

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

**Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e
caracterização genotípica do pescado comercializado em feiras
livres em municípios do Recôncavo da Bahia**

SANMILY SANTOS DAMACENA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JUNHO - 2019

**Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e
caracterização genotípica do pescado comercializado em feiras
livres em municípios do Recôncavo da Bahia**

SANMILY SANTOS DAMACENA

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JUNHO - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

D154q	<p>Damacena, Sanmily Santos.</p> <p>Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e caracterização genotípica do pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia / Sanmily Santos Damacena._ Cruz das Almas, BA, 2019.</p> <p>68f.; il.</p> <p>Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Peixe como alimento – Microbiologia. 2.Pescados – Genética – Caracterização. 3.Feiras livres – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 664.94</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA

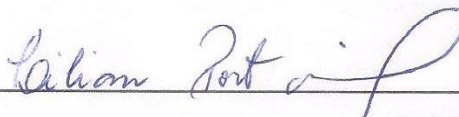
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
SANMILY SANTOS DAMACENA



Profª. Drª. Ludmilla Santana Soares e Barros
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)



Prof. Dr. Marcílio Delan Baliza Fernandes
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Drª Lillian Porto de Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola em

_____"

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão presente em minha vida. Obrigada por me guiar, me dar forças e nunca permitir que eu desistisse.

A minha mãe, por ser fonte de amor e doação, pelo incentivo, esforço e compreensão.

A minha orientadora, Dr^a Ludmilla Santana Soares e Barros, pela confiança, apoio, dedicação, incentivo e por todo conhecimento e experiência compartilhados.

Ao Dr. Marcilio Delan Baliza Fernandes pela boa vontade e pronta ajuda em disponibilizar seu laboratório e pelos conhecimentos compartilhados.

A Dr^a Isabella de Matos Mendes da Silva pelos conselhos e ensinamentos.

A Jaiala e Milena pelos momentos de desabafo e descontração, por terem tornado essa trajetória mais leve.

As meninas, Brisa, Dani e Cris pela ajuda nas horas trabalhosas; pelos sábados, domingos e feriados; pelo clima sempre descontraído. Sem vocês tudo seria muito mais difícil.

Aos técnicos Ângela, Luana, Marcel, Mário e Nubia pela ajuda durante as análises.

A FAPESB pela concessão da bolsa de estudos.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Sequência do *primer*, tamanho do fragmento amplificado e condições usadas na PCR para detecção de gene associado à virulência.....52

Tabela 2- Valores de média em log UFC/g da microbiota presente em amostras de tainha (*Mugil* sp.) provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.....52

Tabela 3- Valores de média em log UFC/g da microbiota presente em amostras de sururu (*Mytella* sp.) provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.....53

Tabela 4- Valores de média em log UFC/g da microbiota presente em amostras de chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*) provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.....53

Tabela 5- Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados em amostras de tainha, sururu e chumbinho provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.....54

Tabela 6- Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isolados em amostras de tainha, sururu e chumbinho provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FAO	Food and Agriculture Organization
HPA	Health Protection Agency
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Proteína Ligada a Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SHU	Síndrome Hemolítico-Urêmica
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
STX	Toxina Shiga
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	14
------------------	----

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura: Qualidade microbiológica de pescado comercializado em feiras livres e riscos associados ao seu consumo	15
Resumo	16
Abstract	17
Produção pesqueira	18
Pescado	19
Comercialização de pescado em feiras livres	23
Doenças Transmitidas por Alimentos	24
Microrganismos aeróbios mesófilos	26
Bolores e leveduras	27
Coliformes totais e termotolerantes	28
<i>Escherichia coli</i>	29
<i>Staphylococcus aureus</i>	30
Resistência antimicrobiana	31
Reação em Cadeia da Polimerase	33
REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO 2

Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e caracterização genética do pescado comercializado em feiras livres no Recôncavo da Bahia.....	47
Resumo	48
Abstract	49
Introdução	49
Material e métodos	50
Resultados	52
Discussão	55
Conclusão	59
Agradecimentos	59
REFERÊNCIAS	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
ANEXO	65

RESUMO

DAMACENA, S. S. Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e caracterização genotípica do pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia

O pescado é um alimento que possui alto valor nutritivo, no entanto, pode ter sua qualidade comprometida em função de contaminações ao longo da cadeia de produção. Em mercados e feiras livres este fato pode ser agravado devido a forma de venda e de manipulação inadequadas. O trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia e caracterizar os isolados quanto à suscetibilidade a antimicrobianos e à presença de genes de virulência. Semanalmente, no período de abril a junho de 2018, foram analisadas 54 amostras de pescado comercializados nos municípios de Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus. Em cada coleta foram adquiridas duas amostras de tainha (*Mugil brasiliensis*), duas de sururu (*Mytella* sp.) e duas de chumbinho (*Anomalocardia brasiliensis*), sendo realizadas três repetições em cada município. Para análise microbiológica foi feito a contagem total de bactérias heterotróficas mesófilas pelo método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em Ágar Padrão para Contagem (PCA), bolores e leveduras por plaqueamento em superfície (*spread plate*) em Ágar Sabouraud Dextrose. Para contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* foi feito plaqueamento em profundidade utilizando o Chromocult® Coliform Agar e para quantificação de *Staphylococcus aureus* foi utilizado o método rápido Petrifilm™ STX (3M Company). O perfil de sensibilidade dos isolados de *S. aureus* e *E. coli* a antimicrobianos comerciais foi determinado pelo método disco-difusão. Realizou-se a extração do DNA dos isolados de *E. coli* e utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisar o gene de virulência *stx*. A quantificação de coliformes totais variou de 0 a 9,50 log UFC/g. Bolores e leveduras e bactérias heterotróficas mesófilas apresentaram a maior quantificação, 9,95 log UFC/g e 9,78 log UFC/g, respectivamente. Para *S. aureus*, 85,4% dos isolados foram resistentes a penicilina, 79,2% a clindamicina e 75% a oxacilina. *E.*

coli se mostrou resistente a nove antimicrobianos, com maior resistência para amoxicilina (88,4%), ampicilina (85,5%) e cefoxitina (82,6%). Não foi detectada a presença do gene *stx* em nenhuma amostra estudada. Diante dos resultados encontrados é possível concluir que as amostras de pescado comercializado em feiras livres nos municípios de Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus apresentam qualidade microbiológica insatisfatória, além de servirem de veículo para microrganismos resistentes.

Palavras-chave: *Mugil* sp., *Mytella* sp., *Anomalocardia brasiliiana*, gene *stx*, resistência antimicrobiana

ABSTRACT

DAMACENA, S. S. Microbiological quality, resistant bacteria and genotypic characterization of fish marketed in street markets in municipalities of the Recôncavo of Bahia

Fish is a food that has high nutritional value, however, it can have its quality compromised due to contaminations along the production chain. In markets and street markets this fact can be aggravated due to inadequate sales and handling. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of fish marketed in street markets in municipalities of the Recôncavo of Bahia and characterize the isolates for antimicrobial susceptibility and the presence of virulence genes. On a weekly basis, from April to June 2018, 54 fish samples commercialized in the municipalities of Cachoeira, Cruz das Almas and Santo Antônio de Jesus were analyzed. In each collect, two tainha samples (*Mugil* sp.), two of sururu (*Mytella* sp.) and two of chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*), three repetitions were performed in each municipality. For microbiological analysis, the total count of mesophilic heterotrophic bacteria by pour plate in Plate Count Agar (PCA), molds and yeasts by spread plate in Agar Sabouraud Dextrose. For counting of total coliforms and *Escherichia coli* was done using Chromocult® Coliform Agar and for quantification of *Staphylococcus aureus* the rapid method Petrifilm™ STX (3M Company) was used. The sensitivity profile of *S. aureus* and *E. coli* isolates to commercial antimicrobials was determined by the disc-diffusion method. The DNA was extracted from the *E. coli* isolates and the Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to screen for the *stx* virulence gene. The quantification of total coliforms ranged from 0 to 9.50 log CFU / g. Molds and yeasts and heterotrophic mesophilic bacteria presented the highest quantification, 9.95 log CFU / g and 9.78 log CFU / g, respectively. For *S. aureus*, 85.4% of the isolates were resistant to penicillin, 79.2% to clindamycin and 75% to oxacillin. *E. coli* was resistant to nine antimicrobials, with higher resistance to amoxicillin (88.4%), ampicillin (85.5%) and

cefoxitin (82.6%). The presence of the *stx* gene was not detected in any sample studied. In view of the results found, it is possible to conclude that samples of fish marketed in street markets in the municipalities of Cachoeira, Cruz das Almas and Santo Antônio de Jesus have unsatisfactory microbiological quality, besides serving as vehicles for resistant microorganisms.

Keywords: *Mugil* sp., *Mytella* sp., *Anomalocardia brasiliiana*, *stx* gene, antimicrobial resistance

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país dotado de uma extensa faixa litorânea. Todos os estados da região Nordeste possuem zona costeira e a atividade pesqueira é uma prática comum no cotidiano das comunidades que tradicionalmente ocupam esta área. Para as comunidades litorâneas e ribeirinhas, a pesca artesanal, a cata de caranguejos e mariscos são práticas ancestrais, repassadas através de gerações. O pescado obtido é destinado à subsistência da comunidade e à comercialização (ALVES et al., 2017).

A demanda mundial por pescado tem sofrido um significativo incremento nas últimas décadas, principalmente em função do crescimento populacional e da busca, pelos consumidores, por alimentos mais saudáveis (BRABO et al., 2016). Além de ser rico em proteínas, o pescado possui também todos os aminoácidos essenciais ao crescimento e à manutenção do organismo humano, aliado à presença de elementos minerais necessários às inúmeras funções orgânicas (GONÇALVES et al., 2012).

Entretanto, o pescado pode representar um risco a saúde dos consumidores, visto que após a sua captura se deteriora gradualmente, devido a fatores como pH próximo da neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, alta atividade metabólica da biota microbiana que o acompanha e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras do peixe. Sendo assim, frequentemente associados à Doenças Transmitidas por Alimentos (SOARES; GONÇALVES, 2012).

As Doenças Transmitidas por Alimentos, mais popularmente conhecidas como DTAs, são originadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados, a maior parte são infecções causadas por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas (SIRTOLI; COMARELLA, 2018). Representam um importante problema de saúde pública, por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo. O pescado pode transmitir microrganismos patogênicos para o homem, a maior parte deles decorrente da contaminação ambiental (SILVA et al., 2017).

Outro fator que tem agravado a qualidade dos alimentos de origem animal é a comercialização em feiras livres, muitas vezes expostos em barracas, sem refrigeração, sem proteção e na presença de poeira e insetos. Alimentos crus, comercializados em feiras livres e mercados públicos podem ser veículos de contaminação de microrganismos causadores de toxinfecção, colocando em risco a saúde do consumidor (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2012). O fato do pescado ser principalmente adquirido nesses estabelecimentos gera uma grande preocupação, uma vez que este tipo de comércio apresenta sérios problemas relacionados às condições higiênico-sanitárias (NUNES et al., 2012).

Por outro lado, o uso abusivo de antimicrobianos tanto na medicina humana quanto na veterinária, é um fator preocupante pois contribui para o aumento da resistência antimicrobiana (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2017). Além disto, bactérias com baixa patogenicidade para humanos, mas resistentes aos agentes antimicrobianos, podem transmitir essa característica para os patógenos humanos por meio de genes móveis (COSTA et al., 2009).

