



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ANTENOR FERREIRA LEAL NETO**

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM SASHIMI E PERFIL  
ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS**

**SALVADOR**

**2017**

**ANTENOR FERREIRA LEAL NETO**

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM SASHIMI E PERFIL  
ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida

**SALVADOR**

**2017**

Leal Neto, Antenor Ferreira  
Ocorrência de *Escherichia coli* em sashimi e perfil  
antimicrobiano dos isolados / Antenor Ferreira; Leal Neto. --  
Salvador, 2017.  
61 f. : il

Orientadora: Rogéria Comastri de Castro Almeida.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência  
de Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola de  
Farmácia, 2017.

1. Culinária japonesa. 2. Cepas diarreiogênicas. 3. Peixe.  
4. Multirresistência. I. Almeida, Rogéria Comastri de Castro.  
II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

ANTENOR FERREIRA LEAL NETO

### OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM *sashimi* E PERFIL ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 27 de março de 2017.

#### BANCA EXAMINADORA

Dr<sup>a</sup>. Rogéria Comastri de Castro Almeida  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Isabella de Matos Mendes da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dr. Maurício Costa Alves da Silva  
Universidade Federal da Bahia

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Rogeria Comastri de Castro Almeida pela orientação, confiança e conhecimentos na realização desse trabalho, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

À equipe de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, Joelza Carvalho, Luana Milen e Isabela Maciel pela amizade, companheirismo e trabalho em equipe.

Aos Técnicos do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, Ary, Luiz e Ayze.

À Professora Doutora Alaíse Gil Guimarães, pelo apoio para a realização desse trabalho.

Ao Professor Doutor Maurício Costa Alves da Silva, pelo apoio para a realização do anteprojeto de pesquisa ao mestrado.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos possibilitando recursos para a execução do projeto, bem como minha manutenção pessoal durante o período.

LEAL NETO, Antenor Ferreira. Ocorrência de *Escherichia coli* em *sashimi* e perfil antimicrobiano dos isolados. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## RESUMO

O *sashimi* é um produto oriundo da culinária japonesa, elaborado com pescado cru, geralmente, salmão e atum. Esse produto, muito popular no Brasil e em vários outros países do mundo, pode representar importante fonte de contaminação bacteriana para o homem devido às etapas envolvidas no preparo do peixe cru, seu armazenamento e distribuição. Entretanto, dados sobre a ocorrência de patógenos nesse produto são escassos na literatura. Esse estudo teve como objetivo investigar a presença de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* em *sashimi* comercializados em restaurantes de Salvador, BA, Brasil, e avaliar a susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos. Foram analisadas 127 amostras de *sashimi* crus, no período de junho a outubro de 2016, oriundas de 16 restaurantes da culinária japonesa. As amostras foram inoculadas em caldo EC e aquelas positivas para a produção de gás foram estriadas na superfície do ágar EMB de Levine. Colônias típicas do microrganismo foram confirmadas através das provas bioquímicas do IMViC. Para verificar a presença de cepas diarreio gênicas EPEC, EIEC e EHEC, os isolados foram submetidos ao teste de aglutinação em lâmina. Em adição, os isolados identificados como *E. coli* foram submetidos ao teste de susceptibilidade a 14 antibióticos através da técnica de disco-difusão. *E. coli* foi detectada em 14,7% das amostras de *sashimi*, sendo que 19% em amostras de *sashimi* preparadas com atum e 11% naquelas preparadas com salmão. As cepas EPEC, EIEC e EHEC não foram identificadas, pois nenhum isolado demonstrou resultado positivo para aglutinação nos testes sorológicos. Quanto à susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos, 66,6% e 62,5% foram resistentes a ampicilina e estreptomicina, respectivamente. Verificou-se que 29,16% dos isolados apresentaram Resistência Múltipla a Antimicrobianos (RMA), índice superior a 20%, caracterizando-se como cepas multirresistentes. Quanto à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), verificou-se que 12% dos isolados apresentaram a enzima. A presença de isolados multirresistentes e produção de ESBL por alguns deles nas amostras analisadas é um dado preocupante, indicando a necessidade de monitorar e intensificar o controle do uso de antimicrobianos na terapia veterinária e humana.

