

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Saúde Pública**

**Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da  
qualidade sanitária de peixes comercializados  
na cidade de São Paulo**

**Miriam Lopes da Silva**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Pública para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Pública.**

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Associada Maria Helena Matté**

**São Paulo**  
**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da  
qualidade sanitária de peixes comercializados  
na cidade de São Paulo**

**Miriam Lopes da Silva**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Pública para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Pública.**

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Associada Maria Helena Matté**

**São Paulo  
2007**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

À

*À Deus que criou a*

*V*

*Aos meus pais que me ofereceram a*

*I*

*À Jeanne que iluminou a minha*

*D*

*Ao Fernando que mudou a minha*

*A*

*À Pâmela, Bárbara e Bruna que coloriram a minha*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho somente foi possível mediante a participação e o apoio de inúmeras pessoas às quais desejo expressar meu mais profundo agradecimento.

À Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, Diretora de Serviços do Instituto Adolfo Lutz, a quem devo meu ingresso no campo da microbiologia, minha primeira chance de realizar pesquisa científica, além de inúmeras outras oportunidades de “fazer parte”.

À Sandra Regina Brasil Stolf Pukinskas, Maria Walderez Szeszs e Dulcilena de Matos, da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, por terem me ensinado tanto e por terem me acolhido generosamente, e à minha amiga Ivete Borges Luiz por ter me apresentado essa boa gente.

Ao Departamento de Prática de Saúde Pública, da Faculdade de Saúde Pública/USP, na figura dos professores que atuaram em sua chefia: professor Omar Miguel (*in memoriam*), professora Evelin Naked de Castro Sá (*in memoriam*) e professor Pedro Manuel Leal Germano por me oferecerem sucessivas oportunidades de crescimento profissional e humano.

Às inesquecíveis amigas que passaram pelo Laboratório de Saúde Pública: Claudia Yoshida, tão frágil e tão forte, tão jovem e tão sábia; Agnes Hanashiro, com seu bom humor genuíno aliado à competência; Marisa Morita, alegria pura e contagiante mesclada com elevado senso de responsabilidade; Suzete Contrera de Moura Pedro, sempre transmitindo prudência, confiança e companheirismo; Suzi de Almeida Vasconcelos

Barboni, fonte de incansáveis incentivos; e Rosa Maria dos Santos, com quem compartilhei artigos e incertezas.

À Andrea Cabral pela ajuda na primeira coleta.

À Dra. Lúcia Baldassi, não somente, pelas sábias observações que em muito contribuíram para a conclusão do trabalho, mas também pelo estímulo dispensado, mesmo antes de iniciá-lo e em vários momentos após.

À Dra. Ana Maria de Souza Pinto pelo devotado interesse e inestimáveis sugestões, tanto na fase de qualificação quanto na pré-banca.

Ao pessoal administrativo da secretaria do Departamento de Prática de Saúde Pública – FSP/USP, Maria Aparecida Soares Alves, Sonia Francisca Martins, Daniel Augusto de Castro Spegiarin e Livia Mara Silva Rosa, pela colaboração constante.

À equipe da Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública/USP pela incomparável eficiência na disponibilização dos artigos, tão indispensáveis, e ao colega de laboratório, Pedro “Tigrão” Pedro, que viabilizou meu acesso a artigos científicos, preciosos, em todos os sentidos e revisou o *abstract*.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, Maria Aparecida Mendes, Reinilda Maria de Figueiredo Shimono e Marcinha, sempre profissionalmente competentes, nunca deixando de ser humanas.

E, por fim, agradeço à Profa. Dra. Maria Helena Matté, com quem tenho o privilégio de compartilhar o convívio profissional, usina de força e de idéias, que além de tudo o que fez, ainda fez algo ímpar: orientou-me.

*Peixe cru: comer ou não comer? Eis a questão.*

## RESUMO

Silva ML. **Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo** [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.

Práticas nutricionais saudáveis e a globalização cultural popularizaram o consumo de pratos à base de peixe cru, anteriormente restritos aos países orientais. Estimativas mostram que doenças de origem alimentar causam aproximadamente 76 milhões de casos, 325 mil hospitalizações e 5 mil mortes a cada ano, somente nos Estados Unidos. Casos com etiologia desconhecida somam 62 milhões, com 265 mil hospitalizações e 3.200 mortes. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* e cepas potencialmente patogênicas de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp. em peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, Brasil. Vinte amostras de peixes, de diferentes espécies, foram adquiridas em feiras livres e analisadas utilizando metodologia convencional para investigação de patógenos em alimentos. Altos níveis de contaminação fecal foram detectados em 25% das amostras. *Staphylococcus aureus* foi isolado em 10% das amostras, entretanto em valores abaixo do permitido pela legislação brasileira. Todas as amostras estavam negativas para *Salmonella* spp. *V. parahaemolyticus* não foi isolado, 30% das amostras foram positivas para outras espécies de *Vibrio*, inclusive *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139. *Aeromonas* spp. , incluindo *A. hydrophila* foi isolada em 50% das amostras de peixe. O isolamento de *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 e *Aeromonas hydrophila*, assim como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sugere que peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo podem representar um risco para os consumidores e ser um importante veículo de transmissão de espécies enteropatogênicas.

**Descritores:** *Aeromonas*, *Vibrio*, peixe, DTAs, Vigilância Sanitária, Saúde Pública.

## ABSTRACT

Silva ML. Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo./**Investigation of *Aeromonas* and *Vibrio* species and sanitary quality in fish commercialized in São Paulo City.** [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.

Healthier nutritional lifestyles and cultural globalization have popularized the consumption of raw fish dishes that were previously restricted to oriental countries. Estimates indicate that food-borne diseases cause approximately 76 million illnesses, 325,000 hospitalizations and 5,000 deaths each year in the United States alone. Cases with unknown etiology account for 62 million illnesses, 265,000 hospitalizations and 3,200 deaths. The purpose of this study was to investigate the presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and potentially pathogenic strains of *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp. in fish commercialized at the retail level in the markets of São Paulo City, Brazil. Twenty fish of different species were analysed for foodborne pathogens using conventional methodologies. High levels of faecal contamination were detected in 25% of fish samples. *Staphylococcus aureus* was isolated from 10% of samples; however, in each case this was below the limits established by Brazilian legislation. All samples were negative for *Salmonella* and 30% tested positive for others *Vibrio* spp., including *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Vibrio parahaemolyticus* was not found in this study. *Aeromonas* spp., including *A. hydrophila*, were isolated in 50% of fish samples. The isolation of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 and *Aeromonas hydrophila* as well as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* suggests that fish commercialized in São Paulo City may represent a health risk to consumers and be an important vehicle for transmission of these enteropathogenic species.

**Descriptors:** *Aeromonas*, *Vibrio*, fish, foodborne diseases, Sanitary Surveillance, Public Health.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 HISTÓRICO DAS FEIRAS LIVRES.....	19
1.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS – DTAs.....	27
1.3 OS PEIXES E A CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR.....	30
1.4 OS PEIXES COMO ORIGEM DE DTAs .....	32
1.5 AGENTES ETIOLÓGICOS.....	35
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	35
1.5.2 <i>Salmonella</i> spp. ....	40
1.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
1.5.4 <i>Aeromonas</i> spp. ....	49
1.5.5 <i>Vibrio</i> spp. ....	58
1.6 JUSTIFICATIVA .....	64
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>66</b>
2.1 GERAL .....	66
2.2 ESPECÍFICOS .....	66
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
3.1 AMOSTRAGEM .....	67
3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	69
3.2.1 Pesquisa de Coliformes Termotolerantes e <i>E. coli</i> a 45°C. .	69

3.2.1.1 Expressão dos Resultados em NMP de Bactérias por 100g.....	70
3.2.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	72
3.2.3 Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva .....	74
3.2.4 Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp. ....	76
3.2.5 Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp. Potencialmente Patogênicos .....	78
3.3 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS .....	80
3.4 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. POR MEIO DE PROVAS MOLECULARES .....	81
3.4.1 Extração do DNA Genômico de <i>Salmonella</i> spp. ....	82
3.4.1.1 Método de Obtenção do DNA Através de Choque Térmico. ....	82
3.4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	83
3.4.2.1 Preparação da Mistura Master para a PCR.....	84
3.4.2.2 Condições de PCR para Identificação de <i>Salmonella</i> spp. ....	84
3.4.3 Análise do DNA .....	85
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
4.1 ENUMERAÇÃO DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL E PRESENÇA DE <i>Escherichia coli</i> .....	89
4.2 PRESENÇA DE <i>Salmonella</i> spp. ....	93
4.3 ENUMERAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	97

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Aeromonas</i> spp. ....	98
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Vibrio</i> spp. ....	101
4.6 AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DO PEIXE .....	104
4.7 RELEVÂNCIA PARA SAÚDE PÚBLICA .....	112
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>116</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>118</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>120</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Retrato de escravos (“pretos de ganho”), fotografados por Cristiano Jr. ....	21
<b>Figura 2:</b> Quitandeiras da Lapa. Litografia de Chamberlain, mostrando barraca e ambulantes da Praça XV no Rio de Janeiro. ....	22
<b>Figura 3:</b> Escravos de ganho vendendo capim e leite em São Paulo. Gravura de Jean-Baptiste Debret. ....	24
<b>Figura 4:</b> Ilustração esquemática do processamento da amostra para isolamento de indicadores de contaminação fecal e <i>Escherichia coli</i> . ....	71
<b>Figura 5:</b> Ilustração esquemática do processamento da amostra para isolamento de <i>Salmonella</i> spp. ....	73
<b>Figura 6:</b> Ilustração esquemática do processamento da amostra para isolamento de estafilococos coagulase positiva. ....	75
<b>Figura 7:</b> Ilustração esquemática do processamento da amostra para isolamento de espécies de <i>Aeromonas</i> . ....	77
<b>Figura 8:</b> Ilustração esquemática do processamento da amostra para isolamento de espécies de <i>Vibrio</i> . ....	79
<b>Figura 9:</b> Número de cepas isoladas em 20 amostras de peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, segundo diversidade de espécies. ....	88
<b>Figura 10:</b> Número de amostras de peixe próprias e impróprias para consumo de acordo com a contagem de coliformes termotolerantes e presença de <i>E. coli</i> . ....	91
<b>Figura 11:</b> Gel de agarose contendo <i>amplicons</i> de <i>mPCR</i> para identificação de espécies de <i>Salmonella</i> . ....	95

## LISTA DE TABELA E QUADROS

<b>Tabela 1:</b>	Número e porcentagem de surtos ocasionados por alimentos, nos quais o alimento implicado foi identificado como peixe ou frutos do mar em países europeus, entre 1993 e 1998, segundo o país e total de surtos. ....	34
<b>Quadro 1:</b>	Amostragem de peixes coletados em feiras livres da cidade de S. Paulo, segundo localização, barraca, número da amostra e número da coleta. ....	68
<b>Quadro 2:</b>	Características dos iniciadores para identificação de <i>Salmonella</i> , segundo seqüência dos nucleotídeos e peso molecular. ....	83
<b>Quadro 3:</b>	Distribuição de microrganismos em amostras de peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, segundo origem (feira e barraca) e espécie de peixe .....	87
<b>Quadro 4:</b>	Contagem geral de NMP/g de coliformes totais, termotolerantes e presença de <i>E. coli</i> , segundo amostra, espécie de peixe, feira livre e barraca, da cidade de São Paulo. ....	90
<b>Quadro 5:</b>	Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos determinados pela ANVISA, segundo o grupo de alimentos e tipo de amostra .....	105

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da FAO/WHO (Organização para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial de Saúde), a produção pesqueira mundial, de 19 milhões de toneladas em 1950, ultrapassou em 2004 os 141 milhões de toneladas. A produção brasileira cresceu de 150 mil toneladas para mais de 1 milhão de toneladas no mesmo período (FAO, 1999; FAOSTAT, 2005; FAO, 2007). Peixes e outros frutos do mar representam um terço do consumo mundial de proteína (DIAZ, 2004) e o seu consumo vêm aumentando também no Brasil. Nos últimos 40 anos o consumo per capita de peixes e frutos do mar cresceu em média de 9 para 16 kg/ano. Entre os anos de 2001 e 2003 a média de consumo no Brasil esteve entre 5 e 10 kg/ano (VALDIMARSSON, 2005).

O aumento da produção pesqueira mundial corresponde ao acréscimo do consumo de peixes como uma alternativa, ou em substituição, a outras fontes de proteínas em países em desenvolvimento (SEHGAL e SEHGAL, 2002, CROCI e SUFFREDINI, 2003). Além desses fatores, a busca de uma melhor qualidade de vida, através de práticas alimentares mais saudáveis e controle de peso, dentre outros, também vem contribuindo para que o consumo de peixes aumente nos últimos anos.

Alto nível protéico, fácil digestibilidade, baixa taxa de gordura e ainda a benéfica presença dos ácidos graxos polinsaturados ômega-3, conhecido como protetor cardiovascular, por manter os níveis de colesterol dentro da

normalidade, são apenas algumas das qualidades que constroem a boa reputação da carne de peixe (HOLUB e HOLUB, 2004; BAUTISTA e ENGLER, 2005).

Apesar das inúmeras qualidades, o peixe é muito suscetível à deterioração microbiana devido à atividade de água elevada, ao teor de gorduras facilmente oxidáveis e ao pH próximo da neutralidade (pH 6,6-6,8), fatores que favorecem o desenvolvimento de bactérias (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Além desses fatores, globalização cultural, integração do comércio mundial, status, dentre outras razões (HAWKES, 2006), têm influenciado no aumento do consumo de pratos orientais à base de peixes crus não somente no Brasil (GERMANO et al., 1993b, SOARES e GERMANO, 2004) como em outros países (YANO et al., 2004; WATANABE et al., 2005; CWIERTKA, 2005). Na China, por exemplo, o aumento da preferência por ingestão de peixes crus ou levemente cozidos é atribuído ao recente crescimento econômico chinês (YANO et al., 2004), o que consiste em uma mudança de hábito preocupante, segundo alertam os pesquisadores.

No Brasil, aliada a esta tendência, nos últimos anos ocorreu a popularização do consumo de pratos orientais, devido ao aumento do número de estabelecimentos que oferecem pratos típicos, dentre os quais, aqueles à base de peixe cru, como *sushis* e *sashimis* (GERMANO et al., 1993b, SOARES e GERMANO, 2004; MARTINS, 2006).

*Sushi* é basicamente um bolinho de arroz temperado com vinagre, moldado à mão e coberto com fatias de peixe cru, polvo, omelete oriental, camarão ou *kanikama*. O *sashimi* consiste em fatias de peixe ou pescado cru, de várias espécies, servidas com molho de soja e pasta de raiz forte, denominada *wassabi* (HANASHIRO et al., 1999).

Esses alimentos podem ser encontrados não somente em restaurantes especializados em bairros típicos, como também em restaurantes que oferecem refeições por quilo, *fast-foods* em *shopping centers* e redes especializadas de *deliveries* por toda a cidade de São Paulo. (GERMANO et al., 2003; SOARES e GERMANO, 2004; MARTINS, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2006; MÁRSICO et al., 2006). Esse aumento de consumo tem sido verificado também em outras capitais do país, como Brasília (DF), onde o consumo de pratos típicos da culinária japonesa cresceu 20% entre 2001 e 2002 (RESENDE, 2004).

Em São Paulo, capital gastronômica do país, onde a culinária oriental é muito difundida, são cadastrados pela Associação Brasileira de Culinária Japonesa (ABCJ) 300 restaurantes. Nesses estabelecimentos, o consumo médio semanal por restaurante, de uma única espécie, o salmão, é de 200 quilos ou o equivalente a 2,6 mil toneladas por ano. A ABCJ calcula serem *sushis* e *sashimis* responsáveis por 80% do consumo nestes restaurantes (ANVISA, 2005). Esses pratos são também preparados e consumidos nas residências pelos apreciadores da culinária japonesa.

A carne de peixe, que possui benefícios nutricionais reconhecidos, como qualquer alimento de origem animal, pode, ao contrário, tornar-se um risco ao consumidor se não forem observados cuidados no preparo, manipulação e conservação desta (DIAZ, 2004; HUSS et al., 2000). Com a intenção de torná-lo mais saudável pela preservação de seus nutrientes, esse alimento é ingerido cru, como no caso dos *sushis* e *sashimis*, ou ainda pouco cozido, potencializando o risco e fazendo com que esses cuidados sejam ainda mais relevantes (FELDHUSEN, 2000; HUSS et al., 2000).

Às condições inerentes ao alimento, podem juntar-se outros fatores como refrigeração inadequada, conservação em gelo de origem duvidosa (FALCÃO et al., 2004), falta de higiene do manipulador, dentre outras variáveis críticas. Esses fatores podem estar presentes em toda a cadeia de processamento do peixe desde a captura ou despesca<sup>1</sup> até a mesa do consumidor.

Todos esses fatores podem incrementar a proporção de patógenos presentes nos alimentos, levando o consumidor a uma toxinfecção alimentar causada pela proliferação de bactérias responsáveis pela produção de toxinas (GERMANO et al., 1998).

---

<sup>1</sup> Termo utilizado na piscicultura para designar a captura dos espécimes cultivados para fins comerciais ou de manejo.

## 1.1 HISTÓRICO DAS FEIRAS LIVRES

A feira livre no Brasil é uma modalidade de mercado varejista ao ar livre, de periodicidade semanal, organizada como serviço de utilidade pública pela municipalidade e voltada para a distribuição local (circunscrita ao bairro) de gêneros alimentícios e produtos básicos. Herança em certa medida da tradição ibérica (também de raiz mourisca), influenciada por práticas africanas, está presente na maioria das cidades brasileiras (MASCARENHAS, 2005a).

As feiras são fenômenos econômicos sociais muito antigos. Existem pelo menos três citações no novo testamento encontradas em Mateus (21:12), Marcos (11:15) e Lucas (19:45) referentes à “purificação do templo”, que levam a crer na existência de feiras nessa época:

“E foram para Jerusalém. Entrando ele no templo passou a expulsar os que ali vendiam e compravam; derrubou as mesas dos cambistas e as cadeiras dos que vendiam pombas.” Marcos (11:15)<sup>2</sup>.

Acredita-se que a consolidação das feiras tenha ocorrido na Idade Média, uma vez que nos períodos escravagista e feudalista se destacam a produção apenas para consumo próprio, como indica Souto Maior (1978) citado por SOUSA (2004). As atividades comerciais de Bizâncio com o Oriente estimularam a concorrência comercial que levaram aos

---

<sup>2</sup> MARCOS. Livro de Marcos in: A Bíblia Sagrada. Novo Testamento. Rio de Janeiro, Sociedade Bíblica do Brasil, 1960, p. 60.

descobrimientos e a expansão da civilização europeia no século XVI. Nesta época as feiras realizavam-se uma ou duas vezes ao ano, com a devida permissão dos reis, assim como os chamados mercados, que eram realizados semanalmente. As feiras eram imensas, situavam-se no cruzamento de estradas principais, ponto de encontro de pessoas das mais diversas localidades, onde eram comercializadas mercadorias por atacado, provindas de todos os pontos do mundo conhecido. As feiras europeias mais importantes eram realizadas na região de *Champagne*, para onde eram atraídos mercadores lianos, transalpinos, florentinos, milaneses, luqueses, genoveses, venesianos, alemães, provençais dentre outros, segundo Huberman (1959) citado por SOUSA (2004).

No Brasil, desde o período colonial, o abastecimento de gêneros alimentícios e de produtos em geral, principalmente para as pessoas de menor poder aquisitivo, se dava por meio de pequenos comerciantes ou diretamente de pequenos produtores. Esse comércio era exercido de duas formas: levado de porta em porta, ou alocado em algum ponto fixo do espaço público onde a clientela pudesse se dirigir, como mostram as Figuras 1, 2 e 3 (MARTINS, 2005, MASCARENHAS, 2005b ).

Os comerciantes utilizavam seu corpo e alguns suportes como cestos, bandejas ou caixas de madeira que carregavam a fim de mostrarem o seu produto aos clientes ou se instalavam em pequenas tendas ou barracas (MARTINS, 2005). Assim, os ambulantes formavam um grupo constituído principalmente de índios e escravos (“pretos de ganho” ou forros) que iam

vender o produto do senhor ou o seu próprio, plantado nas redondezas ou fabricado em pequenos empreendimentos na cidade (MASCARENHAS, 2005b ).



**Figura 1:** Retrato de escravos (“pretos de ganho”), fotografados por Cristiano Jr. (KOSSOY e CARNEIRO, 2002).

No início do século XIX, com a vinda de D. João VI, juntamente com a família real e sua corte, o Brasil começa a receber forte influência cultural européia, intensificada ainda mais com a chegada de um grupo de artistas franceses. Esse grupo que ficou conhecido como Missão Artística Francesa e outros artistas independentes retrataram, durante anos, as paisagens e cenas da vida cotidiana do povo brasileiro.

É por meio de aquarelas, estampas e outras formas de expressão produzidas por artistas como Jean-Baptiste Debret (1768–1848), Nicolas-Antoine Taunay (1775–1830), Johann-Moritz Rugendas (1802–1858), Thomas Ender (1793–1875) e Henry Chamberlain (1796–1844), dentre outros, que podemos constatar a existência desta modalidade de varejo que,

na aparência, representa talvez a principal forma precursora das feiras livres modernas (MASCARENHAS, 2005b). Os inúmeros registros iconográficos e os diários desses viajantes estrangeiros estão férteis de imagens de vendeiros nas ruas mais movimentadas das cidades coloniais, conduzindo seus tabuleiros de doces, frutas, miudezas e tantos outros gêneros.

Em 1820, Chamberlain descreve as atividades comerciais na Praça XV, no Rio de Janeiro daquela época (Figura 2).

(...)“a barraca de mercado, aqui reproduzida, é igual às que geralmente se encontram nas áreas abertas da cidade. Sua construção é muito simples, sendo armada de manhã e desarmada à noite. Consiste apenas em quatro esteios retos e uma coberta de folhas de bananeira, para quebrar os raios abrasadores do sol. Estas barracas pertencem, em geral, a negras livres que negociam com aves, verduras, legumes e milho e, às vezes, também com pão e **peixe frito**” (o destaque é nosso).



**Figura 2:** Quitandeiras da Lapa. Litografia de Chamberlain, mostrando barraca e ambulantes da Praça XV no Rio de Janeiro (disponível no site do Museu de Arte de São Paulo: <<http://masp.uol.com.br/exposicoes/2007/brasil-darwin/>> 15 maio 2007).

Jean-Baptiste Debret, conhecido como “a alma da missão francesa”, observou em relação à cidade do Rio de Janeiro e de seu comércio de ambulantes:

(...)“percorrendo as ruas fica-se espantado com a prodigiosa quantidade de negros, perambulando seminus e que executam os trabalhos mais penosos e servem de carregadores. Os mercados são abundantemente abastecidos de frutas, legumes, aves e **peixes** (o destaque é nosso). Rio de Janeiro é o principal centro comercial do Brasil. Sua população em 1816 era avaliada em cento e cinquenta mil almas, com três quintos de escravos”.

Em 1817, Louis-François Tollenare descreve Recife dessa forma:

“Um pequeno mercado junto de uma igreja oferece à minha vista montões de raízes de mandioca, bananas, ananases, cajus, mangas e laranjas. As vendedeiras, mui sucintamente vestidas, algumas de cachimbo ao queixo, preparam grosseiros manjares para o povo” (...).

Este quadro não era diferente na província de São Paulo. Com permissão da Câmara Municipal, as negras quitandeiras<sup>3</sup> se reuniam no logradouro (por essa razão) conhecido como Rua da Quitanda (atualmente Rua Álvares Penteado) e lá vendiam seus produtos. Eram as escravas de ganho e/ou forras, que vendiam em plena rua as “miudezas, hortaliças, cereais, palmitos, frutas e demais produtos dos sítios e chácaras, que

---

<sup>3</sup> Quitandeira: do quimbundo *kitanda* = mercado.

abasteciam a cidade provinciana”, segundo Sant’anna<sup>4</sup> (1953) citado por RIBEIRO e CAMPOS (2007), como ilustra a Figura 3.



**Figura 3:** Escravos de ganho vendendo capim e leite em São Paulo. Gravura de Jean-Baptiste Debret.

Esses pontos de reunião de comércio são muito similares às atuais feiras livres. São semelhantes inclusive no incômodo que provocam quanto à sujeira e poluição sonora (AUDI, 2002; CAPISTRANO et al., 2004). Já naquela época o Estado procurava manter o controle tanto socioeconômico, quanto estético-arquitetônico dessas atividades informais (MASCARENHAS, 2005a), influenciados pela visão europeia da época.

Em 1636, no Rio de Janeiro, os oficiais da Câmara, procurando disciplinar a ação dos mercadores de gêneros alimentícios, estabeleceram que os pescadores vendessem suas mercadorias no trecho que compreendia a Praia de Nossa Senhora do Carmo até a porta do Governador (entre a Praça 15 de Novembro e a Rua da Alfândega).

---

<sup>4</sup> Nuto Sant’anna: Historiador e chefe da Seção de Documentação Histórica do Departamento de Cultura da PMSP na década de 1930.

