelle Furtado pela amizade e carinho. Agradeço também a Jonatas, Manu e Débora Rochelly da UFRPE pelo incentivo, carinho e ensinamentos durante a realização do meu estágio no Laboratório de Doenças Infecciosas.

À Universidade Estadual do Maranhão pela oportunidade da graduação e ao curso de Medicina Veterinária, incluindo seus diretores, funcionários (Em especial Patrícia, por sempre estar disposta a ajudar), colegas de outras turmas e todos os professores que contribuíram e ainda irão contribuir na minha formação.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e a FAPEMA pelo financiamento dessa pesquisa.

“O homem é do tamanho do seu sonho”

Fernando Pessoa

RESUMO

A culinária japonesa passou a ser agregada ao paladar brasileiro, principalmente em locais de turismo e, atualmente, com a expansão do mercado gastronômico o acesso a alimentação diferenciada, os hábitos alimentares têm se tornado cada vez mais globalizados. Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de sashimi de salmão (*Salmo salar*) foram coletadas 60 amostras em restaurantes especializados nessa culinária na cidade de São Luís – MA e submetidas a análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão. As análises microbiológicas para pesquisa de *Staphylococcus coagulase positivo* foram realizadas conforme a metodologia prescrita pela Instrução Normativa 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Para o isolamento do gênero *Aeromonas* spp. foi utilizado o método convencional e a caracterização das espécies foi realizada por meio da chave de identificação Aerokey II. Para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos foram selecionadas as cepas positivas e utilizado o método de difusão de discos com o ágar Mueller Hinton. A pesquisa de *Staphylococcus* sp mostrou que 32 amostras (53,3%) apresentaram contagens entre $2,1 \times 10^2$ a 5×10^4 UFC/g, entretanto nenhuma apresentou contaminação por *Staphylococcus coagulase positivo*, sendo que a legislação brasileira estabelece como contagem máxima 5×10^3 UFC/g. Os resultados para a pesquisa de *Aeromonas* spp demonstram que do total de 60 amostras analisadas, 57 (95%) foram positivas e a caracterização bioquímica permitiu o isolamento de 66 cepas, sendo 60 (91%) da espécie *Aeromonas hydrophila* e 6 (9%) *Aeromonas caviae*. Essas ainda apresentaram elevados percentuais de resistência aos 11 antimicrobianos testados. O índice de múltipla resistência antimicrobiana foi maior que 0,2 em 94% das cepas de *Aeromonas* isoladas, caracterizando multirresistência. A análise microbiológica do *sashimi* revelou alta porcentagem de microorganismos do gênero *Aeromonas*, o que constitui sérios riscos para a população consumidora, pois estas bactérias estão associadas ao surgimento de gastroenterites sob a forma de surtos e também outras infecções extraintestinais. A presença de bactérias *Staphylococcus coagulase negativo* indica falhas durante a manipulação e armazenamento do Salmão.

Palavras-chave: *Sashimi*, *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* sp., resistência antimicrobiana, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

Japanese cuisine has to be added to the Brazilian taste, especially in tourist locations and currently with the expansion of the gourmet market access to different food, eating habits have become increasingly globalized. In order to evaluate the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from salmon sashimi (*Salmo salar*) were collected 60 samples in restaurants specializing in this cuisine in the city of São Luís - MA and subjected to microbiological analysis in Food and Water Microbiology Laboratory State University of Maranhão. Microbiological testing for *Staphylococcus* coagulase positive research were carried out according to the methodology prescribed by the Normative Instruction 62 of August 26, 2003, the Ministry of Agriculture Livestock and Supply. For the isolation of the genus *Aeromonas*. We used the conventional method and characterization of the species was carried out by Aerokey II identification key. For susceptibility testing to antibiotics were selected positive strains and used the disc diffusion method with Mueller Hinton agar. The *Staphylococcus* sp survey showed that 32 samples (53.3%) had scores between $2,1 \times 10^2$ to 5×10^4 UFC/g, though none had contamination by *Staphylococcus* coagulase positive, and Brazilian law sets a maximum count 5×10^3 UFC/g. The results for the detection of *Aeromonas* demonstrate that the total of 60 samples tested, 57 (95%) were positive and biochemical characterization has allowed the isolation of 66 strains, 60 (91%) of *Aeromonas hydrophila* species and 6 (9%) *Aeromonas caviae*. These also had high percentages of resistance to 11 antibiotics tested. The multiple antimicrobial resistance index was higher than 0.2 in 94% of *Aeromonas* strains characterizing multidrug resistance. Microbiological analysis of sashimi revealed the high incidence of microorganisms of the genus *Aeromonas*, which constitutes a serious risk to consumer population because these bacteria are associated with the emergence of gastroenteritis in the form of outbreaks and also other extra-intestinal infections. The presence of bacteria *Staphylococcus* coagulase negative indicates failures during the handling and storage of Salmon.

Keywords: *Sashimi*, *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* sp., antimicrobial resistance, microbiological quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica da cidade de São Luís – MA.....	27
Figura 2: Localização geográfica dos dez restaurantes selecionados para amostragem de coleta de amostras de sashimi de Salmão para análise microbiológica.....	28
Figura 3: Sashimi de Salmão (<i>Salmo salar</i>).....	29
Figura 4: Chave bioquímica para identificação das espécies de <i>Aeromonas</i> spp	32
Figura 5: Percentual de amostras de sashimi positivas para <i>Staphylococcus</i> sp. coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016	35
Figura 6: Percentual de amostras de sashimi contaminadas por <i>Aeromonas</i> spp. coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016	40
Figura 7: Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de <i>Aeromonas caviae</i> isoladas de amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes da cidade de São Luís - MA, 2016.....	45
Figura 8: Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> isoladas de amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes da cidade de São Luís - MA, 2016.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padrão de interpretação do teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	33
Tabela 2: Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g) em amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016.....	36
Tabela 3: Espécies de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i> isoladas de amostras de sashimi, obtidas em restaurantes na cidade de São Luís, 2016	41
Tabela 4: Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Aeromonas caviae</i> isoladas de amostras de sashimi em dez restaurantes na cidade de São Luís - MA, 2016	43
Tabela 5: Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) encontrados nos 66 isolados de <i>A. hydrophila</i> e <i>A. caviae</i> em amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C	Antes de cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMC	Amoxicilina Clavulanato
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
BP	Baird Parker
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CFO	Cefoxitima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
d.C	Depois de Cristo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
EPI	Equipamento de Proteção Individual
Etc	Outras coisas
et al	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
GEN	Gentamicina
h	Horas
km²	Quilômetro quadrado
L	Litro
Log	Logaritmo
LVX	Ciprofloxacina
NaCl	Cloreto de sódio
NUGEO	Núcleo Geoambiental
MAR	Múltipla resistência antimicrobiana
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPT	Piperaciclina
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
S	Sul
sp.	Espécie
spp.	Subespécie
SUT	Sulfa Trimetoprim
Tnase	Termonuclease
TSA	Ágar Trypticase Soja

TSB	Caldo Trypticase Soja
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V	5
VII	7
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
W	Oeste
x	Vezes
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
B	Beta
%	Porcentagem
+	Mais
±	Mais ou menos
µg	Micrograma
°C	Graus Celsius
Ω-3	Ômega-3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Pescado	18
3.2 Salmão (<i>Salmo salar</i>)	19
3.4 Sushi e sashimi	20
3.3 <i>Aeromonas</i> spp.	21
3.4 <i>Staphylococcus</i> sp.	23
3.5 Antimicrobianos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Área de estudo	27
4.2 Identificação dos restaurantes	27
4.3 Obtenção das amostras	28
4.4 Análises Microbiológicas	29
4.4.1 Pesquisa de <i>Staphylococcus coagulase positivo</i>	29
4.4.2 Pesquisa de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	30
4.4.3 Susceptibilidade in vitro dos micro-organismos isolados frente aos antimicrobianos	33
4.4.4 Determinação do índice de múltipla resistência aos antimicrobianos	34
4.5 Análise estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> sp.	35
5.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus coagulase positivo</i>	38
5.3 Pesquisa de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	39
5.4 Perfil de resistência aos antimicrobianos	42
5.5 Índice de Múltipla Resistência a Antibióticos	47
6 CONCLUSÕES	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os costumes alimentares no Brasil são resultantes de uma mistura de ingredientes oriundos da pré-existente culinária indígena, da introdução da cozinha e técnicas de preparo de povos colonizadores, assim como adaptações realizadas pelos escravos de origem africana (SANTOS, 2005) e contribuições de diversos povos imigrantes, como os japoneses.

A culinária japonesa passou a ser agregada ao paladar brasileiro principalmente em locais de turismo. A sua preparação atrativa em cor, beleza e sabor está inserida ao contexto de alimentação saudável, aliada à sua apresentação como um importante fator de qualidade de vida e longevidade (RIBEIRO; PAOLUCCI, 2006).

O hábito de ingerir pratos à base de peixes crus, comum na culinária japonesa, tem sido evidenciado através do crescente surgimento de lojas especializadas, principalmente em bairros de classe mais elevada e nas grandes cidades brasileiras. Estes restaurantes estão presentes em quase todos os centros comerciais dentro da categoria comida de preparo rápido ou *fast-food* e ainda ocorrendo através de lojas na modalidade de entrega em domicílio ou *delivery* (VELLOSO, 2004).

Entretanto, essa forma de consumo do pescado pode veicular uma variedade de agentes patogênicos ao homem, causadores de toxinfecções alimentares (VALLANDRO, 2010). Alguns pratos japoneses, como o sashimi, são preparados manualmente, além da contaminação oriunda do pescado, do local da captura, o contato direto do alimento com as mãos e a manipulação excessiva podem levar ao aumento da incidência de vários patógenos como o *Staphylococcus aureus*, coliformes termotolerantes (JAY, 2005) e *Aeromonas*.

Bactérias do gênero *Aeromonas* estão relacionadas a infecções oportunistas, tanto no ser humano como em outros animais (a exemplo dos peixes), além de apresentarem capacidade de resistência a múltiplas drogas (JANDA; ABBOTT, 1998; KO et al., 2000; PALU et al., 2006)

O aumento da resistência bacteriana pode ser facilmente ocasionado, devido a utilização de maneira indiscriminada de antimicrobianos no combate de doenças ou como promotores de crescimento, o que aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos (FRAPPAOLA; GUEST, 1986)

Aeromonas é um patógeno emergente, que já foi isolado de fontes humanas e animais. Os peixes são importantes veículos de infecções humanas causadas por *Aeromonas*, principalmente quando são consumidos crus (SILVA, 2010). Considerando que o sashimi é

um alimento consumido cru, ou seja, não passa por nenhum tratamento capaz de reduzir ou eliminar micro-organismos patogênicos presentes pode-se considera-lo um alimento de alto risco, sendo então de suma importância monitorar sua presença no pescado e avaliar os seus riscos para a saúde pública.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão frequentemente ligadas a surtos de intoxicações alimentares, pois a manipulação inadequada no pescado representa um risco potencial, podendo contaminar o pescado, especialmente o sashimi, que exige cuidado e conhecimento no seu preparo. Preparações muito manipuladas tem grande risco de provocar infecção por *Staphylococcus*, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuem treinamento adequado (SILVA JÚNIOR, 2014)

Nesse contexto, são necessários estudos que determinem a qualidade sanitária de alimentos consumidos crus, como o sashimi, para definir o padrão de qualidade de manipulação e consumo desse alimento, além de contribuir com dados para subsidiar pesquisas futuras em saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de bactérias do gênero *Aeromonas* e *Staphylococcus* isoladas de amostras de sashimi em São Luís – MA.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a contagem de *Staphylococcus* sp.;
- Identificar as espécies de *Aeromonas* spp. e de *Staphylococcus* coagulase positivo;
- Determinar os perfis de resistência dos micro-organismos isolados com diferentes antimicrobianos;
- Verificar o índice de múltipla resistência aos antimicrobianos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Peixe

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), “PESCADO” compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada usados na alimentação humana (BRASIL, 1952).

O pescado é a proteína animal mais consumida no mercado internacional, e a que encontra mais espaço para crescer. Esse crescimento se deve ao fato do pescado ser um alimento saudável, associado à melhoria da renda nos países emergentes, como Brasil, China e Índia, com crescimento acelerado a partir de 2000. O salmão, em especial, vem se destacando muito neste mercado, no ano de 2012 foram importados da produção chilena (referência no segmento) 68 mil toneladas, colocando o Brasil em 5^o lugar no ranking mundial, ficando atrás apenas da União Europeia, Estados Unidos da América (EUA), Rússia e Japão (SIDONIO et al., 2012).

Nas últimas décadas o consumo de peixe vem crescendo consideravelmente no Brasil, em 2013 o consumo *per capita* médio era de 10,5 kg/ano, inferior à média mundial que era de 12 kg/ano. No entanto, os brasileiros já consomem peixe acima da média mínima recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que é de 12 quilos por habitante/ano (BASTOS, 2015). Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) alguns fatores têm contribuído com o crescimento no consumo desta proteína animal, dentre eles o aumento do poder de compra que conseqüentemente gera uma pressão sobre a demanda por alimentos de boa qualidade, estimulando no Brasil o aumento da produção de peixes (BRASIL, 2011).