**Palavras-chave:** Culinária japonesa, cepas diarreio gênicas, peixe, multirresistência

LEAL NETO, Antenor. Occurrence of *Escherichia coli* in sashimi and antimicrobial profiles of the isolates. 61 f. Dissertation (Master degree) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

### ABSTRACT

Sashimi is a product of Japanese culinary usually made from raw salmon and tuna fish. This product, very popular in Brazil and several other countries of the world may represent important source of bacterial contamination for humans due to the steps involved in the preparation of raw fish, their storage and distribution. However, data about the occurrence of pathogens in this product are rare in the literature. The aim of the present study was to investigate the presence of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* in sashimi commercialized in restaurants in Salvador, BA, Brazil, and to evaluate the susceptibility of the isolates to antimicrobials. A total of 127 sashimi samples from 16 Japanese culinary restaurants were analyzed. The samples were inoculated in EC broth and those positive for gas production were striated on the surface of the Levine EMB agar. Typical colonies of the microorganism were confirmed through the biochemical tests of IMViC. In order to verify the presence of EPEC, EIEC and EHEC diarrheagenic strains, the isolates were submitted to the serum agglutination test. In addition, the isolates identified as *E. coli* were submitted to antimicrobial test to 14 antibiotics by disc diffusion technique. *E. coli* was detected in 14.7% of sashimi samples, 19% in sashimi samples prepared with tuna and 11% in those prepared with salmon. EPEC, EHEC and EIEC strains were not identified because no isolates were positive for agglutination in the serologic tests. Regarding the susceptibility of isolates to antimicrobials, 66.6% and 62.5% were resistant to ampicillin and streptomycin, respectively. It was verified that 29.16% of the isolates presented Multiple Resistance to Antimicrobials (MRA), index higher than 20%, characterizing them as multiresistant strains. Regarding the production of beta-lactamases extended spectrum (ESBL) enzyme, it is verified that 12% of the isolates were positive. The presence of multiresistant strains and the production of ESBL for bacteria in the samples analyzed is a concern, indicating the need to monitor and intensify the control of the use of antimicrobials in veterinary's and human's therapy.

**Keywords:** Japanese culinary, diarrheagenic strains, fish, multiresistant

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	7
2.	OBJETIVOS .....	10
2.1.	Objetivo geral .....	10
2.2.	Objetivos específicos .....	10
CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA .....		11
1.	PESCADO E ALIMENTAÇÃO .....	11
1.1.	Cenário da produção de pescado .....	11
1.2.	O pescado na alimentação humana .....	12
1.3.	Salmão ( <i>Salmon salar</i> ) .....	13
1.4.	Atum ( <i>Thunnus thynnus</i> ) .....	14
2.	CULINÁRIA JAPONESA .....	15
2.1.	<i>Sashimi</i> .....	15
3.	DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS.....	16
4.	<i>Escherichia coli</i> .....	18
3.1.1.	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC) .....	19
3.1.2.	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC) .....	21
3.1.3.	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC) .....	22
3.1.4.	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC) .....	22
3.1.5.	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC) .....	23
3.1.6.	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC) .....	24
5.	PRINCIPAIS SURTOS ENVOLVENDO <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM ALIMENTOS .....	25
6.	<i>Escherichia coli</i> E A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....	28
6.1.	Produção de $\beta$ -lactamases de espectro estendido .....	32
7.	REFERÊNCIAS .....	33
CAPÍTULO II: ARTIGO “Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> em <i>sashimi</i> e perfil antimicrobiano dos isolados” .....		39
1.	INTRODUÇÃO .....	42
2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	44



3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.	CONCLUSÃO.....	52
5.	REFERÊNCIAS.....	53

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Em diversas regiões do mundo, a carne de peixe contribui para uma alimentação saudável, visto que é considerada uma excelente fonte de proteína animal, além de possuir outros nutrientes essenciais. Isso é relevante principalmente em países em desenvolvimento, onde a população consome esse produto como principal fonte de proteína (FAO, 2006). Alguns especialistas relatam que a ingestão de peixes, ditos gordos, é uma fonte importante de ômega-3, ácidos graxos e nutrientes essenciais, como a vitamina D, na dieta (LEE et al., 2009; TURUNEN et al., 2011; OKEN et al., 2012).