Neste local, que ficou conhecido como a Praia do Peixe, foram instaladas barracas de madeira, cobertas de telha, onde se vendia o pescado. O vice-rei Luiz de Vasconcelos, insatisfeito com a estética do lugar, em 1789, ordenou a reedificação das barracas de peixe com regularidade e simetria. Devido a incômodos como algazarras, muita sujeira e maus odores, em 1823, a Secretaria de Estado dos Negócios do Império determinou a remoção das barracas para outro local de acordo com Gorberg e Fridman citados por MARTINS (2005).

Em 1793, na província de São Paulo, as quitandeiras foram proibidas de trabalhar depois “das Ave-Marias”, sob pena de perderem os gêneros que vendiam e serem presas por 30 dias, além de pagarem 6.000 réis pelas despesas da prisão.

Em 1822, quando a Rua da Quitanda já tinha sido rebatizada como Rua do Comércio, moradores e negociantes fizeram uma reclamação formal à Câmara sobre o incômodo enxame de moscas atraídas pelos produtos comercializadas no local. Segundo Sant’anna (1953) citado por RIBEIRO e CAMPOS (2007), a municipalidade, em atenção aos reclamantes, limitou-se em restringir o espaço ocupado pelas quitandeiras.

A feira livre foi oficialmente criada no Rio de Janeiro, em 1904, porém somente em 1916 a prefeitura resolve expandi-la. As feiras passam então a existir em número de 14, duas para cada dia da semana. Evolui paulatinamente até constituir, no início dos anos 30, um conjunto de 42 feiras (seis para cada dia da semana) (MASCARENHAS, 2005a).

Como já descrito, a comercialização de peixes e produtos excedentes das fazendas é realizada na cidade de São Paulo desde a metade do século XVII. Em 1687 a primeira feira oficializada acontecia no Terreiro da Misericórdia. No fim do século XVIII as feiras eram realizadas nos locais de pouso de tropeiros. Entretanto a feira livre, da maneira como a conhecemos, foi reconhecida oficialmente em 1914, por meio do ato do Prefeito Washington Luiz P. de Souza e permanece ainda hoje como tradicional comércio de pescados e produtos hortifrutigranjeiros.

Na cidade de São Paulo são 889 feiras livres<sup>5</sup> atuando em praticamente toda a malha urbana, das zonas residenciais nobres aos mais distantes e pauperizados bairros da periferia metropolitana. Embora este tipo de comércio tenha perdido sua exclusividade devido às mudanças no comportamento dos consumidores, no tocante às facilidades encontradas em outros tipos de comércio, ela continua tendo sua importância sem perder a referência de produtos frescos e baratos, principalmente para consumidores fidelizados (MENDONÇA et al., 2002).

---

<sup>5</sup> SEMAB - Secretaria Municipal de Abastecimento PMSP. Disponível em: <<http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/abastecimento/organizacao/estrutura/0021>> acesso em 21.05.2007.

## 1.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS – DTAs

Muitos países conhecem o impacto na saúde e o peso monetário que as doenças de origem alimentar representam em suas comunidades. Estudo realizado em 1996, pelo *Economic Research Service* (ERS), órgão ligado ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, estima que haja de 6,5 a 33 milhões de casos de doenças de origem alimentar, causadas por diversos patógenos, com mais de 9 mil mortes a cada ano (BUZBY et al., 1996). A estimativa da OMS é de 76 milhões de casos com aproximadamente 325 mil hospitalizações e 5 mil mortes, naquele país (MEAD et al., 1999).

No Reino Unido, as infecções intestinais causam substancial morbidade, sendo responsáveis por mais de 300 mortes e 35 mil hospitalizações anuais. Estima-se que ocorram 9,4 milhões de casos por ano (WHEELER et al., 1999).

Estimativas indicam que a ocorrência de casos de gastroenterite entre os australianos varia de 1 a 4 milhões de episódios por ano (HALL et al., 2005).

No Brasil, não existem dados confiáveis sobre o número de casos de doenças de origem alimentar (CARMO et al., 2005; GERMANO et al., 1993a), porém, em países em desenvolvimento, grupo em que este se encontra, nos quais a subnutrição e a falta de saneamento básico são comuns, aliados à precariedade na atenção à saúde e à baixa escolaridade,

principalmente entre a população de baixo nível socioeconômico, as gastroenterites são comuns e, talvez por essa razão, desvalorizadas (O'RYAN et al., 2005).

Segundo BUZBY et al. (1996), somente nos Estados Unidos, o custo estimado com doenças de origem alimentar (incluindo gastos médicos diretos e indiretos, perda de produtividade e mortes prematuras), tendo como causa somente microrganismos bacterianos, é de 2,9 a 6,7 bilhões de dólares/ano. Estimativas atualizadas em 2000 demonstraram que esse valor elevou-se para 6,9 bilhões de dólares (ERS, 2004).

No Brasil, os custos com hospitalizações devido a Doenças Transmitidas por Alimentos, entre 1999 e 2004, chegaram a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (CARMO et al., 2005).

Infecção gastrintestinal é a mais freqüente causa de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento. A causa mais comum de diarreia e disenteria entre crianças é a presença de enterobactérias em alimentos e água (O'RYAN et al., 2005). A virulência desses microrganismos está associada a diversos fatores como: presença de adesinas, produção de hemolisinas, toxinas e diversas proteínas envolvidas na aderência, invasão e desorganização/rearranjo cinético da célula alvo, dentre outros. (MATTÉ MH, 1995, 1996; MATTÉ GR, 2003; NATARO e KAPER, 1998; BALABAN e RASOOLY, 2000; FIGUEIREDO, 2004; VILCHES et al., 2004; TORRES et al., 2005; FOSTER, 2005).

Os exemplos mais comuns de bactérias enterotoxigênicas são *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. As primeiras possuem como fatores de virulência mais estudados as colicinas e as enterotoxinas termoestável (ST) e termolábil (LT), já as salmonelas possuem um aparato sofisticado para invasão e colonização, que envolve diversas proteínas e é conhecido como Sistema de Secreção Tipo III, utilizado também por outros microrganismos como *Aeromonas hydrophila* (MATTÉ MH, 1995, 1996; MATTÉ GR, 2003; BALABAN e RASOOLY, 2000; FIGUEIREDO, 2004; VILCHES et al., 2004; TORRES et al., 2005; FOSTER, 2005).

Outras bactérias de importância em saúde pública, alvos desse estudo, cujo tipo de toxina secretada provoca diarreia são: *Vibrio cholerae*, através da toxina colérica, hemolisina, dentre outras; *Staphylococcus aureus*, que produz 18 enterotoxinas; e *Aeromonas hydrophila* produtora de aerolisina e citotoxinas termoestável e termolábil, para citar apenas alguns exemplos (FOSTER, 2005; HOLTFRETER e BROKER, 2005).

### 1.3 OS PEIXES E A CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR

Os peixes podem ser agentes de contaminação, como qualquer fonte de proteína de origem animal, e portanto representam risco para a saúde humana. A água, salgada ou doce, constitui ambiente natural de uma variedade de bactérias capazes de originar infecção no homem, embora o potencial para isso dependa de fatores como: sobrevivência, latência e dose infectante do organismo e suscetibilidade do hospedeiro.

Por estarem em contato direto com a água, os peixes podem albergar naturalmente esses patógenos (JANDA e ABBOT, 1998; NEYTS et al., 2000; HÂSTEIN et al., 2006; MATTÉ et al., 2007), inclusive aqueles mantidos sob refrigeração (VASUDEVAN et al., 2002; SAUTOUR et al., 2003). Muitas dessas bactérias, incluindo espécies dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio*, patogênicas ao homem, são encontradas normalmente na superfície dos pescados, que são comumente consumidos pela população.

As atividades humanas que acarretam aumento nos índices de poluição das águas do mar e de outros corpos hídricos também elevam o nível de contaminação dos peixes. O lançamento inadequado de esgoto ou simplesmente emissão, ao mar, de esgoto clandestino constitui um acréscimo de bactérias nesse meio ambiente, principalmente as enteropatogênicas. Através do consumo de peixes, essa carga microbiana pode retornar aos seres humanos e realimentar esse ciclo indefinidamente (FELDHUSEN, 2000).

Outra preocupante modalidade de poluição é a introdução de microrganismos patogênicos em águas marinhas, transportados por navios de regiões epidêmicas para locais não contaminados, por meio da água de lastro. O lastro é essencial para a manutenção da estabilidade e segurança dos navios em alto-mar quando navegam sem carga. A água armazenada no navio, em seu local de origem é despejada em águas próximas à costa dos países de destino, antes de receber nova carga, aumentando assim a poluição marinha. Essa prática contribuiu, por exemplo, para a reintrodução do *Vibrio cholerae* no continente americano. A sétima pandemia de cólera, iniciada na Ásia, entrou através do Peru em 1991 e se espalhou rapidamente pela América Latina e Golfo do México, matando 5 mil pessoas (McCARTHY e KHAMBATY, 1994; MATTÉ, 2003).

A manipulação inadequada do alimento também é fator que contribui com o desenvolvimento de microrganismos patogênicos ao homem. Pode ocorrer em toda a complexa cadeia que envolve o pescado, desde o momento de captura até o consumidor final.

Os estafilococos, por exemplo, estão presentes nas cavidades orofaríngea e nasal, nas mãos e unhas, cabelos e pêlos, além da pele e podem ser facilmente transmitidos aos alimentos, se não forem observadas práticas corretas de higiene (WERTHEIM et al., 2005).

Através da manipulação inadequada também podem ser introduzidos outros patógenos que constituem a flora natural de animais de sangue

quente como coliformes termotolerantes e salmonelas (SAKER-SAMPAIO e VIEIRA, 2004).

Microorganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. embora presentes inicialmente em pequenas quantidades no alimento podem causar infecção gastrointestinal, se não forem observadas boas práticas de manipulação e conservação dos alimentos.

#### 1.4 OS PEIXES COMO ORIGEM DE DTAs

O pescado apresenta-se em muitas ocasiões como um veículo importante de infecções gastrointestinais. Muitas espécies enteropatogênicas são encontradas em peixes, inclusive aqueles mantidos sob refrigeração (DALTON et al., 2004). Peixes e frutos do mar estão envolvidos, nos Estados Unidos, em 19% dos surtos de doenças causadas por alimentos de origem conhecida (OLSEN et al., 2000).

Entre 1992 e 1999, 1.425 surtos de infecção intestinal foram reportados na Inglaterra e País de Gales. Foram associados com o consumo de peixe e frutos do mar 148 (10%) dos surtos, dentre os quais 47% foram relacionados ao consumo de peixes, 36% ao consumo de moluscos e 11% ao consumo de crustáceos (GILLESPIE et al., 2001).

Na Europa, a contribuição de pescado em surtos de doenças transmitidas por alimentos variou entre 0,3 a 12,2%, dentre 16 países pesquisados, como pode ser observada na tabela 1 (TIRADO e SCHMIDT, 2000).

Dados australianos mostram que dentre 173 surtos de origem alimentar, com tipo de alimento implicado conhecido, depois da carne associada em 64 (30%) dos surtos, o segundo veículo mais freqüentemente implicado entre 1995 e 2000 naquele país foram peixes em 34 (16%) dos surtos, seguido pelos frutos do mar responsáveis por 13 (6%) deles (DALTON et al., 2004; HALL et al., 2005).

No Brasil, entre 1999 e 2004, em aproximadamente 33% (1.243/3.737) dos surtos não foi possível determinar o tipo de alimento implicado, enquanto peixes e frutos do mar foram implicados em 1% e 0,37% destes surtos, respectivamente (CARMO et al., 2005). Mesmo na ausência de informações confiáveis sobre o número de casos de doenças provocadas por alimentos contaminados, sabe-se que o pescado está fortemente relacionado com toxinfecções, principalmente quando é oferecido em locais sem condições de salubridade (AZEVEDO FILHO et al., 2004, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002).

**Tabela 1:** Número e porcentagem de surtos ocasionados por alimentos, nos quais o alimento implicado foi identificado como peixe ou frutos do mar em países europeus, entre 1993 e 1998, segundo o país e total de surtos.

País	Total de Surtos	Pescado	
		N.º	%
Alemanha	811	11	1,4
Bélgica	354	6	1,7
Bulgária	99	1	1,0
Croácia	338	10	3,0
Dinamarca	324	4	1,2
Escócia	33	2	6,1
Espanha	5517	418	7,6
Finlândia	295	36	12,2
França	2189	206	9,4
Holanda	2524	149	5,9
Itália	84	6	7,1
Noruega	165	18	10,9
Polônia	2558	7	0,3
Portugal	110	7	6,4
Romênia	375	8	2,1
Suécia	526	55	10,5
<b>Total</b>	<b>17246</b>	<b>1076</b>	<b>6,2</b>

Fonte: Os dados foram compilados do 7º Relatório do Programa de Vigilância Europeu no Controle de Infecções e Intoxicações devido a DTAs da OMS (TIRADO e SCHMIDT, 2000).

## 1.5 AGENTES ETIOLÓGICOS

Existem basicamente duas formas de doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados. Uma delas é a infecção, com sintomas como diarreia, náuseas, vômitos, dores abdominais e febre dentre outros. A outra forma é a intoxicação, cujos sintomas se iniciam com náuseas, vômitos, câimbras abdominais, diarreia, sudorese, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e que se distingue da primeira principalmente pela ausência de febre, que pode ocorrer, porém raramente. Podem apresentar-se como um quadro leve e passageiro, uma septicemia ou até levar à morte, dependendo das condições do indivíduo e da dose infectante (TAUXE, 2002). As toxinas desses microrganismos induzem a mudança no transporte de íons das células do epitélio intestinal, resultando na perda de eletrólitos (sobretudo de sódio e potássio), juntamente com a água, produzindo diarreia.

### 1.5.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é um microrganismo considerado como habitante natural da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente sendo, portanto, normalmente encontrado nas fezes destes animais. A maioria das cepas de *E. coli* são comensais

intestinais inofensivas (NATARO e KAPER, 1998; SCHMIDT e HENSEL, 2004).

São classificadas como bastonetes retos, Gram negativos, não-formadoras de esporos, móveis através de flagelos ou imóveis. São anaeróbias facultativas e utilizam glicose e outros carboidratos com a formação de ácido e gás (ØRSKOV, 1984).

Existem basicamente seis diferentes grupos de *E. coli* enteropatogênicas, sendo classificados de acordo com: propriedades de virulência, sorotipos O:H e interações com a mucosa intestinal, síndrome clínica e epidemiologia. As espécies são classificadas por sorotipagem, usando anticorpos, especialmente contra antígenos "O", somático e "H" flagelar, de várias cepas (WOLF, 1997).

Algumas espécies de enterobactérias são divididas em tipos sorológicos, ou sorotipos, tomando-se por base a especificidade imunológica dos chamados antígenos O, K e H. Embora praticamente todas as espécies tenham sido investigadas quanto aos sorotipos, somente algumas, como as *E. coli*, são sorotipadas em rotina. Na maioria das vezes, a sorotipagem tem finalidade epidemiológica, mas com relação às *E.coli* esta se faz necessária também para caracterizar os sorotipos enteropatogênicos que não podem ser diferenciados apenas por provas bioquímicas (NATARO e KAPER 1998, TRABULSI et al., 2002).

As cepas de *Escherichia coli* diarreio gênicas incluem os seguintes patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (LEVINE, 1987; NATARO e KAPER, 1998). Em conjunto são as causas mais comuns de diarreia aguda em crianças de países em desenvolvimento (O'RYAN et al., 2005).

A *E. coli* enteropatogênica, EPEC, é conhecida como causadora de surtos de diarreia neonatal que ocorrem freqüentemente em berçários hospitalares. Em países em desenvolvimento como o Brasil, México e África do Sul, tem sido implicada em 30-40% dos casos de diarreia infantil (TRABULSI et al., 2002). Em países industrializados, a incidência desses organismos tem decrescido, porém continuam sendo uma importante causa de diarreia em creches e berçários (NATARO e KAPER, 1998). Muitos adultos possuem EPEC no trato intestinal, porém não expressam os sintomas da doença. Acredita-se que adultos adquiram imunidade a este microrganismo (CHEN e FRANKEL, 2005).

A *Escherichia coli* enterotoxigênica, ETEC, é mais associada a adultos em países desenvolvidos à chamada "diarreia do viajante" do que às doenças alimentares, e em crianças em países em desenvolvimento é causa de diarreia. Os sintomas de ETEC são similares aos da cólera, ou seja, diarreia aquosa, desidratação, choque, e algumas vezes vômito. Podem ser expressas em cada cepa, uma ou mais toxinas, que agem no intestino

delgado induzindo a liberação de fluído. Não ocorre invasão nem dano à camada epitelial do intestino delgado, apenas ocorrem colonização e produção de toxinas. Diversos tipos de fatores de colonização têm sido identificados e demonstram serem específicos dessa espécie (TORRES et al., 2005).

Outro grupo de *E. coli* patogênico é o das enteroinvasivas, EIEC, cuja patologia é muito semelhante à da *Shigelose*. Os sintomas são calafrios, febre, dores abdominais e disenteria. O período de incubação varia de 8 a 24 horas com média de 11 horas e a duração da doença é usualmente de vários dias (VIEIRA et al., 2004). O microrganismo invade células do epitélio intestinal, os enterócitos, multiplicando-se e espalhando-se pelas células adjacentes provocando ulcerações do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta.

O quarto grupo é o das *Escherichia coli* entero-hemorrágicas, EHEC. Entre os grupos de *E. coli* patogênicas este é, provavelmente, o mais importante em termos de infecções alimentares, e o principal sorotipo envolvido é o O157:H7 (DOYLE, 1991; CHAPMAN et al., 2001; TORRES et al., 2005). A infecção por *E. coli* O157:H7 é bastante severa e pode ser expressa por três manifestações diferentes: colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e trombocitopenia trombótica púrpura (TTP).

A *Escherichia coli* enteroagregativa, EAEC, compreende um grupo de cepas de *E. coli* cuja principal característica é a produção de um padrão de aderência exclusivo em células HEp-2 (células epiteliais de origem

epifaríngea), que lembram tijolos empilhados. São muitas vezes isoladas de crianças saudáveis (O'RYAN et al., 2005; TORRES et al., 2005).

O termo *Escherichia coli* difusamente aderente, DAEC, descreve a característica de adesão à superfície de células HEp-2, observada em um grupo de cepas de *E. coli* bastante heterogêneo (SERVIN, 2005). DAEC é reconhecida como potencialmente causadora de diarreia, porém há controvérsias sobre seu papel.

Embora surtos relacionados com alimentos, envolvendo *Escherichia coli*, sejam raros em países desenvolvidos, em 1993 várias crianças adoeceram e duas faleceram num surto envolvendo a contaminação por *E. coli* O157:H7 de hambúrguer malcozido em uma cadeia de *fast-food* americana (CDC, 1993; HELMS et al., 2006).

Após inúmeros surtos registrados em 1996, no Japão, *E. coli* O157:H7 passou a ser doença de comunicação compulsória. Desde então, os laboratórios públicos pesquisam EHEC em alimentos suspeitos, por meio de técnicas moleculares. TERAJIMA et al., em 1999, isolaram *E. coli* O157:H7 de um surto envolvendo 49 pacientes e 13 portadores, ocasionado por ingestão de *ikura-sushi* (bolinho de arroz com ovas de salmão), em sete cidades do país. Por meio do perfil molecular, a fonte de contaminação foi determinada como sendo as ovas de salmão de um único fornecedor.

O modelo de prato pronto para o consumo mantido a 18°C foi copiado do Japão e adotado pela indústria chinesa. Dentre esses alimentos, estão

disponíveis nas lojas de conveniência de Taiwan *sushis* e *temakis* (*sushi* enrolado em formato de cone). Dentre 22 amostras de *sushis* e 25 amostras de *temakis* analisadas, FANG et al. (2003), isolaram coliformes em 15 (68%) e 21 (84%), respectivamente. *Escherichia coli* estava presente em 1 (4,6%) amostra de *sushi* e em 4 (16%) amostras de *temakis*.

Na avaliação da qualidade de preparações à base de peixe cru em bufês da cidade de São Paulo, *E. coli* foi isolada em 45% do total de 20 amostras (MARTINS, 2006).

### 1.5.2 *Salmonella* spp.

As salmonelas, assim como os coliformes, compõem a família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes Gram negativos, não-esporulados, móveis ou imóveis. Embora possam ser encontradas amplamente na natureza, em sua maioria habitam os intestinos do homem e dos animais de sangue quente. Todas as espécies são consideradas patogênicas para o homem, por isso são sorotipadas em rotina, com finalidade epidemiológica, de acordo com seus antígenos somáticos e flagelares (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

A bactéria pode também ser disseminada por pessoas infectadas, durante a manipulação dos alimentos. Espécies de *Salmonella* podem produzir três tipos de doenças: febre tifóide, gastroenterite e agravos em

órgãos específicos, acompanhados de septicemia. Se não for tratada a doença pode levar à morte (FELDHUSEN, 2000, CDC, 2002).

A febre tifóide é a denominação da infecção causada pela *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi*. Os sintomas clínicos são: mal-estar geral, dor de cabeça, febre alta e persistente, dor abdominal, vômito, suor e anorexia. O período médio de incubação é de 14 dias. Septicemia ocorre geralmente 10 dias após o início da infecção, sendo a vesícula biliar o alvo da infecção (CVE, 2003).

A *Salmonella enterica* causa gastroenterite. A infecção, denominada salmonelose, é caracterizada por diarreia, dores abdominais, febre branda, calafrios, náusea, anorexia, dores de cabeça. Os sintomas surgem entre 10 e 36 horas depois da infecção e duram de 2 a 5 dias. Em idosos e crianças de pouca idade, mesmo um pequeno número de bactérias pode causar a doença, principalmente se estiverem contaminando alimentos com alta taxa de gordura (HENNESSY et al., 1996).

As salmonelas crescem rapidamente em uma variedade de alimentos, gordurosos como ovos, carne, chocolate e leite. Salmonelose é uma das doenças mais freqüentemente reportadas em muitos países (CDC, 2005). Na Inglaterra, por exemplo, a taxa de infecção anual está em torno de 500 casos/milhão de pessoas (FELDHUSEN, 2000).

Um surto de salmonelose atingiu 35 estados americanos em 1994 por causa de sorvete contaminado. Os pesquisadores estimaram que

gastroenterite por *Salmonella* Enteritidis tivesse atingido 224 mil pessoas que comeram sorvete da marca “Schwan”. Foram isoladas cepas de 8 dentre 226 amostras do produto (HENNESSY et al., 1996).

De modo geral, na Europa e Estados Unidos, casos de salmonelose associados ao consumo de peixes e crustáceos são raros se comparados com aqueles associados com outros alimentos, como aves, por exemplo. (FELDHUSEN, 2000; FELL et al., 2000).

CATO (1998), compilando dados reportados ao ministério da saúde japonês, no período entre 1987 e 1996, somou 57 surtos de salmonelose, que originaram 3.145 casos, nos quais peixes e frutos do mar ou seus derivados estavam implicados.

Surtos esporádicos de salmonelose foram registrados na região central do Japão, em 1999. Os casos atingiram crianças entre 1 e 12 anos de idade, provocando diarreia aquosa e/ou hemorrágica, com presença ou não de muco. Estudos epidemiológicos identificaram como agente etiológico a *Salmonella* Oranienburg e como veículo “Oyatsu-Chinmi” um tipo de salgadinho processado de lula. Após o primeiro isolamento dessa variedade de *Salmonella*, o número de registros de surtos causados por alimentos contendo lula aumentou em várias partes do Japão (HAMADA et al., 1999).

Em 2000, FELL et al. investigaram um surto envolvendo 14 casos de *Salmonella* Blockley, na Alemanha, determinando como fonte das infecções o consumo de enguias defumadas, fornecidas vivas por dois criatórios de

uma cidade da Itália. O isolamento desta sorovariedade é raro, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos, particularmente na Alemanha, onde a taxa de isolamento é menor que 0,5%.

Na Europa, surtos envolvendo *Salmonella* Linvingstone são raramente reportados e estão relacionados com aves. No entanto, em 2001, GUERIN et al. (2004) isolaram essa sorovariedade em fezes, urina e sangue de pacientes de diversas localidades na Noruega e Suécia. Dos 60 casos reportados, 22 (37%) pessoas foram hospitalizadas e 3 (5%) foram a óbito duas semanas após a infecção. Dentre os doentes, 47 (78%) tiveram gastroenterite, 4 (7%), infecção do trato urinário (ITU), 7 (12%), gastroenterite e ITU concomitantemente, um caso de infecção em ferimento abdominal e um caso assintomático. Os pesquisadores comprovaram que o veículo implicado foi uma determinada marca de peixe processado.

Surtos de doenças de origem alimentar envolvendo *sushi* são raramente descritos na literatura, no entanto, BARRALET et al. (2004), investigando um surto de *Salmonella* Singapore, na Austrália, registraram 12 casos associados ao consumo de *sushi*. Somente foi possível determinar o estabelecimento implicado, mas não o tipo de *sushi*, devido à variedade oferecida e frequência no consumo.

Para esclarecer o aumento do número de casos por *S. Paratyphi* B var. Java, GAULIN et al. (2005) utilizaram PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) para comparar cepas isoladas em água de aquários, com cepas isoladas de amostras clínicas. Dentre os indivíduos envolvidos no

surto, 60% tiveram contato com peixes ou tanques/aquários de peixes tropicais e mais que 50% das amostras de água de aquários caseiros ou de *pet shops* foram positivas para essa variedade de *Salmonella*.