Nessa perspectiva, o trabalho foi dividido em dois capítulos, no primeiro capítulo consta o referencial teórico. O segundo capítulo retrata a caracterização microbiológica do pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia, a sensibilidade dos isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a antimicrobianos comerciais e a caracterização genotípica dos isolados de *E. coli*.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura: Qualidade microbiológica de pescado comercializado em feiras livres e riscos associados ao seu consumo

RESUMO

Levando-se em consideração que o ser humano necessita de uma alimentação saudável e balanceada, o pescado é uma das principais opções disponíveis, uma vez que apresenta em sua composição um excelente valor nutritivo. No entanto, este tipo de alimento pode trazer riscos à saúde da população visto que é o alimento de origem animal mais susceptível ao processo de deterioração, além disso a sua qualidade pode ser comprometida durante a comercialização. Nota-se um aumento da incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) em todo mundo, em decorrência da maior urbanização da sociedade que acarreta mudanças nos hábitos alimentares, além de fatores como a temperatura inadequada, má conservação dos alimentos, deficiência de higiene pessoal e no ambiente onde esses alimentos são comercializados, como é o caso de feiras livres, locais que possuem situações favoráveis para o crescimento e proliferação de microrganismos. Os problemas encontrados estão muitas vezes relacionados com as más condições higiênico-sanitárias das bancas, dos produtores, dos produtos comercializados de maneira incorreta e dos feirantes. A presença de microrganismos patogênicos também pode estar associada a deficiências nas etapas de processamento ou na conservação do produto, comprometendo a sua qualidade e podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, que vão desde uma simples intoxicação até a morte. Por ser altamente perecível, o pescado exige cuidados especiais na manipulação, armazenamento, conservação, transporte e comercialização. Outro fator importante para saúde pública é o aumento da resistência antimicrobiana devido ao uso contínuo e inadequado de antimicrobianos, além do seu descarte em locais indevidos.

Palavras-chave: Microrganismos patogênicos. Doenças Transmitidas por Alimentos. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Taking into consideration that the human being needs a healthy and balanced diet, fish is one of the main options available, since it presents in its composition an excellent nutritive value. However, this type of food can pose risks to the health of the population since it is the food of animal origin most susceptible to the process of deterioration, moreover its quality can be compromised during marketing. There is an increase in the incidence of Foodborne Diseases worldwide, due to the greater urbanization of the society that causes changes in eating habits, besides factors such as inadequate temperature, poor conservation of food and in the environment where these foods are marketed, as is the case of street markets, places that have favorable conditions for the growth and proliferation of microorganisms. The problems encountered are often related to the poor hygienic-sanitary conditions of the stands, of producers, of products marketed incorrectly and the market stalls. The presence of pathogenic microorganisms may also be associated with deficiencies in the processing steps or in product conservation, compromising their quality and causing serious damage to consumer health, ranging from simple intoxication to death. For being highly perishable, fish requires special care in handling, storage, conservation, transportation and marketing. Another important factor for public health is the increase of antimicrobial resistance due to the continuous and inadequate use of antimicrobials, besides their disposal in undue places.

Keywords: Pathogenic microorganisms. Foodborne Disease. Antimicrobial Resistance.

PRODUÇÃO PESQUEIRA

A produção pesqueira mundial (extrativista e aquicultura), em 2014, alcançou 167,2 milhões de toneladas, sendo 87,5% utilizados na alimentação humana, com uma oferta *per capita* de 20 kg ao ano, o que corresponde a 17% da proteína animal e sustento para 10 a 12% da população mundial. A pesca extrativa em 2014 contribuiu com 55,9% da produção mundial de pescados (93,4 milhões de toneladas), sendo 87,2% desse montante oriundo da pesca marinha e costeira. No Brasil, essa modalidade pesqueira representava aproximadamente 760 mil toneladas (ACAUAN et al., 2018).

A pesca extrativa e a criação de organismos aquáticos, especialmente de peixes, representam importantes setores da produção alimentícia mundial. A produção aquícola brasileira é ainda incipiente frente a países da Europa ou mesmo da América Latina (produzindo cerca de 700 mil toneladas/ano), refletindo no hábito de baixo consumo de peixes pela população (FAO, 2014). Nos últimos anos, a produção aquícola mundial se igualou à pesca extrativa em quantidade produzida (FAO, 2014) e o crescimento se deu em países mais favoráveis à essa produção, como o Brasil, o qual dispõe de recursos hídricos em abundância, clima favorável e produção ainda incipiente. A pesca extrativa não é capaz de suprir adequadamente o fornecimento de pescados, haja visto a forte redução dos estoques pesqueiros e a crescente demanda por peixes e outros produtos (LOPES; OLIVEIRA; RAMOS, 2016).

A participação da pesca artesanal é muito importante na composição da produção pesqueira nacional, pois capturam peixes, moluscos e crustáceos, aproveitando quase que integralmente o pescado capturado. A pesca industrial, pelo contrário, tem interesse restrito às espécies alvo e que possuem maior demanda no mercado externo ou naquelas com grandes volumes para a industrialização. Ressalta-se que a última pode levar a predação de alguns recursos, uma vez que o pescado de menor valor comercial é descartado (CASOTTI; BATISTA; FREITAS, 2017).

No Estado da Bahia a pesca é quase que exclusivamente artesanal, sendo realizada em mar aberto, em afloramentos recifais próximos à costa ou nas desembocaduras de rios, ou seja, nos estuários, onde desenvolve-se o

ecossistema de manguezal. É representada por duas atividades distintas: a mariscagem, que inclui a captura de moluscos bivalves, caranguejos, siris e aratus; e a pesca propriamente dita, que lida com os peixes, camarão e lagosta. Ambas são consideradas de grande relevância socioeconômica, principalmente em regiões estuarinas, onde se encontram muitas comunidades pesqueiras (CASAL; SOUTO, 2018).

O Recôncavo Baiano, denominação dada ao conjunto de municípios em torno da Baía de Todos os Santos, é uma das regiões onde comunidades de pescadores artesanais estão concentradas, pois nesta baía, existe um grande número de estuários, originando um complexo de manguezais de enorme potencial para o cultivo de organismos aquáticos, bem como para o sustento das populações de pescadores e marisqueiras que vivem nessas comunidades pesqueiras (VASCONCELLOS, 2012).

PESCADO

Pescado é o termo genérico que compreende organismos aquáticos como peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios, mamíferos de água doce e salgada e algas que são utilizados na alimentação humana (RIBEIRO et al., 2016).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o consumo de pescado no Brasil - de 14,4 kg por habitante/ano - já superou o recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que é 12 kg, por habitante, a cada ano e projeções apontam incremento no setor. O Relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), divulgado em 2016, estima que o País deve registrar crescimento de 104% na pesca e aquicultura até 2025. Segundo o estudo, o aumento na produção brasileira será o maior registrado na região (BRASIL, 2017).

A qualidade do pescado como alimento é indiscutível, uma vez que é uma importante fonte de proteínas e lipídeos. De maneira geral, o pescado está sendo cada vez mais procurado, já que pode estar presente nos mais variados tipos de dietas e possui qualidades nutricionais. A recomendação para a ingestão de pescado é de, pelo menos, duas vezes por semana. No entanto, o consumo é

fortemente dependente de fatores como hábitos de vida e aspectos econômicos que envolvem a oferta e demanda em cada região de produção (FAO, 2012).

As proteínas da sua carne possuem alto valor biológico, apresentando também todos os aminoácidos essenciais e elevado teor de lisina, um aminoácido responsável pelo início do processo digestivo; esses aminoácidos são bem absorvidos pelo organismo humano. A digestibilidade da carne de pescado está em torno de 95% dependendo da espécie, sendo superior aos demais tipos de carnes. A parte muscular do pescado apresenta três grupos de proteínas - as sarcoplasmáticas, que desempenham funções bioquímicas nas células; as miofibrilares, que atuam no sistema de contração e relaxamento do músculo; e as proteínas do sistema conjuntivo, responsáveis pela integridade muscular (SOARES; GONÇALVES, 2012).

A alta digestibilidade da carne de pescado se atribui ao menor comprimento das fibras musculares, facilitando a atuação de enzimas digestivas, e a maior fração de proteínas miofibrilares, pois sua digestão se dá em maior proporção do que as proteínas do tecido conjuntivo. Em relação à gordura, em muitas espécies ela se apresenta como o segundo maior componente depois da proteína. Geralmente, a carne de pescado apresenta baixo teor de colesterol e um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados que protegem o sistema cardíaco e reduzem os riscos de doenças coronarianas (GONÇALVES, 2011).

O peixe é considerado um alimento de excelente valor nutricional, por ser constituído de grandes quantidades de minerais como o cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e iodo, este último restringindo-se aos peixes marinhos. A carne de peixe pode ser inserida em dietas restritas ao sódio, por apresentar baixo teor desse mineral, além de conter proteínas de alto valor biológico, ou seja, aquelas com todos os aminoácidos essenciais, os quais não há produção endógena pelo nosso organismo (RIBEIRO et al., 2018).

Já os moluscos, de modo geral, possuem uma composição nutricional de aproximadamente 80,3% de água, 3,4% de carboidratos, 12,8% de proteínas, 1,4% de gordura e 2,1% de cinzas, o que o caracteriza como um alimento saudável (JAY, 2005). São organismos filtradores, ou seja, bioacumuladores de poluentes, possuindo, portanto, a capacidade de absorver toxinas, poluentes químicos e biológicos, inclusive metais pesados e microrganismos presentes na água, filtrando

de 19 a 50 litros de água por hora, com pouca ou nenhuma capacidade seletiva (SANTOS NETO; MIRANDA; COMARELLA, 2016).

Tainha (*Mugil* sp.)

Os peixes da família Mugilidae apresentam ampla distribuição, ocorrendo, principalmente, nas regiões costeiras de águas tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil são encontrados ao longo de toda a costa, estando as espécies associadas a ambientes estuarinos e lagunares (RANZANI-PAIVA, 2018). Eles são comumente chamados tainhas e paratis nas regiões sul e sudeste, e tainhas e curimãs nas regiões norte e nordeste (SANTOS; SCHWANTES; SCHWANTES, 2000). Alimentam-se de camarão e de turvança, uma espuma amarelada que flutua sobre a superfície do mar (SOUZA; BARELLA, 2001).

São peixes com importância comercial significativa tanto na pesca quanto aquicultura de diversas regiões do mundo. O gênero *Mugil* apresenta 15 espécies válidas e pertence à família Mugilidae, única família da ordem Mugiliformes. Apresentam grande similaridade em sua morfologia externa, o que dificulta a identificação taxonômica, sendo motivo de inúmeras revisões em nível de gênero e espécie dentro da família Mugilidae (SANTANA et al., 2015).

Sururu (*Mytella* sp.)

As espécies de mitídeos estuarinos de interesse comercial que ocorrem no Brasil são: *Mytella falcata* descrita originalmente como *M. charruana* e, *M. guyanensis* (Lamarck, 1819), conhecida como bico de ouro. Na América do Sul, na costa do Oceano Atlântico, *M. guyanensis* distribui-se desde a Venezuela até o estado de Santa Catarina, Brasil, enquanto que na costa do Oceano Pacífico, distribui-se desde o México até o Peru, sendo esse último, encontrado em bosques de manguezal, enterrados, preferencialmente, no sedimento argiloso-lodoso da região entre marés (SANTOS NETO; MIRANDA; COMARELLA, 2016).