O peixe representa uma excelente fonte de alimento para as populações desde o surgimento da humanidade, pois, se comparado sob o ponto de vista nutricional com as demais carnes, nota-se que este alimento possui qualidade nutricional superior, pois é rico em minerais e vitaminas contém proteínas de alta qualidade e rápida digestibilidade, além de ser uma excelente fonte de ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega 3 ($\Omega 3$) (VIEGAS et al., 2011). Devido a essas características, em vários países, como os da Europa e da Ásia, é a proteína de origem animal mais consumida. Com relação à quantidade e à qualidade das proteínas do pescado, o teor é sempre alto, variando entre 15% a 25% (GERMANO; GERMANO, 2015).

Apesar do pescado possuir grande importância em todo o mundo devido ao seu alto valor nutricional, é também um dos alimentos mais susceptíveis à deterioração devido sua elevada atividade de água, riqueza de nutrientes, alto teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis, e principalmente, pH próximo da neutralidade (RIBEIRO et al., 2009). Esses fatores favorecem o aparecimento de alterações indesejáveis e também o desenvolvimento de micro-organismos que podem causar danos à saúde do homem (SILVA et al., 2008). Dentre os principais agentes bacterianos causadores de danos à saúde do homem são destacados o *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e o *Vibrio cholerae* (VIEIRA, 2004).

A contaminação do peixe antes da captura pode ocorrer por micro-organismos, resíduos de produtos químicos, águas contaminadas ou poluídas dos estuários e das bacias pesqueiras (FAO, 2010). Após a captura, essa contaminação pode advir da falta de higiene nos porões dos barcos; durante o caminho para o porto, pela utilização de gelo de má qualidade; no cais do entreposto quando lavado com água contaminada; nos caminhões mal refrigerados, ou seja, em todas as etapas de distribuição até alcançar o consumidor final. A refrigeração, a higiene das instalações e a qualidade da água são pontos de extrema importância para garantir a conservação e qualidade do pescado (GERMANO et al., 1993).

Doenças transmitidas por alimentos - DTA's, são causadas por organismos que invadem o corpo humano através de alimentos contaminados. Quando se falar de DTA's em pescado do ponto de vista microbiológico, os moluscos (mexilhão fresco e congelado, ostras e sururu) e peixes, servidos crus, estão incluídos no mais alto grau de risco (HUSS et al. 2000).

3.2 Salmão (*Salmo salar*)

Há cerca de 12 mil anos, o salmão (*Salmo salar*) vem sendo utilizado como alimento do homem, segundo informações encontradas em paredes de cavernas na França (STANSBY, 1968). O salmão é um grande peixe da família Salmonidae, sendo muito conhecido como o peixe do “sushi”, pela sua finalidade de alimentar os seres humanos sendo servido cru. É um peixe muito apreciado pela sua carne rosada, consistente, tenra e saborosa. É um dos peixes mais comercializados nos estabelecimentos especializados na culinária japonesa (MALAVOTA, 2008).

O salmão é originário das águas geladas do Atlântico Norte e do Pacífico Sul, contudo há cerca de 20 anos esse pescado foi introduzido no território chileno com fins exclusivamente comerciais. O governo do Chile promoveu o desenvolvimento da piscicultura

no Rio Claro em Coyhaique, porém esse projeto foi extinto depois de oito anos por não atingir os resultados almejados. Durante esse período, algumas empresas começaram a criar salmões em grandes "currais" flutuantes, fazendo do Chile, hoje, o segundo maior produtor de salmão do mundo, com padrões de excelência e grandes volumes de exportações, perdendo apenas para a Noruega (MALAVOTA, 2008).

Esse peixe nasce nas cabeceiras dos rios e, após um ano, migra para o oceano para se alimentar. Na ocasião do acasalamento, retorna para o lugar onde nasceu e se reproduz. Há algum tempo que o salmão é produzido em viveiros, devido ao crescimento significativo do comércio desse produto, nesse caso, os produtores tentam reproduzir o ciclo natural de vida do salmão: depositam as ovas em rios de água doce e, passado um tempo do nascimento, levam os peixes para o mar, em criadouros devidamente cercados. É empregada alta tecnologia, para que se obtenha um produto de boa qualidade e em tempo recorde, para atender à crescente demanda (RODRIGUES, 2007).

O Brasil ocupa uma posição de destaque, sendo o segundo lugar no ranking dos países importadores do salmão chileno, seguido pelos EUA e Japão. Diariamente, cerca de seis milhões de pessoas consomem o salmão chileno (CHANDÍA, 2010).

O salmão é um dos peixes mais utilizados na culinária japonesa para preparação do sushi e sashimi, entretanto outros pescados podem ser utilizados como o atum (*Thunnus* spp.), polvo (*Octopoda* spp.), badejo (*Mycteroperca* spp.), robalo (*Centropomus* spp.), linguado (*Paralichthys* spp.), lula (*Teuthida* spp.), dentre outros (GUIA DA PESCA, 2007).

3.4 Sushi e sashimi

A culinária japonesa é composta por alimentos frescos e naturais, oriundos de pescados e vegetais, que popularmente são conhecidos como sushis e sashimis (CARROLL, 2009; EDWARDS, 2013). O sushi é um alimento contendo basicamente arroz temperado (vinagre, açúcar e sal), combinado com algas, peixe cru, mariscos, vegetais ou ovo. É servido acompanhado de wasabi (raiz forte japonesa) e shoyu (molho de soja) (BARBER e TAKEMURA, 2011; SATO, 2013). O sashimi consiste em finas fatias de pescado fresco, preparados manualmente, servidos com apenas um molho e um simples acompanhamento (VECIANA-NOGUES et al., 1997). Estes pratos estão tornando-se populares, também, em outros países além do Japão (YANO et al., 2004; HAMADA-SATO et al., 2005).

O sushi se originou através da necessidade de conservação do peixe cru. Esse método foi desenvolvido pelos povos antigos do Sudeste da Ásia e não existem registros precisos de

quando começaram essas técnicas, mas sabe-se que no século V a.C a conservação de peixe cru com arroz já era realizada (BARBER; TAKEMURA, 2008).

Essa técnica de conservação era realizada retirando a cabeça e as vísceras do peixe, em seguida seus filés, que eram salgados e armazenados em barris de madeira com camadas de arroz cozido entre eles. O arroz cozido fermentava de forma natural, liberando ácido láctico, isso diminuía o pH e garantia a conservação do peixe. Ao longo do processo de conservação o arroz se tornava impróprio para o consumo, sendo descartado e somente o peixe aproveitado (PATROCÍNIO, 2009).

Esse método foi introduzido no Japão no início do século VII d.C e sofreu modificações com o passar dos anos até se tornar o sushi que se consome na atualidade. Deixou então de ser um método de conservação e passou a ser um alimento de consumo imediato, um bolinho de arroz com uma fatia de peixe cru (BARBER; TAKEMURA, 2008).

O consumo de peixe cru se propagou muito nos últimos anos, e no Brasil esse tipo de culinária também faz muito sucesso, isso é confirmado pelo crescente número de estabelecimentos especializados nesta culinária nas diversas cidades brasileiras (EDWARDS, 2013).

Esse aumento no consumo de sushi e sashimi pela população levaram a uma preocupação com relação à qualidade da matéria-prima e nas etapas de preparo e manipulação, visto que existe um grande número de micro-organismos que podem ser veiculados por esse alimento, então é necessária atenção especial das autoridades sanitárias para garantir a qualidade desse produto (SOUZA, 2003; GERMANO e GERMANO, 2015).

3.3 *Aeromonas* spp.

Bactérias do gênero *Aeromonas* são, em sua maioria, bastonetes gram-negativos, de vida livre, anaeróbias facultativos e móveis devido a um único flagelo polar. Inicialmente foram classificadas junto ao *Vibrio* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na família Vibrionaceae, contudo, estudos genéticos comprovaram a necessidade de sua reclassificação em uma família própria, Aeromonadacea (GHENGHESH et al., 2008; TAVARES, et al, 2014). Colwell et al. (1986) também recomendaram a reclassificação do gênero *Aeromonas*, pois estas apresentam características filogenéticas distintas das encontradas na família Vibrionaceae.

Este gênero envolve um grupo de micro-organismos que estão amplamente difundidos no solo, nas fezes humanas e animais e principalmente nos ambientes aquáticos, devido sua extrema adaptabilidade (MATTE, 1995). A água é o principal meio de transmissão de

Aeromonas spp., deste modo, a infecção pode ser direta, através da sua ingestão contaminada ou por meio dos alimentos que tenha sido submetido a algum processo em contato com esta, dentre eles, destaca-se os de origem animal, que podem ser contaminados em várias etapas do seu processamento (BIZANI; BRANDELLI, 2001; JANDA; ABBOTT, 2010; TAVARES, 2014).

A OMS (2011) classificou algumas espécies de *Aeromonas* como veiculadoras de doenças a seres humanos, sendo um interesse emergente de saúde pública, pois estes patógenos podem ser veiculados pela água e por alimentos contaminados (MERINO et al., 1995; HEUZENROEDER et al., 1999; MARTINS et al., 2002).

Peixoto et. al (2012) destacam que cinco são as espécies de importância clínica: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. schubertii*, dentre estas as espécies *A. hydrophila* e *A. salmonicida* são as mais importantes para peixes e para a saúde pública, pois podem multiplicar-se e produzir exotoxinas em temperaturas de refrigeração.

O mecanismo de patogenicidade do gênero *Aeromonas* spp. se deve a vários fatores, como as hemolisinas, citotoxinas, fosfolipases, DNase e habilidade de aderência às células epiteliais, são alguns produtos extracelulares presentes em espécies do gênero *Aeromonas*, sendo importantes como fatores de virulência. A presença desses fatores de virulência vai determinar a evolução da doença causada por essa bactéria (SCOARIS et al., 2007; TAVARES, 2014).

A pesquisa de *Aeromonas* spp. não é um parâmetro de qualidade microbiológica considerada pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), porém, este gênero inclui espécies potencialmente patogênicas para o homem e que estão amplamente distribuídas na natureza, sendo, portanto um fator preocupante, já que a contaminação por essa bactéria pode advir de muitas fontes (TAVARES et al., 2014).

Aeromonas spp. são boas formadoras de biofilmes, tendo importância nos sistemas de distribuição de água e nos locais de processamento de alimentos, além disso, secretam muitas proteínas extracelulares, incluindo amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease. (NAM; JOH, 2007; SCOARIS et al., 2007). A formação dos biofilmes se deve à presença de pili tipo IV, que promove a hiperpiliação e a autoagregação de células bacterianas (BÉCHET; BLONDEAU, 2003).

Cepas patogênicas de *A. hydrophila* podem provocar infecções em peixes, anfíbios e seres humanos através de feridas abertas ou pela ingestão de um número suficiente de bactérias em água ou alimentos (FDA, 2009). Foi isolada uma cepa de *A. hydrophila* a partir de fezes diarreicas de uma criança de um ano de idade no México, a cepa identificada por

métodos bioquímicos e genéticos apresentou capacidade de produção de enzimas extracelulares relacionadas com virulência, proteases, lípases e hemolisinas (AGUILERA-ARREOLA et al., 2009).

A presença de *Aeromonas* spp. nos alimentos tem sido demonstrada, evidenciando-se diversas prováveis fontes de contaminação como carnes frescas e congeladas, leite, produtos de padaria, água tanto doce quanto salgada, vegetais e até alimentos processados representam risco de contaminação (AWAN et al., 2009; PEIXOTO, 2012).

Conforme Tavares et al. (2014) a água é importante disseminador de *Aeromonas* spp. e como o seu uso é imprescindível para o processamento de vários alimentos o cuidado com ela é muito importante para a prevenção de infecções.

3.4 *Staphylococcus* sp.

Os *Staphylococcus* são um grupo de micro-organismos, pertencentes à família Micrococcaceae, que está dividida em 36 espécies, com destaque para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hycus* e *Staphylococcus epidermidis*. São cocos gram-positivos, não formadores de esporos, imóveis, agrupados aos pares ou em cachos irregulares, oxidase negativo e catalase positivo. Essas bactérias são divididas em duas categorias: coagulase positivo e coagulase negativo, esta enzima tem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo, sendo uma característica de patogenicidade. Algumas cepas produzem enterotoxina termoestável, provocando quadros de intoxicação alimentar (HOLT et al., 1994; DAMASCENO, 2009).

As bactérias desse gênero crescem à temperatura de 10 a 45°C, sendo ótimo o limite de 35 a 37°C, enquanto suas enterotoxinas são produzidas entre 40-45°C. Toleram valores de pH entre 4,5 e 4,8 e apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas (HOLT et al., 1994).

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são responsáveis por aproximadamente 45% das intoxicações no mundo. Os alimentos são contaminados nas várias etapas de produção ou estocagem, tanto por cepas de origem ambiental, como humana. Encontrando condições ótimas, como aquecimento ou refrigeração em temperatura inadequada, esta bactéria se multiplica e pode produzir toxinas (GERMANO; GERMANO, 2015).

A contaminação do pescado por *Staphylococcus* sp. ocorre predominantemente através da manipulação, pois essa bactéria se encontra nas mãos, cavidade oral e mucosa nasal, dessa forma durante o processamento podem contaminar o pescado, sem que este sofra alterações nas suas características sensoriais. A partir destes, podem atingir o ar, poeira, esgoto, água e diversas superfícies, equipamentos e utensílios que tenham entrado em contato com manipuladores. Deste modo, os alimentos ficam sujeitos a contaminação; e se os mesmos apresentarem boas condições para o crescimento do patógeno, o alimento será uma fonte de intoxicação (VIEIRA, 2004; OLIVEIRA; MARQUES, 2012; FORSYTHE, 2013; GERMANO; GERMANO, 2015).