LIMA e REIS (2002) isolaram *Salmonella* spp. em 7 (35%) pacus de um total de 20 amostras de diversas origens. Dentre elas, 2 (28,5%) oriundas de feiras livres da cidade de Cuiabá (MT).

Em Pernambuco, AZEVEDO FILHO et al. (2004), durante investigação de surto de diarreia, isolaram *Salmonella* spp. em 8 (1,4%) amostras de fezes, dentre 582 amostras clínicas pesquisadas. O abastecimento de água da cidade era precário e a população utilizava-se de fontes de água bruta sem tratamento para suprir suas necessidades, sendo esta, de acordo com os autores, a provável causa da infecção, embora não se tenha isolado o patógeno do ambiente.

Avaliando a qualidade sanitária em pesqueiros paulistanos, MORITA (2005) identificou por provas bioquímicas e sorológicas, confirmadas por biologia molecular, 14 cepas de *Salmonella* spp., dentre 30 amostras de água pesquisadas.

### 1.5.3 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* pertence a um grupo de microrganismos Gram positivos, não-formadores de esporos, da família *Micrococcaceae*. Possui 38 espécies e 24 subespécies (DSMZ, 2005), dentre as quais 18 produtoras de enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Podem produzir coagulase ou não. É um microrganismo comensal humano e também um patógeno oportunista. Além do homem, coloniza a pele e as mucosas de várias espécies de animais de sangue quente. *S. aureus* é mais freqüentemente encontrado no vestíbulo nasal. A pele, a faringe e o períneo são outros locais que abrigam o microrganismo. Com menos freqüência, o trato gastrintestinal, a vagina e a axila também podem ser fontes de *S. aureus* (WERTHEIM et al., 2005).

Estudos de prevalência demonstram que entre a população adulta a taxa de portadores de *S. aureus*, no vestíbulo nasal, tem se mantido em aproximadamente 27% desde o ano 2000. Esse valor é menor que a taxa de 35% reportada anteriormente, a qual incluía estudos desde 1934 (WERTHEIM et al., 2005).

Portadores assintomáticos possuem um papel importante na manutenção e disseminação desses microrganismos, especialmente pessoas ligadas a atividades relacionadas com processamento de alimentos e saúde (GONZÁLEZ-ROMO et al., 2003).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno de grande importância dentre os Gram positivos, afetando pessoas de todas as idades. Causa frequentemente infecções de significância clínica, tais como pneumonia, endocardite, sinusite, artrite, osteomielite, síndrome do choque tóxico e infecções do trato urinário, devido principalmente às infecções hospitalares. Também causa intoxicação, pela ingestão de alimentos contendo toxinas pré-formadas (CHAMBERS, 2001).

A maioria dos *S. aureus* depende de fatores ambientais para a produção de toxinas. Forma um conjunto de 18 tipos conhecidos de enterotoxinas, além da toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1, do inglês, *Toxic Shock Syndrome Toxin-1*), anteriormente denominada SEF. As enterotoxinas estafilocócicas foram designadas por SE (*Staphylococcal Enterotoxin*), e são acrescidas por letras do alfabeto, à medida que estão sendo descobertas. São elas: SEA até SEE (sendo que SEC possui subdivisão: SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>), SEG até SER e SEU. Os tipos de enterotoxinas envolvidos em surtos vão de SEA até SED (FOSTER, 2005; HOLTFRETER e BROKER, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são resistentes às principais enzimas proteolíticas, por isso não são inativadas pelas proteases gastrointestinais, como a pepsina e tripsina. Possuem também resistência ao tratamento térmico, sendo essa a característica mais importante em termos de segurança alimentar (BALABAN e RASOOLY, 2000). Essas toxinas são consideradas superantígenos, por serem moléculas capazes de

estimular o sistema imune, ativando a produção maciça de linfócitos T inespecíficos (HOLTFRETER e BROKER, 2005).

Embora pouco se saiba sobre a forma de penetração através do intestino e o mecanismo de ação que leva à intoxicação alimentar, sabe-se que a enterotoxina liga-se ao nervo vago. Por essa razão, a infecção por estafilococos é caracterizada principalmente por produzir vômitos “em jatos”, além de náuseas, dores abdominais e diarreia, 2-6 horas após a ingestão do alimento contaminado. A infecção é autolimitada, sendo que a recuperação do paciente ocorre entre 1 a 3 dias após o aparecimento dos sintomas, por essa razão é pouco relatada. Casos de morte por intoxicação alimentar são raríssimos em indivíduos hígidos (VINCENT et al., 2006).

No Japão, *Staphylococcus aureus* foi responsável por 91 surtos, tendo como veículo peixe, marisco e derivados, que resultaram em 2.026 casos, no período compreendido entre 1987 e 1996. Entre produtos derivados de peixe e marisco, foram contabilizados 82 surtos e 4.068 casos envolvendo bactérias, dentre os quais 28 (34%) surtos e 1.068 (26%) casos foram atribuídos à contaminação por *S. aureus* (CATO, 1998).

Nos Estados Unidos, menos de 10% de surtos de origem alimentar são devido a *S. aureus*. Raramente envolvem alimentos preparados industrialmente. Entretanto a manipulação de alimentos em restaurantes ou mesmo em cozinhas domésticas, sem os cuidados de higiene necessários, pode ser a causa da grande maioria dos surtos (CATO, 1998).

CUNHA NETO et al., (2002) analisaram 37 amostras de camarão *in natura* procedentes da bacia pesqueira do litoral de Natal (RN) e delas selecionaram uma cepa de estafilococos coagulase positiva. O mesmo procedimento foi realizado em 75 amostras de alimentos processados, incluindo peixe cozido, perfazendo um total de 15 cepas. As espécies de *Staphylococcus* isoladas nos alimentos foram *S. aureus*, *S. intermedius* e estafilococos coagulase positiva. Todas as cepas submetidas ao teste de produção de enterotoxinas apresentaram-se positivas e foram isoladas de camarão, queijo tipo coalho, macarrão, peixe cozido e pasta de alho. Apenas o camarão apresentou-se positivo para *Staphylococcus aureus*, porém dentro do valor permitido pela legislação ( $5 \times 10^2$  UFC/g – Unidades Formadoras de Colônias por grama).

OETTERER et al., (2003), monitorando o processo de fermentação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*), em 4 processos de tratamento diferentes (peixes inteiros e eviscerados, ambos com e sem condimentos, acrescidos de 20% de sal), analisaram as amostras *in natura* e nos períodos de 1, 15, 30, 45 e 60 dias de fermentação e evidenciaram que *Staphylococcus aureus* apresentaram baixas contagens, em todos os processos testados.

#### 1.5.4 *Aeromonas* spp.

O gênero *Aeromonas* é conhecido como patógeno de peixes desde 1894 (KIRKAN et al., 2003). Sofreu inúmeras revisões taxonômicas nos últimos anos. Embora inicialmente localizado como um gênero da família *Vibrionaceae* (POPOFF, 1984), a qual inclui além do *Vibrio* os gêneros *Photobacterium* e *Plesiomonas*, subseqüentes investigações filogenéticas indicaram que o gênero *Aeromonas* não está estreitamente relacionado a essa família. Atualmente existem 14 espécies descritas por meio de características bioquímicas e grupos de hibridização de DNA (ABBOTT et al., 1998, 2003; ØRMEN et al., 2005). Presentemente, localizado em família própria, *Aeromonadaceae* (COLWELL et al., 1986), o gênero *Aeromonas* é composto por bacilos Gram negativos, imóveis e móveis por meio de flagelo polar, fermentadores, anaeróbios facultativos e que apresentam reação de oxidase positiva, característica que o distingue das enterobacteriaceas (POPOFF, 1984).

O gênero *Aeromonas* engloba um grupo de organismos amplamente espalhados pelos ambientes aquáticos, devido principalmente à sua extrema adaptabilidade (MATTÉ, 1995). Embora identificado primeiramente em águas marinhas e salobras, tem sido isolado de água potável, inclusive clorada, destinada ao abastecimento público (GAVRIEL et al., 1998; SEN e RODGERS, 2004; PAVLOV et al., 2004), e até em águas minerais engarrafadas (TSAI e YU, 1997; VENIERI et al., 2006; VILLARI et al., 2003; PIANETTI et al., 2005). *Aeromonas* spp. também são contaminantes comuns

de anfíbios, répteis, aves, peixes e mamíferos (PASQUALE et al., 1994; JANDA e ABBOT, 1998). A patogenicidade de algumas espécies para homens e animais já foi demonstrada (SEN e RODGERS, 2004).

No Brasil, MATTÉ em 1995 isolou *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *A. jandaei* em água de represa, tanto na superfície da água quanto no sedimento, enquanto FALCÃO et al. (1998), pesquisando água de rios, represa e de irrigação, isolaram 3 espécies de *Aeromonas*. No mesmo ano, RAZZOLINI isolou espécies de *Aeromonas* procedentes de bebedouros e caixas de água em algumas regiões de São Paulo. GIBOTTI et al. (2000) isolaram 32 cepas de *Aeromonas* provenientes de 70 amostras de águas de rio. ROCHA (2004) isolou *Aeromonas* spp. em lagoas de estabilização e unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio.

Na Itália, MESSI et al. (2002) encontraram espécies de *Aeromonas* na água mineral e sugerem a capacidade de *Aeromonas hydrophila* sobreviver a esse microambiente por tempo prolongado. Na região de Lecce, também na Itália, MASSA et al. (2001) relataram o isolamento de *Aeromonas* spp. em 10% das amostras de poços de água estudados. Na Espanha, SOLER et al. (2002) isolaram 102 *Aeromonas* spp de água de reservatórios, rios e água do mar, registrando inclusive resultado inédito, a ocorrência de *Aeromonas popoffii* em água do mar. IVANOVA et al. (2001) estudaram pela primeira vez a incidência desse gênero em água de abastecimento próximo à cidade de Vladivostok na Rússia.

FILLER et al. (2000) associaram *Aeromonas sobria* isolada de água de aquário a caso de falha renal aguda em criança, hospitalizada em Ontário, Canadá.

A maioria dos fenótipos de *Aeromonas* é encontrada em águas contaminadas por esgoto e lodo ativado. A presença destes microrganismos é favorecida pelo conteúdo de matéria orgânica presente na água, portanto sua sobrevivência é aumentada em águas poluídas e com descarga de esgotos (MATTE, 1995; RAZZOLINI, 1998).

Embora a sobrevivência e o crescimento desses organismos em água do mar ainda estejam sendo discutidos, muitos estudos indicam que frutos do mar em geral possuem um maior risco de estarem contaminados com *Aeromonas* spp. (TSAI e CHEN, 1996; HÄNNINEN et al., 1997; NEYTS et al., 2000).

São também encontrados em diferentes tipos de alimentos, de diversas origens, inclusive aqueles mantidos sob refrigeração. Os principais são os alimentos de origem marinha, porém são encontrados também em queijo e vegetais (GONZÁLES-RODRÍGUEZ et al., 2002; BULHÕES e ROSSI Jr., 2002).

HÄNNINEN et al. (1997) isolaram em peixe e derivados, do comércio local de Helsinque, Finlândia, cepas potencialmente patogênicas de *Aeromonas* spp. *Aeromonas* estavam presentes em 100% de amostras de ovas de peixe e água (17 e 23 amostras, respectivamente), em 93% (27) de

amostras de peixe e 16% (2) de amostras de camarão. O total de 117 cepas foi isolado de 69 amostras, muitas das quais continham até mais que 3 espécies de *Aeromonas*, dentre elas: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii sobria* e *A. veronii veronii*, já associadas à gastroenterite.

NOJIMOTO et al. (1997), visando conhecer a epidemiologia de *Aeromonas* spp. em Goiânia (GO), analisaram 163 amostras de fezes diarréicas e não-diarréicas de crianças com idade inferior a 5 anos, sem antibioticoterapia. Das 91 amostras de fezes diarréicas foram isoladas 20 (21,9%) cepas de cinco espécies diferentes de *Aeromonas* spp. (*A. caviae*, *A. salmonicida* var. *salmonicida*, *A. salmonicida* var. *achromogenes*, *A. sobria*, e *A. hydrophila*). Dentre as 72 amostras de fezes não-diarréicas, a presença de *Aeromonas* spp. foi negativa. Os pesquisadores demonstraram que todas as cepas de *A. hydrophila* e *A. caviae* isoladas apresentavam atividade hemolítica, sugerindo que outros fatores possam estar envolvidos na regulação da patogenicidade das demais cepas.

RALL et al. (1998) isolaram *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. sobria* em amostras de pintado (*Pseudoplatystoma* sp.) comercializadas em supermercados de São Paulo. Um total de 50 amostras de peixe foi coletado e processado por meio de duas técnicas. Pelo método de presença/ausência, 21 (42%) amostras de peixe foram positivas, enquanto 24 (48%) amostras foram positivas pelo método de plaqueamento direto. Verificou-se a produção de enterotoxina *in vitro* em 88% das cepas de *A. hydrophila*, 27% das cepas de *A. sobria* e 13% das cepas de *A. caviae*. No

teste *in vivo*, 67% das cepas de *A. sobria*, 60% das cepas de *A. hydrophila* e 40% das cepas de *A. caviae* revelaram-se positivas.

SANTOS et al. (1999) demonstraram a presença de gene relacionado à aerolisina, enzima responsável pela hemólise de eritrócitos, em cepas de *Aeromonas caviae*, *A. eucrenophila*, *A. jandaei* e *A. hydrophila*, isoladas de amostras de peixes diversos.

GONZÁLES-RODRÍGUEZ et al. (2002) estudaram 20 lotes de filés frescos sem pele de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 10 de postas de salmão (*Salmo salar*), adquiridos em supermercados. Durante o armazenamento das amostras, a refrigeração foi mantida em 3°C. Foram isoladas cepas de *Aeromonas* em ambos os tipos de amostras. As espécies mais isoladas de filés de truta foram: *A. veronii* var *sobria*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila* e *A. veronii* var *veronii*, nessa ordem. Das postas de salmão foram isoladas *A. caviae* e *A. veronii* var *sobria*.

A presença de *Aeromonas* foi pesquisada em 87 amostras de vários tipos de peixes comercializados na Malásia, das quais foram isoladas *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* var *sobria* (RADU et al., 2003). Na Índia, em 33,58% (180/536) das amostras de peixes analisadas, comercializados no mercado de Coimbatore, foram isoladas *Aeromonas hydrophila* (VIVEKANANDHAN et al., 2005).

Caracterizando cepas de *Aeromonas hydrophila*, isoladas de diversos órgãos (fígado, rins, brânquias e baço) de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e

pacu (*Piaractus mesopotamicus*), COSTA (2003) concluiu que duas linhagens dessa espécie possuíam capacidade virulenta, uma vez que produziram enterotoxinas estáveis ao calor, importante fator na patogênese de *Aeromonas* associadas às gastroenterites.

ULLMANN et al. (2005) isolaram espécies patogênicas de *Aeromonas* em 84 amostras de frutos do mar, incluindo salmão. Dentre as espécies isoladas *A. hydrophila* foi a mais freqüente com 14% das amostras positivas, seguida por *A. caviae* e *A. sobria*. Os pesquisadores também comprovaram a produção de fatores de virulência nas cepas isoladas.

MORITA (2005), pesquisando a presença de bactérias patogênicas do gênero *Aeromonas* em 30 pesque-pagues da região metropolitana de São Paulo, coletou de cada estabelecimento 100 mL de água e uma amostra de peixe. Das 30 amostras de água e peixe, foram isoladas respectivamente 10 e 8 espécies de *Aeromonas*. As seguintes espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas foram isoladas: *A. allosaccharophila*, *A. trota*, *A. jandaei*, *A. veronii sobria* e *A. hydrophila*. O autor sugere que a quantidade e diversidade de espécies encontradas representam risco à saúde dos usuários desses estabelecimentos, consumidores de produtos de pesca.

O gênero *Aeromonas* já foi descrito como patógeno emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (RALL et al., 1998) e existem vários estudos relacionando suas espécies com doenças em homens e animais (BAUAB et al., 2003; BORCHARDT et al., 2003; ARDEHALI et al., 2006)

Inúmeros estudos realizados demonstraram sua patogenicidade associada à presença de fatores de virulência, tais como enterotoxinas hemolíticas (MATTÉ 1995, 1996), citotoxinas (CHOPRA et al., 2000), quitinases, proteases, nucleases, lipases entre outros (MORITA, 2005; ROCHA, 2004; BAUAB, 2000), que dependendo da atuação em conjunto ou isoladas podem provocar doença (MOYER, 1987; KRZYMINSKA et al., 2001).

As formas móveis de *Aeromonas* estão relacionadas a diversas doenças no homem, principalmente diarreia autolimitante e mesmo severas semelhantes à colérica. Embora sejam as infecções gastrointestinais a forma mais comum de manifestação clínica, espécies de *Aeromonas* são agentes etiológicos de uma variedade de doenças. A capacidade de produzir doença em diferentes espécies animais já está bem documentada pela literatura. Porém seu papel como patógeno humano vem sendo discutido nas últimas três décadas e ainda está sendo elucidado, sendo considerados patógenos emergentes. Devido a essa ubiquidade existe uma grande discussão sobre seu papel como contaminante (BALOTESCU et al., 2003).

Nos agravos não-gastrointestinais atribuídos a *Aeromonas* estão incluídos infecção de tecidos moles, peritonites, infecções do trato urinário (OJEDA-VARGAS, 2005), meningites, septicemia e bacteremia (JANDA e ABBOTT, 1998; KO et al., 2000). A associação de *Aeromonas* com infecções primárias envolvendo fígado, sistema biliar e pâncreas também foi descrita (CLARK e CHENOWETH, 2003).

Foram isoladas de surtos de gastroenterites (FREITAS et al., 1998) de forma colérica e/ou disentérica ou diarreia crônica, colite ulcerativa em adultos e crianças, assim como de infecções extraintestinais em pacientes imunocomprometidos (KO e CHUANG, 1995; KO et al., 2005). Nesse aspecto inclui um amplo número de problemas em tecidos de variados locais, como articulações, ossos, sistema respiratório, pele (micronecrose, abscesso, celulite, furúnculos); trato urinário, olhos, meninges (PARRAS et al., 1993), endocárdio, peritônio, além de doenças hepatobiliares, choque endotóxico e sepsis (MUNOZ et al., 1994; GARCIA-IRURE et al., 2003). As infecções não-intestinais, produzidas por *Aeromonas*, principalmente *A. hydrophila* e *A. veronii*, provocam uma alta letalidade, especialmente em imunodeprimidos, devido ao pouco conhecimento no que diz respeito à resistência dessas bactérias aos antimicrobianos.

SCOGLIO et al. (2001), estudando fatores de virulência em 7 cepas de *A. hydrophila* e 11 cepas de *Aeromonas caviae* isoladas de amostras de frutos do mar, detectaram que 100% das cepas eram produtoras de lipase e apresentaram aderência às células do epitélio de mamíferos, enquanto somente as cepas de *A. hydrophila* (100%) eram produtoras de DNase e caseinase.

No Brasil foi registrado em 2004 um surto de doença diarreica aguda. Embora não tenham sido implicadas como agente causal do surto, cepas de *Aeromonas* potencialmente patogênicas foram também isoladas. Do total de 582 amostras clínicas de fezes, colhidas para pesquisa de vários patógenos,

foram isoladas *A. veronii caviae* em 10% (58), *A. veronii sobria* em 4% (23), *A. veronii veronii* em 2,6% (15) e *A. veronii media* em 1,2% (7) (AZEVEDO FILHO et al., 2004). Segundo os autores, a água foi o veículo implicado neste surto, uma vez que o fornecimento municipal era intermitente e a população utilizava açudes para compensar a escassez.

VILA et al. (2003), estudando a prevalência de *Aeromonas* spp. associadas à diarreia dos viajantes, isolaram as seguintes espécies: *A. veronii sobria*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *A. hydrophila*, embora as espécies que se associaram à doença, de forma mais significativa, tenham sido as duas primeiras.

MARTINS et al. (2002) estudaram a incidência de *Aeromonas* em infecções humanas e em alimentos e para a identificação das espécies basearam-se na classificação de POPOFF (1984). Demonstraram que 46 (24%) das *Aeromonas* spp isoladas produziam enterotoxinas. A espécie produtora de enterotoxina mais freqüente em amostras clínicas foi *A. veronii* e a mais isolada de amostras de alimentos foi *A. sobria*. Em relação à atividade hemolítica, a espécie com maior ocorrência em amostras clínicas e de alimentos foi *A. veronii* (70%). Das 194 *Aeromonas* spp isoladas, 157 (89%) produziram citotoxinas.

### 1.5.5 *Vibrio* spp.

Dentre os patógenos mais relevantes, encontram-se os do gênero *Vibrio* que são bacilos curvos Gram negativos, móveis por meio de flagelos e habitantes do meio aquático (BAUMANN et al., 1984). A espécie mais importante para a saúde pública é a *Vibrio cholerae*, uma bactéria enterotoxigênica causadora da cólera, doença endêmica na Índia e em Bangladesh.

A doença conhecida como cólera é o resultado da ingestão de alimento ou água contaminados com *Vibrio cholerae* produtor de toxina, que compreende vários grupos sorológicos, caracterizados por antígenos somáticos. Durante a sétima pandemia de cólera, o agente etiológico responsável foi o *Vibrio cholerae*, sorogrupo O1, biotipo El Tor. Entretanto, em 1993, foram publicados dados sobre uma epidemia causada por um novo sorogrupo, o O139 ou Bengal, biotipo El Tor, que vem sendo considerado como possível causador de uma próxima pandemia de cólera (REIDL e KLOSE, 2002; MATTÉ, 2003).

O biotipo El Tor difere do clássico por ser mais tolerante ao meio ambiente (maior capacidade de sobreviver na água e produzir menor porcentagem de quadros severos). A via principal de transmissão da cólera é a água, porém alguns alimentos, como o pescado, podem veicular o vibrião (CALIA et al., 1994).

A única espécie que hospeda essa bactéria é o homem e a infecção limita-se à superfície da mucosa intestinal, onde a bactéria adere e após a colonização nas células epiteliais produz uma toxina potente, denominada toxina colérica (CT). Esta toxina é semelhante à enterotoxina termolábil de *E. coli* (RIVERA et al., 2001). O resultado final da infecção é uma desidratação por diarreia intensa, devido à elevação de AMP cíclico (cAMP) celular e interrupção do fluxo normal de íons no epitélio intestinal. Dependendo das condições do indivíduo e do tratamento dispensado, pode levar à morte.

Várias espécies de *Vibrio* são patogênicas para o homem, peixes e outros organismos marinhos, porém *V. cholerae*, responsável por sete pandemias, juntamente com *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, são responsáveis pela maioria dos surtos de doenças veiculadas por alimentos (MATTÉ, 2003).

A sétima pandemia de cólera, que teve início em 1961 e se espalhou para o mundo, chegou à América Latina em janeiro de 1991. A doença que no Brasil se iniciou na região Nordeste teve entre 1991 e 2000, 168.598 casos clínicos confirmados que resultaram em 2.035 óbitos (VITAL BRAZIL et al., 2002). Desde 2000, os casos confirmados de cólera têm sido registrados apenas na região Nordeste. Segundo o boletim de doenças de notificação compulsória os últimos 7 casos de cólera foram confirmados em 2001 (FUNASA, 2002), porém casos têm sido reportados após investigação

de surtos de diarreia no estado de Pernambuco (AZEVEDO FILHO et al., 2004, SOUSA et al., 2004).

AZEVEDO FILHO et al., (2004), investigando um surto de diarreia no sertão pernambucano, isolou de amostras de fezes *Vibrio cholerae* O1 Ogawa toxigênico. Dentre 1.146 casos de diarreia, foram analisadas 582 amostras de fezes e confirmados 18 casos de cólera.

*Vibrio parahaemolyticus* foi identificado e primeiramente investigado por japoneses em 1950 como um contaminante natural de peixes crus e crustáceos. Trata-se de uma bactéria halofílica, isto é, requer cloreto de sódio para seu crescimento. Gastrenterites devido ao *V. parahaemolyticus* estão quase sempre associadas ao consumo de frutos do mar e crustáceos, particularmente de pratos ao estilo da culinária japonesa, isto é, à base de frutos do mar crus ou levemente cozidos. Espécies de *Vibrio* podem sobreviver em ostras à temperatura de refrigeração acima de 14 dias (PEREIRA et al., 2004).

Entre peixes, mariscos e produtos derivados foram contabilizados, no período entre 1987 e 1996, no Japão, 707 surtos e 18.628 casos envolvendo *V. parahaemolyticus*. No mesmo período, *V. cholerae* não-O1 esteve envolvido em 3 surtos que resultaram em 28 casos, cujos alimentos também foram peixes e mariscos sem, no entanto, serem isolados de seus respectivos derivados (CATO, 1998).