A *Mytella falcata* apresenta concha de tamanho médio (até 50 mm), faixa resilial e linhas de crescimento aparentes, valvas carenadas e charneira denteada. É conhecida popularmente como sururu, mexilhão do estuário ou bacucu, distribui-se na costa do Pacífico, do México ao Equador, e na costa do Atlântico, da Venezuela à Argentina. No Brasil, distribui-se por toda região costeira, desde a zona infra-litoral até a zona entre marés (PALMEIRA et al., 2016).

A *Mytella guyanensis* apresenta a concha grande (80 mm de comprimento), faixa resilial perfurada, umbo subterminal, linhas de crescimento aparente, charneira edêntulada, com uma carena dividindo a valva numa região anterior brilhante e noutra posterior opaca (PEREIRA et al., 2003).

Chumbinho (*Anomalocardia brasiliana*)

A. brasiliana (Gmelin, 1791) é uma espécie de bivalve, da família Veneridae que possui hábito sésil e filtrador, alimenta-se de plâncton e material particulado em suspensão. Geralmente é encontrada em locais mais protegidos das ações de ondas e correntes (baías, estuários, planícies de maré, etc.), em regiões de entremarés, predominando em sedimentos arenosos e arenolodosos a uma profundidade variando entre 5 a 10 cm do substrato (BOEHS; MAGALHÃES, 2004).

Sua ocorrência é registrada nas Antilhas, ao longo de toda costa do Brasil e no Uruguai. No Brasil a *A. brasiliana* possui uma série de nomes populares, tais como, berbigão, vôngole, bebe fumo, papa fumo, maçonim, befun, sarnambi e chumbinho, sendo este o nome mais comumente utilizado na Baía de Todos os Santos (BOEHS et al., 2008).

Por ser bem aceita para consumo humano e ser de fácil localização e captura, é explorada em diversos pontos da costa brasileira, tanto para o consumo de subsistência quanto para as vendas ao mercado consumidor (LUZ; BOEHS, 2011).

Quanto à alimentação, *A. brasiliana* ingere substâncias em suspensão através do sifão exalante, com o qual a água e as partículas são levadas para dentro da cavidade do manto. É a espécie de molusco mais frequente e predominante no litoral na Bahia, apresentando uma distribuição ao acaso e distribuição agregada (RODRIGUES et al., 2010).

COMERCIALIZAÇÃO DE PESCADO EM FEIRAS LIVRES

A palavra feira deriva do latim *feria*, que significa dia de festa, sendo utilizada para designar o local escolhido para efetivação de transações de mercado em dias fixos e horários determinados. É um formato de varejo que não possui lojas físicas e, por essa razão, ocorre em instalações provisórias montadas nas vias públicas, localizadas em pontos estratégicos da cidade, em dias e horários determinados (MOREL; REZENDE; SETTE, 2015).

A feira livre no Brasil está presente desde o período colonial, introduzida pelos portugueses, sendo o modelo de mercado periódico mais antigo e tradicional do país, exercendo grande importância no desenvolvimento econômico, social e cultural. Por outro lado, apresentam problemas sérios no armazenamento e conservação dos produtos, o que pode refletir diretamente na saúde do consumidor (SILVA-JUNIOR; FERREIRA; FRAZÃO, 2018).

Há uma preferência do consumidor por feiras livres, devido à crença de que os alimentos comercializados nestes locais são sempre frescos e de qualidade superior. Entretanto, nas feiras livres, inclusive nas de produtos orgânicos, os alimentos estão expostos a várias situações que propiciam a sua contaminação através do manipulador quando o mesmo não adota práticas adequadas de manipulação; exposição do alimento para venda, bem como o seu acondicionamento e armazenamento em condições inapropriadas (MARTINS; FERREIRA, 2018).

Em sua maioria, o pescado permanece exposto à temperatura ambiente durante todo o período de comercialização. Sabe-se que a refrigeração é uma técnica eficaz na conservação de alimentos (SILVA-JUNIOR; FERREIRA; FRAZÃO, 2018). Souza et al. (2013) ainda destacam que a falta de cuidados na manutenção da cadeia do frio, desde a captura até a comercialização, pode alterar as características químicas, microbiológicas e organolépticas do pescado, ocasionadas pelo crescimento bacteriano, oxidação lipídica e alterações autópticas.

A feira é considerada potencial veiculador quanto a veiculação de doenças de origem alimentar e representa um desafio ao serviço de vigilância sanitária, uma

vez que não há grande preocupação do governo para fiscalizá-la adequadamente (HOLANDA et al., 2013).

DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTAs)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças transmitidas por alimentos abrangem enfermidades do mais amplo espectro, e, além de ser um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, são resultado da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou produtos químicos. Essa contaminação pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção até o consumo, principalmente através do meio ambiente, incluindo a poluição da água, solo ou ar (SANTIAGO et al., 2013).

Os agentes biológicos envolvidos na contaminação de alimentos incluem bactérias, vírus e parasitos, os quais podem causar distúrbios que vão de uma gastroenterite leve até casos mais sérios, com possível risco de morte. Alguns desses patógenos estão presentes naturalmente no ambiente aquático, enquanto outros podem ser introduzidos a partir de esgotos contaminados com fezes humanas e de animais (AMAGLIANI; BRANDI; SCHIAVANO, 2012).

Caracteriza-se surto de DTA, a ocorrência de dois ou mais casos de uma mesma doença causada pela ingestão de alimento e/ou água de mesma origem. Sendo de notificação de caráter obrigatório ao Ministério da Saúde conforme Portaria de Consolidação MS nº 04 de 28 de setembro de 2017. Entretanto, muitos casos não são notificados, pois muitas pessoas não buscam por atendimento médico, havendo assim, a escassez de dados e dificultando a mensuração do problema e desenvolvimento de medidas para controle (CAPUANO et al., 2008; BRASIL, 2018a).

A maioria dos surtos diarreicos tem sido relacionado à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração sensorial visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de microrganismos necessária para degradar os alimentos. Esses fatos dificultam a rastreio dos alimentos causadores de surtos, uma vez que

os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar sensorialmente os alimentos fonte da DTA, pois alimentos com características sensoriais alteradas dificilmente causam problemas, devido à sensação repulsiva que causam aos consumidores (SANTIAGO et al., 2013).

No ano de 2014, foram registrados 886 surtos de DTA e 15.700 pessoas doentes contra 861 surtos e 17.455 pessoas doentes no ano de 2013. O ano de 2015 fechou com redução de 35% e 41% dos surtos e doentes respectivamente, comparado com o ano de 2014. Em 2016 foram identificados apenas 543 surtos epidemiológicos, o que representa redução de 19,3% em relação a 2015 (673 surtos). Já em 2017, os resultados representam os valores somente até maio (133 surtos e 2014 doentes). Os sintomas e sinais estão coerentes com os principais agentes etiológicos associados aos surtos, representando 90,5% dos casos que são as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (BRASIL, 2018b). As DTAs são consideradas uma das preocupações mundiais, pois representa um grande problema de saúde pública, sendo responsáveis por grandes custos sociais e econômicos (WELKER et al., 2010).

De acordo com a OMS, anualmente, uma em cada dez pessoas são acometidas pelas DTAs, podendo ser fatais em crianças com idade inferior a cinco anos. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (Sinan), em 2017 foram identificados 598 surtos de DTAs, 9.320 doentes e 12 óbitos, sendo a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* considerados os principais agentes envolvidos em surtos de DTAs no Brasil nos últimos anos (BRASIL, 2018b).

Oliveira et al. (2010) analisaram estudos realizados sobre DTA's e concluíram que apenas uma pequena parcela dos casos está registrada nos bancos oficiais da Vigilância Sanitária, evidenciando o problema mundial de subnotificação, e que esses surtos, geralmente, são aqueles que envolvem um maior número de pessoas ou os que apresentam sintomas mais prolongados ou severos. Apesar desses entraves, dados mundiais registram um aumento significativo desses casos, nos últimos anos.

Microrganismos aeróbios mesófilos

Aeróbios mesófilos constituem um grupo de microrganismos capazes de se multiplicar em temperatura entre 10 a 45° C, sendo a temperatura ótima de crescimento em torno de 30° C, encontrando condições ótimas para o seu metabolismo em temperatura ambiente nos países de clima tropical (SILVA et al., 2007). Segundo Franco e Landgraf (2008) todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. Portanto a sua elevada contagem indica que houveram condições para que esses patógenos se multiplicassem.

Constituem um importante grupo, pois incluem a maioria dos microrganismos contaminantes dos alimentos de origem animal, sendo considerados indicadores da qualidade microbiológica, que podem ser avaliados através da contagem total em placas. O número de mesófilos encontrados em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada (SMIGIC et al., 2012).

A contagem é utilizada como indicador geral de populações bacterianas em alimentos, não diferenciando tipos de bactérias. Mesmo que na legislação não tenha referências para pescado, é importante que estes microrganismos sejam pesquisados visando garantir a qualidade do alimento. Através dessa contagem, se obtém informações gerais sobre a qualidade dos produtos, práticas de manufatura, matérias primas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira, permite avaliar se o produto foi manipulado de forma segura garantindo a segurança alimentar (CARVALHO et al., 2005; SILVA et al., 2017).

Elevadas contagens totais de microrganismos mesófilos sugere a presença de bactérias patogênicas, tais como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, indicando condições higiênicas inadequadas (KOUSTA et al., 2010).

Bolores e leveduras

Os fungos filamentosos são conhecidos como bolores ou mofos, microrganismos eucariotos, heterotróficos e multicelulares. A reprodução é por disseminação dos esporos e o processo de germinação do esporo inicia-se com a formação de um tubo germinativo. Estão presentes em todos os ambientes e são economicamente importantes no campo da medicina, da fitopatologia e indústria, além de serem ecologicamente importantes como decompositores. No entanto, quando presentes nos alimentos, além de oferecer alto risco à saúde, podem causar deterioração, reduzindo seu valor nutricional, alterando também suas propriedades sensoriais, por consequência ocasionando problemas de saúde (VECCHIA; CASTILHOS-FORTES, 2007).

São importantes indicadores da eficiência de boas práticas de sanitização de utensílios e equipamentos usados durante a produção e beneficiamento dos alimentos (MOURA et al., 2014).

Leveduras são formas particulares de fungos, diferenciando-se dos demais por ser um microrganismo eucariótico predominantemente unicelular (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006). Não possuem flagelos e devido a isso são imóveis; suas dimensões variam de espécie para espécie, são classificadas em três classes: ascomicetos, basidiomicetos e fungos imperfeitos; sua reprodução é através de brotamento e gemulação e suas células são esféricas, ovais ou elípticas (TORTORA et al., 2010).

Bolores e leveduras são importantes indicadores da eficiência de práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento de alimentos (MOURA et al., 2014).

Segundo Cardoso et al. (2005), a deterioração por leveduras não é prejudicial à saúde, mas a presença de bolores nos alimentos pode, além de deteriorar o alimento, se tornar um perigo à saúde pública devido à produção de micotoxinas.