De acordo com levantamento do Ministério da Aquicultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2017), os brasileiros consomem em torno de 14,4 Kg de pescado *per capita*/ano, número que está acima da média mundial divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 12 kg. Associadas ao grande consumo de pescado por parte dos brasileiros estão a ascensão e popularização da culinária japonesa em restaurantes, em especial o consumo do *sushi* e *sashimi*, fato que pode ter contribuído para o aumento no consumo *per capita*/ano de pescado em todo o país.

O *sashimi* é um produto oriundo da culinária japonesa, elaborado com pescado cru, geralmente salmão e atum (HKSAR, 2000; CARROL, 2009; MUSCOLINO, 2014). Esse produto, muito popular no Brasil e em vários outros países do mundo, pode representar importante fonte de contaminação bacteriana para o homem devido às etapas envolvidas no preparo do peixe cru, seu armazenamento e distribuição. Entretanto, dados sobre a ocorrência de patógenos nesse produto são escassos na literatura (CORREIA e RONCADA, 2002; SANTOS; VIEIRA, 2013; MUSCOLINO, 2014).

De acordo com Amson et al. (2006), microrganismos presentes no organismo dos animais, podem ser encontrados após o abate na carne crua e ainda causar contaminação cruzada em outros produtos. Além disso, diversos microrganismos com potencial patogênico podem ser veiculados por meio de alimentos, e a presença desses patógenos está ligada intimamente a muitos fatores como a contaminação do *habitat* onde os peixes foram pescados ou criados, contaminação do ambiente de produção,

falta de higiene na manipulação, processamento, armazenamento e venda desses produtos (SOARES e GONÇALVES, 2012).

Como um dos patógenos mais envolvido em surtos de toxinfecção alimentar, a *Escherichia coli* pode ser facilmente disseminada em diferentes ecossistemas através da cadeia alimentícia e água. A bactéria tem demonstrado trocar o seu material genético com outras espécies de bactérias, podendo transferir genes de resistência a antimicrobianos a bactérias transitórias patogênicas que causam doenças em humanos (RYU et al., 2012a).

A contaminação de alimentos prontos para o consumo por *E. coli* pode ter como origem o uso de matéria-prima contaminada ou condições insatisfatórias de higiene do ambiente de preparo dos alimentos. Além disso, durante o preparo pode ocorrer a contaminação cruzada, permitindo a proliferação bacteriana no alimento (JIANG et al., 2014).

A elevada prevalência de resistência dos microrganismos patogênicos a antimicrobianos verificada atualmente em alguns estudos, possivelmente está relacionada ao uso indiscriminado e cada vez mais elevado de antimicrobianos com finalidade profilática e/ou promotora de crescimento na medicina veterinária e no tratamento de doenças na medicina humana (SOUFI et al., 2011; JIANG et al., 2014).

Poucos dados têm sido relatados sobre a caracterização da resistência aos antimicrobianos de *E. coli* isolada de alimentos marinhos, embora existam muitos estudos sobre esta resistência em cepas de *E. coli* provenientes de outros alimentos de origem animal e cepas de origem humana (RYU et al., 2012a; RYU et al., 2012b).

Geralmente as infecções por *E. coli* são tratadas com cefalosporinas de amplo espectro, especialmente as cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações (LIEBANA et al., 2013). Entretanto, o aparecimento de cepas resistentes às cefalosporinas causada principalmente pela produção de  $\beta$ - lactamases, torna difícil tratar as infecções em humanos com esses antimicrobianos, o que vem aumentando o uso nos últimos anos dos carbapenems (D'ANDREA et al., 2013).

É importante considerar que a aquicultura ainda é a melhor maneira para aumentar a produção de pescado e para suprir as necessidades oriundas do crescimento da população (FAO, 2009). Como resultado das condições de estresse e também das

condições higiênicas inadequadas em instalações aquícolas, o risco de infecções bacterianas entre os peixes desse tipo de cultivo é alta. Portanto, altas quantidades de antimicrobianos são usadas na alimentação de peixes para fins de prevenção, bem como uso profilático em instalações aquícolas no mundo (SAPKOTA et al., 2008). O uso de grandes quantidades de antimicrobianos na aquicultura tem resultado no aumento de microrganismos resistentes a esses agentes.