OLIVEIRA et al. (2002), investigando um surto de gastroenterite aguda ocorrido entre participantes de evento científico na cidade de Fortaleza (CE), isolaram *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 (Kanagawa positivo) em 9 amostras de fezes dentre 20 casos. As amostras de ingredientes do almoço que incluíam “patinhas” de caranguejo cruas congeladas, mussarela de búfala, filé de peixe cru (sirigado) congelado, suspeito de contaminação, não se apresentaram positivas para *V. parahaemolyticus*. Não foi possível analisar sobras da refeição suspeita. Foram também isoladas cepas de *V. alginolyticus* em amostras de “patinhas” de caranguejo cruas, porém consideradas, pelo pesquisador, satisfatórias para consumo.

No Rio de Janeiro, PEREIRA et al., 2004, analisando 50 amostras de moluscos bivalves marinhos de restaurantes e coletados de seu habitat, isolaram 141 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. Embora os moluscos analisados estivessem próprios para consumo, do ponto de vista da legislação vigente à época, os pesquisadores alertavam para índice relevante de isolamento desse patógeno que apresentou cepas produtoras de urease e sorotipos reconhecidamente implicados em surtos de gastroenterite.

SOUSA et al. (2004) pesquisaram a presença de *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* em ostras de um estuário na região Nordeste do Brasil. Em 300 amostras de ostras, em um período de oito meses, *V. cholerae* foi o vibrião mais freqüentemente detectado (33,3% das amostras).

Dos 22 isolados, 20 foram identificados como *V. cholerae* não-O1/não-O139. *V. parahaemolyticus* foi isolado em apenas umas das coletas.

Outras espécies como *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. furnissii* e *V. mimicus* são potencialmente patogênicas e constituem risco para a saúde humana, já tendo sido relacionadas com infecções de origem alimentar (MATTÉ et al., 2007; ELHADI et al., 2004; DZIUBAN et al., 2006).

ELHADI et al. (2004) pesquisaram a presença de espécies patogênicas de *Vibrio*, durante um ano, em frutos do mar obtidos no comércio, em 11 locais diferentes de 4 estados da Malásia. Dentre as 768 amostras estavam incluídos camarão, lula, caranguejo, ostras e mariscos. Foram isoladas 7 espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* e *V. fluvialis*. De 97 cepas de *V. cholerae* isoladas, uma possuía o sorotipo O1, e 14, o sorotipo O139. Os pesquisadores demonstraram que o pescado vendido na Malásia representaria um risco potencial aos consumidores daquele país.

NASCIMENTO et al. (2001) isolaram e identificaram 29 cepas de *Vibrio vulnificus* a partir de 20 amostras de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), comercializado na feira de pescado de Mucuripe, Fortaleza (CE). Destas, 7 (amostras diferentes), foram submetidas a testes de virulência em camundongos e de sensibilidade a drogas antimicrobianas. Nenhuma cepa apresentou virulência e todas foram resistentes aos antibióticos: clindamicina, penicilina e ampicilina.

Uma avaliação realizada, no período de 1999 a 2003, pelo Departamento de Higiene Ambiental e Alimentar do Governo de Hong Kong demonstrou que no pescado o isolamento de *V. parahaemolyticus* representou 313 (56,7%) dos casos confirmados, dentre 1.465 (53,8%) pessoas afetadas (FEHD, 2005).

Estudo da ocorrência de vibrios em 107 amostras de moluscos bivalves, comercializados na região da Baía de Todos os Santos (BA), resultou no isolamento de 336 cepas de vibrios potencialmente patogênicas. Dentre as quais 216 (20%) de *Vibrio parahaemolyticus*, 64 (5,9%) de *V. alginolyticus*, 24 (2,2%) de *V. fluvialis*, 17 (1,5%) de *V. cholerae*, 14 (1,3%) de *V. vulnificus*, e 1 (0,1%) de *V. mimicus* (BARBONI, 2003).

MATTÉ et al. (2007) avaliaram a distribuição de espécies de vibrios potencialmente patogênicos em pescado, bem como a ocorrência de fatores de virulência em isolados de *Vibrio metschnikovii*, com o objetivo de verificar seu potencial para causar intoxicação através de alimentos e o risco para saúde pública. Das 25 amostras de peixes e frutos do mar avaliadas, foram observadas 9 (36%) amostras positivas para *V. metschnikovii*, 2 (8%) para *V. cholerae* não-O1/não-O139, 4 (16%) para *V. parahaemolyticus*, 2 (8%) para *V. mimicus*, 2 (8%) para *V. alginolyticus*, e 3 (12%) para *V. vulnificus*.

## 1.6 JUSTIFICATIVA

A produção pesqueira mundial tem aumentado a cada ano e o Brasil vem acompanhando essa evolução (FAO, 1999; FAOSTAT, 2005; FAO, 2007). Peixes e outros frutos do mar representam um terço do consumo mundial de proteína (DIAZ, 2004). O consumo no Brasil entre os anos de 2001 e 2003 esteve em média entre 5 e 10 kg/ano (VALDIMARSSON, 2005).

Apesar de o peixe ser uma fonte de proteína saudável, também pode ser um veiculador de doenças. Não somente por sofrer rápida deterioração, mas também devido a diversos comportamentos de risco que permitem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Em feiras livres o pescado deveria ser mantido, dentre outras condições seguras de conservação, sob refrigeração adequada, por meio de gelo picado de boa procedência. Os feirantes deveriam primar pela limpeza e higiene pessoal e do local de trabalho, bem como pela qualidade do produto oferecido ao consumidor. Porém as leis existentes, que regulamentam o comércio em feiras livres, sob os vários aspectos, inclusive de saúde pública, são de modo geral ignoradas.

Se não forem observadas boas práticas de manipulação e conservação dos peixes, estes podem passar a abrigar patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (SAKER-

SAMPAIO e VIEIRA, 2004). Além disso, podem promover o desenvolvimento de microrganismos como *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp., se estes estiverem contaminando o peixe. Todos esses microrganismos podem causar infecção gastrointestinal no homem.

Estimativas mundiais indicam que 2,5 milhões de pessoas morram a cada ano devido a doenças diarréicas (KOSEK et al., 2003), resultando em perdas econômicas, danos à saúde e morte (BUZBY et al., 1996, MEAD et al., 1999). Mesmo em países industrializados, muitos surtos permanecem sem a determinação dos agentes etiológicos envolvidos (TIRADO e SCHMIDT, 2000). No Brasil, não existem dados precisos sobre o número de casos de doenças de origem alimentar (CARMO et al., 2005; GERMANO et al., 1993a).

O controle e prevenção de DTAs dependem da identificação de suas causas. Por essa razão, toda a informação gerada dentro das normas de metodologia científica, somada àquelas acumuladas até o momento, são ferramentas valiosas e necessárias para o melhor conhecimento da epidemiologia das DTAs.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as condições higiênico-sanitárias dos peixes comercializados nas feiras livres da cidade de São Paulo.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Enumerar microrganismos indicadores de contaminação fecal e *Escherichia coli*.
- Verificar a presença de microrganismos do gênero *Salmonella*.
- Enumerar microrganismos estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus*).
- Isolar e identificar microrganismos do gênero *Aeromonas* de interesse em Saúde Pública.
- Isolar e identificar microrganismos do gênero *Vibrio* de interesse em Saúde Pública.
- Discutir o significado da presença dos microrganismos isolados, sob a perspectiva da Saúde Pública.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado com 20 amostras de peixes de diversas espécies, habitualmente empregadas no preparo de pratos à base de peixe cru, como por exemplo *sushi* e *sashimi*, assim constituídas: 8 amostras de atum (*Thunnus* spp.), 9 amostras de salmão (*Oncorhynchus* spp.) e 1 amostra de badejo (*Mycteroperca* spp.), e 2 bandejas de *sashimi*, com três espécies de peixes cada. Uma das bandejas era composta por salmão, atum e robalo (*Centropomus* spp.) e a outra continha além de salmão e atum, linguado (*Paralichthys* spp.).

As amostras adquiridas, mensalmente pelo período de 6 meses, em feiras livres paulistanas foram escolhidas de acordo com três critérios de natureza logística: o dia da semana (terça-feira), a oferta das espécies de peixes-alvo do estudo e proximidade com o laboratório. Foram coletadas em 5 feiras livres de 4 regiões de São Paulo (central, leste, oeste e sul), de maneira que cada uma tivesse pelo menos dois pontos-de-venda (barracas) amostrados. Por essa razão foram realizadas coletas em 2 feiras na região leste. Não foi possível obter amostra na região norte, uma vez que não foram atendidos esses critérios logísticos (Quadro 1).

As amostras, sempre que possível, de espécies diferentes de peixe, tinham aproximadamente 500 g e foram mantidas na embalagem originalmente oferecida pelo feirante.

**Quadro 1:** Amostragem de peixes coletados em feiras livres da cidade de S. Paulo, segundo localização, barraca, número da amostra e número da coleta.

Localização			Barraca	Nº. da Amostra	Nº. da Coleta
Região◇	Bairro	Feira*			
Centro	Pacaembu	1	A	1	1
				5	3
			B	2	1
				17	6
			C	3	2
				4	2
18◇	6				
Oeste	Pinheiros	2	A	6	3
				7	3
			B	8◇	3
				19	6
20	6				
Sul	V. Mariana	3	A	9	4
				10	4
			B	11	4
				12	4
Leste	Brás	4	A	13	5
				14	5
	Belém	5	A	15	5
				16	5

(◇) Atribuição da prefeitura do município de São Paulo; (\*) Número atribuído à feira amostrada; (◇) Bandeja de *sashimi*.

Para o transporte, as amostras foram acondicionadas em recipiente térmico, imediatamente encaminhadas para o laboratório e processadas no mesmo dia da aquisição, em um período máximo de 3 horas.

Enquanto esperavam pelo processamento, as amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 e 8°C.

### 3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

As amostras foram processadas de acordo com as normas da *American Public Health Association – APHA* (1992), descrita por SILVA et al. (2001) para pesquisa e isolamento dos seguintes microrganismos: coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, e segundo MATTÉ et al. (1994) para pesquisa de *Aeromonas* spp. e diversidade de *Vibrio* spp.

Os resultados obtidos serão analisados por meio dos padrões preconizados na Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 12 (BRASIL, 2001), de 2 de janeiro de 2001.

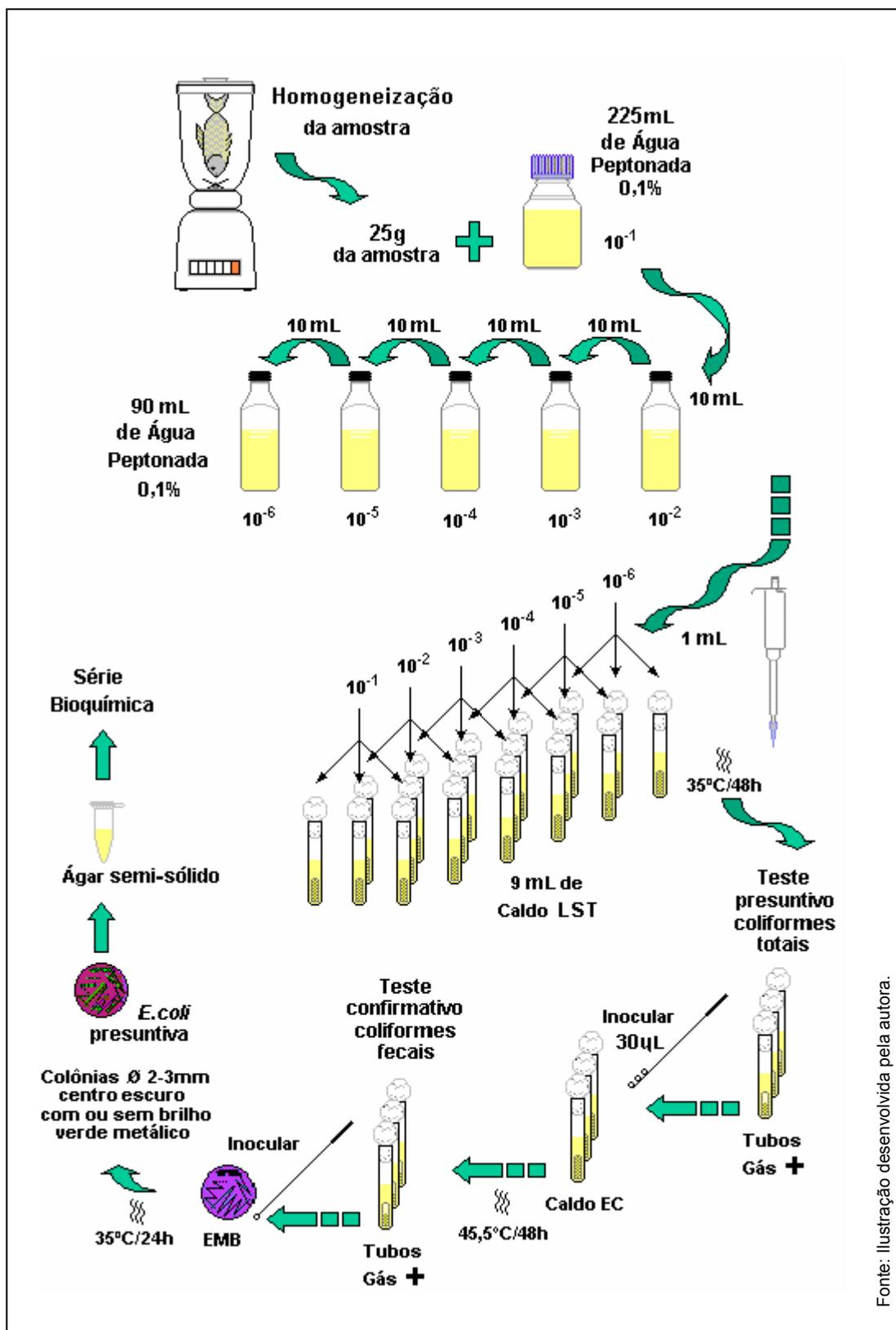
#### 3.2.1 Pesquisa de Coliformes Termotolerantes e *E. coli* a 45°C

A pesquisa de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* foi realizada por meio da técnica dos tubos múltiplos com série de 3 tubos de cada diluição seriada até  $10^{-6}$ , para determinação do número mais provável de organismos por grama, empregando-se a tabela de Hoskins (SILVA et al., 2001). Após a homogeneização de cada amostra, à primeira alíquota de 25 g, foram adicionados 225 mL de Água Peptonada 0,1% (AP 0,1%), e feitas diluições sucessivas até  $10^{-6}$ , passando-se 10 mL da diluição anterior para um frasco contendo 90 mL de AP 0,1%, obtendo-se a diluição seguinte e assim sucessivamente.

De cada diluição, foram transferidos 1 mL a cada um de 3 tubos contendo 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com tubo de Durham invertido. Após serem incubados a 35°C por até 48 h, os tubos positivos para coliformes totais, isto é, que apresentaram formação de ácidos e gás, foram novamente cultivados, transferindo-se com o auxílio de alça microbiológica tripla, cerca de 30µl para 3 tubos contendo 9 mL de Caldo *Escherichia coli* (EC), com tubo de Durham invertido. Depois de incubados a 45,5°C por até 48 h, os tubos positivos para coliformes termotolerantes (presença de gás) foram inoculados, em placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), pela técnica de esgotamento e então incubados a 35°C por 24 h (Figura 4). As colônias que apresentaram macromorfologia típica, ou seja, diâmetro entre 2 e 3 mm, centro escuro, com ou sem brilho verde metálico, foram reisoladas em Ágar Lúria e submetidas a uma série de testes bioquímicos, para confirmação da presença de *E. coli*.

#### 3.2.1.1 Expressão dos Resultados em NMP de Bactérias por 100 g

A combinação de resultados positivos e negativos no ensaio confirmativo permite a obtenção de uma estimativa da densidade original das bactérias (NMP) por meio da aplicação de cálculos de probabilidade predeterminados na tabela de Hoskins (SILVA et al., 2001). Os resultados foram, então, expressos em número mais provável de bactérias por 100 g.

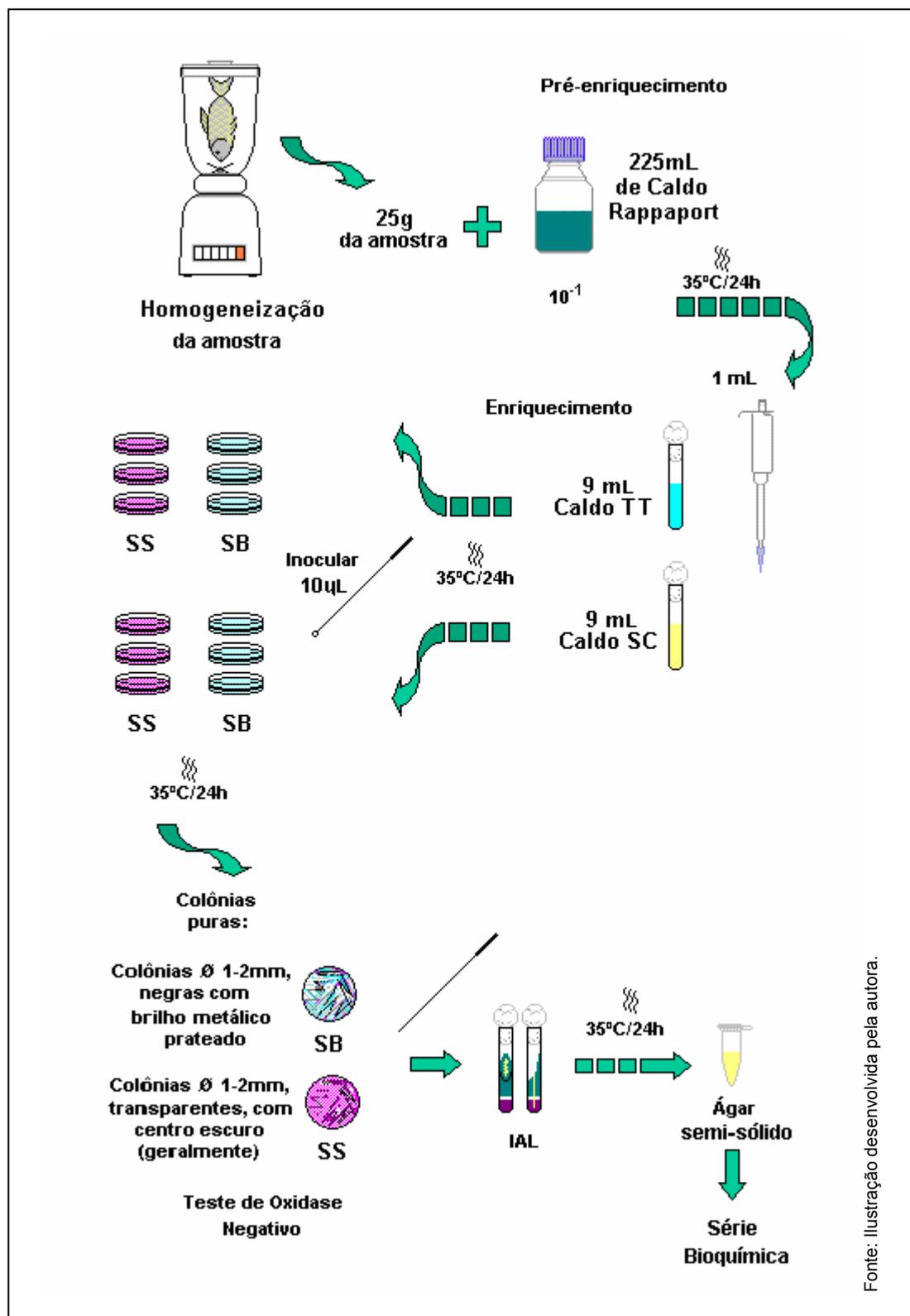


**Figura 4:** Ilustração esquemática do processamento de amostras de peixes para isolamento de indicadores de contaminação fecal e *Escherichia coli*.

### 3.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para investigação de *Salmonella* spp., uma alíquota de 25 g, de cada amostra de peixe, foi enriquecida com 225 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubada a 35°C. Após 24 h, foram distribuídas 2 alíquotas de 1 mL de amostra enriquecida, para tubos contendo 9 mL, um de Caldo Tetrionato (TT) e outro de Caldo Selenito-Cistina (SC), e novamente incubando-se a 35°C por 24 h. Após essa etapa de pré-enriquecimento, foram inoculadas, por meio da técnica de esgotamento, com o auxílio de alça bacteriológica, placas de Petri, em triplicata, contendo Ágar Salmonela-Shiguela (SS) e Ágar Sulfito de Bismuto (SB) e incubadas 35°C por 24 h.

Foram reisoladas, de cada placa de Petri, de 3 a 5 colônias com macromorfologia suspeita, para confirmação por meio de testes bioquímicos (Figura 5). Os testes que compõem a série bioquímica, para confirmação de presença de *Salmonella* spp., foram os seguintes: capacidade de fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol, inositol, dulcitol, eritritol e trealose); produção de gás a partir da glicose; utilização de citrato de Simmons; hidrólise da esculina, uréia e gelatina; redução do nitrato; teste de Voges-Proskauer; reação de vermelho de metila, descarboxilação da lisina; desaminase da ornitina e da fenilalanina, teste de oxidase; reação de indol e produção de sulfito. Foram realizados nas colônias suspeitas de *Salmonella*, testes sorológicos utilizando anti-soro polivalente somático (O) e flagelar (H) da Probac do Brasil, segundo as instruções do fabricante.



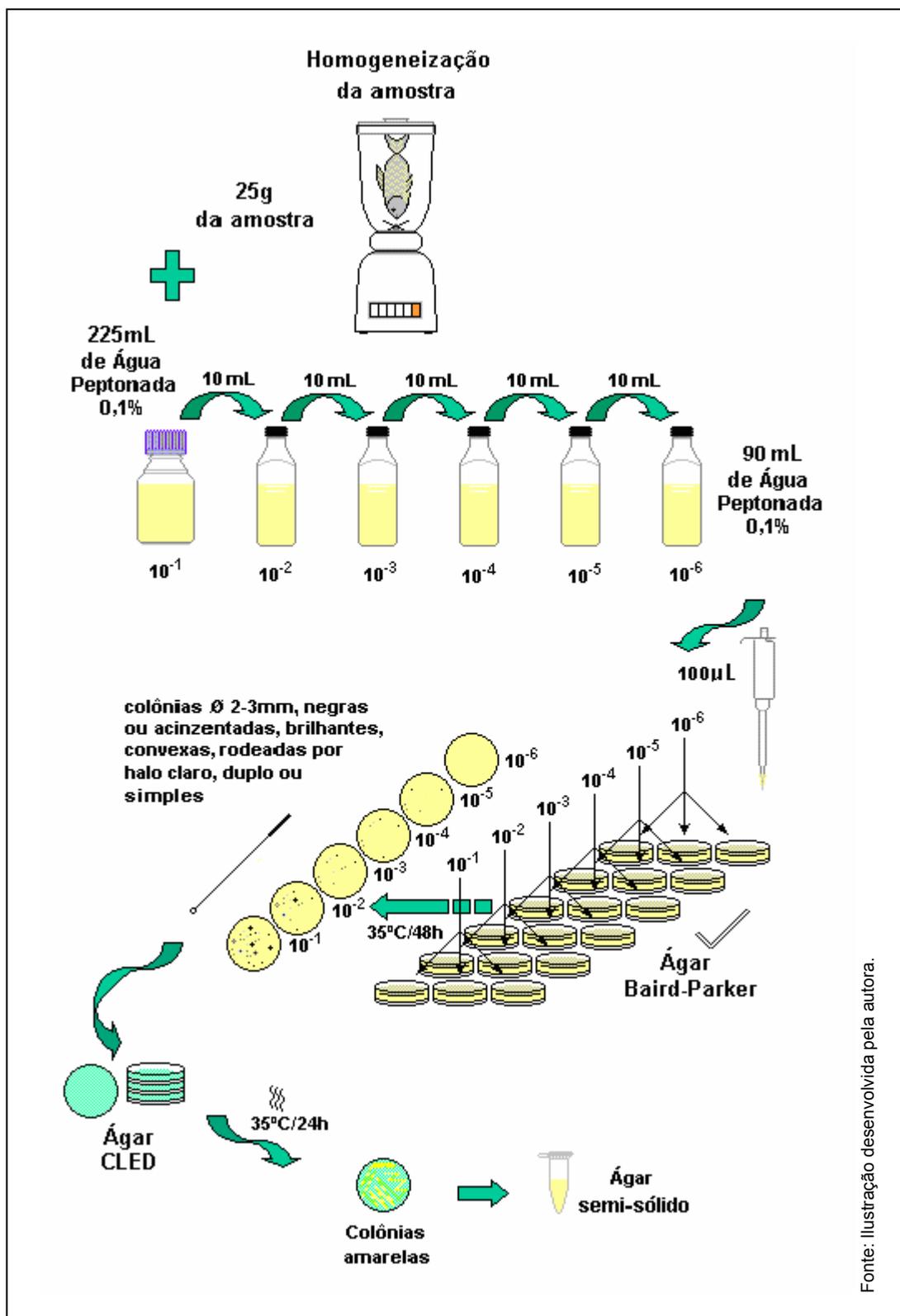
**Figura 5:** Ilustração esquemática do processamento de amostras de peixes para isolamento de *Salmonella* spp.

