

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Micro-organismos patogênicos em pescados do
estuário da Lagoa dos Patos**

Janaina Viana da Rosa

Pelotas, 2014

JANAINA VIANA DA ROSA

Micro-organismos patogênicos em pescados do estuário da Lagoa dos Patos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Cláudio Dias Timm
Co-orientador: Eduarda Hallal Duval

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
(Gabriela Machado Lopes – CRB-10/1842)

R788m Rosa, Janaina Viana da

Micro-organismos patogênicos em pescados do estuário da lagoa dos patos / Janaina Viana da Rosa ; orientador Cláudio Dias Timm; co-orientadora Eduarda Hallal Duval - Pelotas, 2014.
36 f. : il.

Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

1. Peixes 2. *Vibrio parahaemolyticus* 3. *Salmonella enterica*
4. *Mugil platanus* 5. *Paralichthys orbignyanus* I. Timm, Cláudio Dias (orientador) II Duval, Eduarda Hallal (co-orientadora)
III. Título.

CDD 639.3

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dra. Eduarda Hallal Duval (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Eliézer Ávila Gandra (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Éverton Fagundes da Silva (Universidade Federal de Pelotas)

Agradecimentos:

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus e à minha família, meus pais, Elsa Viana da Rosa e Jorge Luiz Leal da Rosa e meu irmão Wagner Viana da Rosa por sempre me apoiarem em todas etapas da minha vida e, da melhor maneira, me proporcionarem uma vida maravilhosa.

Ao meu professor e orientador Dr. Cláudio Dias Timm e a toda equipe do laboratório, pelo valioso ensinamento prático-teórico em todo período de mestrado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), na Universidade Federal de Pelotas, onde pude amadurecer em caráter profissional e pessoal.

Às minhas amigas e meu namorado por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos e por me darem muita força.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos

Resumo

ROSA, Janaina Viana da. **Micro-organismos patogênicos em pescados do estuário da Lagoa dos Patos**. 2014. 36f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Nos últimos anos, o consumo de peixes vem aumentando, já que ele fornece proteínas, possui baixa quantidade de gordura saturada e é rico em micronutrientes, além de ser também fonte de ácidos graxos que oferecem benefícios para a saúde. Entretanto, os pescados constituem um potencial veículo de micro-organismos causadores de doenças em seres humanos, estando sujeitos à contaminação por micro-organismos adquiridos tanto no ambiente aquático, como durante a captura, manipulação e transporte. Treze desembarques de pescados foram acompanhados e 130 peixes (65 inteiros e 65 limpos) foram analisados quanto à presença de *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica*. Os peixes provenientes do estuário da Lagoa dos Patos foram coletados no desembarque e após o processamento, e analisados para verificar a sua contaminação. Para comparação dos isolados, foi feita análise pela rep-PCR. As espécies desembarcadas foram a corvina (*Micropogonias furnieri*), a tainha (*Mugil platanus*) e o linguado (*Paralichthys orbignyanus*). *V. parahaemolyticus* foi isolado de 4,61% amostras de peixes inteiros e 4,61% de peixes já eviscerados e prontos para o comércio. *S. enterica* foi isolada de 1,54% de eviscerados. Quatro cepas *V. parahaemolyticus*, apresentaram idêntico perfil de bandas, sendo uma de peixe inteiro e uma de peixe eviscerado do 2º desembarque e duas do 3º desembarque, ambas de peixes já limpos. Outras duas cepas foram oriundas de peixes inteiros de desembarques diferentes e apresentaram distintos perfis de bandas. No caso do 2º desembarque, a matéria-prima permaneceu contaminada com a mesma cepa bacteriana mesmo após a evisceração e a higienização do pescado para venda, indicando que estes procedimentos não foram suficientes para eliminar o micro-organismo do alimento. No 3º desembarque, provavelmente tenha ocorrido contaminação cruzada a partir de algum outro pescado contaminado. *S. enterica* foi identificada em duas amostras de peixes já processados, oriundos do mesmo desembarque e as duas cepas apresentaram perfis de bandas iguais. Como não houve isolamento do micro-organismo de peixes inteiros, presume-se que a causa da contaminação por *S. enterica* se deva a falhas higiênico-sanitárias no processo de evisceração, como utensílios ou mãos dos manipuladores contaminados. *V. parahaemolyticus* ocorre naturalmente em pescados do estuário da Lagoa dos Patos e pode permanecer nos peixes após evisceração e higienização. *S. enterica* pode estar presente no pescado pronto para a venda, provavelmente devido a práticas higiênico-sanitárias impróprias durante seu processamento, uma vez que esta bactéria não foi isolada de peixes inteiros. Existe a necessidade de orientar os manipuladores quanto aos seus hábitos higiênico-sanitários, além de significativa melhoria nas operações de limpeza e sanificação, de modo a serem eliminados os riscos microbiológicos e assim garantir a inocuidade do alimento.

Palavras-chave: Peixes. *Vibrio parahaemolyticus*. *Salmonella enterica*. *Mugil platanus*. *Paralichthys orbignyanus*. Segurança alimentar.

Abstract

ROSA, Janaina Viana da. **Micro-organismos patogênicos em pescados do estuário da Lagoa dos Patos**. 2014. 36f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In recent years, the fish consumption has been increasing, since it provides protein, has low amount of saturated fat and is rich in micronutrients, as well as being a source of fatty acids that can offer health benefits. However, the fish is a potential vehicle for microorganisms that can cause diseases in humans, because they are subject to contamination by microorganisms acquired in the aquatic environment, as well as during harvesting, handling and shipping. Thirteen landings of fish were monitored and 130 fish (65 integer and 65 clean) were analyzed for the presence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica*. Fish from Lagoa dos Patos estuary were collected on the arrival and after being processed, and then analyzed to verify its contamination. In order to compare the isolates, rep-PCR analysis was performed. The species collected were croakers (*Micropogonias furnieri*), gray mullet (*Mugil platanus*) and the flounder (*Paralichthys orbignyanus*). *V. parahaemolyticus* was isolated from 4.61 % of whole fish samples and 4.61 % of gutted fish and ready to trade. *S. enterica* was isolated from 1.54% of gutted fish. Four *V. parahaemolyticus* strains showed identical profile bands, one from whole fish and one from gutted fish from the both the second landing, and two from gutted fish from the third landing. Two other strains came from whole fish from different landings and has showed distinct banding profiles. On the second landing, the fish remained contaminated with the same bacterial strain even after gutting and hygienization, when ready for sale, indicating that these procedures were not enough to eliminate the microorganism. On the third landing, probably a cross contamination from some other contaminated fish has occurred. *S. enterica* was identified in two samples of fish already processed, that came from the same landing and the two strains showed the same bands profiles. As there was no isolation of this microorganism in the whole fish, it is assumed that the cause of contamination with *S. enterica* is due to hygienic and sanitary failures in the evisceration process, such as contaminated utensils or hands. *V. parahaemolyticus* naturally occurs on the fish of Lagoa dos Patos estuary, and can remain in the fish after gutting and cleaning. *S. enterica* may be present in fish ready for sale, probably due to improper sanitary-hygienic practices during processing since this bacterium was not isolated from the whole fish. There is a need to guide the handlers about hygienic and sanitary habits, besides a significant improvement in cleaning and sanitizing operations, in order to eliminate the microbiological risks and ensure the food safety.