Moura-Filho et al. (2007) em Recife – PE analisando amostras de sashimis e vegetais verificaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo de 0 a 5,04 Log₁₀. Malavota (2008) analisando amostras de sashimi em Nitérois - RJ observou que as contagens de *Staphylococcus coagulase positivo* variaram de 0 a 5,04 Log₁₀ UFC/g. Oliveira e Marques (2012) ao avaliar as condições higienicossanitárias no preparo de sushi e sashimi de um estabelecimento comercial em Cariri (Ceará), observaram que as amostras de salada de camarão, apresentaram um alto índice de *Staphylococcus* sp., estando acima do padrão e tornando-se um risco a saúde do consumidor.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001, permite até 5x10³ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positivo para amostras à base de carne, pescado e similares crus (quibe cru, carpaccio, “sushi”, “sashimi” etc).

Alimentos que sofrem intensa manipulação durante o seu preparo e que permanecem por longos períodos a temperatura ambiente após o seu preparo, são considerados alimentos de alto risco, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuem treinamento adequado (SILVA JÚNIOR, 2014). A pesquisa de bactérias do gênero *Staphylococcus* no pescado nos permite avaliar se os procedimentos higienicossanitários durante o processo de produção foram bem executados, servindo como indicador de contaminação pós processo (SILVA et al., 2010).

3.5 Antimicrobianos

Um grande número de doenças provoca prejuízos à produção animal, sendo na maioria dos casos causada por agentes infecciosos. Dessa forma há bastante tempo são

utilizados antimicrobianos com o fim de matar ou inibir o crescimento de micro-organismos e para evitar a mortalidade excessiva dos animais (READ, 2003, TAVECHIO, 2009).

O uso indiscriminado de antimicrobianos para o controle de doenças ou como promotores de crescimento aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos, além de causar impactos ao meio ambiente e a saúde pública, devido à presença de resíduos de antibióticos no peixe, podendo ocasionar distúrbios alimentares, como as alergias. Além disso, a exposição a antibióticos em concentrações mínimas pode levar ao aparecimento de resistência, tanto em bactérias comensais do intestino humano, como em bactérias dos peixes e aquáticas, com provável dispersão de genes de resistência em diferentes populações bacterianas (READ, 2003; CABELLO, 2006; GORDON et al., 2007; BURRIDGE, 2010; GUARDABASSI, 2010).

Os agentes antimicrobianos são moléculas de origem biológicas e/ou sintéticas que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de micro-organismos. Podem ser produzidos de forma natural, através de fungos ou bactérias ou de forma sintética ou semi-sintética. Necessitam ser seguros para o hospedeiro, permitindo a sua utilização como agentes quimioterapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas (READ, 2003; BURRIDGE et al., 2010; GUARDABASSI, 2010; ROMERO, et al., 2012).

Na aquicultura, os antimicrobianos são comumente utilizados, por curtos períodos de tempo, em níveis terapêuticos, por via oral com exceção de alguns casos de peixes reprodutores, que são tratados com injeções intraperitoneais. Os peixes marinhos, devido ao teor de sal da água do mar, necessitam ter maior quantidade de antibióticos disponível para assegurar um grau suficiente de moléculas de fármacos ativas (SØRUM, 2006; ROMERO, 2012).

A resistência aos antimicrobianos é um mecanismo genético, onde os genes contidos na bactéria codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Ela pode se originar de mutações que ocorrem na bactéria durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético e através da importação de genes causadores desse mecanismo, consistindo na resistência transferível. Esta resistência acontece pelos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, comumente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (TAVARES, 2000).

A aquicultura do Salmão vem crescendo em todo o mundo, especialmente em dois países, Noruega e Chile (ASCHE et al., 2008; BARTON E FLOYSDAND 2010). No Chile, esse crescimento tem sido acompanhado por grandes mortalidades, que chegam a 50% em

algumas condições, gerando grandes perdas econômicas (BRAVO e MEDTLYNG, 2007; BUSTOS et al., 2011) e levando a utilização cada vez maior de agentes antimicrobianos terapêuticos e profiláticos. Estimativas comprovam que cerca de 950 toneladas de quinolonas, 1500 toneladas de tetraciclina e 478 toneladas de florfenicol foram utilizadas na aquicultura do salmão no Chile entre 2000 e 2008 (MILANAO, 2002; MILLANAO et al., 2011).

Os agentes antimicrobianos são geralmente administradas ao salmão misturados na ração (SORUM, 2006; BURRIDGE, et al., 2010). Os resíduos desses antibióticos podem permanecer no ambiente aquático por períodos variáveis de tempo (CAPONE et al., 1996; HERWIG et al., 1997; BURRIDGE, et al., 2010) e provocar o surgimento de bactérias resistentes, além de influenciar na diversidade microbiana, atuando sobre outros micro-organismos (CAPONE et al., 1996; COYNE et al., 2001; SORUM, 2006; HOLTEN et al., 1999).

O aparecimento de múltipla resistência aos antimicrobianos acontece pelo uso indiscriminado de antibióticos na aquicultura (FRAPPAOLA; GUEST, 1986). Bactérias patogênicas como *Aeromonas* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo podem transmitir genes de resistência a antibióticos. A maior parte das *Aeromonas* spp. é resistente à penicilina, ampicilina e carbenicilina (PEIXOTO, 2012). Já os *Staphylococcus* sp. mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas (FARIAS et al., 1997; TAVARES, 2000; JAY, 2005). As bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam alta resistência à ampicilina e, por esse motivo, este antimicrobiano é utilizado nos meios de cultura seletivos para este micro-organismo (GHENGHESH et al., 2008).

Albuquerque et al. (2007), verificou que 100% das cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de pescado comercializado em uma feira de Fortaleza, Ceará foram resistentes à ampicilina e 44% apresentaram multirresistência, esse fato é de extrema importância, visto que a bactéria não responde a diversos tratamentos para infecções.

Hirsch et al. (2006) analisando amostras de peixes e ambientes aquáticos na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais observou que 43% dos isolados apresentaram índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) igual ou superior a 22%, ou seja, resistência a dois ou mais drogas das nove testadas.

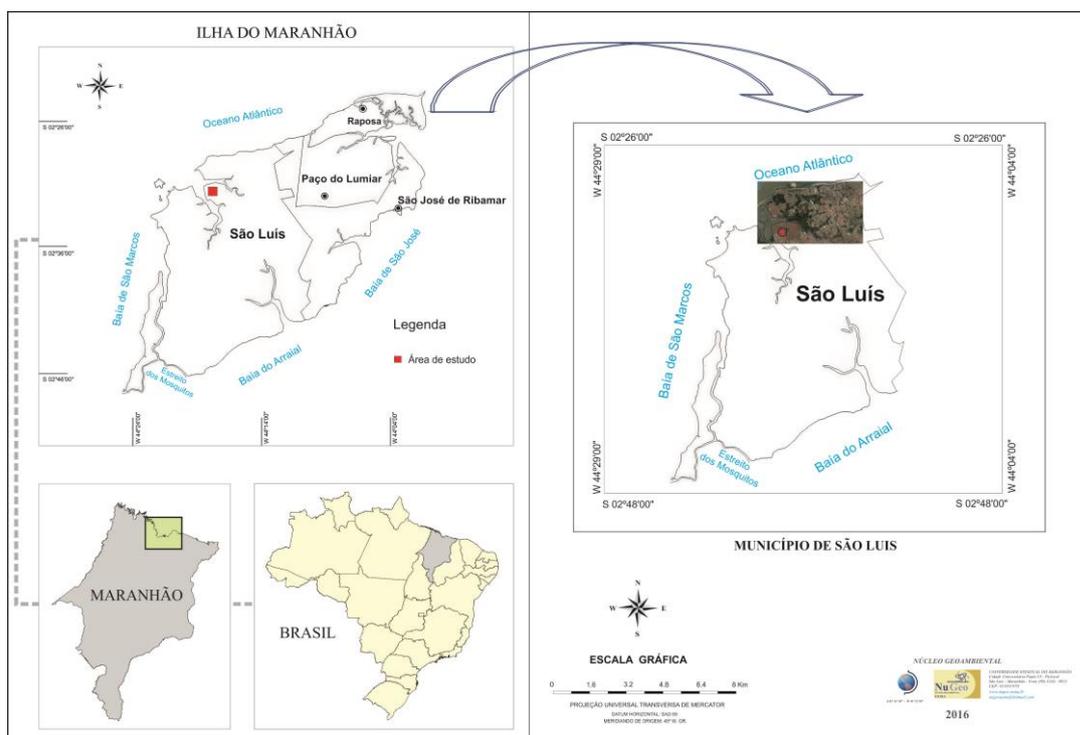
Mejdi et al. (2010) isolaram de água do mar e mexilhões *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. e comprovaram a resistência frente a 12 antimicrobianos usando o método de Kirby-Bauer, e a maioria dos isolados mostrou-se resistente a pelo menos dois agentes e a ampicilina apresentou a maior porcentagem de resistência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A cidade de São Luís - MA localiza-se na ilha de Upaon-Açu, no Atlântico Sul, entre as baías de São Marcos e São José de Ribamar (Figura 1), com população estimada de 1.073.893 habitantes, e 834,785 km² de extensão territorial, estando sob as seguintes coordenadas geográficas 2° 31' 48" S, 44° 18' 10" W (IBGE, 2015).

Figura 1: Localização geográfica da cidade de São Luís – MA

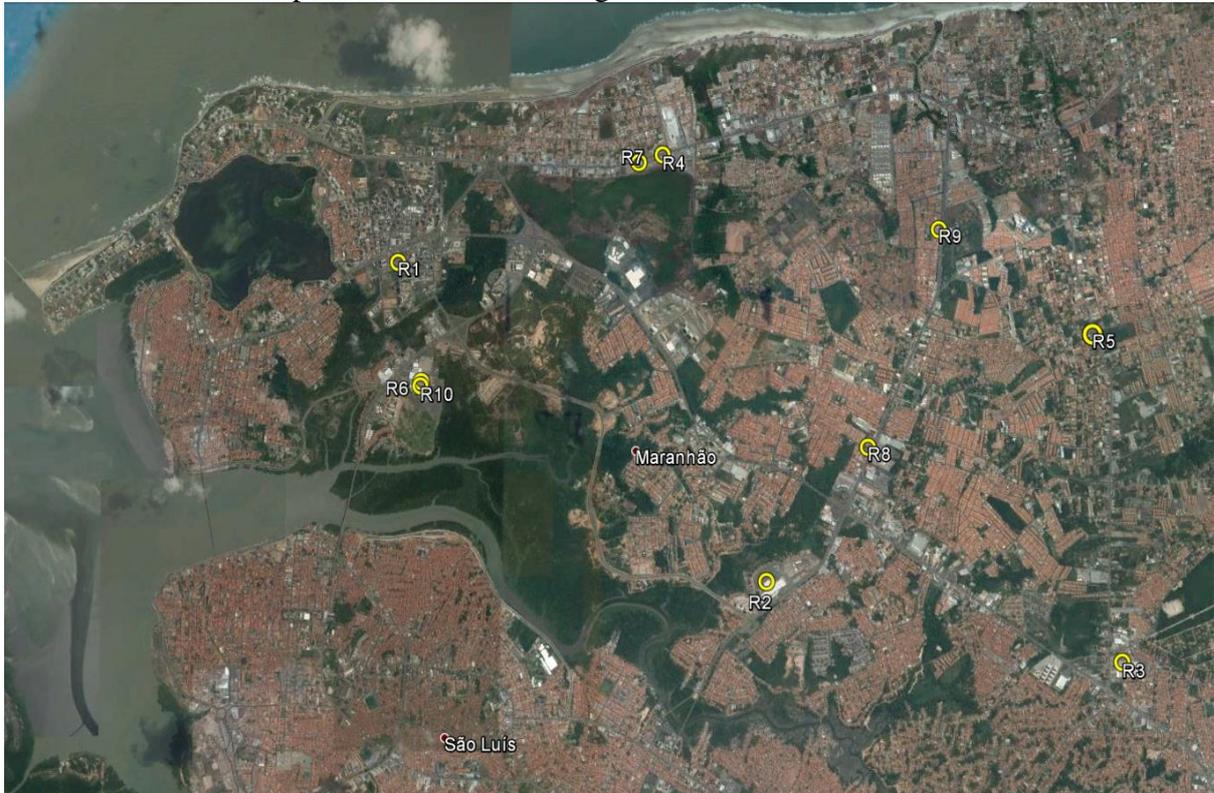


Fonte: NUGEO, UEMA, 2016.

4.2 Identificação dos restaurantes

Inicialmente foram identificados os restaurantes especializados na culinária japonesa na cidade de São Luís - MA com base em dados coletados com a vigilância sanitária e por meio de buscas na internet, e foram selecionados dez (Figura 2) para coleta das amostras e análises microbiológicas. Os critérios utilizados para a seleção dos restaurantes foram: comercializar somente comida japonesa e estar entre os mais frequentados dentro da cidade de São Luís.

Figura 2: Localização geográfica dos dez restaurantes selecionados para coleta de amostras de sashimi de Salmão para análise microbiológica



Fonte: NUGEO, UEMA, 2016.