### 3.2.3 Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva

Para o isolamento de estafilococos coagulase positiva, foram utilizadas as mesmas diluições seriadas obtidas para a pesquisa de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

Após a homogeneização das amostras, em AP 0,1%, 100µl de cada uma das 3 primeiras diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), foram transferidos com pipeta automática e com o auxílio de bastão de Drigalski, espalhados, até sua completa distribuição, em placas de Petri contendo Ágar Baird Parker (BP) e incubadas a 35°C por até 48 h. As colônias com macromorfologia típica, isto é, que apresentaram diâmetro entre 2 e 3 mm, negras ou acinzentadas (redução do telurito a telúrio), brilhantes, convexas, rodeadas por halo claro de 2 a 5 mm de largura (lipólise e proteólise da gema) e atípica (sem halo), foram reisoladas em Ágar Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED) e incubadas a 35°C por até 24 h.

Colônias puras com macromorfologia esperada nesse meio de cultura (pequenas e opacas de cor amarela intensa) foram repicadas em Ágar Lúria e incubadas a 35°C por 24 h. Utilizando as culturas conservadas, foram preparados esfregaços para coloração de Gram. As colônias cujos esfregaços apresentavam estruturas cocóides, Gram positivas, agrupadas ou não em forma de cacho de uva, foram submetidas aos testes bioquímicos clássicos para confirmação de *S. aureus*, tais como produção de coagulase, produção da nuclease DNase e presença de catalase (Figura 6).

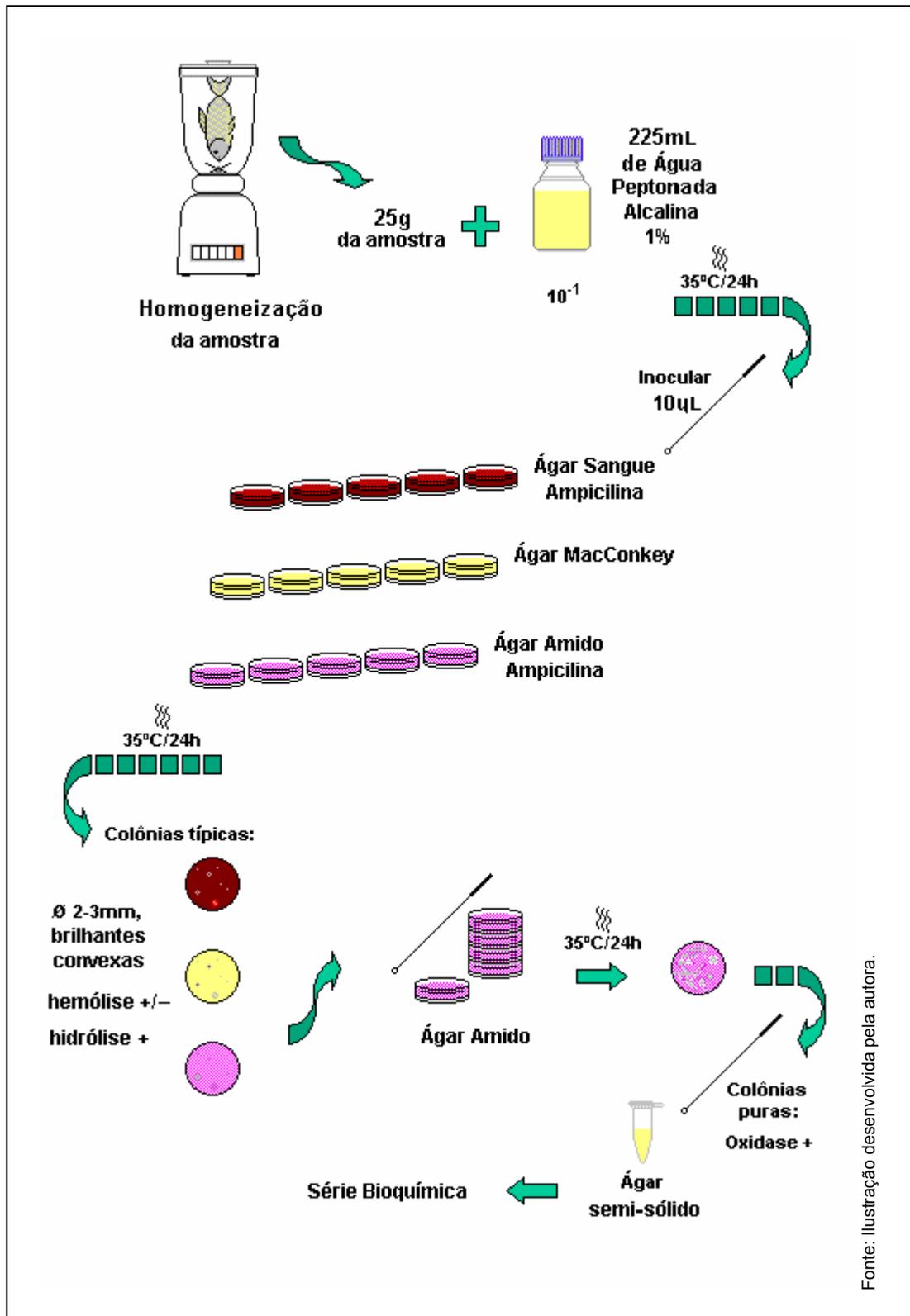


**Figura 6:** Ilustração esquemática do processamento de amostras de peixes para isolamento de estafilococos coagulase positiva.

### 3.2.4 Pesquisa de *Aeromonas* spp.

Para a pesquisa de microrganismos do gênero *Aeromonas*, foi utilizada a mesma diluição inicial utilizada para a pesquisa de *Vibrio* em APA 1%, pH 8,6. Após incubação a 35°C por 24 h, uma alíquota de aproximadamente 10µl foi inoculada por técnica de esgotamento, com auxílio de uma alça bacteriológica, em 5 placas de Petri contendo Ágar Sangue Ampicilina (SA), 5 com Ágar Amido Ampicilina (AA) e 5 com Ágar MacConkey (MC), perfazendo um total de 15 placas. Depois de incubadas a 35°C por até 24 h, as placas que apresentaram colônias típicas, isto é, que apresentaram diâmetro entre 2 e 3 mm, brilhantes, convexas, apresentando ou não hemólise, foram reisoladas em Ágar Amido (AA), e incubadas a 35°C por até 24 h.

Colônias puras com macromorfologia esperada nesse meio de cultura, positivas para hidrólise do amido e prova de oxidase, foram isoladas em ágar semi-sólido e submetidas à identificação de espécie por série bioquímica (Figura 7). Foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: tolerância ao NaCl em concentrações de 0, 6, 8 e 10%; fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol, manose, arabinose, inositol, salicina); produção de gás a partir da glicose; hidrólise da esculina; redução do nitrato; teste de Voges-Proskauer e oxidase; reação de vermelho de metila e indol, descarboxilase da lisina e arginina; desaminase da ornitina e produção de sulfito e classificadas em nível de espécie de acordo com os critérios estabelecidos previamente (JANDA e ABBOTT, 1998).



**Figura 7:** Ilustração esquemática do processamento de amostras de peixes para isolamento de espécies de *Aeromonas*.

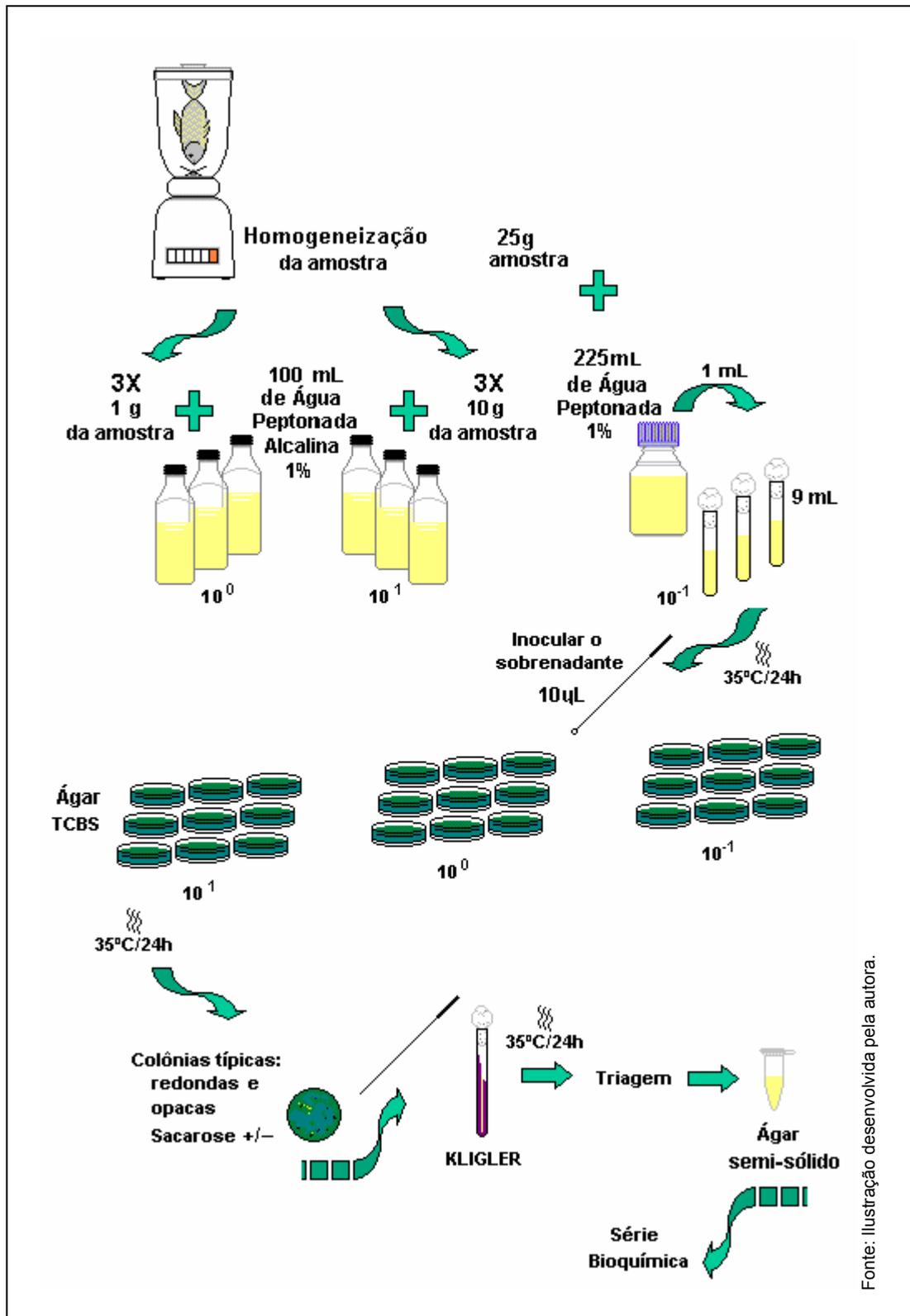
### 3.2.5 Pesquisa de *Vibrio* spp. Potencialmente Patogênicos

Após a homogeneização das amostras foram retiradas, de cada uma, alíquotas, 3 de 10 g e 3 de 1 g, às quais foram adicionados 100 mL de Água Peptonada Alcalina 1%, pH 8,6 (APA1%), obtendo-se as diluições de  $10^1$  e  $10^0$ . Da diluição  $10^1$  foi aliquoteado 1 mL para cada um, de 3 tubos, contendo 9 mL de APA 1%, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ .

Após incubação a  $35^\circ\text{C}/24$  h, a película formada na superfície de cada tubo da diluição  $10^{-1}$  e frascos das diluições  $10^1$  e  $10^0$ , foi inoculada por técnica de esgotamento, em placas de Petri, em triplicata, contendo Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e incubada por  $35^\circ\text{C}/24$  h. Passado esse período, foram reisoladas em Ágar Lúria até 10 colônias suspeitas, de cada placa.

A morfologia esperada para essas colônias varia conforme a espécie. *Vibrio parahaemolyticus*, são verdes em Ágar TCBS, por serem sacarose negativos, formam colônias de 2-3 mm de diâmetro, redondas e opacas, Descrição essa válida para outras espécies de víbrios, como *V. vulnificus* e *V. mimicus*.

Algumas espécies como *V. metschnikovii*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* e *Vibrio cholerae*, por exemplo, são sacarose positivas, apresentando a cor amarela no meio TCBS e sendo suas colônias ligeiramente maiores, entre 3-5 mm de diâmetro (Figura 8).



**Figura 8:** Ilustração esquemática do processamento de amostras de peixes para isolamento de espécies de *Vibrio*.

As colônias isoladas foram submetidas aos testes bioquímicos usualmente utilizados para a identificação desse gênero, tais como teste de tolerância ao NaCl em concentrações de 0, 6, 8 e 10%; fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol, manose, arabinose, inositol, salicina); produção de gás a partir da glicose; hidrólise da esculina; redução do nitrato; teste de Voges-Proskauer e oxidase; reação de vermelho de metila e indol, descarboxilase da lisina e arginina; desaminase da ornitina e produção de sulfito.

Foram realizados nas colônias suspeitas de *Vibrio cholerae* testes sorológicos utilizando anti-soro polivalente anti-*V. cholerae* O1 da Probac do Brasil, segundo as instruções do fabricante, para confirmação do sorogrupo O1.

### 3.3 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Todos os microrganismos isolados foram conservados a -70°C e após sua completa identificação passaram a fazer parte da Coleção de Culturas de Bactérias do Laboratório de Saúde Pública/HSP/FSP.

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. POR MEIO DE PROVAS MOLECULARES

Após o isolamento e identificação fenotípica, os microrganismos de interesse foram submetidos a provas moleculares para identificação definitiva.

O DNA das colônias de interesse caracterizadas fenotipicamente foi extraído para iniciar a caracterização genotípica e foi utilizado como DNA molde na reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) para ampliação do material genético. O produto da PCR, *amplicons*, foi então preparado para ser detectado e separado por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose.

O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, a imagem dos *amplicons* foi capturada por meio do sistema de aquisição de imagem Epi Chemi II Darkroom (UVP) e gravada por meio do software Labworks (UVP). A medida dos fragmentos (*amplicons*) foi determinada por meio do Software Gelworks 1D Advanced 4.01 (UVP).

O DNA foi analisado, por meio das imagens obtidas, conforme o microrganismo-alvo, bem como o tipo de informação que se desejava obter. (taxonomia, fatores de virulência, dentre outros).

### 3.4.1 Extração do DNA Genômico de *Salmonella* spp.

As colônias semelhantes às exibidas por *Salmonella* spp. que foram submetidas à investigação clássica (morfológica, bioquímica e sorológica) e também aquelas com características atípicas foram submetidas às provas moleculares para confirmação taxonômica.

#### 3.4.1.1 Método de Obtenção do DNA através de Choque Térmico

A extração do DNA genômico em pequena escala foi realizada por choque térmico segundo descrito por CHAPMAN et al. (2001), com modificações.

Cada uma das colônias foi cultivada em tubo de Falcon (50 mL) contendo 10 mL de caldo Lúria a 35°C por 18 h. Depois de centrifugada a 5.000 rpm por 10 min a 24°C o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q Gradient System – Millipore ®) e homogeneizado. A suspensão foi transferida para tubo tipo *Eppendorf* ® de 1,5 mL e centrifugada a 12.000 rpm por 3 min a 24°C, quando então o sobrenadante foi descartado e novamente o *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura, homogeneizado e aquecido a 95°C por 10 min. Os tubos foram então congelados a -20°C por 30 min e depois mantidos a 65°C por 1 min. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 rpm por 10 min a 24°C e o sobrenadante contendo o DNA foi

transferido para um novo tubo tipo Eppendorf® de 1,5 mL e mantido a -20°C até o momento do uso.

### 3.4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi utilizada a seqüência dos iniciadores descrita por SOUMET et al. (1999), que desenvolveram um ensaio baseado em Multiplex PCR (*mPCR*) com três conjuntos de iniciadores para detecção de todos os sorotipos de *Salmonella enterica* (ST 11 e ST 15) e identificação de *Salmonella* Enteritidis (S1 e S4) e *Salmonella* Typhimurium (Fli 15 e Typ 04). No Quadro 2 podem ser observadas as seqüências de nucleotídeos.

**Quadro 2:** Características dos iniciadores para identificação de *Salmonella*, segundo seqüência dos nucleotídeos e peso molecular.

Iniciador	Seqüência 5'- 3'	Peso molecular (pb <sup>**</sup> )
ST 11	GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA	429
ST 15	GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G	
S 1	GCC GTA CAC GAC CTT ATA GA	250
S 4	ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC	
Fli 15	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	620
Typ 04	ACT GGT AAA GAT GGC T	

Fonte: Compilado de Soumet et al., 1999.

(\*\*) pb: pares de base.

### 3.4.2.1 Preparação da Mistura Master para a PCR

As condições de reação da PCR e ciclos térmicos foram realizados segundo a descrição de SOUMET et al. (1999), com modificações que estão descritas a seguir.

Para o volume final de 25  $\mu$ L da reação de Multiplex PCR por tubo foram utilizados 5  $\mu$ L de DNA molde, 200  $\mu$ mol de cada nucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 2,5  $\mu$ L de Tampão 10X, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™), 1,2  $\mu$ mol de cada iniciador (ST 11, ST 15, S 1 e S 4) e 1,36  $\mu$ mol de cada iniciador (Fli 15 e Typ 04).

### 3.4.2.2 Condições de PCR para Identificação de *Salmonella* spp.

Todas as amplificações de material genético empreendidas nesse estudo foram realizadas por meio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) programado com as condições cíclicas previamente definidas para cada microrganismo estudado. Em cada amplificação foram incluídos controles positivo (DNA de cepa conhecida) e negativo (mistura da reação sem DNA), para posterior utilização em conjunto com os *amplicons*.

O controle positivo utilizado para a pesquisa de *Salmonella* Typhimurium foi uma cepa cedida pelo Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico de São Paulo.

Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados no termociclador programado da seguinte maneira: um período de desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguido do período de amplificação em 30 ciclos. Cada ciclo constituído de desnaturação a 94°C durante 1 min, anelamento a 55°C durante 3 min e extensão a 72°C durante 1 min. Depois de completados os 30 ciclos de amplificação, os tubos foram submetidos a uma extensão final a 72°C por 7 min. Ao final, a reação foi interrompida automaticamente por esfriamento a 4°C e mantida nessa temperatura até o momento de uso.

### 3.4.3 Análise do DNA

Os produtos da PCR (*amplicons*) originados das cepas de *Salmonella* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8%, adicionado de 1µg/mL brometo de etídeo, em tampão TAE 1X (Tampão Tris – Acetato – EDTA) utilizando intensidade de corrente de 6 V/cm durante 1 h e um marcador de peso molecular de 1Kb Ladder (Invitrogen™).

As amostras foram consideradas positivas quando seus respectivos *amplicons* produziram uma banda visível com os tamanhos medidos em pares de bases (pb), como referido no Quadro 2.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas 20 amostras de peixes de diversas espécies, habitualmente empregadas no preparo de pratos à base de peixe cru, adquiridas em feiras livres da cidade de São Paulo. Dentre as espécies de peixes oferecidas em pedaços, postas e filés, havia também bandejas de *sashimi* de composições variadas. As amostras adquiridas eram compostas por salmão (*Oncorhynchus* spp.), atum (*Thunnus* spp.) e robalo (*Centropomus* spp.) e a outra que continha além de salmão e atum, linguado (*Paralichthys* spp.).

Dentre as 20 amostras analisadas pela diversidade de espécies de *Vibrio* e *Aeromonas*, determinação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Escherichia coli*, presença de *Salmonella* spp., enumeração de coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva, foi observado que 14 (70%) amostras continham microrganismos patógenos e/ou potencialmente patogênicos.

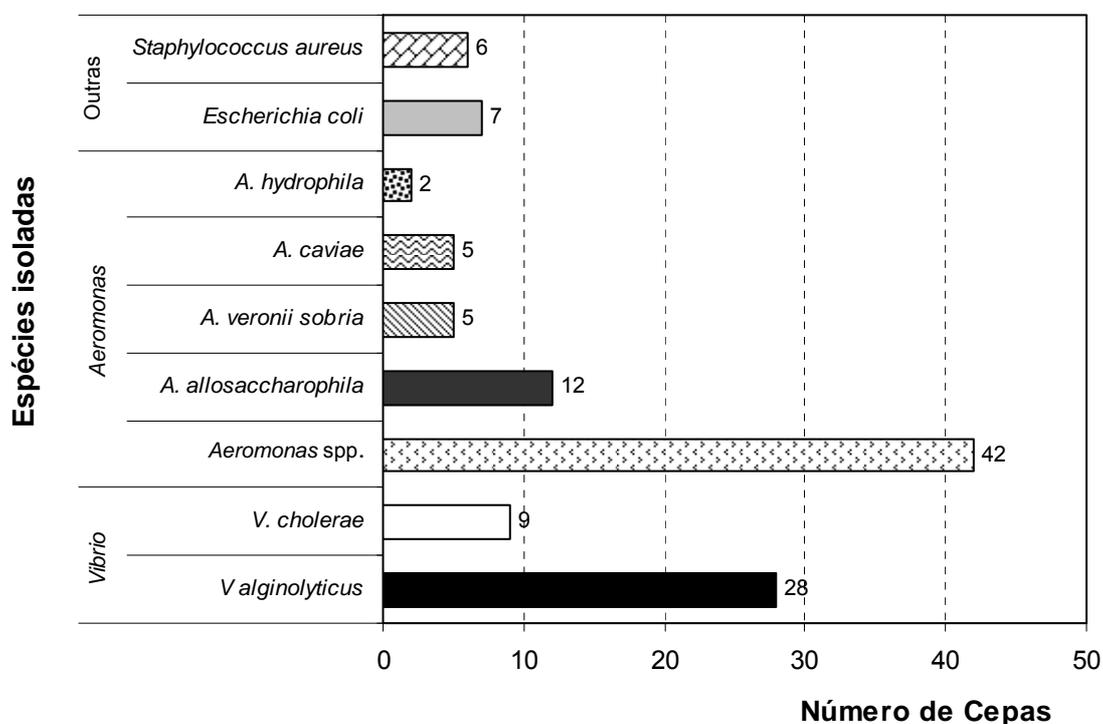
Os resultados demonstraram que embora alguns patógenos tenham sido isolados em quantidades dentro dos limites permitidos pela legislação, foi possível detectar mais que uma espécie de microrganismo em cada amostra. Como pode ser observado no Quadro 3, em 8 amostras foi verificada a presença de apenas 1 microrganismo, em 3 amostras, 2 microrganismos e em 3 amostras, 3 microrganismos. Em 6 amostras não foi verificada a presença de microrganismos patogênicos.

**Quadro 3:** Distribuição de microrganismos em amostras de peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, segundo origem (feira e barraca) e espécie de peixe.

Feira	1						2						3				4		5	
	A		B		c		a		B				A		B		a		a	
Amostra	1	5	2	17	3	4	18	6	7	8	19	20	9	10	11	12	13	14	15	16
Peixe	S	A	A	S	S	A	L	A	S	R	S	A	A	S	A	S	S	B	S	A
Coliformes *	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. caviae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. veronii sobria</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Legenda:** (S) Salmão; (A) Atum; (B) Badejo; (R) Bandeja de *sashimi* contendo robalo, salmão e atum; (L) Bandeja de *sashimi* contendo linguado, salmão e atum; (a,b e c) Identificação das barracas amostradas; (1,2,3,4 e 5) Identificação das feiras livres; (\*) Coliformes termotolerantes em contagem superior ao padrão da RDC 12.

Dentre as 14 amostras positivas, foram encontrados os seguintes microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *A. veronii sobria*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. allosaccharophila*, *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 e *V. alginolyticus*. A diversidade de espécies de microrganismos isolados, bem como o número de cepas são mostrados na Figura 9.



**Figura 9:** Número de cepas isoladas em 20 amostras de peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, segundo diversidade de espécies.

#### 4.1 ENUMERAÇÃO DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL E PRESENÇA DE *Escherichia coli*

A qualidade bacteriológica dos alimentos é controlada pela presença de bactérias que indicam especificamente a existência de contaminação fecal (*Escherichia coli* e coliformes termotolerantes). Com a presença de indicadores fecais, há também a possibilidade real de presença de microrganismos patogênicos. O indicador de contaminação fecal mais específico e mais facilmente detectável é a *E. coli*, que depois de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* é o agente etiológico mais identificado como fonte de surtos de doenças de origem alimentar no Brasil, de acordo com o Sistema Nacional de VE-DTA (CARMO et al., 2005).

A contagem de coliformes totais nas amostras pesquisadas variou de  $2,0 \times 10^1$  a  $1,1 \times 10^3$  NMP g<sup>-1</sup>. Enquanto a contagem de coliformes termotolerantes variou entre  $<3 \times 10^0$  a  $4,3 \times 10^3$  NMP g<sup>-1</sup> apresentando valores superiores a  $10^2$  NMP g<sup>-1</sup> em 5 (25 %) amostras (Quadro 4).

*Escherichia coli* foi isolada de 2 (10%) amostras analisadas, sendo que uma delas possuía valores para coliformes termotolerantes dentro dos limites preconizados pela legislação, segundo o item 22b (BRASIL, 2001).