Esse estudo teve como objetivo investigar a presença de cepas diarreiogênicas de *E. coli* em *sashimi* comercializados em restaurantes da culinária japonesa em Salvador, Bahia, e a resistência das cepas isoladas a antimicrobianos.

O estudo se encontra dividido em dois capítulos. O primeiro apresenta a revisão de literatura com abordagem dos temas relacionados à ocorrência de *E. coli* em *sashimi* e outros produtos de origem animal e o uso de antimicrobianos para tratamento da doença em humanos. O segundo capítulo, em forma de artigo, apresenta a metodologia utilizada, os resultados da pesquisa, as discussões em torno do tema e as conclusões do estudo realizado. Obedecem ao disposto na Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para redação de Dissertação.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 . Objetivo geral

Investigar a presença de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* em amostras de *sashimi* comercializados em restaurantes de Salvador, BA, e determinar o perfil de resistência dos isolados a antimicrobianos.

### 2.2. Objetivos específicos

Investigar a presença de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) em *sashimi*;

Avaliar a resistência/susceptibilidade das cepas diarreio gênicas isoladas do alimento aos principais antimicrobianos utilizados na rotina terapêutica;

Verificar a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) pelos isolados da bactéria;

Verificar a ocorrência de associação entre a presença de *Escherichia coli* e o tipo de peixe usado na preparação do *sashimi*.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Pescado e alimentação

##### 1.1. Cenário da produção de pescado

Em 2014 a produção mundial oriunda das atividades de pesca e aquicultura atingiu cerca de 168 milhões de toneladas (Tabela 1), de acordo com relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Cerca de 94 milhões de toneladas corresponderam a pesca e captura, sendo 81,5 milhões de toneladas provenientes de águas oceânicas e 11,9 milhões de toneladas de águas territoriais (FAO, 2016).

Tabela 1 – Produção mundial da pesca e aquicultura entre 2009 e 2014.

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
	(Milhões de toneladas)					
<b>PRODUÇÃO</b>						
<b>Pesca e Captura</b>						
Águas territoriais	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Águas oceânicas	79,7	77,9	82,6	79,7	81,0	81,5
<b>Total de captura</b>	<b>90,2</b>	<b>89,1</b>	<b>93,7</b>	<b>91,3</b>	<b>92,7</b>	<b>93,4</b>
<b>Aquicultura</b>						
Águas territoriais	34,3	36,9	38,6	42,0	44,8	47,1
Águas oceânicas	21,4	22,1	23,2	24,4	25,5	26,7
<b>Total de aquicultura</b>	<b>55,7</b>	<b>59,0</b>	<b>61,8</b>	<b>66,5</b>	<b>70,3</b>	<b>73,8</b>
<b>TOTAL</b>	<b>145,9</b>	<b>148,1</b>	<b>155,5</b>	<b>157,8</b>	<b>162,9</b>	<b>167,2</b>

(Adaptado de FAO, 2016)

A China lidera a lista dos países maiores produtores de pescado, seguida da Indonésia, Estados Unidos da América e Rússia. Os principais grupos de pescados são

as espécies de atum, lagostas e camarões, com registro de recorde na pesca de atum, atingindo mais de 7 milhões de toneladas em 2014. Os produtos da aquicultura também impulsionaram a produção mundial dessa atividade, aumentando em muito o suprimento de peixe para consumo humano, com cerca de 74 milhões de toneladas produzidas na mesma época. A China se destaca como o maior produtor de peixes na aquicultura, e detém mais de 60% da produção mundial, seguida pela Índia, Vietnã e Egito como outros grandes produtores (FAO, 2016).

O Brasil ocupa apenas a 14ª posição no *ranking* mundial, entretanto, tanto o Brasil como outros países em desenvolvimento desempenham um papel de grande relevância no suprimento dos mercados de alimentos do mundo, representando 61% do total das exportações de peixe no ano de 2012. Esse papel é tão importante que o percentual de exportações do pescado foi superior a outros produtos da agricultura, como leite, açúcar, arroz, carne e banana, totalizando uma receita líquida de cerca de 35 bilhões de dólares (FAO, 2014; FAO, 2016).