Keywords: Fish. *Vibrio parahaemolyticus*. *Salmonella enterica*. *Mugil platanus*. *Paralichthys orbignyanus*. Food safety.

Lista de Figuras

Artigo	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Salmonella enterica</i> em pescados do estuário da Lagoa dos Patos	
Figura 1	Análise comparativa das cepas <i>V. parahaemolyticus</i> por rep-PCR.....	26
Figura 2	Análise comparativa das cepas de <i>S. enterica</i> por rep-PCR	27

Lista de Tabelas

Artigo ***Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos**

Tabela 1 *Primers* utilizados na identificação de *V. parahaemolyticus*.....22

Tabela 2 Quantidade e época das coletas, espécies e isolados em cada tipo de peixe analisado.....23

Lista de Abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
G	Gramas
HCl	Ácido Clorídrico
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetro quadrado
m	Metro
M	Molar
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
V	Volume

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivos.....	13
3 Artigo.....	14
4 Conclusão Geral.....	33
5 Referências.....	34

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos têm como principal funcionalidade o fornecimento de energia e nutrientes para formação e manutenção dos tecidos nos seres vivos (GAVA *et al.*, 2009). Dentre eles, o pescado representa uma valiosa fonte proteica para a alimentação humana e o seu consumo tem apresentado um aumento gradual (MASKE *et al.*, 2011). No Brasil, a pesca artesanal tem significativa participação na produção nacional, contribuindo com aproximadamente 45% do pescado nacional (Ministério da Pesca e Aquicultura, 2011).

O pescado possui uma microbiota própria, que coexiste em equilíbrio biológico no peixe vivo (OGAWA e MAIA, 1999; VIEIRA, 2004) e que reflete as condições microbiológicas do local onde o pescado foi capturado (MURATORI *et al.*, 2004). Após a captura, o pescado também pode ser contaminado durante o transporte, contato com o gelo, manipulação, contato com superfícies e equipamentos, ambiente de estocagem e de comercialização (HUSS, 1997; OGAWA e MAIA, 1999; CARDOSO *et al.*, 2003).

As doenças transmitidas por alimento (DTA) causam, em geral, sintomas gastrointestinais, como diarreia, dores abdominais e vômitos, sendo as bactérias os agentes etiológicos de maior importância. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 30% da população dos países industrializados são anualmente acometidas por DTA (WHO, 2013). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabelece limites de tolerância para os principais patógenos em alimentos, de forma a garantir a segurança do consumidor.

Vibrio é um gênero bacteriano de ambiente tipicamente marinho e estuarino. Bactérias deste gênero são isoladas de peixes e crustáceos, sendo capazes também de se multiplicar sem hospedeiro em águas marinhas (LIMA, 1997). Dentre as espécies patogênicas importantes para humanos, o *V. parahaemolyticus* é

considerado um patógeno relevante nas regiões costeiras de clima temperado e tropical em todo o mundo (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2004). Este micro-organismo tem sido responsável por casos de gastroenterites associadas ao consumo de peixes, moluscos e crustáceos do mar, crus ou mal cozidos (HEITMANN *et al.*, 2005). No Japão, em torno de 20 a 30% das intoxicações alimentares são pelo consumo de frutos do mar contaminados com *V. parahaemolyticus* (ALAM *et al.*, 2002). Na Europa, foram descritos casos em diversos países como na Itália (OTTAVIANI *et al.*, 2008) e França (QUILICI *et al.*, 2005).

Salmonella enterica se distribui amplamente na natureza, especialmente no trato intestinal de animais e humanos (KONEMAN *et al.*, 2001), e pode ser isolada de peixes frescos de águas contaminadas próximo à costa marítima, de rios ou lagos (LIPP e ROSE, 1997). As salmonelas são consideradas as principais causas de doença entérica de origem bacteriana no ser humano, sendo responsáveis por grandes surtos de DTA (D'AOUST *et al.*, 2001). Causa em humanos dores abdominais, febre, vômitos e diarreia (FOX, 2009). De acordo com FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2009) ocorrem de 2 a 4 milhões de casos de salmonelose anualmente nos Estados Unidos. Diversos surtos de salmonelose de origem alimentar são observados e relatados com frequência (NEWELL *et al.*, 2010).

O estudo dos perfis moleculares de isolados de *V. parahaemolyticus* e *S. enterica* obtidos de peixes inteiros e de peixes eviscerados prontos para consumo é um valioso instrumento para o avanço no conhecimento das DTA causadas por essas bactérias. A identificação de clones desses patógenos em distintas etapas da cadeia epidemiológica constitui importante informação para a compreensão das formas de transmissão dos agentes etiológicos e para a elaboração de medidas de controle das enfermidades por eles causadas. A reação em cadeia da polimerase de elementos repetitivos (rep-PCR) tem sido usada com sucesso na diferenciação de cepas de *V. parahaemolyticus* e *S. enterica* (WONG e LIN, 2001; RASSCHAERT *et al.*, 2005). A rep-PCR pode ser gerada pela determinação da presença de sequências repetidas que estão distribuídas no genoma através da PCR de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos (REP-PCR), sequências intergênicas enterobacterianas repetitivas de consenso (ERIC-PCR), elementos BOX (BOX-PCR), politrinucleotídeo (GTG)₅, bem como da composição dos dados de mais de uma dessas técnicas, de forma a compor um único perfil molecular (KUDIRKIENE *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

Geral

- Isolar *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* em pescados capturados artesanalmente no estuário da Lagoa dos Patos.