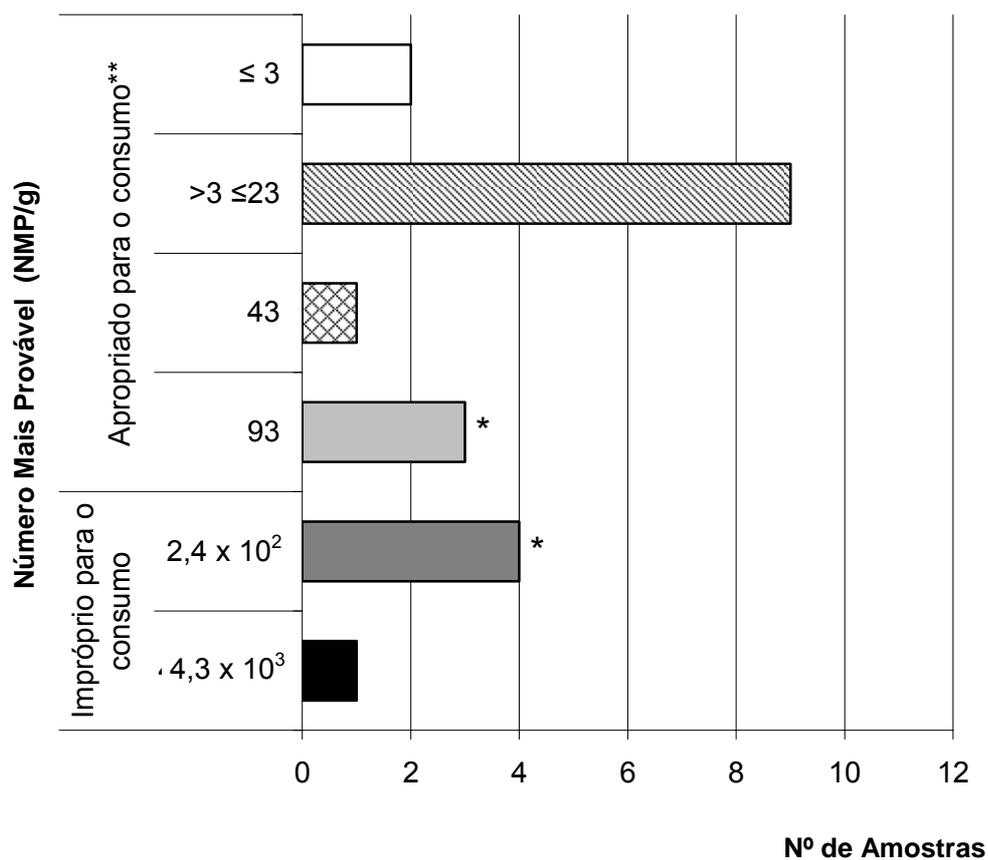
**Quadro 4:** Contagem geral de NMP/g de coliformes totais, termotolerantes e presença de *E. coli*, segundo amostra, espécie de peixe, feira livre e barraca, da cidade de São Paulo.

Feira	Barraca	Peixe*	Amostra	Coliformes		<i>E.coli</i>
				Totais	Termotolerantes	
1	1	S	1	$1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	-
	2	A	2	$4,3 \times 10^1$	9	-
	3	S	3	$2,4 \times 10^2$	<3	-
		A	4	$2,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	-
	1	A	5	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	+
2	1	A	6	$2,4 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	-
		S	7	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	-
	2	R	8	$4,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	-
3	1	A	9	$2,4 \times 10^2$	9	-
		S	10	$2,3 \times 10^1$	4	-
	2	A	11	$9,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	-
		S	12	$1,1 \times 10^3$	$9,3 \times 10^1$	+
4	1	S	13	$1,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^1$	-
		B	14	$2,4 \times 10^2$	4	-
5	1	S	15	$7,5 \times 10^1$	7	-
		A	16	$2,0 \times 10^1$	4	-
1	2	S	17	$1,5 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	-
	3	L	18	$1,5 \times 10^2$	<3	-
2	2	S	19	$4,6 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	-
		A	20	$4,6 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	-

**Legenda:** (S) Salmão; (A) Atum; (B) Badejo; (R) Bandeja de *sashimi* contendo robalo, salmão e atum; (L) Bandeja de *sashimi* contendo linguado, salmão e atum; (+) Presença; (-) Ausência.

Para se verificar as condições higiênico-sanitárias de peixes comercializados em feiras livres, segundo a legislação vigente, não seria necessária a contagem de coliformes termotolerantes e pesquisa de *Escherichia coli*. No entanto, 6 (30%) amostras estariam impróprias para o

consumo, se fosse considerada a possibilidade do peixe ser consumido cru, como pode ser observado na Figura 10.



**Figura 10:** Número de amostras de peixe próprias e impróprias para consumo de acordo com a contagem de coliformes termotolerantes e presença de *E. coli*.

**Nota:** (\*) - Amostra com a presença de *E.coli*; (\*\*) - Exceto a amostra inapropriada para o consumo pela presença de *E.coli*.

Analisando 30 amostras de *sashimis*, comercializados em *shopping centers*, SOARES e GERMANO (2004) encontraram valores de contagem de coliformes fecais entre  $<1,00 \times 10$  a  $4,00 \times 10^3$  UFC/g de amostra e não isolaram *E. coli*. Em estudo semelhante em restaurantes, MARTINS (2006) encontrou coliformes termotolerantes em 10 (50%) e *E.coli* em 9 (45%) das 20 amostras de *sushis* e *sashimis* analisadas.

A análise microbiológica de 87 amostras de *sushis* e *sashimis* comercializados em 8 restaurantes de Brasília (DF) mostrou que 33,33% delas apresentaram valores  $\geq 2,4 \times 10^3$  NMP/g para coliformes totais e que 25,28% estavam acima dos limites máximos recomendáveis para coliformes termotolerantes (RESENDE, 2004).

Para a análise sanitária de branquinha (*Curimatus ciliatus*), peixe de água doce comercializado na região de Teresina (PI), foram coletadas 34 amostras, das quais 15 (44,1%) estavam impróprias para consumo devido à presença de coliformes termotolerantes e em 14 (41,1%) delas foram isoladas *Escherichia coli* (MURATORI et al., 2004).

Embora a severidade da infecção causada pela *E. coli* dependa dos fatores de virulência que a cepa possua e esta seja há longo tempo conhecida como causa de diarreia, a identificação de novas cepas (*E. coli* diarreio gênicas são categorizadas atualmente em sete patótipos) sugere que esse patógeno possa ter maior importância como causa de doença diarreica do que foi anteriormente reconhecida.

#### 4.2 PRESENÇA de *Salmonella* spp.

Essa bactéria, a qual é a mais importante causa mundial, incluindo o Brasil, de doença gastrointestinal, não é reconhecida como parte da flora normal em ambientes aquáticos. Sua presença em pescados está relacionada com práticas enraizadas bem como à falta de higiene durante a manipulação e o processamento pós-captura. No entanto está havendo um aumento nas evidências de que certos sorotipos de *Salmonella* podem fazer parte da microflora endógena em ambientes aquáticos tropicais (HUSS et al., 2000).

Neste estudo 47 colônias com macromorfologia semelhante à *Salmonella* spp. foram isoladas e submetidas a provas bioquímicas. Dentre estas, 10 (21%) tiveram seu perfil fenotípico confirmado. Em todas as colônias identificadas bioquimicamente como *Salmonella* spp. foram realizados testes sorológicos utilizando-se anti-soro polivalente somático (O) com anticorpos contra os antígenos O dos grupos A, B, C, D, E e flagelar (H) com anticorpos contra os antígenos H: a; b; c; d; i; 1, 2 e 5, da Probac do Brasil. A sorologia resultou inconclusiva em 4 delas.

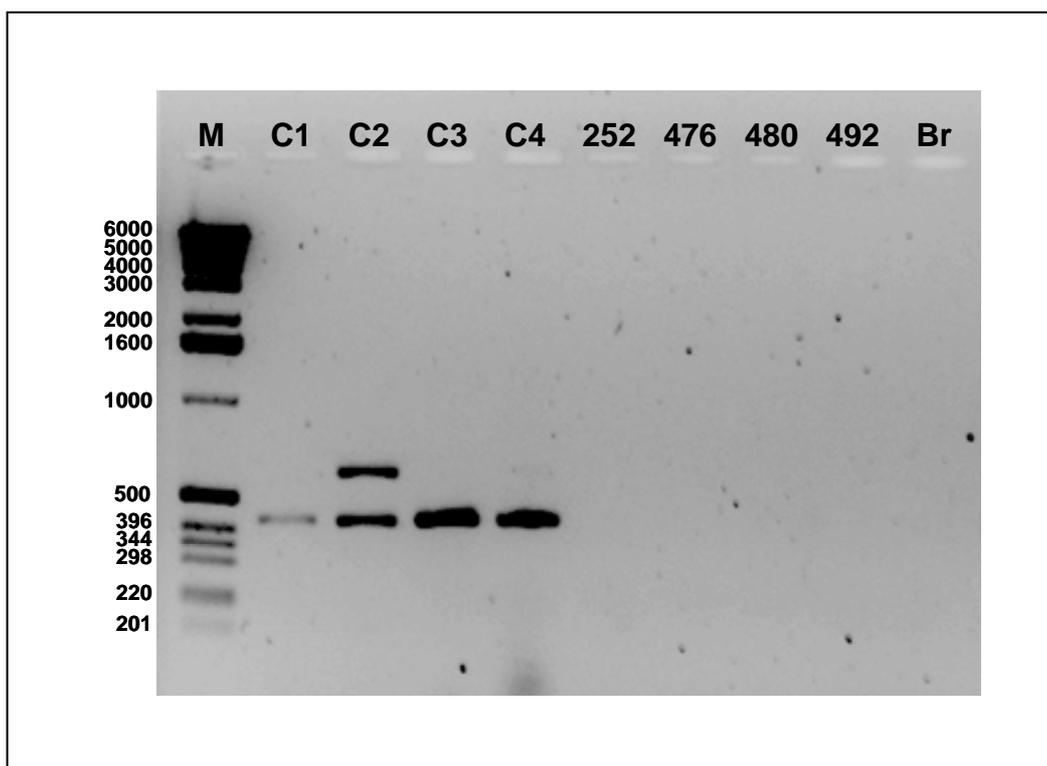
Embora os métodos tradicionais de identificação sejam ainda amplamente utilizados para a detecção e identificação de patógenos encontrados em alimentos, estes são demorados, trabalhosos e muitas vezes inconclusivos, uma vez que testes bioquímicos e sorológicos são

subjetivos, enquanto métodos alternativos, como a PCR, reúnem simplicidade, sensibilidade e especificidade. Por essa razão os isolados de números 252, 476, 480 e 492 foram submetidos a provas moleculares para identificação definitiva.

O método de amplificação do DNA *in vitro* proposto por Saiki e colaboradores, em 1985, permitiu um grande avanço das técnicas de Biologia Molecular, uma vez que tornou possível amplificar um número ilimitado de seqüências-alvo, por meio da PCR, as quais podem ser estudadas por métodos convencionais de análise do DNA.

A PCR foi realizada e os *amplicons* submetidos à eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente. As amostras foram consideradas negativas, uma vez que seus respectivos *amplicons* não produziram uma banda visível no gel de agarose, portanto a identificação presuntiva das colônias de *Salmonella* spp. não foi confirmada por meio da PCR, como mostram os resultados apresentados na Figura 11.

Morita (2005) também se utilizou da prova de PCR para confirmação da presença de *Salmonella* spp. em água de pescadores paulistas. Por meio de provas bioquímicas foram identificadas 24 cepas de *Salmonella* spp., restando 9 cepas positivas após as provas sorológicas e destas 7 cepas confirmadas após a PCR. Além disso, das 24 cepas de *Salmonella* spp. inicialmente isoladas, 7 cepas com sorologia negativa foram positivas pela PCR, 2 cepas com bioquímica e sorologia positivas foram negativas pela PCR, restando 8 cepas negativas tanto na sorologia quanto na PCR.



**Figura 11:** Gel de agarose contendo *amplicons* de *mPCR* para identificação de espécies de *Salmonella*. Onde: M - Marcador de peso molecular 1Kb Ladder; C1 - *Salmonella* spp. 1704-Soumet; C2 - *Salmonella* Typhimurium-Soumet; C3 - *Salmonella* spp. 1704-Chapman; C4 - *Salmonella* Typhimurium-Chapman; 252, 476, 480 e 492 - DNAs suspeitos de *Salmonella* e Br - Controle negativo.

Outros trabalhos encontrados na literatura, do mesmo modo, não registraram a presença de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos que continham peixe cru.

Na avaliação da qualidade sanitária de 30 amostras de *sashimi* de restaurantes especializados em cozinha japonesa, localizados no município de São Paulo, SOARES e GERMANO (2004) não registraram a presença de *Salmonella* spp., assim como RESENDE (2004) e MARTINS (2006), ao pesquisarem o mesmo tipo de amostra, em restaurantes japoneses em Brasília (DF) e na cidade de São Paulo, respectivamente. GONZÁLES-RODRÍGUEZ et al. (2002) não isolaram *Salmonella* em nenhuma das amostras de filés de truta e salmão, adquiridos em supermercados na Espanha.

Surtos de *Salmonella* associados com o consumo de peixes são escassos na literatura pesquisada. HEINITZ et al. (2000), estudando a incidência de *Salmonella* nos Estados Unidos, no período de 1990 a 1998, reportaram 6,9% das amostras de peixe/pescado positivas. Surtos de salmonelose causada pela ingestão de salgadinhos de lula industrializados foram reportados no Japão (HAMADA et al., 1999). Na Austrália, 30 casos de infecção por *Salmonella* foram associados com o consumo de *sushi* (BARRALET et al., 2004). Embora o número de registros do envolvimento de peixes na transmissão de *Salmonella* seja pequeno, a possibilidade de contaminação não pode ser desprezada devido à importância desse microrganismo para a saúde pública.

### 4.3 ENUMERAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* foi encontrado em 2 (10%) amostras de peixe por nós analisadas, sendo que os valores encontrados variaram de  $2 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> a  $4 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> considerados dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela legislação.

Os estafilococos podem ser isolados de peixes recém-capturados, especialmente em águas tropicais (GRAM e HUSS, 1996). *S. aureus* foi isolado em 2 a 10% de peixes e mariscos, porém são mais usualmente encontrados em crustáceos cozidos, entre os quais 24 a 52% das amostras são positivas (ESR, 2001).

Os estafilococos não são considerados bons competidores frente a outras bactérias, por essa razão raramente causam intoxicação quando presentes em alimentos crus, nos quais a flora normal não tenha sido destruída.

Cepas enterotoxigênicas podem ser transferidas das mãos de indivíduos portadores de algum agravo que envolva as vias aéreas superiores (resfriado, dor de garganta), por essa razão os manipuladores de alimento constituem um significativo fator de contribuição para esse tipo de contaminação. No caso dos *sushis*, que são rolinhos preparados com peixe cru, vegetais, alga e arroz, moldados com as mãos, o papel dos manipuladores é fundamental para a inocuidade do alimento.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DE *Aeromonas* spp.

O gênero *Aeromonas* esteve presente em 10 (50%) amostras estudadas. Dentre as 66 cepas de *Aeromonas* isoladas, 24 (36,4%) foram identificadas em nível de espécie. A baixa porcentagem de identificação, também observada por outros autores, se deve à deficiência dos métodos fenotípicos convencionais para a identificação de espécies *Aeromonas* (JANDA, 1991; KIROV, 1993; ABBOTT et al., 1998, ØRMEN et al., 2005). Dentre elas, 12 (18,2%) foram confirmadas como *Aeromonas allosaccharophila*, 5 (7,6%) como *A. caviae*, 5 (7,6%) como *A. veronii* biovariedade *sobria* e 2 (3,0%) como *A. hydrophila* (Figura 9).

As cepas que apresentaram características típicas do gênero *Aeromonas* e que não puderam ser classificadas em nível de espécie pelas provas bioquímicas utilizadas foram classificadas como *Aeromonas* spp. e representam 42 (63,6%) das cepas identificadas.

Embora a sobrevivência e o crescimento desse microrganismo na água do mar ainda estejam sendo discutidos, muitos estudos indicam que o pescado em geral possui alto risco de ser contaminado com *Aeromonas* spp. (TSAI e CHEN, 1996; HÄNNINEN et al., 1997; NEYTS et al., 2000), razão pela qual a pesquisa de *Aeromonas* foi incluída no presente estudo, embora a legislação brasileira vigente não estabeleça padrões para esse microrganismo.

*Aeromonas* spp. têm sido associadas, além de peixes e pescado em geral, a uma grande variedade de alimentos, tais como aves, carne vermelha, vegetais, café, leite pasteurizado e cru, sorvete, dentre outros ( TSAI e CHEN, 1996; HÄNNINEN et al., 1997; NEYTS et al., 2000; SILVA et al., 2000).

Devido à capacidade de *Aeromonas* spp. multiplicarem-se a 4°C, sob atmosfera controlada de estocagem e sob condições anaeróbias, elas representam um risco significativo à saúde (KIROV, 1993). A presença de *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* no presente estudo confirma outros relatos (FREITAS et al., 1998, RALL et al., 1998, GONZÁLES-RODRÍGUEZ et al., 2002, ULLMANN et al., 2005, MORITA, 2005) e destaca o risco que esse microrganismo oferece em peixes (KIROV, 1993; FREITAS et al., 1998; JANDA e ABBOTT, 1998; EPA, 2006).

As espécies isoladas, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovariedade *sobria* têm sido associadas com gastroenterite (JANDA, 1991; KIROV, 1993; EPA, 2006). *Aeromonas allosaccharophila* foi isolada pela primeira vez de enguias doentes e de fezes de paciente com diarreia (MARTÍNEZ-MURCIA et al., 1992). Recentemente foi isolada de carcaças de suínos (SAAVEDRA et al., 2007).

Todos os indivíduos que comem peixe cru contaminado com esses microrganismos estão suscetíveis a gastroenterites. Entretanto certas condições de saúde aumentam o risco do indivíduo de desenvolver uma infecção severa e até fatal.

*Aeromonas* são freqüentemente observadas em crianças muito pequenas e indivíduos com sistema imunológico deficiente ou com alguma doença de base, podendo ocasionar uma infecção mais severa. Incluem-se nesse grupo de risco os indivíduos que sofrem de leucemia (TSAI et al., 2006), carcinoma, cirrose, disfunções hepáticas devido ao consumo excessivo de álcool, hepatite viral (GARCIA-IRURE et al., 2003; KAMANO et al., 2003), diabetes (TENA et al., 2007), neoplasias, doenças auto-imunes (THOMSEN e KRISTIANSEN, 2001), além daqueles que são tratados com drogas imunossupressoras ou estejam sob quimioterapia; (TENA et al., 2007, JANDA e ABBOTT, 1998; EPA, 2006), dentre outras (JANDA e ABBOTT, 1998). *A. hydrophila* possui a capacidade de se espalhar através do corpo e causar infecção generalizada nesses indivíduos.

Acredita-se que adultos sadios também sejam suscetíveis a gastroenterite devido a *Aeromonas* (JANDA e ABBOTT, 1998; ABBOTT et al., 2003). Além disso, idosos e crianças podem correr um maior risco devido à suscetibilidade natural (EPA, 2006).

As pesquisas que se dedicam à investigação desse microrganismo em pescado, do ponto de vista da saúde pública, são escassas (HÄNNINEN et al., 1997; RALL et al., 1998; GONZÁLES-RODRÍGUEZ et al., 2002; RADU et al., 2003; VIVEKANANDHAN et al., 2005). Não foi encontrada, na literatura consultada, nenhuma pesquisa dedicada à investigação de espécies de *Aeromonas* em peixes crus obtidas em feiras livres no Brasil.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio* spp.

Não foi verificada a presença de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de peixe, comercializado em feiras livres da cidade de São Paulo, pesquisadas nesse estudo.

Surtos envolvendo *V. parahaemolyticus* são mais freqüentes no Japão e outros países asiáticos (HUSS et al., 2000; ELHADI et al., 2004), além dos Estados Unidos (CDC, 2005), em contraste são raros na Europa (HERRERA et al., 2006). No Brasil não existem dados sobre a freqüência desse patógeno (CARMO et al., 2005).

ALBUQUERQUE et al. (2006), em estudo realizado com amostras de *sushis* comercializadas em cinco estabelecimentos situados em Fortaleza (CE), não verificaram a ocorrência de *V. parahaemolyticus* nas 30 amostras pesquisadas.

A pesquisa de microrganismos patógenos em amostras de diferentes espécies de peixe de água salgada obtidas em dois hipermercados em Léon, Espanha, resultou no isolamento de 4% (2/50) de amostras positivas para *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio cholerae*, também pesquisado, não foi isolado (HERRERA et al., 2006).

Embora *Vibrio parahaemolyticus* não tenha sido encontrado neste estudo, outras espécies de *Vibrio*, de interesse em saúde pública foram isolados. Dentre as espécies isoladas estão *V. cholerae* e *V. Alginolyticus*.

*Vibrio cholerae* foi isolado em 3 (15%) amostras. Um total de 9 cepas com características de *V. cholerae* foi isolado e submetido a testes sorológicos para determinação de sorogrupo, resultando em *Vibrio cholerae* não-O1/O139.

*Vibrio alginolyticus* foi isolado em 3 (15%) amostras de peixes analisadas e sendo uma espécie potencialmente patogênica, constitui risco para a saúde humana.

Dentre 25 amostras de peixes e frutos do mar coletadas em mercado de pescado em Santos (SP), MATTÉ et al. (2007) isolaram diversas espécies de víbrios, dentre as quais *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* não-O1/não-O139 e *V. alginolyticus*.

*Vibrio cholerae* não-O1 possui distribuição mundial e é ubíquo na água. Casos esporádicos são resultado da ingestão de uma grande quantidade do patógeno por meio de alimento ou água contaminada. *Vibrio cholerae* não-O1 produz um amplo espectro de doença diarréica, variando de branda a severa, idêntica a cólera (CHOI et al., 2003).

*V. alginolyticus* é um bacilo halofílico, Gram negativo e considerado como membro natural da flora marinha (BAUMANN et al., 1984). Possui habilidade de se desenvolver em água salgada e aquecida (MORRIS 2003, DZIUBAN et al., 2006), por essa razão sua incidência é alta em regiões de clima tropical e subtropical (MATTÉ et al., 1994). É uma das espécies *Vibrio* que tem sido implicada como patógeno humano. Foi associado com

infecções de ferimentos cutâneos, otite do ouvido médio e externo. Embora raramente, foi também associado a casos de conjuntivite, gastroenterite e bacteremia (SCHMIDT et al., 1979; CACCAMESE e RASTEGAR, 1999; RODRIGUES et al., 2001; CHIEN et al., 2002; ANDERSEN, 2006, DZIUBAN et al., 2006).

Desde o início da vigilância ativa para casos de infecções por *Vibrio*, diagnosticadas por laboratório, em 1996 até 2002, o *Center of Disease Control and Prevention* – CDC estima que tenha havido um aumento na incidência de infecções de 126%. Entre 2000 e 2002, esse aumento tem sido verificado para outras espécies de *Vibrios*, não *V parahaemolyticus* (CDC, 2003).

Em junho de 2006, autoridades americanas recomendaram que todas as infecções nas quais qualquer espécie de *Vibrio* estivesse implicada fossem classificadas como doença de notificação compulsória em nível nacional (CDC, 2006). Em 2007, o isolamento de *Vibrio* spp. que não seja cepa toxigênica de *Vibrio cholerae* O1 ou O139, de material clínico, passa a ser notificadas ao CDC como “vibriose”. Esse fato demonstra a importância que as infecções causadas por espécies de *Vibrio* têm adquirido nos Estados Unidos.

#### 4.6 AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DO PEIXE

O isolamento de patógenos e organismos indicadores é usado para avaliar a qualidade e segurança alimentar, permitindo o controle sanitário. Padrões microbiológicos para peixe são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde.

A Resolução nº 12 de 01 de janeiro de 2001, da ANVISA, prevê para peixes e preparações à base de pescado dois grupos distintos (BRASIL, 2001): o “grupo 7a”, que compreende peixes consumidos cozidos e o “grupo 22b”, que determina padrões microbiológicos para peixes ou pratos prontos à base de peixe, servidos crus (Quadro 5).

Para o “grupo 7a”, no qual não está previsto o consumo de peixes crus, o padrão microbiológico é a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g e o máximo de  $10^3$  UFC/g para estafilococos coagulase positiva.

Os padrões microbiológicos do segundo grupo, que inclui *sushi* (arroz com peixe cru) e/ou *sashimi* (pequenos pedaços filetados de peixe cru), determinam que coliformes termotolerantes não devam exceder  $10^2$  UFC/g, a presença de estafilococos coagulase positiva seja limitada a  $5 \times 10^3$  UFC/g, a presença de *V. parahaemolyticus* não exceda  $10^3$  UFC/g e haja ausência de *Salmonella* spp. em 25 g. Além disso, patógenos como *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* não podem estar presentes no peixe (BRASIL, 2001).

**Quadro 5:** Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos determinados pela ANVISA, segundo o grupo de alimentos e tipo de amostra.