Ainda, em se tratando de Brasil, um balanço realizado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) estima que a produção de pescado no país no ano de 2013 foi superior a 2,5 milhões de toneladas (BRASIL, 2013). Além disso, dados do boletim estatístico do MPA demonstram que dentre todas as regiões da Federação, a região Nordeste ocupa o primeiro lugar em produção de pescado, seguida da região Sul (BRASIL, 2011).

### *1.2. O pescado na alimentação humana*

O pescado é considerado uma das principais fontes de proteína, sendo um alimento de alta digestibilidade e de alto valor biológico. Além disso, o pescado é conhecido como uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3 e ômega 6, que estão associados a proteção da funcionalidade cardíaca, fontes de vitaminas D, A e B, minerais como cálcio, iodo, zinco, ferro e selênio. O alto teor de lisina, um aminoácido essencial, é outra propriedade que habilita esses produtos como um alimento rico e saudável (ORDOÑEZ, 2005; OETTERER e REGITANO-D'ARCE, 2006; GERMANO e GERMANO, 2008; SOARES e GONÇALVES, 2012; FAO, 2016)

De acordo com a FAO, nos últimos 50 anos o consumo *per capita* anual de peixe no mundo aumentou bastante. Na década de 60, o consumo *per capita* de peixe anual era de 9,9 kg, em 2013 esse consumo foi de 19,7 Kg e estimativas para o ano de 2014 e 2015 sugeriram que esse consumo anual chegaria a 20 Kg *per capita*. Entretanto, em países em desenvolvimento, o consumo *per capita* anual ficou um pouco abaixo da média mundial, atingindo 18,8 Kg em 2013, e em países desenvolvidos foi de 26,8 Kg no mesmo ano. Esse aumento significativo do consumo de peixe tem agido positivamente na dieta e na saúde das pessoas no mundo, no momento que proporciona diversidade nutricional. Ainda em 2013, o consumo de peixe pela população mundial correspondeu a cerca de 17% do consumo de proteína animal no mundo inteiro, e cerca de 7% de toda a proteína total consumida (FAO, 2016).

De acordo com levantamento do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) (BRASIL, 2017), os brasileiros consumiram em torno de 14.4 Kg de pescado *per capita* no ano de 2013, número que estava acima da média mundial, de 12 Kg *per capita*, divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

### 1.3. Salmão (*Salmon salar*)

Salmão, Salmão Negro ou Salmão do Atlântico, são nomes populares do principal representante da Família Salmonidae, tendo como características principais o corpo alongado e a presença de um pedúnculo caudal delgado. Além disso, possui coloração marrom no dorso, podendo ser verde ou azul, os flancos prateados e o abdome em coloração branca. Dentre os maiores produtores de salmão encontram-se: Canadá, Estados Unidos, Chile, Austrália, Rússia, Espanha, França, Irlanda, Islândia, Noruega, Finlândia e Dinamarca (IUCN, 1996; FAO, 2014b) (Figura 1).



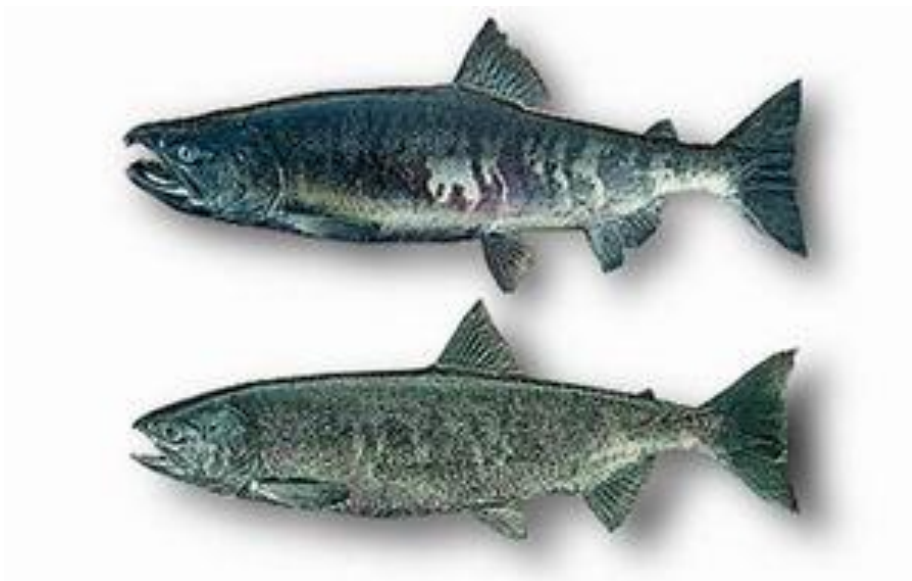


Figura 1- Salmão (*Salmon salar*). Fonte: <http://www.fao.org/fishery/species/2931/en>