Específicos

- Isolar micro-organismos nos pescados no momento do desembarque;
- Isolar micro-organismos nos pescados após a evisceração e preparo para o comércio;
- Estabelecer a similaridade entre os isolados obtidos antes e após o preparo dos pescados para a venda.

3 ARTIGO

3.1 Artigo 1

***Vibrio parahaemolyticus e Salmonella enterica* em pescados do estuário da
Lagoa dos Patos**

**ROSA, J. V. da; SILVA, C. S. J; BARBOSA, F. C.; BAIRROS, J. V.; DUVAL, E.
H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D.**

***Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos**

Resumo

Nos últimos anos, o consumo de peixes vem aumentando, já que ele fornece proteínas, possui baixa quantidade de gordura saturada e é rico em micronutrientes, além de ser também fonte de ácidos graxos que oferecem benefícios para a saúde. Entretanto, os pescados constituem um potencial veículo de micro-organismos causadores de doenças em seres humanos, estando sujeitos à contaminação por micro-organismos adquiridos tanto no ambiente aquático, como durante a captura, manipulação e transporte. Este trabalho teve por objetivo isolar *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* em peixes do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente. Treze desembarques de pescados foram acompanhados e 130 peixes (65 inteiros e 65 limpos) foram analisados quanto a presença de *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica*. Para comparação dos isolados, foi feita análise pela rep-PCR. *V. parahaemolyticus* foi isolado de *M. furnieri* e de *M. platanus* a partir de peixes inteiros e de *M. platanus* de peixes eviscerados. *S. enterica* foi isolada apenas de *P. orbignyianus* já eviscerados. O mesmo perfil de bandas do *V. parahaemolyticus* foi observado em peixe inteiro e eviscerado do mesmo desembarque, sugerindo falhas no processamento que não conseguiu eliminar o micro-organismo da matéria-prima ou não preveniu a contaminação cruzada. Como *S. enterica* não foi isolada de peixe inteiro, presume-se que a causa da contaminação se deva a falhas higiênico-sanitárias no processo de evisceração como utensílios ou mãos dos manipuladores contaminados. Os resultados mostram que peixes das espécies *M. furnieri* e *M. platanus* capturados no estuário da Lagoa dos Patos podem albergar *V. parahaemolyticus* e que este micro-organismo, da mesma forma que *S. enterica*, pode também estar presente no pescado limpo, pronto para o comércio.

Palavras-chaves: Micro-organismos patogênicos; peixe; *Mugil platanus*; *Paralichthys orbignyianus*; segurança alimentar.

Abstract

In recent years, the consumption of fish is increasing, since it provides protein, has low amount of saturated fat and rich in micronutrients, beyond being a source of fatty acids that offer health benefits. However, the fish is a potential vehicle for microorganisms that can cause diseases in humans and is subject to contamination by microorganisms acquired on the aquatic environment, and also during harvesting, handling and shipping. This study aimed to determine the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* in fish from Lagoa dos Patos estuary, captured and processed manually. Thirteen landings of fish were monitored and analyzed. The isolates were compared by rep-PCR analysis. *V. parahaemolyticus* was isolated from *M. furnieri* and *M. platanus*. *V. parahaemolyticus* was isolated from whole fish samples of *M. furnieri* and *M. platanus* and gutted fish samples of *M. platanus*. *S. enterica* was isolated only from gutted fish samples of *P. orbignyanus*. The sameband profile of *V. parahaemolyticus* was observed in whole and gutted fish samples from the same landing, what suggests that there were processing failures that wasn't capable to eliminate the microorganism from the raw fish or failed to prevent cross contamination. As *S. enterica* was not isolated from whole fish, it is assumed that the cause of the contamination is due to hygienic and sanitary failures in the evisceration process, like contaminated utensils or hands. The results show that fish species *M. furnieri* and *M. platanus* captured on the Lagoa dos Patos estuary can be a source of *V. parahaemolyticus* and this microorganism, like *S. enterica*, may also be present in the clean fish ready for market.

Keywords: Pathogenic micro-organisms; fish; *Mugil platanus*; *Paralichthys orbignyanus*; food security.

Introdução

Nos últimos anos o consumo de peixes vem aumentando, já que ele fornece proteínas, possui baixa quantidade de gordura saturada e é rico em micronutrientes, além de ser também fonte de ácidos graxos, como ômega-3, que propiciam benefícios para a saúde humana (FDA, 2009). Efeito protetor contra doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral isquêmico também tem sido reportado (MOZAFFARIAN e RIMM, 2006; WU, 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de peixes de uma a duas vezes por semana (WHO, 2003). Entretanto, por ser um alimento com características intrínsecas necessárias à sobrevivência de muitos patógenos, como pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água (igual ou superior a 0,98) e elevado teor de nutrientes, os pescados constituem um potencial veículo de micro-organismos causadores de doenças em seres humanos (APHA, 2001). Popovic *et al.* (2010) reportaram a importância da manipulação e do armazenamento adequados, já que o pescado é um alimento de alta perecibilidade e de fácil contaminação microbiológica. Ele está sujeito à contaminação por diversos micro-organismos adquiridos tanto no ambiente aquático, como durante a captura, manipulação e transporte (VIEIRA, 2004; RESENDE *et al.*, 2009). As ações preventivas durante a manipulação dos alimentos são eficazes para evitar a contaminação dos mesmos, pois identificam riscos no início da etapa do processo de produção, minimizando a ocorrência desses eventos e contribuindo para atingir o padrão e controle de qualidade necessários (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estudos indicam os manipuladores de alimentos como um dos principais fatores implicados em surtos de doenças de origem alimentar, relacionando-os diretamente com a contaminação dos alimentos, decorrente de doenças, de maus hábitos de higiene e de práticas inadequadas na operacionalização do sistema produtivo de refeições (CAVALLI e SALAY, 2007).