4.3 Obtenção das amostras

Após a identificação dos dez restaurantes foram coletadas de cada local seis amostras, totalizando 60 amostras analisadas de sashimi de filés de salmão (Figura 3) manipulados de restaurantes da culinária japonesa. As coletas foram realizadas com intervalos semanais, no período de janeiro a julho de 2016 na cidade de São Luís.

As amostras foram acondicionadas nas embalagens próprias dos restaurantes e armazenadas em caixa isotérmica com gelo reciclável, sendo enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) onde foram analisadas.

Figura 3: Sashimi de Salmão (*Salmo salar*)



Fonte: Registro da pesquisa, 2016.

4.4 Análises Microbiológicas

4.4.1 Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo

As análises microbiológicas para a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo foram realizadas conforme a metodologia prescrita pela Instrução Normativa 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Foram pesadas 25 gramas de cada amostra de sashimi e inoculadas em 225 mL de água peptonada a 0,1% e obtiveram-se as diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), e a partir destas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas sobre a superfície de placas contendo Agar Baird-Parker (BP), adicionado de telurito de potássio e gema de ovo, distribuído em toda a placa com auxílio de alça de Drigalsky e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C durante 48 horas. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias que apresentaram características típicas do gênero como: cor negra brilhante, zona de precipitação

branca ao seu redor e circundada por um halo transparente, assim como a contagem das atípicas. As colônias típicas de *Stahylococcus aureus* foram transferidas para caldo o cérebro-coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida foram submetidas as provas complementares: prova de catalase, teste de coagulase e coloração de Gram. A prova de catalase consiste em transferir a colônia com a alça de níquel-cromo previamente flambada, para uma lâmina de vidro e em seguida adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%; a presença de borbulhamento imediato indica que a amostra é positiva. O teste de coagulase foi realizado utilizando-se plasma de coelho liofilizado, que consistiu em transferir 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho e incubar a 36°C por 6h, foi observando a formação de coágulo a cada 30 minutos. Para realizar a coloração de Gram primeiramente foram preparados os esfregaços em lâminas. Para isso utilizou-se uma gota de água destilada (colocada anteriormente sobre a lâmina com auxílio de uma alça de platina estéril) em seguida uma colônia do crescimento bacteriano, espalhando com movimentos circulares até formar uma fina camada sobre a lâmina. Em seguida as lâminas foram colocadas para secar ao ar. Após seca, a lâmina foi fixada passando o esfregaço voltado para cima, por 3 vezes através da chama no Bico de Bursen. Na coloração de Gram foram utilizadas as seguintes soluções: Cristal Violeta (corante principal) por 1 minuto, Lugol (solução de iodo-iodeto de potássio) por 1 minuto, Álcool Etílico (agente descorante e diferenciador) por ±20 segundos e Fucsina diluída (corante de contraste) por 30 segundos. Para a leitura, foi colocada uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observado no microscópio utilizando a objetiva de 100x.

4.4.2 Pesquisa de bactérias do gênero *Aeromonas*

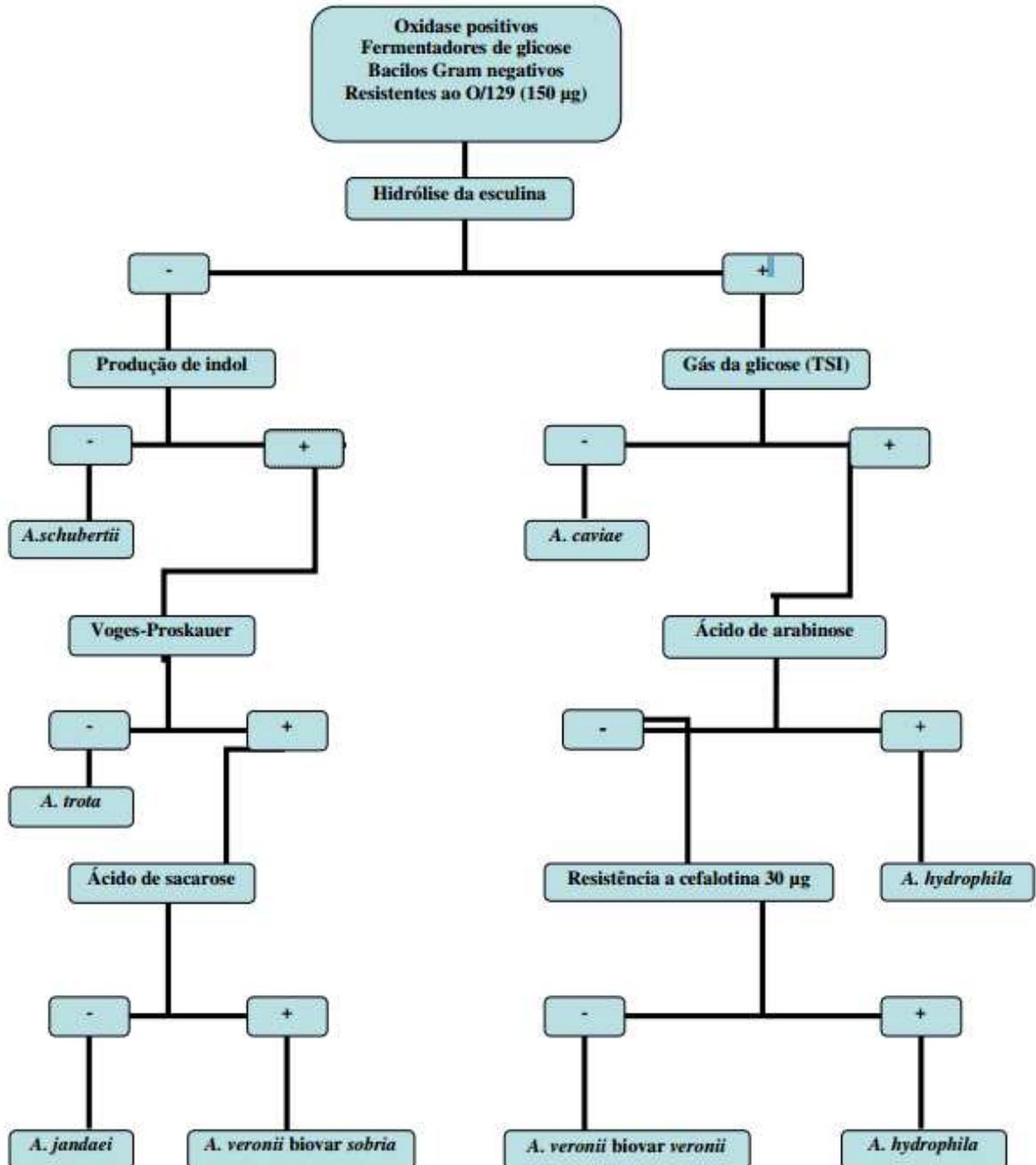
Foram pesadas 25 gramas de cada amostra de sashimi e inoculadas em 225 mL do Caldo Trypticase Soja (TSB) e incubadas a 28°C por 24 h. Após este período, foram semeadas alíquotas do crescimento bacteriano em placas contendo Ágar Vermelho de Fenol-amido-ampicilina (MAJEED et al. 1990; PALUMBO et al. 1991) e Ágar Dextrina-ampicilina, segundo HAVELAAR e VONK (1988), adicionadas com ampicilina (10mg/L) e incubadas a 28°C por 24 horas. Para isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero, foram selecionadas até três colônias típicas (cor amarela, rodeadas por um halo transparentes), para cada um dos meios que foram utilizados e semeados em Ágar Trypticase Soja (TSA) inclinado e incubados a 28°C por 24 h.

Após a incubação, foi realizada a coloração pelo método de Gram e selecionadas as

culturas que se apresentaram na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas. Estas foram repicadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (SAAD et al. 1995) e incubadas a 28°C por 24h sendo consideradas positivas as culturas que apresentaram reação ácida na base e bisel. As culturas positivas foram submetidas ao teste de catalase e oxidase.

Para a realização do teste de oxidase, foi transferida a cultura estocada em TSA, com auxílio de alça descartável e realizado o esfregaço na superfície das tiras de oxidase. Após, 2 minutos as tiras que apresentaram o aparecimento de cor violeta, caracterizaram o resultado positivo. À prova de catalase, consistiu na transferência da colônia com a alça de níquel-cromo previamente flambada, para uma lâmina de vidro, sobre a qual foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A reação positiva foi caracterizada pela observação do borbulhamento imediato, como resultado de liberação de oxigênio. As cepas positivas nesses testes foram consideradas como pertencentes ao gênero *Aeromonas*, e foram submetidas posteriormente às provas bioquímicas, segundo Aerokey II (CARNARHAN et al., 1991) composta de: hidrólise da esculina, produção de indol, produção de gás a partir de glicose, Voges Proskauer, produção de ácido a partir da arabinose e da sacarose e resistência à cefalotina (30µg), para a identificação das espécies (Figura 4).

Figura 4: Chave bioquímica para identificação das espécies de *Aeromonas* spp.



Fonte: CARNAHAN et al., 1991

4.4.3 Susceptibilidade in vitro dos micro-organismos isolados frente aos antimicrobianos

Para realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos foram selecionadas as cepas positivas e utilizado o método de difusão de discos com o ágar Müller Hinton (CLSI, 2013). Os discos de antibióticos utilizados seguiram a sugestão do FDA Clinical Indications para *Enterobacteriaceae*, grupo A (drogas de primeira escolha) e B (drogas de segunda escolha) (Quadro 1).

Tabela 1: Padrão de interpretação do teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Antimicrobianos	Símbolo	Concentração	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina ^A	AMP	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Gentamicina ^A	GEN	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Amicacina ^B	AMI	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilina Clavulanato ^B	AMC	30 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefuroxima ^B	CRX	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Cefepime ^B	COM	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoxitima ^B	CFO	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima ^B	CTX	30 µg	≤ 22	23-25	≥ 26
Ciprofloxacina ^B	LVX	5 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Piperaciclina ^B	PPT	110 µg	≤ 17	18-20	≥ 20
Sulfa Trimetoprim ^B	SUT	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16

^A Drogas de primeira escolha

^B Drogas de segunda escolha

Inóculos das cepas obtidas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de TSA inclinado e depois incubados a 28°C por 24 horas. Em seguida, uma alçada de bactéria foi diluída em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de Mac Farland (Foi utilizado um tubo aferido na escala 0,5 de Mac Farland como comparativo), após a diluição, foi embebido um swab estéril, na suspensão bacteriana e semeado de forma suave em todas as direções na placa, abrangendo toda a superfície. Com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, foram colocados os discos sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de 35°C, por 18-24 horas. Após esse período, os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados com régua e comparados com a tabela de Valores de halos inibitórios esperados para *Enterobacteriaceae* e classificados como resistentes, intermediários ou sensíveis.

4.4.4 Determinação do índice de múltipla resistência aos antimicrobianos

O índice de múltipla resistência antimicrobiana (MAR) foi utilizado para determinação da múltipla resistência. Este índice, quando aplicado a um isolado bacteriano, é definido como a/b , ou seja, o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente (a) dividido pelo número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (b). Índice MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

4.5 Análise estatística

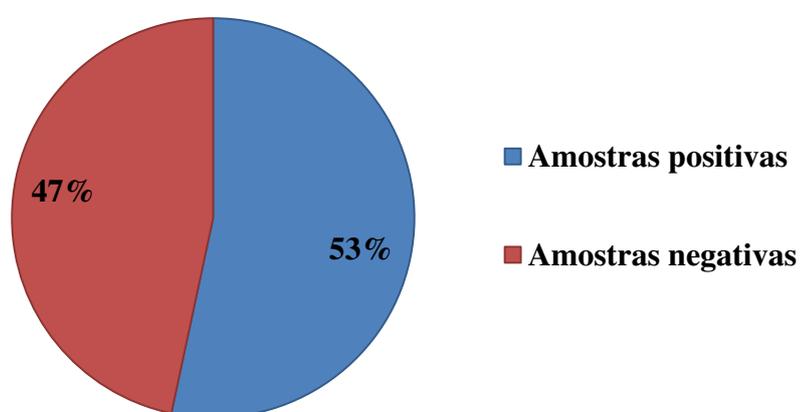
Os dados obtidos foram tabulados em programa Microsoft Office Excel 2010 e interpretados por meio de estatística descritiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pesquisa de *Staphylococcus* sp.

Foi verificado na presente pesquisa que 32 amostras (53%) foram positivas para *Staphylococcus* sp. (Figura 5), apresentando contagens entre $2,1 \times 10^2$ a 5×10^4 UFC/g (Tabela 1).

Figura 5: Percentual de amostras de sashimi positivas para *Staphylococcus* sp. coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016



Com relação aos intervalos de variação de *Staphylococcus* sp. pode-se verificar que as amostras com maior percentual de contaminação estão entre $1,7 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/g, representando 5%, em seguida as amostras com intervalo entre $1,1 \times 10^3$ a $6,9 \times 10^3$ UFC/g, representando 36%, após, as amostras com intervalo entre $2,1 \times 10^2$ a $7,5 \times 10^2$ UFC/g, representando 12% e as amostras com valores <20 , foram consideradas negativas, representando 47% (Tabela 1).