#### 1.4. Atum (*Thunnus thynnus*)

Pertencente à família Scombridae, o atum tem como característica viver a maior parte do tempo em alto mar, aproximando-se da costa apenas em algumas épocas do ano. Essa espécie tem a habilidade de suportar uma ampla faixa de temperatura. Apresentam dorso azul-escuro, quase enegrecido, e flancos e abdome na coloração branca. São considerados peixes robustos e grandes, podendo alcançar três metros de comprimento. Os principais países na pesca de atum são os Estados Unidos e Canadá (IUCN, 2011; FAO, 2014c) (Figura 2).



Figura 2 – Atum (*Thunnus thynnus*). Fonte: <http://www.pesqueirapioneira.com.br>

## 2. Culinária Japonesa

### 2.1. *Sashimi*

O *sashimi* é caracterizado como filés de peixe, moluscos, crustáceos, ovas de peixe ou outros tipos de frutos do mar que são servidos crus e prontos para consumo no seu estado *in natura* (HKSAR, 2000; CARROL, 2009; MUSCOLINO, 2014) (Figura 3). No atual mundo globalizado, a mudança dos hábitos alimentares da população ajudou a disseminar o consumo de produtos da culinária com peixe cru, como o *sashimi*, tradicionalmente da culinária japonesa. Além disso, através desse processo de globalização, vários restaurantes especializados se estabeleceram em regiões do ocidente (EDWARD, 2012).

Para a produção do *sashimi*, o pescado a ser utilizado deve ser fresco, e refrigerado, com o intuito de retardar a proliferação de microrganismos, sendo assim todas as etapas do processo produtivo devem ser controladas, tais como captura, manipulação e armazenamento (SIKORSKY, 1990). De acordo com Correia e Roncada (2002), a qualidade higiênicossanitária do produto pode ser comprometida por hábitos dos manipuladores de alimentos que não condizem com as boas práticas de fabricação.