As micotoxinas podem causar intoxicação alimentar, chamadas de micotoxicoses, a partir da ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas. Os sintomas das micotoxicoses podem ser diversos, incluindo: danos no fígado (hepatotoxicidade), nos rins (nefrotoxicidade), no cérebro (neurotoxicidade), e até

mesmo alterações no material genético (genotoxicidade), levando, muitas vezes, o paciente a óbito (GONÇALVES; SANTANA; PELEGRINI, 2017).

Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes totais ou coliformes a 35°C, são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporogênicos. Este grupo é composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 35-37°C entre 24 e 48 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Fazem parte desse grupo bactérias do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, incluindo cerca de 20 espécies dentre as quais encontram-se tanto bactérias do trato gastrintestinal de humanos e animais homeotérmicos, como também bactérias não entéricas. Apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. A legislação brasileira não estabelece limites no pescado para estes bioindicadores. No entanto, é importante analisar a presença do grupo por estarem relacionados à sua qualidade higiênico-sanitária (SILVA et al., 2010).

Os coliformes termotolerantes ou coliformes a 45°C, são bacilos Gram-negativos capazes de fermentar a lactose com produção de gás e aldeídos ácidos, em 24 horas a $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Este grupo atua como indicador de poluição fecal, devido à sua ocorrência restrita às fezes dos seres humanos e animais homeotérmicos. Sua presença evidencia o risco da presença de organismos patogênicos de origem fecal (SANTOS; SILVA; REZENDE, 2014).

O grupo é composto por três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (SILVA et al., 2010), em que a *Escherichia coli* é a principal representante, indicando contaminação de origem fecal, bem como indicadora de condições higiênicos-sanitárias insatisfatórias. Outro aspecto a ser considerado é a patogenicidade de algumas estirpes para o ser humano e para os animais (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

A presença de *E. coli* no pescado pode estar associada à contaminação fecal do local onde o pescado foi capturado, ao transporte e manuseio, incluindo vasilhame e o gelo utilizado (AGNESE et al., 2001).

Escherichia coli

São bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, anaeróbia facultativa que colonizam o trato gastrintestinal infantil dentro de poucas horas de vida, tornando-se um hospedeiro mutualista, embora em pacientes debilitados ou imunossuprimidos, possam causar infecção (SANTIAGO et al., 2013). *E. coli* é uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes e a principal causadora de doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos contaminados. Desenvolve-se no trato intestinal do homem e animais homeotérmicos e, portanto, sua presença no meio indica contaminação fecal. No entanto, cepas de *E. coli* são comumente isoladas de alimentos, permitindo-se suspeitar do contato destes com material contaminado por fezes em alguma etapa da sua produção (COSTA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2011).

Diferente do que se acredita acerca das infecções por *E. coli* estarem associadas a países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, surtos infecciosos causados por esta bactéria ocorrem em todo o mundo. Segundo Rangel et al. (2005), no período entre 1982 e 2002 registraram-se, anualmente, nos Estados Unidos, cerca de 73.000 infecções pela cepa O157:H7 com 350 surtos na população e 40 mortes nesse mesmo período. A principal rota de transmissão eram os alimentos, respondendo por 52% das infecções.

As cepas de *E. coli* causadoras de síndromes gástrica e diarreicas são classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* entero-invasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* entero-agregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Dentre essas categorias, EPEC, EHEC e EAEC são as que mais têm sido estudadas e sobre as quais se tem mais informações (SANTIAGO et al., 2013).

As EHEC, especialmente do sorotipo O157:H7, foram reconhecidas mundialmente a partir da década de 1980 como um dos mais importantes

patógenos causadores de DTAs. São assim denominadas porque causam no homem colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006).

As cepas EHEC podem pertencer a diferentes grupos sorológicos somáticos, mas a maioria das linhagens associadas à SHU são do sorotipo O157:H7. Essas cepas diferem das demais cepas de *E. coli* em algumas características, sendo mais importantes a não fermentação do sorbitol, a não produção da enzima β -glicuronidase e o crescimento pobre ou nulo a 44°C (SILVA et al., 2001). No Brasil, não há dados oficiais sobre a ocorrência de surtos causados por esse grupo de bactérias, porém estudos demonstram sua presença em alguns alimentos (BENTANCOR et al., 2012; LOIKO et al., 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através de sua Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, estabelece valores para a presença de coliformes termotolerantes, dentre os quais se encontra *E. coli*. Esta determina que moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados, não devem apresentar mais que 5x10 NMP/g. No entanto, para esse mesmo grupo de pescado, seco e ou salgado, o limite de tolerância passa a ser de 10² NMP/g, bem como para pescado defumado, moluscos e crustáceos refrigerados ou congelados e produtos derivados de pescado refrigerados ou congelados. Um limite um pouco maior é dado para produtos à base de pescado, refrigerados ou congelados (hambúrgueres, por exemplo) que é de 10³ NMP/g (BRASIL, 2001).

Staphylococcus aureus

O gênero *Staphylococcus* é dividido em dois grupos com base na sua capacidade de produzir a enzima coagulase; o primeiro grupo é capaz de coagular tanto o plasma de sangue humano como o de coelho, bem como o plasma de outras espécies animais, embora em graus variados, mesmo na presença de anticoagulantes, tratando-se de *Staphylococcus* coagulase positiva, como *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans*; esta propriedade é importante marcador de patogenicidade. O segundo grupo, está o *Staphylococcus*

coagulase negativa, que não coagula o plasma. Trata-se de uma espécie comensal da pele e responsável por infecções hospitalares (VIEIRA, 2004; CHAVES, 2012).

Staphylococcus aureus é uma das espécies mais importantes pertencentes ao gênero e está envolvido em infecções humanas. São cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (SANTOS et al., 2007). Podem crescer em temperaturas entre 7 e 48°C, sendo a temperatura ótima de 37°C. Crescem em faixa de pH entre 4,0 e 9,3, com faixa de pH ótima entre 7,0 e 7,5. São halotolerantes, podendo resistir a concentrações de 10 a 20% de NaCl presente em alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A contaminação de pescados por *S. aureus* indica o manuseio inadequado pelo ser humano, isto está diretamente relacionado com a higiene pessoal dos manipuladores e dos utensílios utilizados por estes. A intoxicação estafilocócica causa náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, em um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado. Estudos têm apontado que as boas práticas de fabricação, as boas condições sanitárias e o controle de temperatura são essenciais para evitar a contaminação, proliferação e produção de toxinas particularmente em peixes pré-cozidos (ROCHA et al, 2013).

No Brasil, o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos RDC nº 12 de 2001, da ANVISA, que define os padrões microbiológicos para alimentos expostos a venda e a exportação, preconiza um limite de 10^3 UFC/g para *S. aureus*. As bactérias sobre as quais a Legislação estabelece limites quase sempre não alteram a aparência do pescado, as razões de suas limitações são devido a elas serem patógenas ao homem e não deteriorar o produto, como é o caso de *S. aureus* (SOARES et al., 2012).

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados

como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando causam a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010).

Trata-se de uma classe de fármacos utilizada frequentemente tanto em unidades de assistência de saúde humana como veterinária, além de ser usualmente consumida pela comunidade e utilizada em animais de produção como promotor de crescimento ou em práticas de profilaxia (ANVISA, 2010).

A descoberta de antimicrobianos eficientes no tratamento de infecções bacterianas proporcionou um grande avanço na medicina, reduzindo consideravelmente o número de mortes causadas por doenças infecciosas. Entretanto, o aumento crescente do uso de antimicrobianos tem potencializado a seleção de cepas de bactérias resistentes (MORAES et al., 2016).

A resistência antimicrobiana é considerada um problema de saúde global, que compromete a efetividade dos antimicrobianos inviabilizando o tratamento de infecções comuns. A resistência ocorre quando microrganismos sofrem mutação genética ao serem expostos a drogas antimicrobianas, esses microrganismos são referidos como “superbactérias”. Durante o fenômeno de mutação as bactérias estão protegidas dos efeitos antimicrobianos, isso propiciará uma multiplicação bacteriana e impedirá o tratamento e cura de doenças (FRACAROLLI; OLIVEIRA; MARZIALE, 2017).

A resistência tem aumentado devido a prescrição excessiva de antimicrobianos por parte dos médicos, ao seu uso indiscriminado pela população e ao emprego dessas drogas nas criações intensivas de animais. A presença de resíduos de antimicrobianos no ambiente favorece a seleção de bactérias resistentes que podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio do pescado contaminado, transferindo genes de resistência a bactéria (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014).

Segundo a *World Health Organization* (WHO) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Treponema pallidum*, são exemplos notórios de bactérias que vêm apresentando resistência aos antimicrobianos. Outro patógeno que conjuntamente com os acima citados tem despertado a atenção da comunidade científica é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que foi responsável por 480.000 novos casos de tuberculose multirresistente e que destes, no ano de 2014, 123.000 casos foram detectados e relatados (SILVA; AQUINO, 2018).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) permite a síntese *in vitro* de ácidos nucleicos através dos quais o segmento de DNA pode ser replicado de forma semi-conservativa. Geralmente exibe um excelente limite de detecção. Permite a síntese de fragmentos de DNA específicos utilizando a enzima DNA-polimerase, que participa da replicação do material genético celular. Esta enzima sintetiza uma seqüência de DNA, como um pequeno fragmento (*primer*) é conectado a uma das cadeias de DNA no local específico escolhido para iniciar a síntese. *Primers* limitam a seqüência a ser replicada e o resultado é a amplificação de uma seqüência de DNA específica com bilhões de cópias. O desenvolvimento de ferramentas para amplificação de segmentos de DNA gerou enormes benefícios na análise de genes, bem como no diagnóstico de muitas doenças genéticas e na detecção de patógenos bacterianos, virais e fúngicos (VALONES et al., 2009).

Com a aplicação da PCR é possível detectar genes envolvidos com a patogenicidade de diversos isolados bacterianos, permitindo simples identificação. Na investigação de patógenos a PCR é indicada para a amplificação de uma região específica do DNA que permite a detecção de determinado *locus* de virulência (COSTA et al., 2010).

A técnica de PCR é empregada para a identificação desses fatores por ser uma técnica rápida, específica e sensível (VARGAS JUNIOR et al., 2017). O uso desta técnica permite a identificação de genes associados à resistência a antimicrobianos, bem como o estudo de fatores de virulência das cepas, permitindo determinar o grau potencial de patogenicidade de uma cepa de interesse (KIM et al., 2018).

A análise direta de PCR é cada vez mais utilizada para a detecção de STEC em culturas primárias de fezes ou alimentos. Uma reação positiva com *primers* específicos para *stx1* ou *stx2* é suficiente para confirmar a presença de STEC em uma amostra, mas o uso de primers capazes de detectar genes de virulência acessórios fornece informações clinicamente relevantes adicionais que também podem ter grande valor epidemiológico (PATON; PATON, 2002).

As Stx constituem o principal fator de virulência das STEC caracterizando dois grupos principais: Stx1, que difere em apenas um aminoácido da toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* sorotipo 1; e stx2 que possui uma similaridade em torno de 60% com Stx1 na sequência de aminoácidos (HUNT, 2010).

Ambas possuem diferentes variantes antigênicas que podem ou não estar associadas com doença severa. Uma única cepa pode possuir um ou mais genes *stx*, e a informação genética para a produção de Stx1 e Stx2 está localizada no genoma de bacteriófagos temperados do tipo lambda integrados no cromossomo da STEC. As cepas que produzem apenas Stx2 são mais patogênicas do que as que só produzem Stx1 ou ambas, estando mais frequentemente associadas à SHU (CAPRIOLI et al., 2005; PATON; PATON, 1998).