Tabela 2: Contagem de *Staphylococcus* sp. (UFC/g) em amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016

Locais de coleta	1º coleta	2º coleta	3º coleta	4º coleta	5º coleta	6º coleta
A	$1,7 \times 10^4$	<20	$2,1 \times 10^3$	<20	<20	<20
B	$1,9 \times 10^4$	<20	$2,4 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	<20
C	8×10^3	<20	$1,2 \times 10^3$	5×10^4	<20	<20
D	8×10^3	<20	$4,6 \times 10^3$	<20	$4,2 \times 10^2$	<20
E	$3,2 \times 10^3$	<20	<20	$6,3 \times 10^2$	<20	$2,1 \times 10^2$
F	$3,1 \times 10^3$	<20	$1,1 \times 10^3$	6×10^3	$7,3 \times 10^3$	<20
G	6×10^3	<20	$6,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	<20
H	$1,4 \times 10^3$	<20	$6,1 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	<20	<20
I	$1,8 \times 10^3$	<20	$1,8 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$	<20	<20
J	5×10^3	<20	<20	$5,9 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	<20
Média	$7,2 \times 10^3$	<20	$2,2 \times 10^3$	$8,6 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$

UFC/g: Unidade Formadora de Colônia

Analisando a tabela 1, pode-se verificar que os restaurantes que apresentaram maior contaminação foram o C com valores de $1,2 \times 10^3$ a 5×10^4 UFC/g, seguido do B com valores de $2,4 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^4$ UFC/g e o F com valores de $1,1 \times 10^3$ a $7,3 \times 10^3$ UFC/g. Um fato é importante a ser destacado é que os restaurantes C e F pertencem a mesma franquia, diferindo apenas na localização dentro da cidade de São Luís, sugerindo falhas nas boas práticas de manipulação nesses estabelecimentos. Os restaurantes com menor contaminação foram o H, com valores de $2,9 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^3$ UFC/g, seguido do E com valores de $2,1 \times 10^2$ a $3,2 \times 10^3$ UFC/g e o I com valores de $7,5 \times 10^2$ a $1,8 \times 10^3$ UFC/g.

Na presente pesquisa sugere-se que a presença de *Staphylococcus* sp. nas amostras analisadas é resultado da intensa manipulação que esse alimento é submetido, pois durante o preparo do sushi e sashimi o peixe juntamente com vegetais, algas e arroz são preparados e moldados com a mão. As bactérias do gênero *Staphylococcus* são encontradas em seres humanos em locais como pele e mucosas, sendo o manipulador uma importante fonte de contaminação, principalmente quando não se utilizam equipamentos de proteção individual (EPI) ou quando há falhas na higiene pessoal.

O manipulador é um importante agente na transmissão de micro-organismos a qualquer tipo de alimento, entretanto isso pode ser evitado por meio de higiene pessoal e manipulação adequada. A saúde e higiene deste profissional é fundamental para garantia de um alimento seguro (OPS, 2005; FREITAS et al., 2009).

A higiene pessoal e a manipulação adequada devem ser prioridade para quem trabalha com alimentos (GERMANO 2015), especialmente para alimentos consumidos crus, onde o risco é maior, pois não passam pelo processo de cocção que minimiza ou elimina a contaminação e podem assegurar a qualidade sanitária dos alimentos, dessa forma, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) precisam ser corretamente adotadas (HUSS et al., 2000; HAMADA-SATO et al., 2005).

De acordo com o trabalho realizado por Durek (2005), as BPF compreendem procedimentos, processos, controles e precauções que garantem a segurança no processamento de alimentos, resultando em um produto seguro, sob o ponto de vista da saúde do consumidor, além disso, também facilitam a produção de alimentos de qualidade uniforme, tendo como objetivo principal a manutenção da segurança do produto. Atualmente atribui que 90% da garantia na obtenção de produtos saudáveis e economicamente viáveis estão na aplicação de BPF na indústria de alimentos. No Brasil, as BPF são normalizadas através do Regulamento Técnico sobre as Condições Higienicossanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de alimentos, regido pela portaria nº 368 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997).

A qualidade do pescado depende do trinômio: tempo, higiene e temperatura. O tempo diz respeito à rapidez com que ocorrem as reações autolíticas e/ou microbianas, que estão ligadas com o grau de higiene do barco, estrutura de processamento e dos manipuladores do pescado, além disso, às baixas temperaturas que, se corretamente aplicadas, impedirão ou retardarão as reações que provocam a degradação (VIEIRA; SAMPAIO, 2004).

Nota-se que a conservação do pescado é outro ponto importante para o crescimento de *Staphylococcus* sp., pois o aquecimento ou refrigeração com temperatura inadequada, favorece a multiplicação desse micro-organismo, que pode produzir toxinas e provocar sintomas de toxinfecções alimentares nos seus consumidores. Nespolo (2009) verificou uma maior contagem de *Staphylococcus* sp. em amostras de salmão (*Salmo salar*) refrigeradas, que naquelas submetidas ao congelamento, demonstrando que este é o melhor método de conservação do pescado.

Além do manipulador, várias outras fontes podem contaminar o pescado com bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. como por exemplo, equipamentos e utensílios (bandejas, facas e tábuas) que por higienização inadequada podem veicular esse micro-organismo ao sashimi. Pode ocorrer ainda contaminação cruzada, onde a superfície e os utensílios utilizados são os mesmos para diferentes tipos de alimentos.

Ré et al. (2013) ao verificar a incidência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos em uma creche no município de Guarapuava-PR pode concluir que uma toalha comum, utilizada pelos manipuladores para a secagem das mãos esteve atuando especificamente na veiculação de *Staphylococcus* spp., além disso outros veículos no interior do estabelecimento (pias, torneiras, etc.) estavam atuando na disseminação das outras espécies microbianas.

De acordo com Santos (2000), a transmissão de *Staphylococcus* sp. pode ocorrer diretamente, através do contato, ou indiretamente, através de aerossóis, secreções, poeira, fômites, objetos e alimentos contaminados, cuja transferência envolve um intermediário, no qual o micro-organismo permanece até ser transferido ao hospedeiro.

Populações elevadas de *Staphylococcus* sp. com variação de $1,7 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/g, $1,1 \times 10^3$ a $6,9 \times 10^3$ UFC/g e $21, \times 10^2$ a $7,5 \times 10^2$ foram observadas revelando a importância de se manter a temperatura adequada de refrigeração do peixe durante a estocagem e exposição para a venda, com objetivo de evitar a multiplicação. Além disso, hábitos de higiene pessoal durante a comercialização, tais como lavagem das mãos, uso de máscaras e ausência de objetos de adorno são medidas que também podem contribuir para a obtenção de produtos de melhor qualidade microbiológica (NESPOLO, 2009).

5.2 Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo

Na presente pesquisa não foi isolado *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras coletadas, embora o parâmetro estabelecido pela legislação vigente seja 5×10^3 UFC/g (BRASIL, 2001).

Embora, a microbiologia de alimentos atribua uma grande importância para *Staphylococcus aureus* pela produção de enterotoxinas, coagulase e termonuclease (TNase), algumas espécies de *Staphylococcus* que não produzem nenhuma dessas enzimas também podem produzir enterotoxinas (JAY, 2005).

Trabalhos realizados por Cunha et al. (2006), demonstram que o grupo de bactérias *Staphylococcus* coagulase negativo, quando presentes em alimentos, não deve ser ignorado, pois a sua capacidade toxigênica já foi verificada em técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Resultado semelhante ao do presente trabalho foi encontrado por Valandro (2010) que ao analisar amostras de sashimi à base de Salmão preparadas em restaurantes especializados

em Culinária Japonesa na cidade Porto Alegre - RS confirmou que nenhuma amostra apresentou contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo.

Já Montanari et al. (2015) verificaram que as amostras como presença de *Staphylococcus* coagulase positivo isoladas de sashimi de salmão preparadas e comercializadas em restaurante japonês no município de JI-Paraná – RO encontravam-se dentro do limite estabelecido pela legislação vigente.

Silva (2007) avaliou a condição sanitária de peixes em feiras livres na cidade de São Paulo e verificou que duas (10%) amostras foram positivas para *Staphylococcus* coagulase positivo, com valores de 2×10^2 e 4×10^2 UFC/g, estando assim, dentro do padrões estabelecidos pela ANVISA.

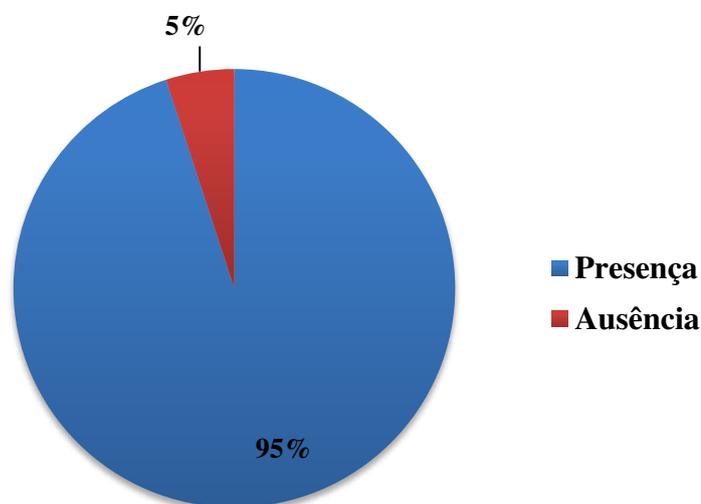
Santos (2012) isolou *Staphylococcus* sp. em 20 amostras de sushi comercializados em restaurantes na cidade de Aracaju e verificou que 16 foram coagulase positivo, porém somente quatro apresentaram níveis acima de 10^3 UFC/g. Esse autor destaca que a manipulação inadequada é a principal forma de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo.

Nespolo (2009) avaliando as características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do estado de São Paulo observou padrões aceitáveis de *Staphylococcus* coagulase positivo, de acordo com a legislação, entretanto, reforça a necessidade da criação de uma legislação específica para pescado cru com padrões abaixo de 10^2 UFC/g, visto que os parâmetros estabelecidos para pratos prontos a base de pescado cru são elevados e podem colocar em risco à saúde do consumidor, embora a população capaz de provocar intoxicação seja de aproximadamente 10^6 UFC/g (RODRIGUES et al., 2004).

5.3 Pesquisa de bactérias do gênero *Aeromonas*

Do total de 60 amostras de sashimi analisadas, a presença de *Aeromonas* spp. foi detectada em 57 (95%) das amostras (Figura 6). A caracterização bioquímica permitiu a identificação de 66 cepas, distribuídas de acordo com a seguinte frequência: *Aeromonas hydrophila* 60 (91%) e *Aeromonas caviae* 6 (9%). O valor encontrado está diretamente relacionado ao fato do ambiente aquático ser a principal fonte de *Aeromonas* spp., sendo os pescados muito susceptíveis a essa contaminação.

Figura 6: Percentual de amostras de sashimi contaminadas por *Aeromonas* spp. coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016



As bactérias do gênero *Aeromonas* não estão associadas a condições sanitárias inadequadas, elas são comuns em diversos locais, incluindo solo e água e são patogênicas em animais de sangue frio, como os peixes. Aparecem ainda em água doce, rios, valas e lagos de água, esgoto bruto, esgoto tratado, lama e água potável tratada com cloro. São isoladas com frequência de águas estuarinas e de praias, mas não é comum em mar profundo, apesar desses micro-organismos aparecem em água de salinidade muito elevada (DEODHAR, 1991; CANTAS et al., 2012).

Vale ressaltar que algumas espécies de *Aeromonas* spp. toleram as concentrações de cloro utilizadas em água destinadas ao consumo humano, dessa forma, a contaminação do sashimi por *Aeromonas* spp. pode ter ocorrido durante o seu processamento, em contato com água contaminada conforme destaca Ghenghesh (2008). Porém, como esse parâmetro não foi avaliado na presente pesquisa, não se pode confirmar essa informação.

No que se refere aos locais de coleta foi possível observar que as espécies de *Aeromonas* estavam no momento do estudo amplamente distribuídas, tendo sido isoladas nos dez pontos de coleta. *A. hydrophila* foi a espécie isolada com maior frequência nas amostras de sashimi analisadas. Estes resultados sugerem que o habitat desse peixe representa um importante reservatório natural de micro-organismos dessa espécie. *A. caviae* foi isolada somente em quatro pontos de coleta, sendo que no restaurante E, foi possível o isolamento de três cepas dessa espécie (Tabela 2).

Tabela 3: Espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de amostras de sashimi, obtidas em restaurantes na cidade de São Luís, 2016

Espécies	Restaurantes										Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
<i>A. hydrophila</i>	5	7	6	6	5	7	6	7	5	6	60
<i>A. caviae</i>	0	0	1	0	3	1	0	0	1	0	6
Total	5	7	7	6	8	8	6	7	6	6	66

Segundo trabalho realizado por Peixoto et al. (2012) *A. hydrophila* está entre as cinco espécies de relevância clínica por serem agentes patogênicos tanto para peixes como para os seres humanos, devido à sua capacidade de produzir exotoxinas em temperaturas de refrigeração. Para Abdullah et al. (2003) esse micro-organismo em seres humanos pode causar gastroenterites transmitidas pelo contato e consumo de carne e água contaminadas, além de infecções de pele, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

A. caviae é a espécie de *Aeromonas* mais isolada em fezes diarréicas de crianças, e embora de alta prevalência, os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade dessa espécie não se encontram totalmente estabelecidos (NAMDARI; BOTTONNE, 1990).