Vibrio parahaemolyticus é um micro-organismo que se distribui em todo o mundo em ambientes marinhos e estuarinos, sendo mais abundante nas regiões mais quentes. Pode ser isolado de pescados e a sua presença representa um perigo para os consumidores (SU, 2007). Este micro-organismo pode causar diarreia, dor

abdominal, vômitos, febre e dores de cabeça. *V. parahaemolyticus* é facilmente eliminado do pescado por exposição ao calor (HUSS,1997), estando as doenças causadas por este patógeno associadas ao consumo de pescados crus ou mal cozidos e também produtos que tenham sido recontaminados (CCFH, 2002).

Salmonella enterica pode ser encontrada no trato gastrointestinal de aves, bovinos, suínos, peixes e humanos, sendo o micro-organismo mais comum em relatos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (VESTBY *et al*, 2009). A salmonelose em humanos causa dores abdominais, febre, vômitos e diarreia (FOX, 2009). As bactérias do gênero *Salmonella* são encontradas no pescado fresco. Rall *et al.* (2011) analisaram 33 amostras de peixe fresco comercializado na cidade de Botucatu e *S. enterica* foi detectada em 3% delas. É mais comum a introdução do micro-organismo durante a manipulação ou pelo contato com águas contaminadas. O habitat desse gênero de bactérias é o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, por isso sua presença indica uma provável contaminação fecal, atribuída ao manuseio do pescado por indivíduos infectados, ao contato com superfícies mal higienizadas ou à contaminação cruzada (MARTINS *et al.*, 2002). A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), através da RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001, determina ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas, para o pescado “in natura” e resfriados.

O estuário da Lagoa dos Patos, no extremo sul do Brasil, ocupa uma área de 963,8 km² (10% da área total desta laguna), recebendo água dos rios localizados na sua porção norte e da Lagoa Mirim, ao sul, através do Canal São Gonçalo (CALLIARI, 1998). O estuário representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal de importância destacada no abastecimento de pescados no sul do Brasil (REIS, 1999). Para garantir a qualidade desses alimentos, é necessário o correto manuseio durante a captura, o processamento, a estocagem e a comercialização. Segundo Baldisserotto (2009), não há estudos sobre a qualidade do pescado continental vendido ao consumidor no Rio Grande do Sul. Também faltam estudos que permitem conhecer a ocorrência de agentes etiológicos de DTA em pescados da região, em especial do estuário da Lagoa dos Patos, o que constitui a base indispensável para traçar planos efetivos de controle da sua transmissão para os consumidores.

O estudo dos perfis moleculares de isolados de *V. parahaemolyticus* e *S. enterica* obtidos de peixes inteiros e de peixes eviscerados prontos para consumo é um valioso instrumento para o avanço no conhecimento das DTA causadas por essas bactérias. A identificação de clones desses patógenos em distintas etapas da cadeia epidemiológica constitui importante informação para a compreensão das formas de transmissão dos agentes etiológicos e para a elaboração de medidas de controle das enfermidades por eles causadas. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo o isolamento de *V. parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* em peixes do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente.

Materiais e métodos

Coleta das amostras

Treze desembarques de pescados capturados na colônia de pescadores Z-3, no município de Pelotas, RS, e no mercado público do município de Rio Grande, RS, provenientes de capturas realizadas com métodos artesanais no estuário da Lagoa dos Patos. Foram coletados aleatoriamente cinco peixes inteiros no momento de cada desembarque e cinco após o processamento (evisceração e higienização) para venda aos consumidores, totalizando 130 amostras. Os pescados foram colocados em sacos estéreis e imediatamente encaminhados ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo, para pesquisa da presença de *V. parahaemolyticus* e de *S. enterica*. As coletas foram realizadas durante os meses de abril a outubro de 2013.

Pesquisa de *Vibrio* spp.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi feita conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration - FDA (KAYSNER & DEPAOLA, 2004), com modificações. As guelras e o fígado de cada peixe foram coletados, colocados em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia), massageados por 5 minutos e incubados a 37 °C por 24 horas para enriquecimento. A partir do material da superfície dessas culturas foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar Tiosulfato Citrato Bili Sacarose (TCBS,

Himedia) e incubação a 37 °C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Até três colônias típicas de cada placa foram semeadas em APA e, após incubação a 37 °C por 24 horas foram misturadas com 20% de glicerol para manutenção de estoque a -70 °C. Os isolados foram recuperados em APA a 37 °C por 24 horas, quando necessário.

Pesquisa de *Salmonella enterica*

A pesquisa de *S. enterica* foi realizada de acordo com as recomendações da FDA (ANDREWS & HAMMACK, 2011), com modificações. Resumidamente, 25 g do intestino de cada pescado foram acondicionados em saco estéril com 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia, Lansing, Michigan, USA), massageados por 5 minutos e incubados a 35 °C por 24 horas. Após a etapa de pré-enriquecimento, foi transferido 1 mL do meio de pré-enriquecimento para 10 mL de caldo Tetrionato (TT, MicroMed, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport- Vassiliadis (RP, MicroMed), e foi feita incubação em banho-maria a 42 °C por 24 horas. Uma alíquota de cada um destes caldos foi semeada por esgotamento em placas com ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS, MicroMed) e placas com ágar Xilose Lisina Dextrose (XLD, Acumedia), seguido de incubação por 24 horas em temperatura de 35 °C. Até três colônias com características compatíveis com *S. enterica* foram selecionadas e passadas para meio Triple sugar Iron (TSI, Acumedia), Lysine Iron Agar (LIA, Acumedia) e Caldo Uréia (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) as colônias que se apresentaram características nos três tubos passaram para testes sorológicos com o soro contra o antígeno O (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), para se verificar a soroaglutinação.

Obtenção dos isolados de pescado pronto para venda

Porções de aproximadamente 25 g foram cortadas transversalmente do pescado processado artesanalmente para venda e colocadas em APT e APA para pesquisa de *S. enterica* e *Vibrio*, respectivamente, seguindo os procedimentos descritos anteriormente.

Extração de DNA

Os DNAs dos isolados foram extraídos conforme Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, foi feita uma cultura em tubos contendo APA e após incubação a 37°C por 24 horas, o pellet obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA foi ressuspenso em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram então adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70 °C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70 °C.

Identificação de *V. parahaemolyticus*

Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *toxR* (Tabela 1), para identificação de *V. parahaemolyticus* conforme Bilung *et al.* (2005), com modificações. Cada reação teve um volume final de 20 µL. Foram utilizados 10 µL de Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil), 1 µL (10 pmol) de cada primer, 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96 °C por 5 min, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63 °C por 1,5 min, extensão a 72 °C por 1,5 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,8%. Como controle positivo, foi utilizado o DNA de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 e controle negativo foi utilizada água pura.