REFERÊNCIAS

ACAUAN, R. C.; TEIXEIRA, B.; POLETTE, M.; BRANCO, J. O. Aspectos legais da pesca artesanal do camarão sete-barbas no município de Penha, SC: o papel do defeso. **Interações**, v. 19, n. 3, p. 543-556, 2018.

AGNESE, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; SILVA, P. P. O.; OLIVEIRA, G. A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais em peixes frescos comercializados no município de Seropédica–RJ. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 67-70, 2001.

ALVES, N. M. S.; SILVA, D. B.; CARVALHO, I. S. M.; SANTANA, B. L. P. Mudanças no cotidiano das comunidades tradicionais pesqueiras de Brejo Grande – Sergipe, Brasil. **Revista GeoNordeste**, n. 1, p. 187-202, 2017.

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

ANVISA. Nota Técnica N. 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/notatecnica-n-01-2010>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

ARAÚJO, A. J. G.; BRANDÃO, C. O.; CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R. H. S. F. Qualidade microbiológica do caranguejo-uçá exposto à venda em três pontos na orla da Praia do Futuro, Fortaleza - CE - Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 4, p.409-416, 2011.

BENTANCOR, M. V.; RUMI, C.; CARBONARI, E.; GERHARDT, M.; LARZA'BAL, D. A.; VILTE, A. Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated

from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 336-342, 2012.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A. R. M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 865-869, 2004.

BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Ecologia Populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 34, n. 2, p. 259-270, 2008.

BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. S.; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.

BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. 12 jan.2001.

BRASIL. Economia e Emprego. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-daembrapa>>. Acesso em: 29 mai. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 158 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) 2018a.

BRASIL. Secretaria Estadual de Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. 2018b.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 289-311, 2005.

CAPUANO, D. M.; LAZZARINI, M. T. P.; GIACOMETTI JUNIOR, E.; TAKAYANAGUI, O. M. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto- SP, Brasil, 2000. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 4, p. 687-695, 2008.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS A. M. C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 303-307, 2005.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte – as leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, p. 36- 42, 2006.

CASAL, F. C.; SOUTO, F. J. B. Conhecimentos etnoecológicos de pescadores da RESEX Marinha Baía do Iguape sobre ecologia trófica em ambiente de manguezal. **Ethnoscientia**, v. 3, 2018.

CASOTTI, R. F.; BATISTA, B. C.; FREITAS, R. R. Análise dos elos produtivos e aplicação do Método de Análise dos Modos e Efeitos de Falhas (FMEA) na pesca artesanal no norte do Espírito Santo, Brasil. **Revista Produção Online**, v. 17, n. 4, p. 1111-1133, 2017.

CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócica. **Ciência Equatorial**, v. 2, n. 1, 2012.

COSTA, M. M.; MABONI, F.; WEBER, S. S.; FERRONATOF, A. I.; SCHIRANK, I. S.; VARGAS, A. Patótipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.

COSTA, A. R. F.; LIMA, K, V, B.; SOUSA, S. O.; LOUREIRO, E. C. B. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.

COSTA, R. A.; MOREIRA, B. A. B.; CARVALHO, F. C. T.; MENEZES, F. G. R.; SILVA, C. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Staphylococcus coagulase positiva e enterobactérias em camarão *Litopenaeus vannamei* comercializado "in natura". **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 566-571, 2011.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; MOURA, F. C. M.; TEIXEIRA, J. A.; ASSIM, D. A.; MIRANDA, P. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 86-95, 2012.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; PEREIRA, A. F.; SILVA, R. A. R.; FERREIRA, L. T. B. Presença de enteropatógenos resistentes a antimicrobianos em ostras e sururus da Baía do Iguape, Maragogipe (Bahia). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 12, n. 1, p. 25-34, 2014.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SAMPAIO, A. P.; SILVA, R. A. R.; SARAIVA, M. A. F.; SILVA, I. P. Veiculação de enterobactérias resistentes aos antimicrobianos em frutos do mar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 10, n. 2, p. 01-15, 2017.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA): 2012. Rome, 2012. 209 p.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde. *The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges*, 243 p. 2014.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Novo relatório da FAO aponta que produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até 2025. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/>>. Acesso em: 20 mai 2017.

FRACAROLLI, I. F. L.; OLIVEIRA, S. A.; MARZIALE, M. H. P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 6, p. 651-657, 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco B. D. G. M. & Landgraf M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, cap.4, p.33-82, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Legislação e Inovação**. São Paulo: Atheneu, 2011. 608 p.

GONÇALVES, A. L. M. M.; DIAS, I. C. L.; NASCIMENTO, D. L.; SILVA, M. I. S. Perfil higiênico-sanitário dos consumidores e estabelecimentos de comercialização de pescado nos municípios de Paço do Lumiar e São José de Ribamar, MA. **Acta Tecnológica**, v. 7, n. 1, p. 25-30, 2012.

GONÇALVES, B; SANTANA, L; PELEGRINI, P. Micotoxinas: uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. **Revista de Saúde da Faciplac**, v. 4, n. 1, 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HOLANDA, M. F. A.; SILVA, M. A. M. P.; PINTO, L. I. F.; BRANDÃO, T. M.; SILVA, R. A. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das feiras-livres de comercialização de peixe na cidade de Caxias-MA. **Acta Tecnológica**, v. 8, n. 2, p. 30-35, 2013.

HUNT, J. M. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, p. 21-45, 2010.

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

KIM, J.; HONG, J.; LIM, J. A.; HEU, S.; ROH, E. Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 73-83, 2018.

KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. H. E. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, p. 805-815, 2010.

LOIKO, M. R.; PAULA, C. M. D.; LANGONE, A. C. J.; RODRIGUES, R. Q.; CIBULSKI, S.; RODRIGUES, R. O.; CAMARGO, A. C.; NERO, L. A.; MAYER, F. Q.; TONDO, E. C. Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. **Meat Science**, v. 116, p. 193-200, 2016.

LOPES, I. G.; OLIVEIRA, R. G.; RAMOS, F. M. Perfil do consumo de peixes pela população brasileira. **Biota Amazônica**, v. 6, n. 2, p. 62-65, 2016.

LUZ, J. R.; BOEHS, G. Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. **Brazilian Journal of Biobiology**, v. 71, n. 3, p. 279-689, 2011.

MARTINS, A. G.; FERREIEA, A. C. S. Caracterização das condições higiênico-sanitária das feiras livres da cidade de Macapá e Santana-AP. **Revista Arquivos Científicos**, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2018.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V. M. Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 24, n. 3, p. 175-182, 2006.

MORAES, A. L.; ARAÚJO, N. G. P.; BRAGA, T. L. Automedicação: revisando a literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 5, n. 1, p. 122-132, 2016.

MOREL, L. P. S.; REZENDE, L. T.; SETTE, R. S. Negócio feira livre: análise e discussão sob a perspectiva do feirante. **Revista Extensão Rural**, v. 22, n. 4, p. 43-57, 2015.

MOURA, S. G.; MURATORI, M. C. S.; MONTE, A. M.; CARNEIRO, R. M.; SOUZA, D. C.; MOURA, J. Z. Qualidade do mel de *Apis mellifera* L. relacionadas às boas práticas apícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, p. 731-739, 2014.

NUNES, E. S. C. L.; FRANCO, R. M.; MÁRSICO, E. T.; NOGUEIRA, E. B.; NEVES, M. S.; SILVA, F. E. R. Presença de bactérias indicadoras de condições higiênico-sanitárias e de patógenos em pirarucu (*Arapaima giga* Shing, 1822) salgado seco comercializados em supermercados e feiras da cidade de Belém, Pará. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 19, n. 2, p. 98-103, 2012.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I. TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

PALMEIRA, K. R.; CALIXTO, F. A.; KELLER, L. A.; MESQUITA, E. F. M. O sururu como produto de subsistência e renda da população ribeirinha, Brasil - Revisão de Literatura. **Revista Semioses**, v. 10, n. 3, p. 49-61, 2016.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detecção Direta e Caracterização de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica por PCR Multiplex para *stx 1*, *stx 2*, *eae*, *ehxA* e *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 271-274, 2002.

PEREIRA, O. M.; HILBERATH, R. C.; ANSARAH, P. R. A. C.; GALVÃO, M. S. N. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do Estuário de Ilha Comprida, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 139-149, 2003.

RANGEL, J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, 2005.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Características hematológicas de tainha, *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP (lat. 25°00'S – long. 47°55'W). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 22, n. 1, p. 1-22, 2018.

RIBEIRO, N. A. S.; COUTO JUNIOR, E. B.; BALIAN, S. C. Avaliação crítica de dois métodos para determinação da qualidade da pescada *Macrodon ancylodon* (BLOCH & SCHNEIDER, 1801). Análise Descritiva Quantitativa e Teste de Aceitabilidade. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 26-35, 2016.

RIBEIRO, R. C.; BARROS, L. A.; PIRES, C. R. F.; KATO, H. C. A.; SOUSA, D. N. Avaliação do consumo de peixes no município de Palmas-TO. **Boletim de Indústria Animal**, v. 75, p. 1-11, 2018.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, L. O.; ALVES, K. S.; DANTAS, L. Í. S.; SILVA, R. P.; ARAÚJO, M. F. F. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia

(*Oreochromis niloticus*) comercializados no Mercado Modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **HOLOS**, v. 29, n. 1, p. 84, 2013.

RODRIGUES, A. M. L.; BORGES-AZEVEDO, C. M.; HENRY-SILVA, G. G. Aspectos da biologia e ecologia do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 377-383, 2010.

SANTANA, T. C.; CASTRO, J. J. P.; LIMA, D. J. V.; CASTRO, J. S.; LINDOSO, A. L. P.; TEIXEIRA, E. G. Levantamento e caracterização das espécies do gênero *Mugil* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Mugiliformes) da Ilha do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 8, n. 2, p. 55-64, 2015.

SANTIAGO, J. A. S.; ARAÚJO, P. F. R.; SANTIAGO, A. P.; CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R. H. S. F. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados-revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.

SANTOS, M.; SCHWANTES, M. L. B.; SCHWANTES, A. R. Lactate dehydrogenase of *Mugil* sp. (Mugilidae, Perciformes). Lack of electrokinetic, thermostability and kinetic differences among individuals with different number of scales. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, 2000.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, J. A.; SILVA, J. X.; REZENDE, A. J. Avaliação microbiológica de coliformes totais e termotolerantes em água e bebedouros de uma escola pública no Gama - Distrito Federal. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 1, p. 11-18, 2014.

SANTOS NETO, J. P.; MIRANDA, C. E. P.; COMARELLA, S. Análise do risco sanitário de alimentos: qualidade microbiológica do molusco sururu (*Mytella* sp.). **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 10, n. 5, p. 85-100, 2016.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; CONTRERAS, C.; BERAQUET, N. J.; YOKOYA, F.; NASCIMENTO, C. A.; OLIVEIRA, V. M.; TSE, C. L. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 223-227, 2001.

SILVA, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. S.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de análise microbiológica**. Ed. Varela. 3 ed. São Paulo, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 5. ed, São Paulo: Blucher, 2017. 560 p.