A. hydrophila já foi isolada no homem em casos de gastroenterites, infecções do trato urinário, osteomielite, septicemia, meningite e infecções de feridas comuns. As espécies *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. caviae* são mais habitualmente insinuadas em infecções humanas intestinais. *Aeromonas* spp. tem a capacidade de provocar diarreia devido à presença de toxina enterotoxigênica. Diversos documentos relatam espécies de *Aeromonas* como causa de gastroenterites em crianças e adultos e cada vez mais se isolam de pacientes com diarreia do viajante (VILA et al., 2003; SORUM, 2006; BARCELLOS, 2008; GHENGHESH, 2008; CANTAS, 2012).

Considerando que tais micro-organismos são capazes de produzir inúmeros produtos, mesmo em condição de refrigeração, os resultados obtidos na presente pesquisa alertam para a possibilidade de ocorrência de gastroenterite em consumidores desse alimento, bem como infecção cutânea em pescadores e manipuladores de alimentos. Clark e Chenoweth (2003) e Guerra et al. (2007) relatam que os riscos são maiores para pacientes pediátricos, geriátricos e portadores de doenças imunossupressoras, pois as *Aeromonas* spp. são especialmente patogênicas.

Vários estudos realizados no Brasil já evidenciaram que o peixe pode ser um importante veículo de transmissão de *Aeromonas*, evidenciando a importância desse micro-

organismo para a saúde pública, tendo em vista seu elevado potencial patogênico para o ser humano. Martins (2006) isolou *Aeromonas* spp. em 75% das amostras de sushi e sashimi preparados a base de pescado cru (salmão, atum, robalo e peixe prego) servidos em bufês na cidade de São Paulo. Silva (2007) ao analisar a qualidade sanitária de peixes na cidade de São Paulo verificou que *Aeromonas* spp., incluindo *A. hydrophila* foi isolada em 50% das amostras. Costa (2016) observou que 13% das amostras de Atum (*Thunnus* spp.) fresco comercializado no município de São Paulo foram positivas para *Aeromonas* spp., sendo 10 (90,9%) confirmadas como *A. hydrophila* pela PCR.

5.4 Perfil de resistência aos antimicrobianos

Verificou-se que 64 isolados de *Aeromonas* spp. foram resistentes a ampicilina, 63 à cefuroxima, 54 à amoxicilina-clavulanato, 50 à cefoxitina, 40 à cefotaxima, 31 à sulfatrimetoprim, 26 à piperaciclina, 23 ao ciprofloxacina, 22 à gentamicina e amicacina e 13 ao cefepime. Em relação ao perfil de resistência podemos observar que de um modo geral, os isolados de *Aeromonas* spp., oriundos das amostras de sashimi avaliadas apresentaram elevados percentuais de resistência aos onze antimicrobianos testados, favorecendo a manutenção de bactérias resistentes no ambiente aquático (Tabela 3).

A utilização irracional ou excessiva de antimicrobianos na aquicultura dá condições para o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos, e gera um efeito direto sobre o seu valor terapêutico futuro (SMITH, 2008). Segundo Pablo (2009) nos ambientes de aquicultura está crescente a incidência de resistência antimicrobiana de *Aeromonas* spp., dessa forma, o uso de antibióticos deve, sempre ser acompanhado dos dados de susceptibilidade da bactéria alvo (SMITH, 2008).

Tabela 4: Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas caviae* isoladas de amostras de sashimi em dez restaurantes na cidade de São Luís - MA, 2016

Antimicrobianos	Número de cepas			
	Resistente	Intermediário	Sensível	Total
Ampicilina	64 (97%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	66
Gentamicina	22 (33%)	8 (12%)	36 (55%)	66
Amicacina	22 (33%)	13 (20%)	31 (47%)	66
Amoxicilina Clavulanato	54 (82%)	5 (7%)	7 (11%)	66
Cefuroxima	63 (95%)	3 (5%)	0	66
Cefepime	13 (20%)	5 (7%)	48 (73%)	66
Cefoxitina	50 (76%)	11 (17%)	5 (7%)	66
Cefotaxima	40 (61%)	12 (18%)	14 (21%)	66
Ciprofloxacina	23 (35%)	9 (14%)	34 (51%)	66
Piperaciclina	26 (39%)	8 (12%)	32 (49%)	66
Sulfa Trimetoprim	31 (47%)	6 (9%)	29 (44%)	66

As cepas de *Aeromonas* spp. isoladas apresentaram elevada frequência de resistência para Ampicilina, estando de acordo com o estudo realizado por Silva (2010) que observou que todas as amostras de *Aeromonas* spp. isoladas da água dos viveiros e dos peixes, oriundos de pisciculturas da Região da Baixada Ocidental Maranhense foram resistentes a esse antibiótico. A resistência de *Aeromonas* spp. à ampicilina é esperada na grande maioria das espécies, sendo esse antimicrobiano utilizado nos meios de cultura seletivos para este micro-organismo (GHENGHESH et al., 2008).

Foi observada elevada resistência a cefuroxima (95%), amoxicilina-clavulanato (82%) e cefoxitina (76%). Silva (2010) constatou que 78,6% dos isolados de *Aeromonas* spp. foram resistentes a cefuroxima. Suhel (2011) verificou que 100% das amostras de *Aeromonas* spp. isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo no Espírito Santo foram resistentes a amoxicilina, percentual semelhante, de 82% foi encontrado no presente estudo. A resistência de *Aeromonas* spp. a cefoxitina também foi confirmada por Cereser (2003), com percentual de 75%, valor bem próximo do presente trabalho. Miranda e Zemelman (2002) observaram que as bactérias isoladas de salmão provenientes de fazendas no Chile apresentaram uma elevada incidência de resistência aos β -lactâmicos (ampicilina e amoxicilina).

Aeromonas spp. são produtoras naturais de β - lactamase ou induzem a atividade dessa enzima, dessa forma a resistência a amoxicilina + clavulonato, já era esperada, pois existe uma grande prevalência de genes de β - lactamases nas bactérias do gênero *Aeromonas*, algumas das quais resistentes à inibição do ácido clavulônico (IACONIS e SANDERS, 1990; SEGATORE et al., 1993; JACOBS e CHENIA, 2007).

Cefepime (20%), Gentamicina (33%), Amicacina (33%) e Ciprofloxacina (35%) foram os antibióticos com menor resistência às cepas de *Aeromonas* spp. isoladas, portanto em casos de infecções causadas por essa bactéria, essas drogas seriam os produtos de eleição. Esses dados são importantes para indicar um antibiótico eficiente para tratamento de pacientes acometidos por infecções causada por bactérias do gênero *Aeromonas*.

Cereser (2003) encontrou resultados semelhantes ao do presente trabalho, onde Gentamicina, cefepime e Ciprofloxacina apresentaram os menores níveis de resistência (42,5%, 45% e 47,5%, respectivamente) de *Aeromonas* spp. isolada de queijo minas frescal industrial e artesanal no Rio Grande do Sul. Akinbowale et al. (2007) verificou uma baixa resistência de *Aeromonas* spp. a Ciprofloxacina quando analisou amostras de truta em pisciculturas. Miranda e Castillo (1998) também observaram baixa resistência de *Aeromonas* spp., isoladas de sistemas de água doce no Chile a gentamicina e amicacina, concordando com os dados encontrados nesta pesquisa.

Estudos de bactérias resistentes aos antibióticos isoladas de peixes comercializados no Chile e residentes de águas próximas a esgotos urbanos mostram uma alta proporção de resistência à ampicilina, estreptomicina e tetraciclina, e uma baixa frequência de resistência a gentamicina e amicacina (MIRANDA E ZEMELMAN, 2001).

Destaca-se que o uso que o uso excessivo de antimicrobianos na aquicultura do salmão tem efeito não só no local de criação, mas também a uma certa distância de onde essas atividades ocorrem como resultado de transporte por correntes de água. Buschmann et al. (2012) verificou que resíduos de flumequina, uma quinolona com potencial de resistência cruzada com ácido oxolínico, estava presente em sedimentos nas duas propriedades de seu estudo em locais diferentes e distantes, o autor relata que muito provavelmente esses resíduos tenham sido transportados pelas correntes marinhas das muitas outras áreas de aquicultura da região que utilizam este antimicrobiano.

Miranda e Zemelman (2002) em seu estudo com bactérias isoladas de salmão provenientes de fazendas no Chile reforçou a hipótese de que bactérias resistentes também estão presentes em ambientes de criação de salmão em períodos em que nenhuma terapia antibacteriana é administrada.

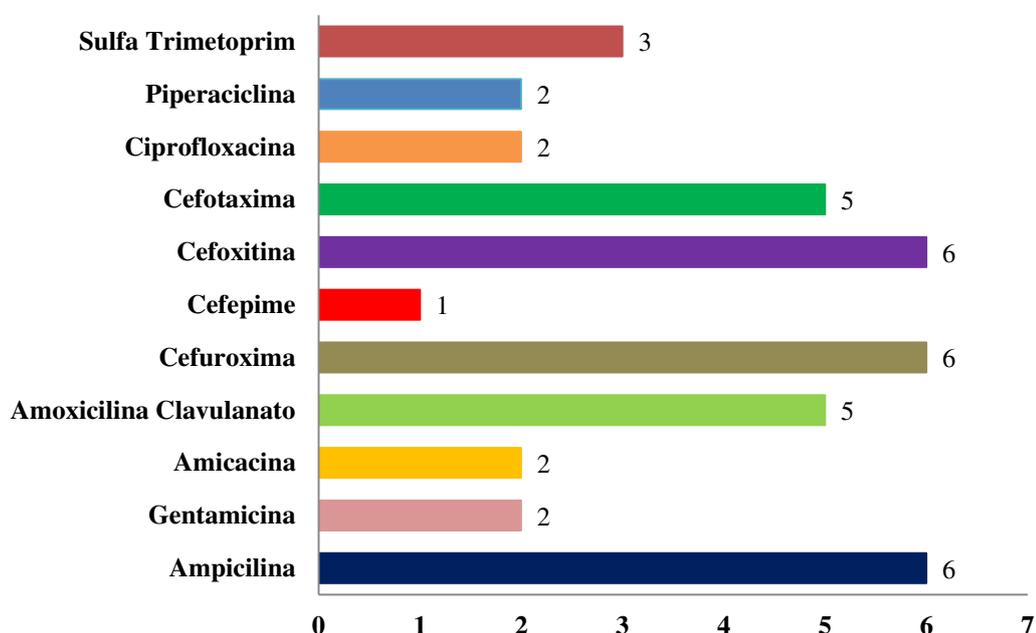
Uma limitação importante desta pesquisa é a falta de informação relativa à utilização e frequência de aplicação de antimicrobianos, visto que as amostras foram coletadas diretamente dos restaurantes e a informação que se tem, é que a origem desse peixe na maioria dos locais é do Chile, porém foi observado um elevado percentual de resistência de *Aeromonas* spp. a vários antimicrobianos, sugerindo que é feita a utilização de antibióticos ou

estes chegam por meio da água de outras propriedades que fazem uso e acabam provocando resistência as bactérias presentes no meio, especialmente as do gênero *Aeromonas* spp, conforme verificado na presente pesquisa.

Ao analisar a resistência aos antimicrobianos de acordo com as espécies isoladas podemos observar que tanto *Aeromonas caviae* como *Aeromonas hydrophila* apresentaram elevados números de cepas resistentes.

Verificou-se que todas (6/6) as cepas de *A. caviae* testadas foram resistentes á ampicilina, cefuroxima e cefoxitina (Figura 7).

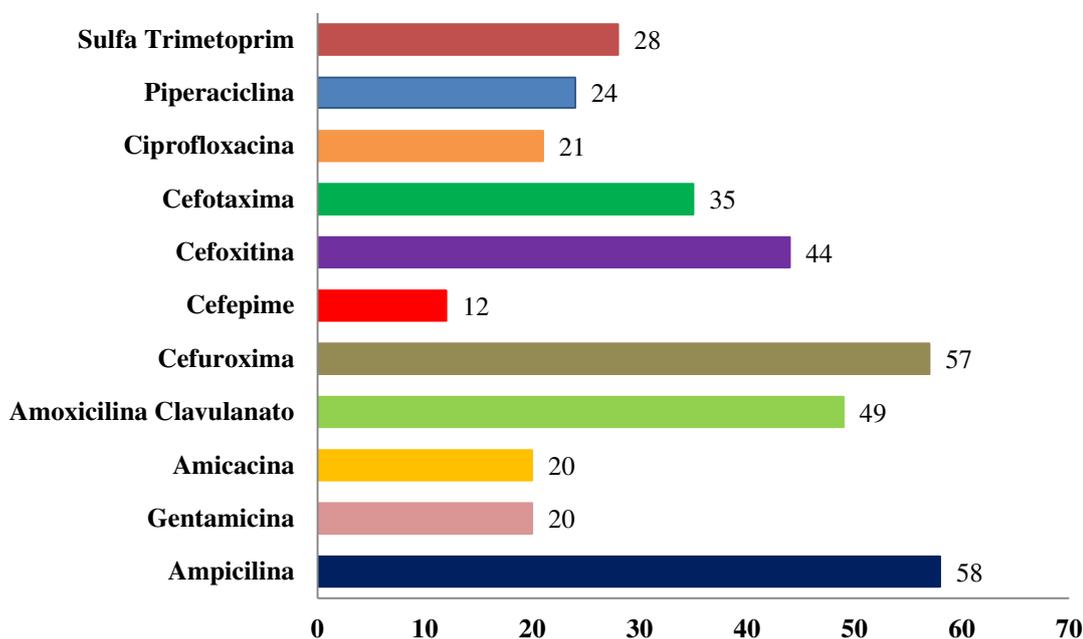
Figura 7: Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Aeromonas caviae* isoladas de amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes da cidade de São Luís - MA, 2016



Evangelista-Barreto et al. (2010) constatou em seu estudo que as *A. caviae* isoladas do Rio Cocó no Ceará/Brasil apresentaram maior índice de múltipla resistência, sendo resistente a quatro antibióticos. Os antibióticos com menor resistência a *A. caviae* foram cefepime, piperaciclina, ciprofloxacina, amicacina e gentamicina.