Tabela 1: *Primers* utilizados na identificação de *V. parahaemolyticus*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
ToxR-a	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	Kim <i>et al.</i> (1999)
ToxR-b	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG		

Rep-PCR

Para comparação das cepas da mesma espécie, os DNAs de *S. enterica* e *V. parahaemolyticus* foram analisados pela rep-PCR, utilizando PCR-(GTG)₅ (VERSALOVIC *et al.*, 1994), segundo Rasschaert *et al.* (2005). As condições da rep-PCR foram as seguintes: 2,5 µL de DNA, 2 µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3', 12,5 µL de Master Mix e 8 µL de água para completar o volume da reação. Os ciclos da amplificação foram efetuados da seguinte forma: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos subsequentes de 95 °C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 60 °C por 5 minutos, e finalmente 1 ciclo de 60 °C por 16 minutos. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%. Como controle positivo de *V. parahaemolyticus*, foi utilizado o DNA da cepa ATCC 17802 e de *S. enterica* o DNA da cepa LIPOA 2047. Como controle negativo foram utilizados todos os componentes da reação, menos DNA.

Resultados e discussão

Treze desembarques de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos foram acompanhados e 130 peixes (65 inteiros e 65 limpos, prontos para a venda) foram amostrados e analisados quanto à presença de *V. parahaemolyticus* e de *S. enterica*. As espécies capturadas e desembarcadas na época do ano em que o trabalho foi realizado foram a corvina (*Micropogonias furnieri*), a tainha (*Mugil platanus*), ambas de desembarques realizados na Z-3, e o linguado (*Paralichthys orbignyanus*), obtido no mercado público de Rio Grande. As três espécies albergavam algum dos micro-organismos pesquisados (Tabela 2). Este é o primeiro registro de isolamento de *V. parahaemolyticus* de *M. furnieri* e *M. platanus*.

Tabela 2: Quantidade e época das coletas, espécies e isolados em cada tipo de peixe analisado.

Desembarques	Meses	Pescados	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>S. enterica</i>	
			Peixes inteiros	Peixes eviscerados	Peixes inteiros	Peixes eviscerados
1	Abril	<i>M. platanus</i>	1	0	0	0
2	Abril	<i>M. platanus</i>	1	1	0	0
3	Abril	<i>M. platanus</i>	0	2	0	0
4	Junho	<i>P. orbignyana</i>	0	0	0	0
5	Julho	<i>P. orbignyana</i>	0	0	0	2
6	Setembro	<i>P. orbignyana</i>	0	0	0	0
7	Outubro	<i>P. orbignyana</i>	0	0	0	0
8	Outubro	<i>M. furnieri</i>	1	0	0	0
9	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0	0	0
10	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0	0	0
11	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0	0	0
12	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0	0	0
13	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0	0	0

V. parahaemolyticus foi isolado de três (4,61%) de 65 amostras de peixes inteiros e de três (4,61%) de 65 amostras de peixes já eviscerados e prontos para o comércio (Tabela 2). O isolamento do micro-organismo apenas nas coletas de abril e outubro pode estar ligado à temperatura do ambiente. *V. parahaemolyticus* é encontrado mais comumente em climas tropical e temperado (MAGALHÃES *et al.*, 1991), onde as temperaturas são mais elevadas. Nos meses frios a bactéria está presente principalmente no lodo marinho e nos meses quentes pode estar livre na água ou nos peixes e moluscos (BUTT *et al.* 2004; SÃO PAULO, 2004). Possivelmente devido a isso, no período de coletas de junho a setembro, que são meses mais frios, o micro-organismo não foi isolado dos peixes. Chen (2004) isolou *V. parahaemolyticus* de 2,67% (3/112) de amostras de atum (*Thunnus* spp.) obtidas no município de São Paulo, SP, onde o clima é considerado subtropical, assim como na região onde o nosso trabalho foi realizado, no qual o micro-organismo foi isolado

de 4,61% (6/130) das amostras analisadas. Pereira *et al.* (2007) isolaram *V. parahaemolyticus* em 11,6% de 86 amostras de mexilhões (*Perna perna*) provenientes do município de Niterói, RJ, que possui clima tropical. Vieira *et al.* (2004) encontraram em 90 amostras de caranguejos de água doce (*Ucides cordatus*) analisadas, 8,9% positivas para *V. parahaemolyticus*, em Fortaleza, CE, onde o clima é semi-árido. Como o nosso trabalho e o de Chen (2004) incluíram coletas em épocas de frio, isso pode ter influenciado o número de isolamentos do micro-organismo, que foi menor em comparação aos estudos de Vieira *et al.* (2004) e de Pereira *et al.* (2007), realizados em climas com temperaturas ambientais mais elevadas. *V. parahaemolyticus* é encontrado com maior frequência em estuários, sedimentos, moluscos e crustáceos (ICMSF, 1978). Estas características podem também ser consideradas como fatores para as diferenças de porcentagens encontradas nos trabalhos citados, já que *Thunnus* spp. é um peixe pelágico, *Perna perna* é um molusco filtrador e *Ucides cordatus* é um crustáceo que se alimenta de detritos. Por outro lado, no nosso estudo, *V. parahaemolyticus* não foi isolado de *P. orbignyanus*, que é um peixe bentônico e vive em íntimo contato com o leito do estuário. Possíveis explicações são que o número de amostras analisadas (20 peixes inteiros de quatro desembarques) tenha sido insuficiente ou que a espécie, devido a fatores intrínsecos, não seja um hospedeiro apropriado para *V. parahaemolyticus*.

Este patógeno também tem sido isolado de diferentes espécies de pescados em estudos realizados em outros países e regiões. Herrera *et al.* (2006), em pesquisa realizada na Espanha com 50 amostras de filés e postas de diferentes peixes marinhos frescos (congro, espadarte, linguado, garoupa e badejo), encontraram *V. parahaemolyticus* em duas (4%). Estes percentuais são semelhantes aos resultados obtidos no nosso estudo. Diferentemente, Torres e Fernandez (1993), que estudaram 57 amostras de frutos do mar (ostras frescas, peixes e camarões) coletadas durante um ano em Guadalajara, México, observaram incidência de *V. parahaemolyticus* de 45,6 %, sendo 71,4% em peixes, 44% em ostras e 27,6% em camarão.