SILVA, A. T. F.; ROCHA, P. G. G.; FILHO, L. B. F.; COSTA, C. A.; NASCIMENTO, J. C. S.; NETO, P. M. C. Alterações microbianas dos produtos de pescado curados: Revisão. **PUBVET**, v.11, n.7, p. 658-661, 2017.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.

SILVA-JUNIOR, A. C. S.; FERREIRA, L. R.; FRAZÃO, A. S. Avaliação da condição higiênico-sanitária na comercialização de pescado da Feira do Produtor Rural do Buritizal, Macapá-Amapá. **LifeStyle Journal**, v. 4, n. 1, p. 71-81, 2018.

SIRTOLI, D. B.; COMARELLA, L. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v.12, n.10, p. 197-209, 2018.

SMIGIC, N.; DJEKIC, I.; TOMASEVIC, I.; MIOCINOVIC, J.; GVOZDENOVIC, R. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, v. 25, p. 728-731, 2012.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n.1, p. 1-10, 2012.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A.; SOUZA, L. B.; SILVA, J. B. A. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) armazenada em gelo. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 239-242, 2012.

SOUZA, M. R.; BARELLA, W. Conhecimento popular sobre peixes numa comunidade caiçara da Estação Ecológica de Juréia-Itatins/SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 2, p. 123-130, 2001.

SOUZA, M. C.; TEIXEIRA, L. J. Q.; ROCHA, C. T.; FERREIRA, G. A. M.; LIMA-FILHO, T. Emprego do frio na conservação de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 15, p. 1027-1046, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2010.

VALONES, M. A. A.; GUIMARÃES, R. L.; BRANDÃO, L. A. C.; SOUZA, P. R. E.; CARVALHO, A. A. T.; CROVELA, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 1-11, 2009.

VARGAS JUNIOR, S. F.; CUNHA, R. C.; PEREIRA, D. I. B.; BOTTON, S. A.; LADEIRA, S. R. L.; LUCIA JUNIOR, T.; SALLIS, E. S. V. Identificação de fatores de

virulência de isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros na região Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, 2017.

VASCONCELLOS, L. G. Pesca artesanal e petróleo no Recôncavo Baiano: gestão ambiental federal como mediadora de conflitos. **Revista Nordestina de Ecoturismo**, v. 5, n. 1, p. 103-110, 2012.

VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 324-327, 2007.

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

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

CAPÍTULO 2

Qualidade microbiológica e veiculação de bactérias resistentes no pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia

Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e caracterização genética do pescado comercializado em feiras livres no Recôncavo da Bahia

**Sanmily Santos Damacena¹, Ludmilla Santana Soares e Barros¹, Marcílio Delan Baliza Fernandes²,
Crisnanda Silva e Silva¹, Daniela Simões Velame¹**

(1) Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

- UFRB, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil

(2) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Avenida

Carlos Amaral, 1015, Cajueiro, CEP 44574-490, Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil

RESUMO

A comercialização informal de pescado é uma importante fonte de alimentos e de renda para muitas famílias, entretanto constitui uma preocupação na perspectiva da saúde pública, pois pode ter a sua qualidade comprometida durante a comercialização. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia, caracterizar os isolados quanto à suscetibilidade a antimicrobianos e pesquisar genes de virulência. Foram coletadas amostras de tainha (*Mugil* sp.), sururu (*Mytella* sp.) e chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*) em feiras livres nos municípios de Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus. Foram avaliadas a presença de mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os isolados de *E. coli* e *S. aureus* foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana. Foi realizada pesquisa do gene *stx* em isolados de *E. coli*. As quantificações de coliformes totais e *S. aureus* variaram de 0 a 9,50 log UFC/g, além disso foram encontradas elevadas contagens de mesófilos e bolores e leveduras. *E. coli* apresentou maior resistência (76,8%) a amoxicilina. *S. aureus* apresentou sensibilidade maior a gentamicina. O gene *stx* não foi identificado em nenhuma das amostras estudadas. Conclui-se que parte do pescado comercializado nas feiras livres destes três municípios apresenta qualidade microbiológica insatisfatória, podendo causar riscos à saúde do consumidor, além de servir de veículo para disseminação de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Mugil* sp. *Mytella* sp. *Anomalocardia brasiliiana*. Resistência. Virulência

Microbiological quality, transmission of resistant bacteria and genetic characterization in fish marketed in street market in municipalities of Recôncavo of Bahia

ABSTRACT

Informal marketing of fish is an important source of food and income for many families, but it is a public health concern since it can be compromised during marketing. The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of the fish marketed in open fairs in municipalities of the Bahia Reconcavo, to characterize the isolates for antimicrobial susceptibility and to investigate virulence genes. Samples of tainha (*Mugil* sp.), sururu (*Mytella* sp.) and chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*) were collected in street market in the municipalities of Cachoeira, Cruz das Almas and Santo Antônio de Jesus. The presence of mesophiles, molds and yeasts, total coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The isolates of *E. coli* and *S. aureus* were submitted to the antimicrobial susceptibility test. Research on gene *stx* in *E. coli* isolates was performed. Quantifications of total coliforms and *S. aureus* ranged from 0 to 9.50 log CFU / g, and high counts of mesophiles and molds and yeasts were found. *E. coli* presented greater resistance (76.8%) to amoxicillin. *S. aureus* presented greater sensitivity to gentamicin. The *stx* gene was not identified in any of the samples studied. It is concluded that part of the fish marketed in the free trade fairs of these three municipalities presents unsatisfactory microbiological quality, which may cause risks to the consumer's health, besides serving as a vehicle for the dissemination of bacteria resistant to different antimicrobials.

Keywords: *Mugil* sp. *Mytella* sp. *Anomalocardia brasiliiana*. Resistance. Virulence

INTRODUÇÃO

A pesca é uma atividade econômica promotora de benefícios sociais para o ser humano em todo o mundo, sendo o pescado uma importante fonte de alimentos. Além de ser rico em proteínas, o pescado possui também todos os aminoácidos essenciais ao crescimento e à manutenção do organismo humano [1].

Entretanto, o pescado pode representar um perigo para a saúde dos consumidores, visto que após a sua captura se deteriora gradualmente, facilitando a proliferação bacteriana. Sendo assim, frequentemente associados à Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) [2] que representam um importante problema de saúde pública, por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo. O pescado pode transmitir microrganismos patogênicos para o homem, a maior parte deles decorrente da contaminação ambiental [3].

O fato do pescado ser principalmente adquirido em feiras livres gera uma grande preocupação, uma vez que este tipo de comércio apresenta sérios problemas relacionados às condições higiênico-sanitárias [4].

Outro fator que vem chamando a atenção é a problemática da resistência antimicrobiana, visto que envolve cada vez mais espécies bacterianas e novos mecanismos de resistência [5]. A presença de bactérias resistentes em alimentos de origem animal pode possibilitar a troca dos elementos genéticos codificadores de resistência a antimicrobianos, facilitando a disseminação dos genes de resistência entre as bactérias [6].

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do pescado comercializado em feiras livres nos municípios de Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus. Além de testar a susceptibilidade de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a antimicrobianos comerciais e pesquisar o gene *stx* em isolados de *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas aos finais de semana no período de abril a junho de 2018, em feiras livres nos municípios de Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus. As amostras foram obtidas na forma de compra e embaladas da mesma forma com que são disponibilizadas para o consumidor.

Foram realizadas três coletas em cada município, sendo em cada coleta obtida duas amostras de tainha (*Mugil* sp.), duas de sururu (*Mytella* sp.) e duas de chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*), totalizando 54 amostras. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Análise microbiológica

Foi realizada contagem de bactérias heterotróficas mesófilas por plaqueamento em profundidade, usando o Ágar Padrão para Contagem (KASVI). Contagem de bolores e leveduras por plaqueamento em superfície, usando o Ágar Sabouraud Dextrose (KASVI). Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* por plaqueamento em profundidade, usando o Chromocult® Coliform Agar (Merck). Contagem de *Staphylococcus aureus* utilizando o 3M™ Petrifilm™ Staph Express.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Inicialmente, as cepas foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 24 horas. Após esse período, o inóculo foi espalhado no meio Ágar Mueller-Hinton (KASVI) utilizando *swab* estéril e

adicionado os discos de antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente seus halos de inibição medidos com a utilização de uma régua milimetrada. Os resultados foram interpretados de acordo com os parâmetros descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* [7]. Os antimicrobianos testados para *Staphylococcus aureus* foram gentamicina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), penicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), clindamicina (2 µg), vancomicina (30 µg), sulfametoxazol (25 µg). Para *Escherichia coli* foram testados gentamicina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), nitofurantoína (300 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), amoxicilina (30 µg), amicacina (30 µg), ceftazidima (30 µg).

Extração de DNA e PCR

Os isolados de *Escherichia coli* foram preservados em caldo BHI com glicerol a 20 % e mantidos a -20° C para posterior extração de DNA e realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para extração do DNA, 1mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI foi centrifugado a 13.200rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado e adicionados 800µL de água miliQ estéril. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80µL de água miliQ estéril foi adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à temperatura de 96°C por 10 minutos em banho maria. O sobrenadante foi removido e mantido a -20°C até o momento da análise.

O DNA extraído foi submetido à PCR para identificação do gene de virulência *stx*. Foram utilizados os seguintes reagentes e volumes: 3,0 µL de DNA molde; 2,5 µL de PCR buffer c/ MgCl₂; 0,5 µL de dNTP; 1,0 µL de *primer* 1 e 2; 0,1 µL de Taq DNA polimerase, o volume final ajustado para 25 µL com água miliQ estéril.

Para o controle positivo foi utilizada cepa padrão cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro, de *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) (ATCC 43895).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Amplitherm® TX96 Plus. As condições da PCR, a sequência dos *primers* e o tamanho do fragmento amplificado estão descritos na Tabela 1.

Os produtos da PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 % em sistema de eletroforese horizontal, utilizando como marcador de tamanho o peso molecular de 50pb. A corrida por eletroforese foi realizada com fonte digital GSR® 200STD. Utilizou-se o corante de corrida Loading Dye 6X Promega® juntamente com SYBR Green Life Technologies® para visualização dos produtos de PCR em fotodocumentador ultravioleta Loccus L-PIX.

Tabela 1- Sequência do *primer*, tamanho do fragmento amplificado e condições usadas na PCR para detecção de gene associado à virulência.

Gene/patotipo	Sequência do <i>primer</i> 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)	Condições da PCR
<i>stx</i> /EHEC	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	227	5 min 94°C/35 ciclos de 1 min 94°C, 3 min 48°C e 4 min 72°C/10 min 72°C

Análise estatística

Os valores de UFC/g foram transformados em log UFC/g e as médias foram submetidas à análise de variância pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas pelo programa estatístico R, versão 3.4.1 [8].

RESULTADOS

Análise microbiológica

A contagem média de mesófilos e bolores e leveduras nas amostras de tainha não diferiu estatisticamente entre os municípios, nem houve diferenças entre esses microrganismos (Tabela 2). A quantificação de coliformes totais variou de 0 a 9,5 UFC/g.

Tabela 2- Valores de média em log UFC/g da microbiota presente em amostras de tainha (*Mugil* sp.) provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.