Grupo de Alimentos	Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa				
			n	c	m	M	
<b>7</b>	<b>Pescados e Produtos de Pesca</b>						
<b>a</b>	Pescados, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes, "in natura", resfriados ou congelados, não consumidos crus; moluscos bivalves, "in natura", resfriados ou congelados, não consumidos crus; (...)	Estaf. coag. Positiva/g	10 <sup>3</sup>	5	2	5x10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
		<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência	5	0	Ausência	-
<b>22</b>	<b>Pratos Prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares)</b>						
<b>b</b>	A base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, <i>carpaccio</i> , <i>sushi</i> , <i>sashimi</i> , etc)	Coliformes a 45°C/g	10 <sup>2</sup>	5	2	10	10 <sup>2</sup>
		Estaf. coag. Positiva/g	5x10 <sup>3</sup>	5	3	10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>3</sup>
		<i>V. parahaemolyticus</i>	10 <sup>3</sup>	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
		<i>Salmonella</i> sp./25g	Ausência	5	0	Ausência	-

\*Fonte: Resolucao-RDC nº 12 de 12 de janeiro de 2001 da ANVISA

Para a pesquisa das condições higiênico-sanitárias de peixes comercializados em feiras livres, não seria necessária a contagem de coliformes termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*. Porém devemos levar em conta que os hábitos da população estão mudando e que os peixes adquiridos para o consumo cozido podem estar sendo consumidos crus. Os comerciantes, mais dinâmicos pela natureza de seu ofício, já sentiram essa mudança, e estão oferecendo, mesmo em desacordo com a legislação vigente (Decreto municipal n.º 25.545, de 14/03/88), peixes prontos para o consumo em forma de *sashimis*, como foi constatado durante a coleta.

Se o resultado da análise das amostras do presente estudo for comparado aos critérios descritos no grupo 7a do Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001), desconsiderando-se o consumo, cru ou cozido, do alimento, 100% das amostras estariam em condições satisfatórias. Entretanto, considerando-se como base os padrões descritos no grupo 22b, não-aplicável em feiras livres, 9 (45%) amostras estariam inapropriadas para o consumo humano (Quadro 3).

Embora a existência dos riscos microbiológicos associados ao consumo de peixes crus seja bem conhecida, dados sobre a incidência de contaminação associada a esse tipo de alimento, bem como a origem da contaminação são escassos no Brasil (CARMO et al., 2005).

No Brasil, peixes e frutos do mar foram implicados em 1% e 0,37%, respectivamente, de surtos de doenças transmitidas por alimentos (CARMO et al., 2005). É provável que estes números não reflitam a realidade e se devam à falta de notificação, uma vez que o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) ainda não está totalmente implantado. Na Austrália, os peixes e crustáceos são responsáveis por 16% e 6%, respectivamente, dos surtos de origem conhecida (DALTON et al., 2004, HALL et al., 2005). Estimativa recente sobre o impacto das doenças de fonte alimentar na Inglaterra e País de Gales demonstrou que frutos do mar são responsáveis por 7% dos casos e 4% das mortes anualmente (ADAK et al., 2005). Na Escócia, o pescado está associado a 6,1% dos surtos de DTAs (TIRADO e SCHMIDT, 2000).

Estimativas indicam que doenças de origem alimentar causem, a cada ano, aproximadamente 76 milhões de casos, 325 mil hospitalizações e 5 mil mortes, somente nos Estados Unidos. Mesmo em países desenvolvidos, a taxa de identificação do agente etiológico das DTAs é baixa em relação à daqueles não-identificados. Nos Estados Unidos os casos com etiologia desconhecida somam 62 milhões de casos, 265 mil hospitalizações e 3.200 mortes (MEAD et al., 1999). No Brasil, desde a implantação do Sistema Nacional de Vigilância (VE-DTA) em 1999 até 2004, foram notificados 3.737 surtos de doenças de origem alimentar, com quase 3,5 milhões de hospitalizações e registradas 38 mortes, com uma média de 568.341 casos por ano. Em 80% (2.989/3.737) dos surtos não foi possível determinar o agente etiológico envolvido (CARMO et al., 2005).

De acordo com a SEMAB (2006), desde a metade do século XVII a comercialização de peixes e produtos excedentes das fazendas era realizada na cidade, porém a Lei n.º 11.683, de 17/11/94, que regulamenta a comercialização de pescados, além de aves e vísceras, foi editada séculos depois (SÃO PAULO, 1994).

As vias públicas, locais onde ocorrem a maioria das feiras livres, possuem focos de insalubridade, tais como presença de lixo, conseqüentemente, insetos e animais errantes (AUDI, 2002; FIGUEIREDO et al., 2007). Ainda que a legislação do município de São Paulo preveja o recolhimento do lixo gerado pelas feiras, isso ocorre somente após o término dela (Decreto n.º 35.028, de 31/03/95). Além disso, é fácil constatar que sanitários, água potável e energia elétrica não estão disponíveis nestes locais para feirantes e consumidores, proporcionando maior risco de contaminação cruzada.

A presença de instalações sanitárias em feiras livres está prevista no Decreto municipal n.º 25.545, de 14/03/88, e foi passada à responsabilidade dos feirantes por meio da Lei n.º 12.605, de 06/05/98 (SÃO PAULO, 1988; SÃO PAULO, 1998). Na avaliação das condições higiênico-sanitárias das feiras livres da cidade de São Paulo, em 50 feiras observadas, 48 (96%) delas não continham instalações sanitárias (AUDI, 2002).

Apesar de ser uma fonte de proteína saudável, o peixe ou pescado é facilmente perecível, reflete as condições microbiológicas do local de captura e, além disso, pode ser contaminado devido à manipulação inadequada e

exposição a temperaturas abusivas, pós-captura (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Em feiras livres o pescado deve ser transportado em veículos isotérmicos, mantido sob refrigeração e a água de degelo, bem como resíduos, deve ser recolhida em recipientes apropriados (Lei 11.683, 1994), porém nem sempre essas práticas são observadas (CAPISTRANO et al., 2004). Além disso a Portaria n.º 026 da SEMAB, de 10/09/2002, determina que o produto seja transportado em recipientes fechados, isotérmicos, confeccionados com material liso, resistente, impermeável, de fácil limpeza e expostos através de vitrine com gelo picado recobrimdo os produtos expostos visando à manutenção da temperatura. A portaria determina, ainda, a utilização de gelo produzido com água potável e proveniente de estabelecimentos legalizados.

FALCÃO et al. (2002) avaliaram a carga microbiana de 60 amostras de gelo comercial, coletadas em seis locais diferentes, dentre os quais fábricas de gelo, mercado de peixe e barracas de feira. Não foi observada nas amostras coletadas a contaminação por *V. cholerae* e *Aeromonas* spp. Em 50 amostras de gelo foram isoladas cepas de *E. coli* e em 1 amostra foi detectada a presença de *Salmonella* Enteritidis, demonstrando que o gelo é uma importante fonte potencial de enterobactérias patógenas.

Na observação de 66 barracas de pescado em feiras livres paulistanas, em 60 (91%) o pescado não era mantido sob gelo e em 58 (88%) eram utilizados utensílios de madeira para o corte do produto (AUDI,

2002). Em feiras da região sul da cidade de São Paulo, CAPISTRANO et al. (2004) observaram pescado sob temperatura ambiente e sem procedência conhecida. Além disso, foram observadas práticas que acrescentam risco à saúde do consumidor, tais como uso de tábuas de corte em madeira para limpeza do pescado e água de procedência ignorada sendo utilizada concomitantemente para lavagem de mãos e utensílios. Quanto à procedência do peixe, resultado semelhante foi obtido em feiras livres de Cuiabá (MT), onde em 16 amostras de peixe exposto à venda, 15 (93,75%) não passaram por inspeção (FIGUEIREDO et al., 2007).

As caixas que servem como meio de armazenamento e transporte do pescado têm um importante papel na preservação desse alimento. No entanto o material do qual são feitas pode ser fonte de contaminação. Superfícies plásticas são favoráveis à adesão de microrganismos (formação de biofilme) devido à porosidade do material.

Os biofilmes, complexos ecossistemas microbianos, podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies tanto no ambiente quanto em um hospedeiro. Bactérias em biofilmes são geralmente mais resistentes a antimicrobianos (DRENKARD e AUSUBEL, 2002), além disso, biofilmes possibilitam a troca genética, podendo aumentar o potencial patogênico da comunidade microbiana existente nesse ambiente (PARSEK e SINGH, 2003). Em determinados momentos, os biofilmes sofrem dispersão, liberando microrganismos que

podem vir a colonizar novos ambientes e assim gerar problemas de saúde pública.

A maioria dos patógenos pode formar biofilmes (HALL-STOODLEY et al., 2004), dentre eles *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* spp. os quais foram isolados no presente estudo.

VARGAS e QUINTAES (2003), realizaram a análise microbiológica das superfícies internas do fundo de caixas plásticas tipo monobloco, usadas no transporte, armazenamento e comercialização de pescados, sendo que 14 provenientes de feiras livres e 2 de mercado municipal. Foram isolados 26 diferentes espécies de microrganismos entre deterioradores e patógenos. Dentre os quais *V. metschnikovii*, *A. hydrophila*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Proteus mirabilis*. Os autores sugerem que caixas de plástico sejam inadequadas e que seja utilizado um material mais apropriado, que possua características que permitam higienização efetiva das superfícies em contato com o alimento e resistência aos danos físicos, evitando a contaminação do pescado.

#### 4.7 RELEVÂNCIA PARA SAÚDE PÚBLICA

O comércio internacional de peixe e produtos derivados tem crescido substancialmente nas últimas décadas (CATO, 1998) e continua em expansão (FAO, 1999). Isso requer um controle sanitário rigoroso e intensa precaução de danos à saúde (NASCIMENTO et al., 2001), uma vez que a carga microbiana que os pescados possuem depois da captura está relacionada com as condições do meio ambiente e da qualidade microbiológica da água. Além disso, ela pode ser ampliada com a manipulação e processamento inadequados, bem como com o abuso de temperatura, como mencionado anteriormente (CROCI e SUFFREDINI, 2003).

A proteína de peixe, que possui reconhecidos benefícios nutricionais, como qualquer alimento de origem animal, pode, ao contrário, tornar-se um risco para quem a consome se as boas práticas durante a manipulação/preparação e conservação não forem observadas (HUSS et al., 2000; DIAZ, 2004), mesmo depois de cozidos. Esse risco é potencializado se o peixe for ingerido marinado, defumado, cru ou levemente cozido, como é de hábito em muitos países.

Não somente a integração do mercado mundial e a globalização cultural, mas também o incentivo a um estilo de vida mais saudável, buscando uma melhor qualidade nutricional ou simplesmente a perda de

peso, entre outras razões (HAWKES, 2006), têm popularizado o consumo de pratos à base de peixe cru, antes restrito aos países orientais (HAMADA-SATO et al., 2005). Essa prática, além de não garantir a eliminação de patógenos presentes no alimento, ainda favorece a contaminação cruzada. Surtos recentes nos Estados Unidos destacam a importância de alimentos ingeridos crus como causa de doenças em humanos (CDC, 2006).

Esses pratos podem ser consumidos nos inúmeros restaurantes espalhados pela cidade – especializados ou não –, em casa – através de serviço de entrega – ou preparados pelo próprio consumidor (GERMANO et al., 2003; SOARES e GERMANO, 2004; MARTINS, 2006; MÁRSICO et al., 2006). O fato chama a atenção para os riscos inerentes a esse tipo de alimento, devido ao papel que o peixe cru pode representar na veiculação de DTA (ANVISA, 2005).

Ingredientes usados crus, que podem abrigar microrganismos potencialmente patogênicos, são freqüentemente manipulados em cozinhas domésticas, tornando as superfícies de contato uma importante fonte de infecção (MATTICK et al., 2003). Manipulação e preparação inadequadas, tempo de armazenamento e cozimento impróprios, assim como capacidade de refrigeração das geladeiras domésticas, podem atuar como fatores de proliferação desses microrganismos. Esse fato pode explicar a substancial proporção de doenças transmitidas por alimentos originadas em alimentos preparados em casa (KENNEDY et al., 2005, REDMOND e GRIFFITH, 2003; LEE et al., 2001). No Brasil, as residências são os locais de maior

ocorrência de surtos de DTA (48,5%), seguidas por restaurantes (18,8%) e escolas (11,6%) (CARMO et al., 2005).

Bactérias como *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* spp. sobrevivem nas mãos, esponjas e panos de prato. Panos de prato podem se tornar altamente contaminados com diversas populações microbianas em um curto período de uso (MATTICK et al., 2003). *S. aureus*, por exemplo, continua viável em superfícies secas, como aço inox, por horas e até dias (KUSUMANINGRUM et al., 2003).

O abuso de tempo e temperatura é o fator mais importante para a qualidade dos alimentos devido à contribuição direta dessas variáveis na proliferação de microrganismos. Estudos demonstram que existem falhas no conhecimento do consumidor com respeito ao tempo de armazenamento e temperatura de refrigeração dos alimentos. Na Suécia, a maioria dos consumidores pesquisados (76%) não tem conhecimento da temperatura do seu refrigerador (MARKLINDER et al., 2004). Na Irlanda, a incidência de isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* em refrigeradores domésticos é de 41%, 6% e 7%, respectivamente (KENNEDY et al., 2005).

De modo geral a incidência de diarreia aguda em adultos é difícil de determinar, uma vez que a ocorrência de gastroenterites associadas aos alimentos não chegam aos serviços de saúde brasileiros. A maioria dos episódios são autolimitados e de breve duração, e provavelmente por essa

razão não despertam maiores cuidados. Da mesma forma não é possível determinar com precisão o número de doenças transmitidas por alimentos.

As deficiências na informação, a falta de conhecimento de quais alimentos são mais implicados, quais agentes etiológicos são isolados, quais são os mecanismos de contaminação e quais são os patógenos emergentes, dentre outras, dificultam estudos epidemiológicos, que são importantes para o desenvolvimento de ações de prevenção.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística<sup>6</sup>, em 2000, a população com 60 anos ou mais representava quase 15 milhões de pessoas. As projeções indicam que esse número poderá dobrar até 2020. Com o aumento da população de idosos haverá o aumento de doenças crônico-degenerativas, conseqüentemente o número de pessoas suscetíveis às DTAs será maior.

O isolamento de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 e *Aeromonas hydrophila* demonstra o papel importante que peixes consumidos crus possuem como veículos de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas.

---

<sup>6</sup> IBGE, Censo Demográfico 1991/2000.

## 5. CONCLUSÃO

Para a interpretação dos resultados das análises microbiológicas de peixes comercializados nas feiras livres da cidade de São Paulo foi levada em consideração a possibilidade do mesmo ser consumido cru. Portanto os resultados aqui resumidos foram comparados aos valores estabelecidos no grupo de alimentos número 22, item b, da RDC 12 de 02 de janeiro de 2001.

- A contagem de coliformes termotolerantes variou entre  $<3 \times 10^0$  a  $4,3 \times 10^3$  NMP  $g^{-1}$ .
- Em 5 (25%) amostras a contagem de coliformes termotolerantes apresentou valores superiores a  $10^2$  NMP  $g^{-1}$ , limite permitido.
- *Escherichia coli* foi isolada de 2 (10%) amostras, representando um perigo para o consumidor, mesmo que as contagens de coliformes termotolerantes estejam dentro dos limites estipulados pela legislação.
- No total, 6 (30%) amostras estavam em condições sanitárias insatisfatórias, portanto impróprias para o consumo humano, devido aos valores apresentados pela contagem de coliformes termotolerantes e/ou a presença de *Escherichia coli*.
- Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp.

- *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) foi encontrado em 2 (10%) amostras, porém os valores encontrados estavam abaixo dos limites de tolerância estabelecidos pela legislação.
- O gênero *Aeromonas* esteve presente em 10 (50%) amostras, sendo que as espécies mais implicadas em gastroenterites foram isoladas. *Aeromonas hydrophila* foi isolada em 2 (10%) amostras, *A. caviae* e *A. veronii* biovariedade *sobria* foram isoladas em 5 (25%) amostras cada uma.
- Não foi constatada a presença de *Vibrio parahaemolyticus*.
- *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 foi isolado em 3 (15%) amostras, representando perigo para os consumidores, uma vez que mesmo cepas não-epidêmicas de *V. cholerae* podem causar diarreia. Além disso, *Vibrio alginolyticus* foi isolado em 3 (15%) delas, representando um perigo adicional.
- Alguns microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos isolados neste estudo não possuem parâmetros previstos na legislação brasileira, porém atribuímos às amostras com sua presença o resultado de insatisfatórias para consumo humano, uma vez que estes já foram implicados a doenças no homem.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas bactérias são implicadas como causa de doenças e representam um perigo maior causado pela manipulação de peixe contaminado ou pela ingestão de pescado cru ou inadequadamente cozido. Esta pesquisa demonstra que peixes comercializados nas feiras livres da cidade de São Paulo abrigam *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139, *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophila*. Somente a presença de *Vibrio cholerae*, por si só, representa um evento inquietante, a despeito da baixa incidência de outros microrganismos nas amostras pesquisadas, patogênicos ou potencialmente patogênicos. O fato de diferentes espécies de *Aeromonas* estarem inicialmente presentes, terem a capacidade de crescer rapidamente sob refrigeração e possuir espécies com potencial patogênico é outro fator preocupante. Além disso, a contaminação com patógenos cujos reservatórios são animais e o homem (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*), mesmo que em baixa quantidade, alerta-nos para o risco da ocorrência de manipulação inadequada, contaminação cruzada e abuso do binômio tempo/temperatura. Os achados sugerem que os peixes da maneira como estão sendo comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo podem representar risco à saúde, especialmente para populações mais suscetíveis como crianças, idosos e adultos com doença de base. No Brasil, com o rápido crescimento da população de idosos, eleva-se também a população de portadores de doenças crônico-degenerativas, aumentando esse grupo de risco.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Do ponto de vista de Saúde Pública, se torna importante e necessária uma campanha educacional dirigida aos vendedores, manipuladores profissionais de alimentos e consumidores, alertando para o risco potencial do consumo de peixe cru ou levemente cozido.

A população deveria ser alertada sobre os perigos da aquisição de peixes já fracionados e/ou prontos para o consumo em forma de *sashimis* para que ocorra uma redução na procura, reduzindo assim a oferta.

Os alimentos que podem ser consumidos crus deveriam possuir um padrão microbiológico mais restrito em tolerância e mais amplo em pesquisa de microrganismos.

O risco inerente a esse tipo de alimento pode ser reduzido se a população for mais bem informada. Entendendo o risco, é possível aprender a prevenir as DTAs seguindo algumas medidas simples de higiene, quando do preparo desse tipo de prato.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>7</sup>

Abbott SL, Seli LS, Catino M JR, Hartley MA, Janda JM. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. J Clin Microbiol 1998; 36(4): 1103-4.

Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol 2003; 41(6): 2348-57.

Adak GK, Meakins SM, Yip H, Lopman BA, O'Brien SJ. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. Emerg Infect Dis 2005; 11(3): 365-72.

Albuquerque WF, Evangelista-Barreto NS, Silva AIM, Vieira RHSF. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e Estafilococos coagulase positiva, em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza-CE. Hig aliment 2006; 20(146): 58-61.

Andersen PH. Infections with seawater bacteria. EPI-NEWS 2006; (26-32): 1. [acesso em 11 mai 2007]. Disponível em: [http://www.ssi.dk/graphics/en/news/epinews/2006/PDF/2006-26\\_32-final-www\\_2.pdf](http://www.ssi.dk/graphics/en/news/epinews/2006/PDF/2006-26_32-final-www_2.pdf)

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. [acesso em 15 jun 2005]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/imprensa/clipping/2005/abril/100405.pdf>.

Ardehali B, Hand K, Nduka C, Holmes A, Wood S. Delayed leech-borne infection with *Aeromonas hydrophila* in escharotic flap wound. J Plast Reconst Aesth Surg 2006; 59(1): 94-5.

---

<sup>7</sup> Apresentação de acordo com o Comitê Internacional de Revistas Biomédicas (USP 2006)

Audi SG. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das feiras-livres do município de São Paulo – SP. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2002.

Azevedo Filho AC, Romano APM, Barros AML, Dimech CP, Santos DA, Hatch DL, Carmo EH, Santos ED, Carmo GMI, Duarte HHP, Sobel J, Alves RMS, Nunes RN, Araújo WN, Wanderley ZD. Investigação de surto de diarreia aguda com isolamento de *V. cholerae* O1 Ogawa toxigênico no município de São Bento do Una – PE. Bol Eletrônico Epidemiol [periódico na internet] 2004; 8: 1-6. [acesso em 11 dez 2005]. Disponível em: [http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/boletim\\_eletronico\\_epi/boletim\\_eletronico\\_epi\\_0804.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0804.pdf)

Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000; 61(1): 1-10.

Balotescu C, Israil A, Radu R, Alexandru I, Dobre G. Aspects of constitutive and acquired antibioresistance in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from water sources. Roum Arch Microbiol Immunol 2003; 62(3-4): 179-89. [resumo na internet] [acesso em 20 abr 2004]. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=16008142&query\\_hl=3&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16008142&query_hl=3&itool=pubmed_docsum)

Barboni SAV. Ocorrência de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2001 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de todos os santos e Valença, Bahia – Brasil. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.

Barralet J, Stafford R, Towner C, SMITH P. Outbreak of *Salmonella* Singapore associated with eating sushi. Commun Dis Intell 2004; 28(4): 527-8.

Bauab TM. *Aeromonas* spp. de origem humana e ambiental: características fenotípicas, sorotípicas, genotípicas e de virulência [tese de doutorado]. Rio Claro (SP): Instituto de Biociências de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista; 2000.

Bauab TM, Levy CE, Rodrigues J, Falcão DP. Niche-specific association of *Aeromonas* ribotypes from human and environmental origin. *Microbiol Immunol* 2003; 47(1): 7-16.

Baumann P, Furniss AL, Lee JL. Genus I: *Vibrio* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins Co.; 1984. p. 518-38.

Bautista MC, Engler MM. The Mediterranean diet: is it cardioprotective? *Prog Cardiovasc Nurs* 2005; 20(2): 70-6.

Borchardt MA, Stemper ME, Standridge JH. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(2): 224-8.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan 2001. In: Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2001.

Bulhões CCC, Rossi Jr OC. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2002; 54(3): 320-4.

Buzby JC, Roberts T, Lin CTJ, MacDonald JM. *Bacterial Foodborne Disease: medical costs and productivity losses*. Washington (DC); United States

Department of agriculture. Food and Consumer Economics Division, Economic Research Service. 1996. Agricultural Economics Report 741.

Caccamese SM, Rastegar DA. Chronic diarrhea associated with *Vibrio alginolyticus* in an immunocompromised patient. Clin Infect Dis 1999; 29: 946-7.

Calia KE, Murtagh M, Ferraro MJ, Calderwood SB. Comparison of *Vibrio cholerae* O139 with *V. cholerae* O1 classical and El Tor biotypes. Infect Immun 1994; 62(4): 1504-6.

Capistrano DL, Germano PML, Germano MIS. Feiras livres do município de São Paulo sob o ponto de vista legislativo e sanitário. Hig aliment 2004; 18(116-117): 37-42.

Carmo GMI, Oliveira AA, Dimech CP, dos Santos DA, de Almeida MG, Berto LH, Alves RMS, Carmo EH. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no BRASIL, 1999 - 2004. Bol Eletr Epidemiol 2005; 5(6): 1-7.

Cato, J.C. Economic values associated with seafood safety and implementation of seafood Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programmes. FAO Fisheries Technical Paper 1998; n 381. Rome, FAO. 1998. 70p.

[CDC] Centers For Disease Control And Prevention. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - western United States, 1992-1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993; 42(14): 258-63.

[CDC] Centers For Disease Control And Prevention. Outbreak of *Salmonella* serotype Javiana infections--Orlando, Florida, June 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51(31): 683-4.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Foodborne Illnesses — Selected Sites, United States, 2002. MMWR 2003; 52(15): 340-3.

[CDC] Centers For Disease Control And Prevention. Preliminary FoodNet Data on incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites, United States, 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005; 54(14): 352-64.

[CDC] Centers For Disease Control And Prevention. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006; 55: 1045-6.

Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis 2001; 7(2): 178-82.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. Int J Food Microbiol 2001; 68: 11–20.

Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 83–98.

Chien JY, Shih JT, Hsueh PR, Yang PC, Luh KT. *Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21(5): 401-3.

Choi SM, Lee DG, Kim MS, Park YH, Kim YJ, Lee S, Kim HJ, Choi JH, Yoo JH, Kim DW, Min WS, Shin WS, Kim CC. Bacteremic cellulitis caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* in a patient following hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2003; 31(12): 1181-2.

Chopra AK, Xu X, Ribardo D, González M, Kuhl K, Peterson JW, Houston CW. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2808-18.

Clark NM, Chenoweth CE. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2003; 37(4): 506-13.

Colwell RR, Macdonell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36: 473-7.

Costa AB. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. [tese de doutorado]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP; 2003.

Croci L, Suffredini E. Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici. *Ann Ist Super Sanita* 2003; 39(1): 35-45.

Cunha Neto A, Silva CGM, Stamford TLM. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment* 2002; 22(3): 263-71.

[CVE] Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos e Água. Microorganismos Patogênicos/Doenças. 2003 [acesso em 12 set 2004]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN\\_BACT.HTM](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN_BACT.HTM)

Cwierka KJ. From Ethnic to Hip: Circuits of Japanese Cuisine in Europe. *Food & Foodways* 2005; 13(4): 241-72.