Todos os peixes analisados foram provenientes da Lagoa dos Patos, na qual existe uma troca de água com o Oceano Atlântico através de um canal com 20 km de comprimento e 0,5 a 3 km de largura (BONILHA e ASMUS, 1994). Além das chuvas e dos índices de evaporação, os ventos também controlam decisivamente a

circulação, a distribuição de salinidade e os níveis de água (GARCIA, 1998). Essas mudanças influenciam a quantidade de micro-organismos, já que pode haver entrada de água e outras espécies de animais contaminados. *V. parahaemolyticus* é encontrado com maior frequência em águas que apresentam uma ampla faixa de salinidade, semelhante àquela encontrada em estuários e áreas costeiras, entretanto a sua ocorrência é menor em locais de baixa salinidade (KELLY e STROH, 1988). Na Lagoa dos Patos, os meses de verão são aqueles em que ocorre maior entrada de água salgada (ANACLETO e GOMES, 2006). Como no nosso trabalho as coletas foram realizadas no período de outono, inverno e primavera, a salinidade da água pode ter contribuído para uma baixa incidência de *V. parahaemolyticus*.

S. enterica foi identificada em duas (3,07%) amostras de peixes já processados, oriundos do mesmo desembarque (Tabela 2). Peixes contaminados com *S. enterica* têm sido relatados em outros estudos. Onyango *et al.* (2009), analisaram 120 amostras de carne de tilápia do Nilo capturadas no Quênia e encontraram 9 (14,3%) com presença de *Salmonella* Typhimurium, 7 (11,1%) com *S. Typhi* e 4 (6,3%) *S. Enteritidis*. Em estudo realizado em uma indústria de pescado congelado em Florianópolis, SC, DAMS *et al.* (1996) encontraram *S. enterica* em 20% (1/5) de amostras de pescadinha inteira (*Cynoscion Striatus*) *in natura*, em 80% (4/5) dos filés congelados analisados e em 40% (2/5) de peixe inteiro congelado, citando como possíveis fontes de contaminação a utilização de água não potável, estocagem inadequada do pescado em locais não sanitizados, contaminação cruzada do pescado limpo e eviscerado com resíduos, contato com moscas e contaminação pelo próprio manipulador. Lorenzon (2009) encontrou *S. enterica* em 2% de peixes eviscerados e em 4% de peixes inteiros de um total de 50 amostras, em pesqueiros localizados no nordeste do Estado de São Paulo. No nosso trabalho, não houve isolamento desta bactéria a partir dos peixes inteiros.

Na análise dos isolados de *V. parahaemolyticus* pela rep-PCR, quatro cepas apresentaram idêntico perfil de bandas (Figura 1), sendo uma de peixe inteiro (v6) e uma de peixe eviscerado (e9) do 2º desembarque e duas (e11 e e15) do 3º desembarque, ambas de peixes já limpos. As outras duas cepas (v3 e v42) foram oriundas de desembarques diferentes e apresentaram distintos perfis de bandas. No caso do 2º desembarque, se sugere que a matéria-prima permaneceu contaminada com a mesma cepa bacteriana mesmo após a evisceração e a higienização do pescado para venda, indicando que estes procedimentos não foram suficientes para

eliminar o micro-organismo do alimento. No 3º desembarque, provavelmente tenha ocorrido contaminação cruzada a partir de algum outro pescado contaminado. Estas observações refletem a precariedade das medidas higiênico-sanitárias adotadas no processamento, não só sendo incapazes de eliminar a contaminação que chega com o pescado, como ainda disseminando micro-organismos indesejáveis a partir de peixes inteiros contaminados para peixes processados para a venda.

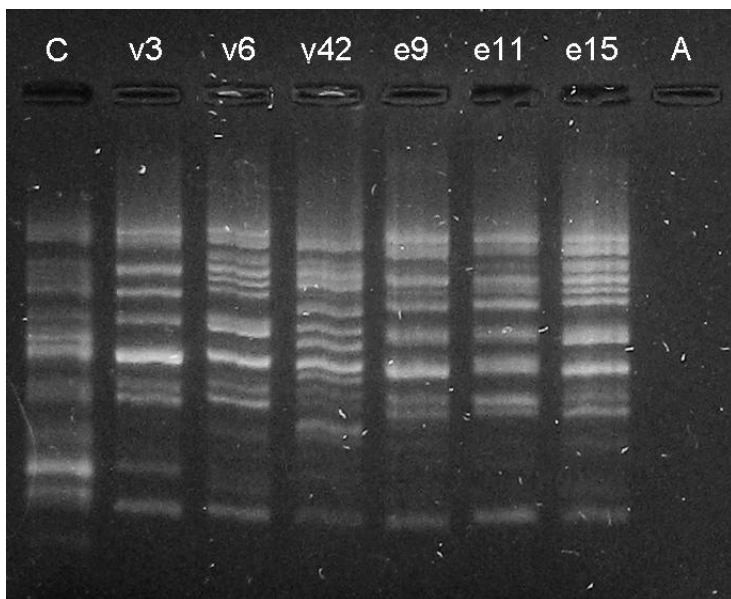


Figura 1: Análise comparativa das cepas *V. parahaemolyticus* por rep-PCR. C: DNA da cepa de referência (ATCC 17802); v: peixe inteiro; e: peixe eviscerado; A: controle negativo.

Com relação a *S. enterica*, as duas cepas isoladas apresentaram perfis de bandas iguais na técnica de rep-PCR (Figura 2). Como a bactéria foi isolada de duas amostras de peixes eviscerados oriundos de um desembarque em que não houve isolamento do micro-organismo de peixes inteiros, presume-se que a causa da contaminação se deva a falhas higiênico-sanitárias no processo de evisceração, como utensílios ou mãos dos manipuladores contaminados. Reforça este argumento o fato de *S. enterica* não ter sido isolada a partir de nenhuma amostra de peixe inteiro de qualquer desembarque, sugerindo que a sua ocorrência infectando peixes do estuário da Lagoa dos Patos, se houver, é baixa.