A Figura 8 apresenta o número de cepas de *A. hydrophila* resistentes aos antimicrobianos testados. Assim como observado na espécie *A. caviae*, os antibióticos com maior resistência a *A. hydrophila* foram ampicilina, cefuroxima e amoxicilina-clavulanato. E os de menor resistência cefepime, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina e piperaciclina.

Figura 8: Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas de amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes da cidade de São Luís - MA, 2016



Hirsch (2005) verificou que todas as cepas de *A. hydrophila* isoladas de peixes e ambientes aquáticos em Minas Gerais foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano dentre os nove testados.

Dessa forma, de modo geral, não foram observadas diferenças evidentes nos padrões de resistência aos antimicrobianos entre isolados de *A. caviae* e *A. hydrophila*.

Bactérias resistentes podem ser transmitidas e chegar a novos lugares através do movimento de pessoas, ou serem disseminadas aos seres humanos por meio de feridas, pela exposição obtida após a manipulação do peixe, pelo contato com animais e através da alimentação (AARESTRUP, 2006; CABELLO, 2006; JACOBS, 2007; BURRIDGE, 2010).

Dessa forma, o uso de antimicrobianos em animais tem consequências para a saúde pública, sendo um tema de preocupação mundial (GUARDABASSI, 2010), pois o aparecimento da resistência limita severamente as opções em medicina humana, devendo sua utilização ser evitada ou controlada a fim de prevenir a disseminação de resistência a antimicrobianos (HEUER, 2009; REGITANO, 2010).

O ambiente aquático possuiu grande diversidade de espécies bacterianas, dessa forma, ao estudar a resistência a antimicrobianos podemos avaliar o papel das bactérias na manutenção e na transferência de genes de resistência a outras bactérias, inclusive patogênicas, com a intenção de compreender a transmissão de micro-organismos resistentes no ambiente de cultivo do pescado (MIRANDA e ZEMELMAN, 2001).

Com o objetivo de diminuir o risco do uso de antimicrobianos em animais sobre a saúde pública e animal, várias organizações e associações profissionais internacionais, nos últimos anos, têm se preocupado com a utilização correta e lógica de antimicrobianos em animais, não só para guardar a eficácia dos antibióticos em medicina veterinária, mas sim para evitar o desenvolvimento e a transmissão de fenótipos resistentes indesejáveis em patógenos zoonóticos, bem como a disseminação entre animais e humanos (GUARDABASSI, 2010)

Entretanto, os piscicultores ainda utilizam de forma irracional e agressiva os quimioterápicos para debelar infecções bacterianas e infestações de ectoparasitas, bem como desinfetantes para evitar a propagação de doenças (CABELLO, 2006).

Dessa forma, o uso de antimicrobianos na aquicultura do salmão no Chile precisa ser controlado e reduzido, porque este aumento tem o potencial de gerar problemas de segurança alimentar e saúde pública (SAMUELSEN et al., 1992; SORUM, 2006; FORTT et al., 2007; BUSCHMANN et al., 2009; MILLANAO et al., 2011).

5.5 Índice de Múltipla Resistência a Antibióticos

No presente estudo observou-se que os resultados obtidos com base no índice MAR demonstraram que houve variação entre 0,18 até 1,0 nos isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de sashimi, e o perfil de multirresistência dos isolados de *Aeromonas* spp. foi observado em 94%, demonstrando alto índice de multirresistência, ou seja, resistência a 2 ou mais drogas das onze testadas (Tabela 4).

Miranda e Zemelman (2002) observaram ocorrência de resistência simultânea a vários antibacterianos e uma alta frequência de bactérias resistentes a 6-10 antibacterianos, e os valores do índice MAR, variando 0,38 - 0,48, sugerindo que fazendas de salmão do Chile podem desempenhar um papel como reservatórios de bactérias multirresistentes, levando, assim, a necessidade de uma atitude mais restritiva quanto ao uso intensivo de antibacterianos na criação de salmão.

Tabela 5: Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) encontrados nos 66 isolados de *A. hydrophila* e *A. caviae* em amostras de sashimi coletadas em dez restaurantes na cidade de São Luís – MA, 2016

Numero de antimicrobianos	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	Índice MAR	Total	%
2	4	-	0,18	4	6
3	3	-	0,27	3	4
4	9	1	0,36	10	15
5	9	-	0,45	9	14
6	15	2	0,45	17	26
7	8	1	0,63	9	14
8	4	1	0,72	5	7
9	1	1	0,81	2	3
10	0	0	0	0	0
11	7	-	1,00	7	11
Total	60	6	-	66	100

Quando analisamos os resultados do índice MAR para a espécie *A. caviae* podemos observar que todos os isolados foram resistentes a 4 ou mais antimicrobianos ou seja, todas com característica de multirresistência. Quanto aos isolados de *A. hydrophila*, somente 4 (6%) apresentaram resistência a 2 antimicrobianos (índice MAR 0,18) sendo que todos os outros isolados dessa espécie apresentaram-se resistentes a 2 ou mais drogas e 7 (11%) foram resistentes aos onze antimicrobianos testados (índice MAR igual a 1,00).

Hirsch et al. (2005) trabalhando com a identificação e resistência de *Aeromonas* spp. em ambientes aquáticos, relataram que diversas espécies isoladas deste gênero foram resistentes a vários antimicrobianos testados, com índice MAR acima de 0,2 em 43% dos isolados.

A múltipla resistência a antibióticos é elevada em ambiente onde há uso frequente dessas drogas, sendo que índices superiores a 0,2 ocorrem geralmente com antimicrobianos que são utilizados constantemente sendo considerados de alto risco, já valores menores ou igual a 0,2 são de antimicrobianos que são ocasionalmente utilizados (KRUMPERMAN, 1983; VIVEKANANDHAN et al., 2002; ADELEKE e OMAFUVBE, 2011).

Estudo realizado por Pablo (2009) verificou que fatores de virulência, como citotoxinas geneticamente semelhantes à shiga-toxina de *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC), foram encontrados em plasmídeos de *Aeromonas* spp., comprovando que essa bactéria pode transmitir genes de resistência a antibióticos a outros agentes patogênicos.

A presença desses isolados multirresistentes, sugere que pode haver uma transmissão de genes de resistência de *Aeromonas* spp. a outros micro-organismos que fazem parte da microbiota intestinal dos seres humanos, dessa forma, caso o consumidor apresente uma infecção intra ou extra-intestinal após o consumo do pescado contaminado, pode limitar as opções de tratamento uma vez que se trata de antibióticos administrados com frequência.

O aumento da resistência a vários agentes antimicrobianos tem sido uma preocupação para a comunidade científica, pois influenciam de forma negativa nas populações de outros organismos, alterando o equilíbrio ecológico. Assim, a busca por alternativas que adotem medidas de manejo adequado são essenciais para minimizar possíveis riscos ao ambiente e a saúde pública sem comprometer a produção na aquicultura (CABELLO et al. 2006).

6 CONCLUSÕES

- As espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* spp., identificadas, *A. hydrophila* e *A. caviae*, apresentam risco de causar gastroenterites e infecções extraintestinais nos consumidores de sashimi;
- As amostras de sashimi analisadas não apresentam riscos de veicular intoxicação alimentar por *Staphylococcus* coagulase positivo;
- Os antibióticos que apresentaram maior sensibilidade às cepas de *Aeromonas* spp. isoladas foram cefepime, gentamicina, amicacina e ciprofloxacina, sendo portando as drogas de escolha para tratamento de infecção causadas por *Aeromonas*;
- As cepas isoladas de bactérias do gênero *Aeromonas* apresentaram característica de multirresistência, ou seja, resistência a 2 ou mais drogas das onze testadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se que o sashimi é um alimento que vem sendo cada vez mais consumido na cidade de São Luís, e isso é evidenciado pelo crescente número de restaurantes especializados nessa culinária, deve-se ter especial atenção no processamento e na obtenção do mesmo para evitar e/ou diminuir o risco de infecções causadas por *Aeromonas* spp. Deve ser feita uma rastreabilidade do sashimi desde a origem até o local de comercialização para identificar as possíveis fontes de contaminação do produto por *Aeromonas* spp. A presença de bactérias *Staphylococcus* coagulase negativo nas amostras de sashimi analisadas não deve ser ignorada e indica falhas durante a manipulação e armazenamento do salmão, dessa forma é necessária adoção de boas práticas de fabricação e controle adequado de temperatura durante a manipulação e armazenamento do salmão. O alto índice de resistência dos isolados de *Aeromonas* spp. frente aos antimicrobianos demonstra que é feita a utilização excessiva dessas drogas e isso pode limitar as opções de tratamento para uso em humanos, em caso de infecções provocadas por *Aeromonas* spp. Se recomenda uma maior atenção por parte das autoridades sanitárias para com estabelecimentos que comercializem pratos à base de peixe cru. O público também deve ser esclarecido sobre os riscos aos quais está sendo submetido ao consumir esse tipo de alimento servido sem tratamento térmico. Os dados encontrados no presente trabalho podem contribuir para subsidiar pesquisas futuras em saúde pública.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. **The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance.** In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C., p. 339–359, 2006.
- ADELEKE, E. O.; OMAFUVBE, B. O. Antibiotic resistance of aerobic mesophilic bacteria isolated from poultry faeces. **Research Journal of Microbiology**, v.6, n.4, p.356-365, 2011.
- AGUILERA-ARREOLA, M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. H.; CASTRO-ESCARPULLI, G. Molecular and phenotypic characterization of *A. hydrophila*-like HG3 isolated of an infant with diarrhea in Mexico. **Bioquímica**, v.34, n.4, p.183-189, 2009.
- AKINBOWALE, O. L. et al. Antibiotic resistance in motile *aeromonads* and *pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, n. 30, p. 177-182, 2007.
- ALBUQUERQUE, W. F. et al. Multi-resistência a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de uma feira de pescado e de seus manipuladores. **Brazilian Journal of Microbiology [online]**. 2007, vol.38, n.1, p.131-134. ISSN 1517-8382. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000100027>.
- ASCHE, F.; ROLL, KH.; TVETERÅS, S. **Tendências futuras na aquicultura: crescimento da produtividade e aumento da produção.** In: Holmer M, Black K, Duarte CM, Marba` N, Karakassis I, editores. Aquicultura na Ecosystema: Springer, p. 271-292, 2008.
- AWAN, M. B. et al. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. **New Microbiologica**, v.32, p.17-23, 2009.
- BARBER, K. ; TAKEMURA, H. **Sushi técnica y sabor.** Barcelona: Blume, 2011. 256 p.
- BARBER, K.; TAKEMURA, H. **Sushi – taste and technique.** Porto: Civilização Editores, 2008. 256 p.
- BARCELLOS L, J. G. et al. Aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 355 - 363, 2008.
- BARTON, JR.; FLØYSAND, A. A ecologia política de aquicultura do salmão chileno, 1982-2010. Uma trajetória de desenvolvimento econômico para a sustentabilidade global. **Environ Mudança**, p. 739-752, 2010.
- BASTOS, T. R. **Veja os dados da piscicultura no brasil.** 2015. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/noticias/criacao/peixe/noticia/2015/04/veja-os-dados-da-piscicultura-no-brasil.html>> Acesso em: 17 out. 2016.
- BÉCHET, M.; BLONDEAU, R. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.1072-1078, 2003.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.334-339, 2001.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 jul. 1952. Seção 1, p. 10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Gabinete do Ministro. Regulamento técnico sobre as condições higienicossanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos Elaboradores/ Industrializados de alimentos. Portaria nº 368 de 08 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Geração de emprego e renda**, 2011. Disponível em: <<http://http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/emprego-e-renda>>. Acesso em: 17 out. 2016.

BRASIL. Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998. Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 26 agos. 2003.

BRAVO, S.; MIDTLYNG, PJ. O uso de vacinas de peixes na indústria do salmão chileno 1999-2003. **Aquicultura**, v. 270, p. 36-42, 2007. Doi: 10.1016 / j.aquaculture.2007.06.017

BUSCHMANN, A. H. et al. Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Environment. **Plos One**, v. 7, n. 8, August 2012.

BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, n. 14, p. 7–23, Aug 2010.