	Cachoeira	Cruz das Almas	Santo Antônio de Jesus
Coliformes totais	3,17 aA	5,68 bB	4,32 bB
<i>Escherichia coli</i>	2,53 bA	3,01 bA	1,05 aA
Mesófilos	6,46 aB	7,94 aB	6,08 aB
Bolores e leveduras	6,78 aB	6,28 aB	5,88 aB
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,68 aA	2,69 aA	1,49 aA

Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada linha e mesma letra maiúscula em uma coluna, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A presença de *E. coli* foi detectada em 20,4% (11/54) das amostras de sururu nos três municípios (Tabela 3). Para *Staphylococcus aureus*, 16,7% (9/54) das amostras apresentaram contaminação maior que o estabelecido pela RDC nº12 que é de 10^3 UFC/g (3 log UFC/g). O sururu foi o pescado que apresentou maior quantificação, variando de 0 a 3,95 log UFC/g, sendo o município de Cruz das Almas o que apresentou maior média para esse patógeno.

Tabela 3- Valores de média em log UFC/g da microbiota presente em amostras de sururu (*Mytella* sp.) provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.

	Cachoeira	Cruz das Almas	Santo Antônio de Jesus
Coliformes totais	4,92 aB	6,43 bB	6,43 bB
<i>Escherichia coli</i>	1,79 aA	4,00 bA	2,68 aA
Mesófilos	6,28 aC	7,09 bC	7,99 bC
Bolores e leveduras	6,45 aC	7,91 bC	6,84 aB
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,13 aA	3,91 bA	1,22 aA

Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada linha e mesma letra maiúscula em uma coluna, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O menor valor de média para *Escherichia coli* foi encontrado no chumbinho, não havendo diferença estatística para esse indicador entre os municípios de Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus (Tabela 4).

Tabela 4- Valores de média em log UFC/g da microbiota presente em amostras de chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*) provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.

	Cachoeira	Cruz das Almas	Santo Antônio de Jesus
Coliformes totais	4,83 bB	3,79 aB	3,37 aB
<i>Escherichia coli</i>	0,72 aA	2,36 bA	1,71 aA
Mesófilos	4,67 aB	6,14 bC	6,85 bC
Bolores e leveduras	4,67 aB	6,18 bC	6,76 bC
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,48 aA	2,92 bA	1,49 aA

Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada linha e mesma letra maiúscula em uma coluna, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Susceptibilidade antimicrobiana

Os resultados do teste de susceptibilidade indicaram que, dos 48 isolados de *Staphylococcus aureus*, 85,4% apresentaram resistência a penicilina, 79,2% a clindamicina e 75% a oxacilina (Tabela 5).

Tabela 5- Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados em amostras de tainha, sururu e chumbinho provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.

Antimicrobianos	Tainha (16)		Sururu (14)		Chumbinho (18)	
	R	S	R	S	R	S
Aminoglicosídeos						
Gentamicina	0	100	7,1	92,9	11,1	88,9
β-lactâmicos						
Cefoxitina	31,2	68,8	64,3	35,7	27,8	72,2
Oxacilina	75	25	100	0	55,6	44,4
Penicilina	81,3	18,7	87,5	12,5	88,9	11,1
Fenicóis						
Cloranfenicol	0	100	7,1	92,9	27,8	72,2
Glicopeptídeos						
Vancomicina	31,2	68,8	50	50	22,2	77,8
Lincosamidas						
Clindamicina	75	25	100	0	88,9	11,1
Macrolídeos						
Eritromicina	62,5	37,5	85,7	14,3	72,2	27,8
Quinolonas						
Ciprofloxacina	25	75	7,1	92,9	27,8	72,2
Sulfonamidas						
Sulfametoxazol	50	50	71,4	28,6	44,4	55,6

R- resistente; S- sensível

As 69 (100%) cepas de *Escherichia coli* testadas apresentaram resistência a pelo menos um dos dez antimicrobianos testados (Tabela 6).

Tabela 6- Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* em amostras de tainha, sururu e chumbinho provenientes de três municípios do Recôncavo da Bahia.

Antimicrobianos	Tainha (27)		Sururu (30)		Chumbinho (12)	
	R	S	R	S	R	S
Aminoglicosídeos						
Gentamicina	0	100	0	100	0	100
Amicacina	14,8	85,2	0	100	25	75
β-lactâmicos						
Amoxicilina	92,6	7,4	80	20	100	0
Ampicilina	88,9	11,1	80	20	83,3	16,7
Cefoxitina	85,2	14,8	73,3	26,7	100	0
Ceftazidima	22,2	77,8	13,4	86,6	8,3	91,7
Fenicóis						
Cloranfenicol	25,9	74,1	13,3	86,7	0	100
Nitrofurantoínas						
Nitrofurantoína	70,4	29,6	56,7	43,3	66,7	33,3
Quinolonas						
Ciprofloxacina	0	100	10	90	0	100
Tetraciclina						
Tetraciclina	59,3	40,7	33,3	66,7	58,3	41,7

R- resistente; S- sensível

Pesquisa de gene de virulência

Em relação a *Escherichia coli* O157:H7, 55,6% (30/50) das amostras foram presumivelmente positivas em Agar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult. Entretanto, não foi identificado o gene *stx* em nenhuma das amostras estudadas.

DISCUSSÃO

Para os moluscos bivalves cozidos, industrializados, resfriados ou congelados é estabelecido um limite de 5×10^6 UFC/g ou 1,70 log UFC/g de coliformes termotolerantes [9]. Foi encontrada *Escherichia coli* em 31,5% das amostras de moluscos estando em desacordo a esta normativa, visto que a *E. coli* é a principal representante desse grupo e é indicativa de contaminação fecal.

A legislação vigente não estabelece parâmetros para análise de bactérias heterotróficas mesófilas, apesar da contagem dessas bactérias ser importante quanto a estimativa da carga microbiana, uma vez que a maioria

dos microrganismos patogênicos de veiculação alimentar são mesófilos. Além disso, a presença de mesófilos em níveis elevados pode indicar potenciais problemas de armazenamento e de manuseio.

Evangelista-Barreto [10] ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas-Bahia encontraram uma quantificação de mesófilos variando 6,67 a 6,83 log UFC/g para pescado fresco. Sousa [11] encontraram um valor máximo de 7,96 log UFC/g em amostras de tilápia oriundo da pesca artesanal do município de Salinas-MG.

De acordo com a Agência de Proteção Sanitária (HPA) britânica, os fungos podem causar deterioração em níveis ligeiramente inferiores (6 – 7 log UFC/g) ao de bactérias Gram-negativas devido à produção de gás e ácido [12]. Desse modo é possível afirmar que 39,26% (32/54) do pescado analisado se encontravam em processo de deterioração por fungos que, por sua vez, podem desencadear reações alérgicas. Essa elevada carga microbiana pode indicar condições higiênicas deficientes de equipamentos, falhas no processamento e/ou estocagem ou matéria-prima com contaminação excessiva.

Pinheiro [13] verificaram a contaminação por fungos filamentosos em 63% das amostras de peixe oriundos de pisciculturas do município de São Luís-MA. Uma contagem de 60 UFC/g de bolores e leveduras foi encontrada por Alves [14] ao analisarem amostras de tilápias do Nilo *in natura* no Paraná.

A resolução vigente, RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [9], não estabelece limites para presença de coliformes totais em alimentos, ainda que indiquem condições higiênicas insatisfatórias, comprometendo a inocuidade dos alimentos.

A presença de coliformes totais no alimento, não indica necessariamente contaminação fecal ou ocorrência de enteropatógenos, indicando falhas higiênicas ao longo do processo de preparo ou mesmo contaminação pós-processamento [15].

A *Escherichia coli*, quando encontrada em alimentos *in natura* indica contaminação fecal recente e possível presença de outros patógenos entéricos como *Klebsiella*, apontando condições higiênicas insatisfatórias. Cepas patogênicas podem ser responsáveis por quadros de diarreia, colites hemorrágicas, meningite, síndrome urêmica e septicemia [16]. Resultados semelhantes foram encontrados por Farias, Trindade e Alcântara [17], que ao analisarem amostras de sururu obtidos no estuário do rio Vaza Barris em Sergipe, encontraram cepas patogênicas de *E. coli*. Corroborando com o presente estudo, Mafra [18] ao analisarem amostras de chumbinho comercializados no mercado municipal de Maragogipe-BA encontraram *E. coli* em 66,7% das amostras.

A *E. coli* é um microrganismo não indígena para os pescados, ou seja, não faz parte da sua microbiota normal. Desta forma o isolamento deste microrganismo neste alimento, pode estar associado à contaminação fecal do local de captura dos pescados, por contaminação cruzada proveniente do processo de transporte e manuseio, assim como pelos utensílios ou gelo utilizado que tenham entrado em contato com o pescado fresco. Sendo assim a sua presença indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias [19,20].

Freitas [21] ao analisarem sururu beneficiado por comunidade quilombola da Baía do Iguape observaram que 33,33% das amostras de sururu desconchado pelas marisqueiras estavam insatisfatórias para *S. aureus*, sendo que o sururu sem lavar foi o que apresentou maior contaminação. Segundo os autores, tal contaminação decorreu das mãos das marisqueiras, portadoras assintomáticas de *S. aureus*, bem como pela recontaminação por meio do contato com os utensílios mal-higienizados, levando risco de intoxicação alimentar aos consumidores.

A falta de informações de Boas Práticas de Manipulação contribui para agravar a contaminação do molusco, principalmente em relação ao binômio tempo x temperatura e contaminação cruzada envolvendo os utensílios.

Fatores que contribuem para a maior densidade microbiana dos moluscos bivalves quando comparado aos peixes é o processo de alimentação desses organismos por filtração, acumulando em seus tecidos diversos microrganismos, caso sejam extraídos em áreas poluídas por esgotos domésticos. Também podem ocorrer falhas higiênico-sanitárias durante o processo de retirada das valvas, realizado quase sempre nas residências das marisqueiras [22].

Staphylococcus aureus apresentou maior resistência a penicilina, pertencente a classe dos β -lactâmicos. Várias são as estratégias de proteção bacteriana aos beta-lactâmicos, entre estas a destruição deste grupo de fármacos pela produção de beta-lactamase, diminuição da capacidade de penetração do antibiótico, assim como redução da afinidade do mesmo às PBP (Proteína ligada à penicilina) [23].

Este fato é preocupante, por se tratarem de cepas resistentes veiculadas em alimentos para o homem, principalmente, aos antimicrobianos do grupo β -lactâmico, classe amplamente utilizada no controle de doenças infecciosas [24].

Observou-se sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus aureus* a ciprofloxacina, pertencente a classe das quinolonas, essas são drogas de escolha em medicina veterinária para o tratamento de infecções bacterianas em peixes [25].

Costa, Nascimento e Silva Júnior [26], ao analisarem o perfil de resistência de *S. aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na feira do Produtor Rural no município de Macapá, encontraram resistência a penicilina (100%), vancomicina (86,7%), clindamicina (66,7%) e eritromicina (33,3%). Segundo os autores, a resistência observada pode ser proveniente da contaminação do habitat natural da *C. acoupa* por fármacos ou substâncias antimicrobianas, contaminação do pescado por meio de manipulador portador de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos testados, propondo-se ainda que a resistência detectada possa ser fruto de transferência horizontal de genes entre populações bacterianas no ambiente natural.

Para *Escherichia coli*, todos os isolados apresentaram-se sensíveis a gentamicina que pertence a classe dos aminoglicosídeos. Estes podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com beta-lactâmicos para tratamento de infecções em aquicultura, embora a nefrotoxicidade destes antimicrobianos para peixes não seja bem esclarecida [27]. Resultado contrário foi encontrado por Dias [28], que ao analisarem a resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de mexilhões no município de Niterói – RJ, encontraram menos de 20% dos isolados sensíveis a gentamicina.