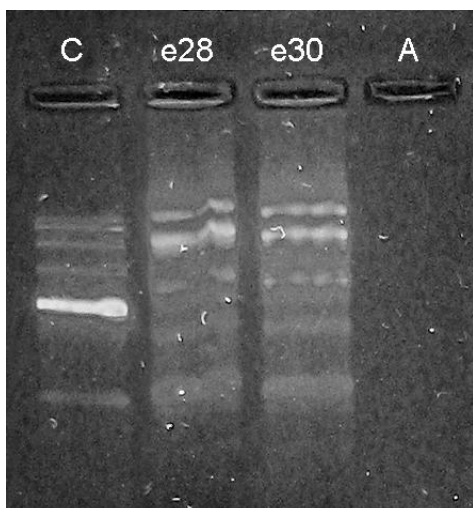


Figura 2: Análise comparativa das cepas de *S. enterica* por rep-PCR. C: DNA da cepa de referência (LIPOA 2047); e: peixe eviscerado; A: controle negativo.

É importante que cuidados higiênico-sanitários sejam adotados durante todas as fases de processamento do pescado de forma que seja minimizada a contaminação natural do alimento por *V. parahaemolyticus* e/ou *S. enterica* e prevenida a contaminação cruzada, evitando assim riscos à saúde do consumidor.

Conclusão

Os peixes das espécies *M. furnieri* e *M. platanus* capturados no estuário da Lagoa dos Patos podem albergar *V. parahaemolyticus*. Este micro-organismo, da mesma forma que *S. enterica*, pode também estar presente no pescado limpo, pronto para o comércio.

Esses resultados são um alerta quanto à importância da adoção de medidas higiênico-sanitárias corretivas e preventivas através das boas práticas de fabricação, assim como quanto à necessidade de maior fiscalização da cadeia de produção de pescados por parte dos órgãos competentes, de forma a reduzir os riscos da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos em humanos.

Referências

ANACLETO, E.I.; GOMES, E.A.T. Relações tróficas no plâncton em um ambiente Estuarino tropical: Lagoa dos Patos (RS), Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1, n.2, p.26-39, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3.ed. Whashington: DDC Vanderzant & DF Splittstoesser, 2001. 676p.

ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T. **Salmonella**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online (BAM), 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.html>>. Acesso em: 18 set. 2013.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência. Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.291-299, 2009.

BILUNG, M.L.; RADU, S.; BAHAMAN, R.A.; RAHIM, A.R.; NAPIS, S.; KQUEEN, Y.C; MURUGAIAH, C.; HADI, A.Y. *et al.* Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara geanosa*). **American Journal of Immunology**, Austrália, v.1, p.31-36, 2005.

BONILHA, L.E; ASMUS, M.L. Modelo ecológico do fitoplâncton e zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Publicações da Academia de Ciências do Estado de São Paulo**, São Paulo, v.87, n.1, p.347-362, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2011. **Resolução RDC n.12, de 12 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, Brasília, 02 de jan. 2001. Disponível em: <http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 24 de fev. 2014.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDRES,C.V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, n. 4, p.201–212, 2004.

CALLIARI, L.J. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J.P. **Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil**, Rio Grande: Ed. Ecoscientia, 1998. p.13-18.

CAVALLI, S. B.; SALAY, E. Gestão de pessoas em unidades produtoras de refeições comerciais e a segurança alimentar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.6, p.657-667, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/related.php?pid=S141552732007000600008&lang=en>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

CCFH (Codex Committee on Food Hygiene). **Discussion paper on risk management strategies for *Vibrio* spp. In seafood**, CX/FH 03/5- Add.3. Orlando, Estados Unidos, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh35/fh0305ce.pdf>. Acesso em: 30/10/2013.

CHEN, J. **Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus spp.*) comercializado na zona sul do município de São Paulo- SP**. 2004. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DAMS, R.I.; BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion Striatus*) inteira e em filés nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.14, n.2, p.151-162, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Draft report of quantitative risk and benefit assessment of consumption of commercial fish, focusing on fetal neurodevelopmental effects (measured by verbal development in children) and on coronary heart disease and stroke in the general population**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/metals/ucm088794.htm>>. Acesso em: 24/01/2014.

FOX, A. Enterobacteriaceae. In: MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.299-313.

GARCIA, C. A. E. Características hidrográficas. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J. P. **Os ecossistemas costeiro e marinho do Extremo Sul do Brasil**, Rio Grande: Ed. Ecoscientia, 1998. p.18-21.

HERRERA, F.C.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M.L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.3, p.527-36, 2006.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, Amsterdam, v.8, p.91-98, 1997.

ICMSF- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Vibrio parahaemolyticus*. In: ICMSF. **Micro-organisms in food 1**: Their significance and methods of enumerations. 2ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. p.201-207, 287-350.

KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr. **Vibrio**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>>. Acesso em: 18 out. 2013.

KIM, Y.B.; OKUDA, J.; MATSUMOTO, C.; TAKAHASHI, N.; HASHIMOTO, S.; NISHIBUCHI, M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. **Journal Clinical Microbiological**, Washington D.C, v.37, p.1173–1177, 1999.

KELLY, M.T.; STROH, E.M.D. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. **Journal Clinical Microbiological**, Washington D.C, v.26, p.1754-1756, 1988.

LORENZON, C.S. **Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo**. 2009. 41f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MAGALHÃES, V.; LIMA, R.A.; TATENO, S.; MAGALHÃES, M. Human gastroenteritis associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, p.64-68, 1991.

MARTINS, C.V.B.; VAZ S.K., MINOZZO, M.G. Aspectos sanitários de pescados comercializados em “pesque-pagues” de Toledo (PR). **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.98, p.51-56, 2002.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.B. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. **Journal of the American Medical Association Evidence**, Japão, v.296, n.15, p.1885-1899, 2006.

OLIVEIRA, M. N. *et al.* Avaliação das condições higiênico-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. **Ciência & Saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.13, n.3, p.1051-1060, 2008. Disponível em:<<http://www.scielo.org/scieloOrg/php/related.php?pid=S1413-81232008000300028&lang=en>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

ONYANGO, D.M.; WANDILI, S.; KAKAI, R. *et al.* Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. **Journal of Infection in Developing Countries**, Bethesda, v.3, n.2, p.99-104, 2009.

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, n.1, p.56-59, 2007.