BUSTOS, PA. et al. A doença amebiana Gill (AGD) em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) de viveiro, no Chile. **Aquicultura**, v. 110, p. 281-288, 2011. Doi: 10.1016 / j.aquaculture.2010.11.001

CABELLO FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, issue 7, July 2006, pages 1137–1144. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x

CANTAS L.; MIDTLYNG, P. J; SØRUM, H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). **BMC Microbiology**, 2012; 12:37. DOI: 10.1186/1471-2180-12-37

- CAPONE, DG. et al. Resíduos de antibacterianos em sedimentos marinhos e invertebrados após a quimioterapia na aquicultura. **Aquicultura**, v.145, p. 55-75, 1996. Doi: 10.1016 / s0044-8486 (96) 01330-0.
- CARNAHAN, A. M. et al. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, p. 2843-2849, 1991.
- CARROLL, W. F. Sushi: Globalization through food culture: Towards Study of Global Food Networks. **Education Research**, v.2, p.451-456, 2009.
- CERESER, N. D. Perfil de resistência de *Aeromonas* spp. isolada no fluxograma de produção do queijo minas frescal industrial e artesanal. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.29, n.1, p. 030-036, 2013.
- CHANDÍA, LORETO. **Salmão chileno: exemplo de produção e exportação de qualidade**. Conexão TÜV Rheinland nº 22 novembro-dezembro/2010. Disponível em: <http://tuvbrasil.com.br/newsletter/TUV-Conexao_nov-dez_2010-pt.pdf> Acesso em: 10 out. 2016.
- CLARK, N.M.; CHENOWETH, C.E. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.506-513, 2003.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. CLSI document M100-S23 (ISBN 1-56238-865-7 [Print]; ISBN 1-56238-866-5 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013.
- COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; LEY, J. Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, n.3, p.473-477, 1986.
- COSTA, A. M. Detecção de *Aeromonas hydrophila* e *Campylobacter* spp em Atum (*Thunnus* spp) fresco comercializado no município de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.53, n.1, p.48-54, 2016.
- COYNE, R.; SMITH, P.; MORIARTY, C. O destino de oxitetraciclina no meio marinho de uma fazenda de salmão gaiola. **Mar Environ Saúde**, 2001, 3: 1-24.
- CUNHA, M. L. R. S. et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37. São Paulo, Jan./Mar. 2006.
- DAMASCENO, A. **Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte – MG**. Dissertação (Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

DEODHAR LP.; SARASWATHI K.; VARUDKAR A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 853–856, May, 1991.

DUREK, C. M. **Verificação das boas práticas de fabricação em indústrias de leite e derivados, registrados no serviço de Inspeção Federal – SIP**. Dissertação - Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 97 p., 2005.

EDWARDS, P.A. **Global sushi; eating and identity**. PGDT, v.11. n. 1, p. 211-225, 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. **Brazilian Journal Microbiology**, v.41, n.2, p.452-460, 2010.

FAO. Farming the waters for people and food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture, 2010. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e00.htm>> Acesso em: 12 out 2016.

FARIAS, W. V. L. et al. Padrão de Sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.3, p. 199-204. 1997.

FDA. U.S. **Food and Drug Administration**. *Aeromonas hydrophila*. In: Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2009.

FORSYTHE, S.T. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2d. Porto Alegre: Artmed, 2013. 602p.

FORTT, ZA.; CABELLO, CF.; BUSCHMANN, RA. Resíduos de tetraciclina e quinolonas em selvagem peixes que vivem em torno de um centro de salmão aquicultura no Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 24, p. 14-18, 2007.

FRAPPAOLA, P.J.; GUEST, G.B. Regulatory status of tetracyclines, penicillin and other antibacterial drugs in animal feeds. **Journal Animal Science**, v.62, p.86-92, 1986.

FREITAS, I. M. S. et al. Boas práticas de Manipulação na Culinária Japonesa. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2009. Recife. **Anais**, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r0625-1.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016.

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.40-44, 1993.

GERMANO, M. I. S. **Promoção da Saúde: um desafio para profissionais envolvidos no treinamento de manipuladores de alimentos**. Tese de doutorado; Faculdade de Saúde Pública da USP; São Paulo, 2002.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5 ed. São Paulo: Manole, 2015. 1112p.

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

GORDON, L. et al. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 1167–1176, 2007.

GUARDABASSI L, KRUSE H. **Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais**. Guia de Antimicrobianos em Veterinária, p. 17–30, 2010.

GUERRA, I. M. F. et al. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in South Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.638-643, 2007.

GUIA DA PESCA, **Peixes para sushi e sashimi**, 2007. Disponível em <<http://www.guiadapesca.com.br/peixes-para-sushi-e-sashimi/>> Acesso em: 02 out 2016.

HAMADA-SATO, N. et al. Quality assurance of raw fish base on HACCP concept. **Food Control**, n.16, p.301-307, 2005.

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

HERWIG, RP.; CINZA, JP.; WESTON, DP. Bactérias resistentes anti-bacterianos nos sedimentos superficiais perto de salmão fazendas net-gaiola em Puget Sound, Washington. **Aquicultura**, v. 149, p. 163-283, 1997. DOI: 10.1016 / s0044-8486 (96) 01455-X.

HEUER, O. E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 8, p.1248–1253, 2009.

HEUZENROEDER, M. W.; WONG, C. Y. F.; FLOWER, R. L. P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates from *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbial Letters**, Amsterdam, v. 174, p. 131-136, 1999.

HIRSCH, D. et al. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 30, n. 6, p. 1211-1217, nov./dez., 2006.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 3^a ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994, 789p.

HOLTEN LÜTZHØFT, HC.; HALLING-SØRENSEN, B.; JØRGENSEN, SE. Toxicidade com algas de agentes antibacterianos aplicado na piscicultura dinamarquês. **Arch Environmental Contamination Toxicology**, v. 436, p. 1171-1175, 1999.

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

IACONIS, J. P.; SANDERS, C. C. Purification and characterization of inducible betalactamases in *Aeromonas* spp. **Antimicrobians Agents Chemotherapy**, v. 34, p. 44-51, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisas - DPE - Coordenação de População e Indicadores Sociais – COPIS. Informações completas, Maranhão, São Luís. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=211130&search=||infogr%E1ficos:-informa%E7%F5es-completas>> Acesso em: 31 out 2016.

JACOBS L.; CHENIA HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. **Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 295–306, 2007.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Envolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: na expanding panorama the species, diseases presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, p. 332-344, 1998.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. **Clinical Microbiology Revnews**, Washington, v. 23, p. 35–73, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005. 711p.

KO, W. C. et al. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bactereamia. **Journal of Infectology**. n. 40, p. 267-273, 2000.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and environmental microbiology**, p. 165-170, July 1983.

MALAVOTA, L. C. M. **Avaliação dos pontos críticos no processamento de “sashimis” em restaurantes: análises bacteriológicas e pesquisa de sensibilidade a antimicrobianos**. 2008. 117 p. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense Faculdade de Veterinária, Niterói, 2008.

MAJEED, K. N. et al. Enterotoxigenic *aeromonas* on retail lamb meat and offal. **Journal of Applied bacteriology**, Oxford, v. 67, p. 165-170, 1990.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higienicossanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [S.l.], v. 32, p. 237-242, 2002.

MATTE, M. H. **Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da represa de Guarapiranga destinados à recreação e captação para**

abastecimento público. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, 1995.

MEJDI, S. et al. Biochemical characteristics and genetic diversity of *Vibrio* spp. and *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the Lac of Bizerte (Tunisia). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.26, p. 2037-2046, 2010.

MERINO, S. et al. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. International. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 157-168, 1995.

MILLANAO, BA. et al. Uso inadecuado y excesivo de Antibióticos: salud pública y salmonicultura en Chile. [O uso indiscriminado e excessivo de antibióticos: saúde pública e da aquicultura no Chile salmão]. **Revista médica de Chile**, v. 139, p. 107-118, 2011. doi: 10.4067 / s0034-98872011000100015.

MILLANAO, A. **Estudio cualitativo y cuantitativo de las quinolonas y fluoroquinolonas importadas y autorizadas parágrafo OSU y disposicion en Medicina y en veterinaria en Chile, en el periodo 1998-2001. Consideraciones Sobre su Impacto para la salud pública y el medio ambiente.** Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, 2002.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antibiotic resistant bacteria in fish from Concepción Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin.**, v.42, p.1096-1102, 2001.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **The Science of the Total Environment**, v. 293, p. 207–218, 2002.

MIRANDA CD, CASTILLO G. Resistance to antibiotics and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Science of the Total Environment**, v. 224, p. 167–176, 1998.

MONTARINE, A. S. et al. avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurantes japoneses no município de Ji-Paraná – RO. **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, p. 4-16, 2015. ISSN: 2446-4821.

MOURA-FILHO, L. G. M. et al. Enumeração e pesquisa de *Vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado do Pernambuco. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v.29, n. 1, p 85-90, 2007.

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, v.45, n.4, p.297-304, 2007.

NAMDARI H, BOTTONE EJ. Microbiologic and Clinical Evidence Supporting the Role of *Aeromonas caviae* as a Pediatric Enteric Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 837-840, 1990.

NESPOLO, M. N. **Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, 2009.

OLIVEIRA, T. W. N., MARQUES, L. F. Avaliação das condições higiênico-sanitária no preparo de *sushi* e *sashimi* de um estabelecimento comercial. **Revista Semiárido De Visu**, v.2, n.1, p.194-201, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for drinking water quality.** 4. ed. 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em: 11 out. 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **HACCP: Ferramentas Essenciais para Inocuidade dos Alimentos.** – Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPPAZ, 2005.

PABLO, M. et al. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p.158–64, 2009.

PALU, A. P. et al. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**, Oxford, v.27, p. 504-509, 2006.

PALUMBO, S. A. et al. Model for anaerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. **Journal of Food Protection**. Amsterdam, v.55, n.4, p.260-265, 1991.

PATROCÍNIO, I. D. R. **A segurança alimentar no consumo de pescado cru com valência para a produção de sushi.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 129 f., 2009.

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

RÉ, L. C.; FREIBERGER, J. A.; KNOB, A. Incidência da bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e em mãos de manipuladores de alimentos em uma creche no município de Guarapuava (PR). **Ambiência Guarapuava (PR)**, v. 9, n. 2, p. 381-393, Maio/Ago, 2013.

REGITANO, J. B.; LEAL R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601–616, 2010.

READ, P.; FERNANDES, T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. **Aquaculture**, v. 226, n. 1-4, p. 139–163, 2003.

RIBEIRO, A. L. M. S. et al. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.16, n.3, p.109-112, 2009.

RIBEIRO, C. M. A.; PAOLUCCI, L. **Gastronomia, Interação cultural e Turismo: estudo sobre a dispersão da culinária nipônica na Cidade de São Paulo – 100 anos da imigração japonesa no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Turismo) – Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2006.

RODRIGUES, C. **Salmão**. 2007. Disponível em: <<http://celiarodrigues-prisma.blogspot.com.br/2007/06/salmo.html>> Acesso em: 13 out 2016.

RODRIGUES, K. L. et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 1, p. 297-299, 2004.

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

SAAD, S. M. et al. Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from. São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

SAMUELSEN, OB. et al. Resíduos de ácido oxolínico de fauna silvestre seguintes medicamentos em pisciculturas. **Dis Aq Org**, v. 12, p. 111-119, 1992. Doi: 10,3354 / dao012111.

SATO, R. A. **Características microbiológicas de sushi adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2013.

SANTOS, A. A. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sushi* comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena** v. 8, 2012.

SANTOS, B. M. O. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 8, n. 1, p. 67-73, 2000.

SANTOS, C. R. A. A alimentação e seu lugar na história: os tempos da memória gustativa. **Revista da academia Paranaense de Letras**, n. 51, p. 165/188, 2005.

SCOARIS, D. O. et al. Virulence and antibiotics susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.93, p.111-122, 2007.

SEGATORE, B. et al. High specificity of *cphA*- encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. **Antimicrobians Agents Chemotherapy**, v. 37, p. 1324-1328, 1993.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, n. 35, p. 421- 463, 2012.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação**. 7 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2014.

SILVA, M. L.; MATTE, G. R.; MATTE, M.H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 208-214, 2008.

SILVA, M. L. **Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 146 p., 2007.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, R. M. L. **Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.

SØRUM H. **Antimicrobial drug resistance in fish pathogens**. In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C., p. 213–237, 2006.

SOUZA, A. T. S. **Certificação da qualidade de pescados**. *Biológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.11-13, jan./dez., 2003.

STANSBY, M. E. **Tecnología de la Industria Pesquera**. Zaragoza, Espanha. Editorial Acribia, 1968. 44 p.

SUHET, M. I. et al. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, p. 036-044, 2011.

TAVARES, V. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do *estafilococos*, do *enterococos* e do *pneumococos* aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, Uberaba May/June 2000.

TAVARES, A. B. et al. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.XX, n.X, p. 1-8, 2014.

TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335– 41, 2009.

VALLANDRO, M. J. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre –RS**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 69 p., 2010.

VECIANA-NOGUÉS, M. T et al. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP related compounds, volatile amines and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 6, p. 2036-2041, jun. 1997.

VELLOSO, E. A. **Avaliação Sensorial e Físico- Química de filés de Tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) refrigerados e submetidos à radiação gama.** Monografia do curso de especialização em irradiação de alimentos. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2004.

VIEGAS, E. M. M. et al. **Técnicas de Processamento de Peixes.** Viçosa - MG: CPT, 256 p., 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática.** Editora Varela. 380 p., São Paulo, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F.; SAMPAIO, S. S. Emprego do gelo nos barcos de pesca. **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado.** São Paulo, v. 2, p. 37-42, 2004.

VILA, J. et al. *Aeromonas* spp. and Traveler's Diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.5, 2003.

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

YANO, Y. et al. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. **Journal of Food Protection** n.67, v.8, p.1617-1623, 2004.