Dalton CB, Gregory J, Kirk MD, Stafford RJ, Givney R, Kraa E, Gould D. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. *Commun Dis Intell* 2004; 28(2): 211-24.

Diaz JH. Is fish consumption safe? *J La State Med Soc* 2004; 156(1): 42-9.

Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* 1991; 12(4): 289-301.

Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002; 416(6882): 740-3.

[DSMZ] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial Nomenclature Up-To-Date (Approved Lists, Validation Lists). Braunschweig, Germany. 2005. [acesso em 17 dez 2005]. Disponível em: <http://www.dsmz.de/download/bactnom/bactname.pdf>

Dziuban EJ, Liang JL, Craun GF, Hill V, Yu PA, Painter J, Moore MR, Calderon RL, Roy SL, Beach MJ. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water-United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55(12): 1-30.

Elhadi N, Radu S, Chen CH, Nishibuchi M. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J Food Prot* 2004; 67(7): 1469-75.

[EPA] United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington, D.C.; 2006. [acesso em 21 set 2006]. Disponível em: <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/humanhealth/microbial/aeromonas-200603.pdf>

[ERS] Economic Research Service - United States Department of Agriculture. Economics of foodborne disease: feature. [acesso em 16 set 2004]. Disponível em: [http://www.ers.usda.gov/Briefing/Foodborne Disease/](http://www.ers.usda.gov/Briefing/Foodborne%20Disease/)

[ESR] Institute of Environmental Science and Research Limited. Microbial Pathogen Data Sheets: *Staphylococcus aureus*. 2001 [acesso em 14 ago 2006]. Disponível em: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/staphylococcus-aureus.pdf>

Falcão DP, Lustrri WR, Bauab TM. Incidence of Non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in Fresh Water in Araraquara, Brazil. *Curr Microbiol* 1998; 37(1): 28-31.

Falcão JP, Dias AMG, Correa EF, Falcão DP. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. *Food Microbiology* 2002; 19(4): 269-76

Falcão JP, Falcão DP, Gomes TAT. Ice as a vehicle for diarrheagenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2004; 91: 99-103.

Fang TJ, Wei QK, Liao CW, Hung MJ, Wang TH. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 2003; 80(3): 241-50.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1999. Historical consumption and future demand for fish and fishery products: exploratory calculations for the years 2015/30, by Y. Ye. *FAO Fisheries Circular No. 946*. Rome. 31 pp.

[FAO FAOSTAT]: Database Fisheries Data. [documento na internet]; [acesso em 20 set 2005]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=esxt&hasbulk=0&subset=fisheries>

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2006*. Rome, 2007. [acesso em 27 mar 2007]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699e00.htm>

[FEHD] Food and Environmental Hygiene Department - Government of the Hong Kong Special Administrative Region. *Risk Assessment Studies*. N° 20

[documento na internet] 2005. [acesso em 20 set 2005]. Disponível em: [http://sc.info.gov.hk/gb/www.fehd.gov.hk/safefood/report/vibrios/vibrios\\_ra.html](http://sc.info.gov.hk/gb/www.fehd.gov.hk/safefood/report/vibrios/vibrios_ra.html)

Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect* 2000; 2(13): 1651-60.

Fell G, Hamouda O, Lindner R, Rehmet S, Liesegang A, Prager R, Gericke B, Petersen L. An outbreak of *Salmonella* Blockley infections following smoked eel consumption in Germany. *Epidemiol Infect* 2000; 125(1): 9-12.

Figueiredo EES, Imbelloni MF, Elesbão HS, Santos AF. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de manipulação e comercialização de produtos de origem animal nas feiras-livres do município de Cuiabá, MT. *Hig aliment* 2007; 21(148): 38-42.

Figueiredo VCF. Métodos moleculares aplicados na pesquisa de *Escherichia coli* O 157 em amostras fecais de bovinos. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

Filler G, Ehrich JH, Strauch E, Beutin L. Acute renal failure in an infant associated with cytotoxic *Aeromonas sobria* isolated from patient's stool and from aquarium water as suspected source of infection. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 469-70.

Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(12): 948-58.

Franco BDGM e Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu; 2002.

Freitas AC, Souza SMS, Macedo LC, Pinto EC, Pereira SS. *Aeromonas* species associated with gastroenteritis in children: Prevalence, characteristics and virulence properties. *Rev Microbiol* 1998; 29(2): 152-7.

[FUNASA] Fundação Nacional de Saúde – Ministério da Saúde. Doenças de Notificação Compulsória. Bol Eletr Epidemiol 2002 2(2): 11.

Garcia-Irure JJ, Navascues A, Vivanco M, Rodrigo A. Peritonitis bacteriana espontânea y bacteremia por *Aeromonas hydrophila*. An Sist Sanit Navar 2003; 26(3): 429-31.

Gaulin C, Vincent C, Ismail J. Sporadic infections of *Salmonella* Paratyphi B, var. Java associated with fish tanks. Can J Public Health 2005; 96(6): 471-4.

Gavriel AA, Landre JP, Lamb AJ. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. J Appl Microbiol 1998; 84(3): 383-92.

Germano PML, Miguel M, Miguel O, Germano MIS. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. Hig aliment 1993a; 7(27): 6-11.

Germano PML, Oliveira JCF, Germano MIS. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. Hig aliment 1993b; 7(28): 40-5.

Germano PML, Germano MIS, Oliveira CAF. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em Saúde Pública. Hig aliment 1998; 12(53): 30-7.

Germano PML, Germano MIS, Oliveira CAF. Qualidade do pescado. In: Germano PML, Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 2ª ed. São Paulo: Varela; 2003. p.125-139.

Gibotti A, Saridakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambe Stream (State of Parana, Brazil). J Appl Microbiol 2000; 89(1): 70-5.

Gillespie IA, Adak GK, O'Brien SJ, Brett MM, Bolton FJ. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with fish and shellfish, England and Wales, 1992-1999. *Commun Dis Public Health* 2001; 4(2):117-23.

González-Rodríguez MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3 degrees C. *Int J Food Microbiol* 2002; 76(1-2): 135-41.

González-Romo F, Rubio M, Betriu C, Picazo JJ; Grupo IGP. Prevalence and treatment of Gram-positive infections in internal medicine departments of Spanish hospitals: IGP Study. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16(4): 428-35.

Gram L, Huss HH. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol* 1996; 33(1): 121-37.

Guerin PJ, De Jong B, Heir E, Hasseltvedt V, Kapperud G, Styrmo K, Gondrosen B, Lassen J, Andersson Y, Aavitsland P. Outbreak of *Salmonella* Livingstone infection in Norway and Sweden due to contaminated processed fish products. *Epidemiol Infect* 2004; 132(5): 889-95.

Hall G, Kirk MD, Becker N, Gregory JE, Unicomb L, Millard G, Stafford R, Lalor K; OZFOODNET WORKING GROUP. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8): 1257-64.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(2): 95-108.

Hamada K, Tsuji H, Masuda K, Uemura K. Outbreak of Salmonellosis Caused by Ingestion of Cuttlefish Chips: Epidemiological Analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52(2): 53-4.

Hamada-Sato N, Usui K, Kobayashi T, Imada C and Watanabe E. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control* 2005;16: 301-307.

Hanashiro A, Torres EAFS, Germano MI, Germano PML. Avaliação da comercialização de refeições orientais prontas – Bentos – no bairro da Liberdade, São Paulo. *Hig aliment* 1999; 13(66): 19-31.

Hänninen ML, Oivanen P, Hirvela-Koski V. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *Int J Food Microbiol* 1997; 34(1): 17-26.

Håstein T, Hjeltnes B, Lillehaug A, Utne Skare J, Berntssen M, Lundebye AK. Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. *Rev Sci Tech* 2006; 25(2): 607-25.

Hawkes C. Uneven dietary development: linking the policies and processes of globalization with the nutrition transition, obesity and diet-related chronic diseases. *Global Health* 2006; 2(4): 1-18.

Helms M, Simonsen J, Molbak K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clin Infect Dis* 2006; 42(4): 498-506.

Hennessy TW, Hedberg CW, Slutsker L, White KE, Besser-Wiek JM, Moen ME, Feldman J, Coleman WW, Edmonson LM, Macdonald KL, Osterholm MT. A national outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections from ice cream. The Investigation Team. *N Engl J Med* 1996; 334(20): 1281-6.

Heinitz ML, Ruble RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *J Food Prot* 2000; 63(5): 579-92.

Herrera FC, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *J Appl Microbiol* 2006; 100(3): 527-36.

Holtfreter S, Broker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53(1): 13-27.

Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* 2004; 263(1-2): 217-25.

Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 2000; 11(2): 149-56.

Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir. *J Appl Microbiol* 2001; 90(6): 919-27.

Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(4): 397-410.

Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 332-44.

Kamano Y, Ohashi H, Kikuchi T, Watanabe K, Kitahara M. Liver abscess and *Aeromonas* bacteremia with septic pulmonary embolism. *Intern Med* 2003; 42(10): 1047-9.

Kennedy J, Jackson V, Blair IS, McDowell DA, Cowan C, Bolton DJ. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *J Food Prot* 2005; 68(7): 1421-30.

Kirkan S, Göksoy EÖ, Kaya O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in turkey hatchery farms. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50(7): 339-42.

Kirov SM. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int J Food Microbiol* 1993; 20: 179-98.

Ko WC, Chuang YC. *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1298–304.

Ko WC, Lee HC, Chuang YC, Liu CC, Wu JJ. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. *J Infect* 2000; 40: 267–73.

Ko WC, Chiang SR, Yan JJ, Chuang YC. Comparative pathogenicity of bacteraemic isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(7): 553-8.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 2003; 81(3):197-204.

Kossoy B, Carneiro MLT. O Olhar Europeu: o negro na iconografia brasileira do século XIX. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo (SP): Edusp; 2002. p. 50, 52, 53.

Krzyminska S, Mokracka J, Laganowska M, Wlodarczak K, Guszczynska E, Liszkowska J, Popkowska E, Lima I, Lemanska I, Wendt M. Enhancement of the virulence of *Aeromonas caviae* diarrhoeal strains by serial passages in mice. *J Med Microbiol* 2001; 50(4): 303-12.

Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int J Food Microbiol* 2003; 85(3): 227-36.

Lee WC, Lee MJ, Kim JS, Park SY. Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. *J Food Prot* 2001; 64(6): 899-902.

Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 1987;155(3): 377-89.

Lima MG, Reis RB. Incidência de *Salmonella* spp.: comparação entre metodologias de detecção em amostras de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de rio e cultivado comercializados no município de Cuibá – MT. Hig aliment 2002; 16(101): 43-9.

Marklinder IM, Lindblad M, Eriksson LM, Finnson AM, Lindqvist R. Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated foods in Sweden. J Food Prot 2004; 67(11): 2570-7.

Mársico ET, Oliveira CM, Ferreira PV, Antunes L, Sobreiro LG. Avaliação da qualidade de *sushis* e *sashimis* comercializados em *shopping centers*. Hig aliment 2006; 20(147): 63-5.

Martínez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E, Collins MD. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol Lett 1992; 91(3): 199-206.

Martins AMM. Ambiências que abrigam o comércio informal no Rio de Janeiro. O estudo de caso do mercado popular da Rua Uruguaiana. In: Colóquio Internacional 2005: comércio, culturas e políticas públicas em tempos de globalização; 2005 nov 22-25; Rio de Janeiro, (BR). Rio de Janeiro. [documento na internet] 2005. [acesso em 26 fev 2007]. Disponível em: [http://www.ess.ufrj.br/site\\_coloquio/angela\\_martins.pdf](http://www.ess.ufrj.br/site_coloquio/angela_martins.pdf)

Martins FO. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (*sushi* e *sashimi*) a base de pescado cru servidos na cidade de São Paulo. São Paulo (SP); 2006. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Martins LM, Marquez RF, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 32(3): 237-42.

Mascarenhas G. Feiras livres: Informalidade e espaços de sociabilidade. In: Colóquio Internacional 2005: comércio, culturas e políticas públicas em tempos de globalização; 2005 nov 22-25; Rio de Janeiro, (BR). Rio de Janeiro. 2005a. [acesso em 26 fev 2007]. Disponível em: [http://www.ess.ufrj.br/site\\_coloquio/mesa2\\_05.pdf](http://www.ess.ufrj.br/site_coloquio/mesa2_05.pdf)

Mascarenhas G. Ordenando o espaço público: a criação das feiras livres na cidade do Rio de Janeiro. Scripta Nova. Revista electrónica de geografía y ciencias sociales. [periódico na internet]. 2005b. IX (194:62). [acesso em 10 mai 2007]. Disponível em: <http://www.ub.es/geocrit/sn/sn-194-62.htm>

Massa S, Altieri C, D'angela A. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. Int J Food Microbiol 2001; 63(1-2): 169-73.

Matté GR, Matté MH, Sato MIZ, Sanchez PS, Rivera IG, Martins MT. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the coast of Brazil. J Appl Bacteriol 1994; 77: 281-7.

Matté MH. Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da represa de Guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1995.

Matté MH. Ribotipagem de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas jandaei*, potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1996.

Matté RG. Estudo de *Vibrio spp.* Potencialmente patogênicos por meio de métodos moleculares. [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.

Matté MH, Baldassi L, Barbosa ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matté GR. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. Food Control 2007; 18: 747-51.

Mattick K, Durham K, Hendrix M, Slader J, Griffith C, Sen M, Humphrey T. The microbiological quality of washing-up water and the environment in domestic and commercial kitchens. J Appl Microbiol 2003; 94(5): 842-8.

McCarthy SA, Khambaty FM. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. Appl Environ Microbiol 1994; 60(7): 2597-601.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mccaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5(5): 607-25.

Mendonça SC, Correia RTP, Albino E. Condições higiênico-sanitárias de mercados e feiras-livres da cidade de Recife-PE. Hig aliment 2002; 16(94): 20-5.

Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Survival of an *Aeromonas hydrophila* in an artificial mineral water microcosm. Water Res 2002; 36(13): 3410-5.

Morita M. Avaliação da qualidade sanitária e pesquisa de *Aeromonas spp* em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

Morris JG. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clin Infect Dis 2003; 37(2): 272-80.

Moyer NP. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. J Clin Microbiol 1987; 25(11): 2044–8.

Munoz P, Fernandez-Baca V, Pelaez T, Sanchez R, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. *Aeromonas* peritonitis. Clin Infect Dis 1994; 18: 32–7.

Muratori MCS, Costa APR, Viana CM, Rodrigues PC, de Podestá Jr. RL. Qualidade sanitária de pescado ‘in natura’. Hig aliment 2004; 18(116-117): 50-4.

Nascimento SMM, Vieira RHSF, Theophilo GND, Rodrigues DP, Vieira GHF. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shirimp consumers. Rev Inst Med trop S. Paulo 2001; 43(5): 263-6.

Neyts K, Huys G, Uyttendaele M, Swings J, Debevere J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. Lett Appl Microbiol 2000; 31(5): 359-63.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11(1): 142-201. Errata em: Clin Microbiol Rev 1998;11(2): 403.

Nojimoto ITI, Bezana CSC, do Carmo C, Valadão, LM e Carrijo KM. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995 - 1996. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 1997, 30(5): 385-8.

Oetterer M; Perujo SD, Gallo CR, Arruda LF, Borghesi R, Cruz AMP. Monitoring the sardine (*sardinella brasiliensis*) fermentation process to obtain anchovies. Scientia Agricola 2003; 60(3): 511-7.

Ojeda-Vargas M. Infecciones del tracto urinario causadas por bacterias del género *Aeromonas*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23(3): 181-2.

Oliveira WK, Wada, MY, Lima JRC, Pinheiro AMC, Britto NPB, Arcanjo SRS, Barbosa LMM, Machado CB, et al. Investigação do surto de gastroenterite

por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará, setembro, 2002. Bol Epidemiol 2002; (4): 5-7.

Olsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS, Bean NH, Slutsker L. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks — United States, 1993 – 1997. In: CDC Surveillance Summaries, 2000. MMWR 2000; 49 (SS-1): 1-62.

Ørmen Ø, Granum PE, Lassen J, Figueras MJ. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. APMIS 2005; 113: 203–7.

Ørskov F. Genus I: *Escherichia* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins Co.; 1984.p. 420-3.

O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. Semin Pediatr Infect Dis 2005; 16(2): 125-36.

Parras F, Diaz MD, Reina J, Moreno S, Guerrero C, Bouza E. Meningitis due to *Aeromonas* species: case report and review. Clin Infect Dis 1993; 17: 1058–60.

Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol 2003; 57: 677-701.

Pasquale V, Baloda SB, Dumontet S, Krovacek K. An Outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). Appl Environ Microbiol 1994; 60(5): 1678-80.

Pavlov D, De Wet CM, Grabow WO, Ehlers MM. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. Int J Food Microbiol 2004; 92(3): 275-87.

Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in

*natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. Ciênc Tecnol Aliment 2004; 24(4): 562-6.

Pianetti A, Falcioni T, Bruscolini F, Sabatini L, Sisti E, Papa S. Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. Appl Environ Microbiol 2005; 71(12): 7948-54.

Popoff M. Genus III, *Aeromonas*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins Co.; 1984.p. 545-8.

Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. Int J Food Microbiol 2003; 81(3): 261-6.

Rall VLM, Iaria ST, Heidtmann S, Pimenta FC, Gamba RC, Pedroso DMM. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp): virulence factors and drug susceptibility. Rev Microbiol 1998; 29(3): 222-7.

Razzolini, MTP. Pesquisa de *Aeromonas* e suas toxinas em águas de consumo humano provenientes de caixas d'água e bebedouros. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade Mackenzie; 1998.

Redmond EC, Griffith CJ. Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. J Food Prot 2003; 66(1): 130-61.

Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev 2002; 26(2): 125-39.

Resende A. Análises microbiológicas, de metais contaminantes (Hg e Pb), e metais nutricionais (Zn e Cu) em *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes de Brasília. [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Instituto de Química da UnB; 2004.

Ribeiro MJ, Campos E. Alimentação em São Paulo. [documento na internet] 2007. [acesso em 14 mai 2007]. Disponível em: [http://www.fotoplus.com / dph/info10/index.html](http://www.fotoplus.com/dph/info10/index.html)

Rivera IN, Chun J, Huq A, Sack RB, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(6): 2421-9.

Rocha SM. Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins - SP. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

Rodrigues SMA, Gonçalves EGR, Mello DM, de Oliveira EG, Hofer E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. *Rev Soc Bras Med trop* 2001; 34(5): 407-11.

Saavedra MJ, Perea V, Fontes MC, Martins C, Martínez-Murcia A. Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007; 91: 159-67.

Saker-Sampaio S, Vieira RHSF. Manuseio do pescado a bordo. In: Vieira RHSF, coordenador. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2004. p. 25-34.

Santos JA, Gonzalez CJ, Otero A, Garcia-Lopez ML. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(12): 5612-4.

São Paulo (Município). Decreto 25.545 de 14 de março de 1988. Dispõe sobre o funcionamento das feiras livres no município de São Paulo e dá outras providências. *Diário Oficial do Município, São Paulo*, 25 de março de 1988 p. 23 a 25.

São Paulo (Município). Lei 11.683 de 17 de novembro de 1994. Dispõe sobre a proibição de comercializar todos os tipos de carne, peixes e aves abatidas em barracas de feiras livres no município de São Paulo que não apresentam condições mínimas de higiene e dá outras providências. Diário Oficial do Município, São Paulo, 18 de novembro de 1994 p. 1.

São Paulo (Município). Lei 12.605 de 06 de maio de 1998. Dispõe sobre a instalação de cabinas sanitárias públicas removíveis, nas feiras de alimentação e dá outras providências. Diário Oficial do Município, São Paulo, 07 de maio de 1998 p. 1.

Sautour M, Mary P, Chihib NE, Hornez JP. The effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila* and on its subsequent survival in microcosm water. J Appl Microbiol 2003; 95(4): 807-13.

Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2004;17(1): 14-56.

Schmidt U, Chmel H, Cobbs C. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. J Clin Microbiol 1979; 10(5): 666-8.

Scoglio ME, Di Pietro A, Picerno I, Delia S, Mauro A, Lagana P. Virulence factors in *Vibrios* and *Aeromonads* isolated from seafood. New Microbiol 2001; 24(3): 273-80.

Sehgal HS, Sehgal GK. Aquacultural and socio-economic aspects of processing carps into some value-added products. Bioresour Technol 2002; 82(3): 291-3.

SEMAB. Secretaria Municipal de Abastecimento [homepage]. São Paulo: Prefeitura do Município de São Paulo; 2006 [atualização não disponível; [acesso em 13 set 2006]. Disponível em: <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/abastecimento/organizacao/estrutura/feiras.asp>

Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J Appl Microbiol* 2004; 97(5): 1077-86.

Servin AL. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2): 264-92.

Silva CF, Schwan RF, Sousa Dias ES, Wheals AE. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2000; 60: 251-60.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo (SP): Varela; 2001. p.259-67.

Soares CM, Germano PML. Análise da qualidade microbiológica de *sashimis*, comercializados em *shopping centers* da cidade de São Paulo, Brasil. *Hig aliment* 2004; 18(116/117): 88-92.

Soler L, Figueras MJ, Chacon MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32(3): 243-7.

Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol* 1999, 28(2): 113-7.

Sousa LG. A origem das feiras. In: Memórias de Economia [on line]. Eumed.net. edición electrónica; 2004 [documento na internet]; [acesso em 14 mai 2006]. Disponível em: [www.eumed.net/cursecon/libreria/](http://www.eumed.net/cursecon/libreria/)

Sousa OV, Vieira RH, Menezes FG, Reis CM, Hofer E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*,

collected from a natural nursery in the Coco river estuary, Fortaleza, Ceara, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2004; 46(2): 59-62.

Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens. Int J Food Microbiol 2002; 78(1-2): 31-41.

Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Gimeno C, Perez-Pomata MT, Bisquert J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25(4): 235-41.

Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Tamura K, Watanabe H. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated ikura-sushi ingestion. Jpn J Infect Dis 1999, 52(2): 52-3.

Thomsen RN, Kristiansen MM. Three cases of bacteraemia caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. Scand J Infect Dis 2001; 33(9): 718-9.

Tirado C, Schmidt K. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 7<sup>o</sup> Report, 1993-1998. [documento na internet] 2000. [acesso em 15 mai 2007]. Disponível em: [http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp\\_fr.htm](http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp_fr.htm)

Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infect Immun 2005; 73(1): 18-29.

Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 2002; 8(5): 508-13.

Tsai GJ, Chen TH. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. Int J Food Microbiol 1996; 31(1-3): 121-31.

Tsai GJ, Yu SC. Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. Int J Food Microbiol 1997; 37(2-3): 137-43.

Tsai MS, Kuo CY, Wang MC, Wu HC, Chien CC, Liu JW. Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39(2): 150-4.

Ullmann D, Krause G, Knabner D, Weber H, Beutin L. Isolation and characterization of potentially human pathogenic, cytotoxin-producing *Aeromonas* strains from retailed seafood in Berlin, Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52(2): 82-7.

[USP] Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Guia de apresentação de teses. Cuenca AMB, de Andrade MTD, Noronha DP, Ferraz MLEF. 2 ed. São Paulo: A Biblioteca, 2006.

Valdimarsson G. An FAO perspective. In: Ryder, J.; Ababouch, L. (eds.) Fifth World Fish Inspection and Quality Control Congress. The Hague, Netherlands, 20–22 October 2003. FAO Fisheries Proceedings. No. 1. Rome, FAO. 2005. 162p.

Vargas DST, Quintaes KD. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas* 2003; 23(3): 517-22.

Vasudevan P, Marek P, Daigle S, Hoagland T, Venkitanarayanan KS. Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets. *J Food Safety* 2002; 22(4): 209–17.

Venieri D, Vantarakis A, Komninou G, Papapetropoulou M. Microbiological evaluation of bottled non-carbonated ("still") water from domestic brands in Greece. *Int J Food Microbiol* 2006; 107(1): 68-72.

Vieira RHSF, Rodrigues DP, Barreto NSE, Sousa OV, Tôrres RCO, Ribeiro RV, Nascimento, SMM, Costa, FAP, Madeira ZR. Microrganismos causadores de intoxicações e infecções alimentares vinculadas ao pescado.

In: Vieira RHSF, coordenador. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2004. p. 89 -197.

Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, Gascon J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(5): 552-5.

Vilches S, Urgell C, Merino S, Chacon MR, Soler L, Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Tomas JM. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Environ Microbiol* 2004 70(11): 6914-9.

Villari P, Crispino M, Montuori P, Boccia S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(1): 697-701.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D. et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34(2): 344-53.

Vital Brazil JM, Alves RM, Rivera IN, Rodrigues DP, Karaolis DK, Campos LC. Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 1999. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215(1): 15-21.

Vivekanandhan G, Hatha AAM, Lakshmanaperumalsamy P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. *Food Microbiol* 2005; 22(1): 133-7.

Watanabe E, Tamada Y, Hamada-Sato N. Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on KI value. *Biosens Bioelectron* 2005; 21(3): 534-8.

Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, Hudson MJ, Roderick PJ. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to

national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *BMJ* 1999; 318(7190): 1046-50.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(12): 751-62.

Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 569-84.

Yano Y, Yokoyama M, Satomi M, Oikawa H, Chen SS. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. *J Food Prot* 2004; 67(8): 1617-23.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)