POPOVIC, N.T.; SKUKAN, A.B.; DZIDARA, P.; COZ- RAKOVAC, R.; STRUNJAK-PEROVIC.; KOZACINSKI, L.; JADAN, M.; BRLEK-GORSKI,D. Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. **Veterinarni Medicina**, Croácia, v.55, n.5, p.233-241, 2010.

RALL, V. L. M.; CARDOSO, K. F. de G.; XAVIER, C. Qualidade microbiológica de pescado comercializado na cidade de Botucatu, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.25, n.192/193, p.123-125, 2011.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; ZUTTER, L. de; HEYNDRIKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D.C, v.43, n.8, p.3615–3623, 2005.

REIS, E.G. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira. In: ALVES, F.N. **Por uma história multidisciplinar do Rio Grande**, Rio Grande: FURG, 1999. p.81-84.

RESENDE, A.; SOUZA, J.R.; OLIVEIRA, Y.S. Análise microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes de Brasília no período de 2001 a 2004. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.23, n.174/175, p.164-170, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed.Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SÃO PAULO. CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Dados de surtos de DTA por semana epidemiológica e municípios (dados preliminares) revisados em ago/2004**. In: Surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados ao CVE; 2004. Disponível em: <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm>. Acesso em: 26 nov. 2013.

SU, Y.C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiology**. Estados Unidos, v.24, p.549-58, 2007.

TORRES, M.R.; FERNANDEZ, E. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in raw fish, oysters and shrimp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, v.35, n.3, p.267-272, 1993.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Washington D.C., v.5, p.25-40, 1994.

VESTBY, L.K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal – and feed factories. **BMC Veterinary Research**, Norway, v.5, n.20, p.48-61, 2009.

VIEIRA, R.H.S.F.; LIMA, E.A.; SOUZA, D.B.R.; REIS, E.F.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.46, n.4, 2004.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiota natural do pescado fresco. In: VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. p.45-58.

WHO. World Health Organization. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916, Geneva, p.4-7, 2003. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

WU, B.T.; DYER, R.A.; KING, D.J.; INNIS, S.M. Low fish intake is associated with low blood concentrations of vitamin D, choline and n-3 DHA in pregnant women. **British Journal of Nutrition**, London, v.12, p.1-8, 2012.

4 CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os resultados encontrados, as espécies de peixes analisadas, capturadas no estuário da Lagoa dos Patos podem albergar *V. parahaemolyticus*. *S. enterica* e *V. parahaemolyticus* pode também estar presentes no pescado limpo, pronto para o comércio.

Através da técnica de rep- PCR foi possível constatar similaridade entre diferentes isolados de ambos os micro-organismos, sendo assim, constatar possíveis fontes de contaminação dos pescados analisados.

A associação entre humanos, ambientes aquáticos e micro-organismos ressalta a importância do monitoramento ambiental, através de um sistema de controle dos micro-organismos encontrados na indústria pesqueira, seus possíveis potenciais patogênicos e significados clínicos. Existe a necessidade de orientar os manipuladores quanto aos seus hábitos higiênico-sanitários, além de significativa melhoria nas operações de limpeza e sanificação, de modo a serem eliminados os riscos microbiológicos e assim garantir a inocuidade do alimento.

Os estudos acerca do tema devem ser intensificados, assim como as ações de vigilância sanitária, a fim de evitar riscos no consumo de pescados, uma vez que a presença de micro-organismos importantes em saúde pública foi constatada em peixes inteiros e já eviscerados.

5 REFERÊNCIAS

ALAM, M.J.; TOMOCHIKA, K.I.; MIYOSHI, S.I.; SHINODA, S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto- Inland Sea, Japan. **FEMS Microbiology Letters**. v. 28, n.1, p. 83-87, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001). **Resolução RDC n.12**, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Disponível em: <http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 17 de abril 2013.

CARDOSO, N.L.C.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; SERAFINI, A.B. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, p.81-87, 2003.

D'AOUST, J.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**: fundamental and frontiers. 2. ed. Washington: ASM, 2001, p. 141-77.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [FDA]. *Salmonella* spp. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

FOX, A. Enterobacteriaceae. In: MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.299-313.

\$GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. Aspectos Nutritivos dos Alimentos. In: GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de Alimentos – Princípios e Aplicações**. São Paulo: Ed. Nobel, 2009. p.30-58.

HEITMANN, I.G.; JOFRE, L.M.; HORMAZABAL, O.J.C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDES, C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v.22, n.2, p.131-140, 2005.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, Amsterdam, v.8, p.91-98, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEM, S.D.; JANDAW, M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p.608-611.

KUDIRKIENE, E; MALAKAUSKAS, A; BOJESSEN, A M; OLSEN, J E; MALAKAUSKAS, M. Sustainable animal husbandry: prevention is better than cure, v. 2. In: THE 14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL HYGIENE (ISAH), 2009, Vechta. **Proceedings...** Vechta, 2009.

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

LIPP, E.K.; ROSE, J. B. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, Paris, v.16, p.620-640, 1997.

MARTINEZ-URTAZA, J.; LOZANO-LEON, A.; DEPAOLA, A.; ISHIBASHI, M.; SHIMADA, K.; NISHIBUCHI, M.; LIEBANA, E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Santiago de Compostela, v.42, p.4672-4678, 2004.

MASKE, C.; MALUF, M.L.F.; SOUZA, B.E.; SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. Composição centesimal, microbiológica e sensorial do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido ao processo de defumação, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.1, p.181- 190, 2011.

MPA- Ministério da Pesca e Aquicultura. **Pesca Artesanal**. 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/pescampa/artesanal>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2013.

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

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases- The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **Journal of food Microbiology**, v. 139, p.13-15, 2010.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OTTAVIANI, D.; LEONI, F.; ROCCHEGIANI, E.; SANTARELLI, S.; CANONICO, C.; MASINI, L.; DITRANI, V.; CARRATURO, A. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy. **Journal of Clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2144-2145, 2008.

QUILICI, M.L.; ROBERT-PILLOT, A.; PICART, J.; FOURNER, J.M. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.11, p.1148-1149, 2005.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRIKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3615–3623, 2005.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiota natural do pescado fresco. In: VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. p.45-58.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Food safety and foodborne illness**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>. Acesso em: 17 de abril 2013.

WONG, H. C.; LIN, C. H. Evaluation of Typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Three PCR Methods Using Specific Primers. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.12, p. 4233–4240, 2001.