Laroche [29] relataram que cepas de *E. coli* isoladas de ambiente aquático apresentaram maior resistência antimicrobiana ao cloranfenicol e a tetraciclina.

Escherichia coli é uma bactéria comensal comum que vive no trato intestinal de animais homeotérmicos, o que a torna um importante microrganismo para o estudo da prevalência de bactérias intestinais resistentes aos antimicrobianos. Produtos de origem animal são uma importante fonte de *E. coli* como fonte de contaminação fecal. Esses microrganismos e seus genes de resistência antimicrobiana podem ser transmitidos aos humanos se os alimentos forem mal cozidos [10].

A resistência antimicrobiana observada para cinco antimicrobianos da família dos β -lactâmicos, principalmente para a ampicilina e amoxicilina pode estar relacionada ao fato desses antimicrobianos serem utilizados mundialmente no controle de doenças infecciosas [30].

O aumento de bactérias resistentes em áreas ambientais tem sido atribuído à contaminação da água, pelo lançamento de resíduos de antimicrobianos oriundos de efluentes domésticos e/ou a presença de cultivos de animais. Este fenômeno tem favorecido a instalação, a manutenção e a propagação de características de resistência entre as populações bacterianas no ambiente aquático [31].

Existem duas classes de shiga toxina, Stx1 e Stx2. Nesse estudo foi pesquisado o gene *stx1*, entretanto as linhagens produtoras de *stx2* estão mais conectadas com a SHU do que as linhagens produtoras de *stx1* [32]. A ausência do gene *stx1* não exclui a possibilidade de encontrar o gene *stx2*.

Cardozo [33] ao analisarem peixe para consumo humano encontraram os genes *stx1*, *stx2* e *eae* em 6,06% (6/99) das amostras de fezes de peixe de vida livre. Nenhuma das amostras de músculo ou água testadas foi positiva para os marcadores STEC ou EPEC investigados.

CONCLUSÃO

A qualidade do pescado comercializado em feiras livres nos municípios Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus analisada nesse estudo é insatisfatória, pois apresenta elevada carga microbiana e acentuado estágio de deterioração. Este fato compromete a inocuidade do alimento e representa um risco a saúde dos consumidores, devido a presença de indicadores de contaminação de origem fecal e de *Staphylococcus aureus* que é patogênica ser humano. Além disso, a resistência de *S. aureus* e *Escherichia coli* a diversos antimicrobianos demonstra que o ambiente de onde estão sendo retirados vem sofrendo com o lançamento de antimicrobianos ou microrganismos resistentes, afetando a microbiota residente.

AGRADECIMENTOS

A Fapesb pela bolsa concedida; a Cefar pela doação dos discos de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

1. Gonçalves, A.L.M.M.; Dias, I.C.L.; Nascimento, D.L.; Silva, M.I.S. (2012) Perfil higiênico-sanitário dos consumidores e estabelecimentos de comercialização de pescado nos municípios de Paço do Lumiar e São José de Ribamar, MA. Acta Tecnológica, 7(1):25-30.
2. Soares, K.M.P.; Gonçalves, A.A. (2012) Qualidade e segurança do pescado. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 71(1):1-10.
3. Silva, A.T.F.; Rocha, P.G.G.; Fonseca Filho, L.B.; Costa, C.A.; Nascimento, J.C.S.; Carvalho Neto, P.M. (2017) Alterações microbianas dos produtos de pescado curados: Revisão. PUBVET, 11(7): 658-661.

4. Nunes, E.S.C.L.; Franco, R.M.; Mársico, E.T.; Nogueira, E.B.; Neves, M.S.; Silva, F.E. (2012) Presença de bactérias indicadoras de condições higiênico-sanitárias e de patógenos em pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) salgado seco comercializados em supermercados e feiras da cidade de Belém, Pará. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 19(2):98-103.
5. Nespolo, N.M.; Saba, R.Z.; Rossatelli, D.A.; Fairbrother, J.M.; Rossi Júnior, O.D. (2014) Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e suscetibilidade a antimicrobianos. Arq. Inst. Biol., 81(3):209-217.
6. Slama, K.B.; Jouini, A.; Sallen, R.B.; Somalo, S.; Sáenz, Y.; Estepa, V. Boudabous, A.; Torres, C. (2010) Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicate. Int. J. Food Microbiol., 137(2-3):281-286.
7. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-four Informational Supplement. CLSI document M49-A. Wayne: PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. R CORE TEAM. R: (2017) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
9. BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF. 12 jan.2001.
10. Evangelista-Barreto, N.S.; Moura, F.C.M.; Teixeira, J.A.; Assim, D.A.; Miranda, P.C. (2012) Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. R Caatinga, 25(3):86-95.

11. Sousa, F.A.; Rodrigues, R.A.; Arruda, F.A.; Santos, W.L.M.; Santos, T.M. (2017) Caracterização higiênico-sanitária e tecnológica dos pescadores e da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) comercializada no mercado municipal de Salinas-MG. Ver Bras Cienc Vet, 24(4):197-200.
12. HPA - Health Protection Agency. (2009) Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London: Health Protection Agency.
13. Pinheiro, C.A.M.; Pinheiro, R.S.; Santos, W.H.L.; Serra, I.M.R.S.; Santos, D.M.S. (2015) Qualidade da água e incidência de fungos em peixes oriundos de pisciculturas do município de São Luís –Maranhão. Pesquisa em Foco, 20(1):53-69.
14. Alves, G.; Zabine, L.; Bantle, J.F.; Rodrigues, L.C.S.; Pasquali, R.; Nascimento, I.A. (2010) Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteiras evisceradas submetidas a salga e secagem natural. Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia da UNIPAR, 13(2):71-75.
15. Chouman, K.; Ponsano, E.H.G.; Michelin, A.P. (2010) Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes self-service. Rev Inst Adolfo Lutz, 69(2):261-266.
16. Jafari, A.; Aslani, M.M.; Bouzari, S. (2012) *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. Iran J Microbiol, 4(3):102-117.
17. Farias, K.L., Trindade, R.C.; Alcântara, A.V. (2010) Ocorrência de *E. coli* (EPEC e EIEC) no sururu, *Mytella guayanensis* Lamarck, e na água do estuário do rio Vaza Barris (Sergipe, Brasil). Arq Cienc Mar, 43(2):66-70.
18. Mafra, J.F.; Marques, V.F.; Carneiro, C.S.; Oliveira, T.A.S.; Evangelista-Barreto, N.S. (2016) Avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves processados e comercializados em Maragogipe, estado da Bahia, Brasil. Acta of Fisheries and Aquatic Resources, 4(2):39-43.

19. Santiago, J.A.S.; Araújo, P.F.R.; Santiago, A.P.; Carvalho, F.C.T.; Vieira, R.H.S.F. (2013) Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados - revisão. *Arq Cienc Mar*, 46(2):92-103.
20. Ferreira, E.M.; Lopes, I.S.; Pereira, D.M.; Rodrigues, L.C.; Costa, F.N. (2014) Microbiological quality of the fish saw (*Scomberomorus brasiliensis*) and the ice used for its conservation. *Arq Inst Biol*, 81(1):49-54.
21. Freitas, F.; Neiva, G.S.; Cruz, E.S.; Santana, J.S.; Silva, I.M.M.; Mendonça, F.S. (2017) Qualidade microbiológica e fatores ambientais de áreas estuarinas da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape (Bahia) destinadas ao cultivo de ostras nativas. *Eng Sanit Ambient*, 22(4).
22. Evangelista-Barreto, N.S.; Damacena, S.S.; Cardoso, L.G.; Marques, V.F.; Silva, I.P. (2017) Condições higiênicossanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 11(1):60-74.
23. Zhanel, G.G.; Hisanaga, T.L.; Laing, N.M.; DeCorby, M.R.; Nichol, K.A.; Palatnik, L.P.; Johnson, J.; Noreddin, A.; Harding, G.K.; Nicolle, L.E.; Hoban, D.J. (2005) Antibiotic resistance in *Escherichia coli* out patient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Agents*, 26(5):380-388.
24. Manjusha, S.; Sarita, G.B. (2013) Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant *Vibrios* isolated from molluscan and crustacean of Kerala. *Int Food Res J*, 20(1): 77-86.
25. Costa, M.M.; Peixoto, R.M.; Bojjink, C.L.; Castagna, L.; Meurer, F.; Vargas, A.C. (2008) Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhandia quelen*). *Pesq Vet Bras*, 28(10):477-480.
26. Costa, A.L.P.; Nascimento, J.F.; Silva Júnior, A.C.S. (2018) Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. *PUBVET*, 12(5):1-6.

27. Amarante, J.F.; Kolling, L.; Ferronato, A.I.; Vargas, A.C.; Costam, M.M.; Amarante, T.A.B. (2018) Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. *Cienc Anim Bras*, 19: 1-7.
28. Dias, M.T.; Santos, P.C.R.F.; Oliveira, L.A.T.; Marin, V.A. (2010) Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* linnaeus, 1758) à antimicrobianos. *Ciênc Tecnol Aliment*, 30(2): 319-324.
29. Laroche, E.; Petit, F.; Fournier, M.; Pawlak, B. (2010) Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *J Hydrol*, 392:12-21.
30. Ahmed, N.; Kamal, M.; Kamran, A.; Zaidi, A.H. (2016) Frequency of extended spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in urinary isolates related to age and gender. *Med Channel*, 22: 16-20.
31. Vivant, A.L. Boutin, C.; Prost-Boucle, S.; Papias, S.; Hartmann, A.; Depret, G.; Ziebal, C.; Le Roux, S.; Pourcher, A.M. (2016) Free water surface constructed wetlands limit the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in the natural environment. *Water Res*, 104(1):178-188.
32. Paton, A.W.; Paton, J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol*, 36:598-602.
33. Cardozo, M.V.; Borges, C.A.; Beraldo, L.G.; Maluta, R.P.; Pollo, A.S.; Borzi, M.M.; Santos, L.F.; Kariyawasam, S.; Ávila, F.A. (2018) Shigatoxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in fish for human consumption. *Braz J Microbiol*, 49:936-941.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados levantados nesse estudo servem de alerta às autoridades, visto que houve a presença de microrganismos cotados pela legislação e presença de patógenos nas amostras, além de resistência a diversos antimicrobianos usados tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana, reforçando a preocupação atual com a disseminação de bactérias resistentes na cadeia produtiva de alimentos.

São necessárias ações que assegurem a qualidade microbiológica do pescado comercializado nas feiras livres nos municípios de Cachoeira, Cruz das Almas e Santo Antônio de Jesus, para diminuir os riscos do desenvolvimento de DTAs nos consumidores.

Diante da problemática percebida na comercialização nas feiras livres, faz-se necessário que sejam adotadas medidas corretivas o mais breve possível, para que se obtenham melhorias na qualidade do pescado bem como nas condições de trabalho dos próprios feirantes. É necessário que aja ações educativas que podem ser implantadas através de cursos, oficinas, palestras e cartilhas, além de reformas na estrutura, contribuindo para a conscientização dos riscos existentes, bem como ações de fiscalização por parte das autoridades da vigilância sanitária de modo a assegurar a inocuidade do pescado comercializado.

Anexo

Normas Brazilian Journal of Microbiology

TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT FORMATTING

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.