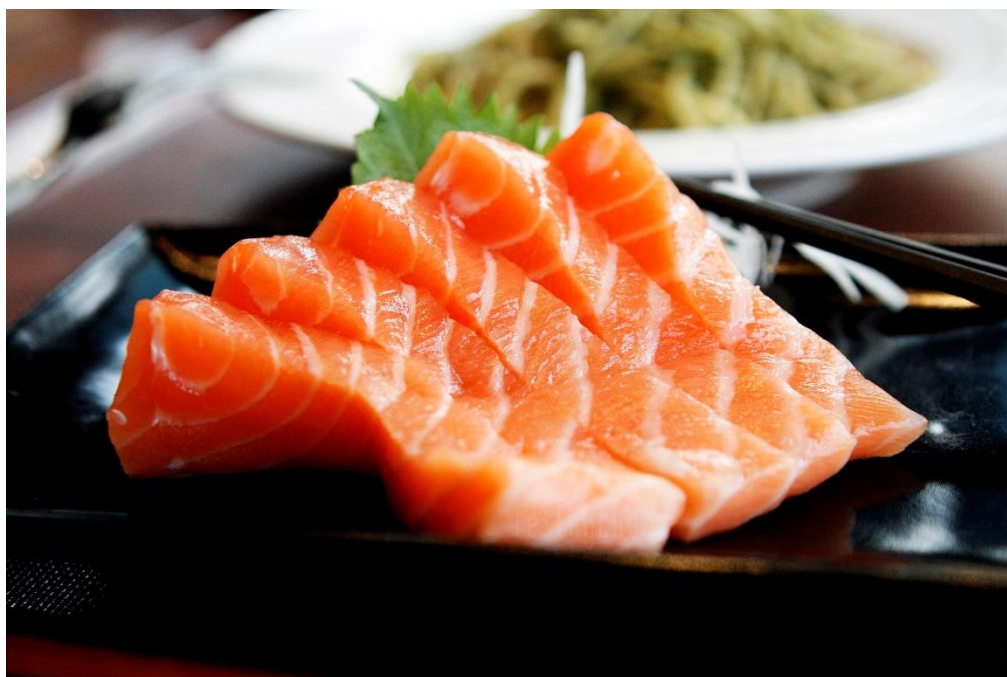


Figura 3 – *Sashimi* de salmão. Fonte: <http://amandahilsen.com>

É fundamental na cadeia de produção do *sashimi* a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a implementação da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), com o objetivo de garantir a segurança e a qualidade higiênicossanitária dos alimentos produzidos (SANTOS e VIEIRA, 2013). Há de se considerar que o pescado *in natura*, possui características ótimas para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, tais como elevado teor de nutrientes e alta atividade de água (CORREIA e RONCADA, 2002; SANTOS e VIEIRA, 2013; MUSCOLINO, 2014). Muitos microrganismos patogênicos já foram identificados em amostras de pescado cru, tais como, bactérias do gênero *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp. e *Aeromonas* spp. (SANTOS e VIEIRA, 2013; MUSCOLINO, 2014).

### 3. Doenças Veiculadas por Alimentos

A enfermidade que é adquirida ao se ingerir alimentos, de origem vegetal ou animal, contaminados por microrganismos (patógenos ou deterioradores) ou toxinas é definida como doença veiculada por alimento (DVA) (FORSYTHE, 2005; BADARÓ et al., 2007; BRASIL, 2016). Esses alimentos podem sofrer contaminação em qualquer etapa do seu processamento, seja na obtenção da matéria-prima, passando pelo seu processamento, embalagem, armazenamento, até o instante da ingestão pelo consumidor (FIDÉLIS, 2005; FORSYTHE, 2005; BRASIL, 2016). A contaminação cruzada entre produtos crus e processados, a falta de monitoramento no controle da temperatura de cozimento, no armazenamento, resfriamento ou congelamento, falhas de higiene pessoal de manipuladores e a própria matéria prima de qualidade deficitária, constituem as principais causas de contaminação alimentar (FIDÉLIS, 2005; FORSYTHE, 2005; SILOCHI, 2005).

As DVA constituem-se em um dos problemas de saúde pública mais disseminados em todo o mundo e uma importante causa da redução da produtividade econômica em um país. A importância destas doenças como um problema de saúde da população é, geralmente, subestimada porque a verdadeira incidência é de difícil avaliação e a severidade das consequências à saúde ou à economia não são devidamente estudadas (TESSARI et al., 2003).

De acordo com dados da Secretaria de Vigilância e Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2016 foram computados 6.848 surtos de doenças veiculadas por alimentos, onde quase 610.000 pessoas foram acometidas. No entanto, no ano de 2016, foram registrados apenas 354 surtos. Entretanto, os casos de DVA no país já atingiram números mais expressivos em anos anteriores, como no ano de 2005, no qual foram registrados mais de 900 surtos de enfermidades associadas à alimentação, e no ano de 2004 mais de 20 mil pessoas foram acometidas por algum tipo de DVA. No período de 2007 a 2016, cerca de 16% dos surtos foram associados a alimentos provenientes de restaurantes e similares, e apenas 0,8% dos surtos foram associados a pescado, porém mais de 65% dos surtos foram registrados com o alimento envolvido não sendo identificado (BRASIL, 2016). Nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), o número de casos confirmados de pessoas acometidas por doenças veiculadas por alimentos chegou a 20.107, sendo que 4.531 pessoas foram hospitalizadas e 77 pessoas foram a óbito (CDC, 2015).

Um dos fatores que pode estar associado a grande quantidade de surtos de DVA é o desconhecimento por parte da população sobre os riscos provenientes dos alimentos e ignorância das melhores maneiras de acondicionar os produtos, tais como temperatura, umidade, tempo e locais de armazenamento (AMSON et al., 2006). Talvez por isso, as residências sejam apontadas como os locais de maior incidência de casos de DVA, com cerca de 39% dos surtos relatados (AMSON et al., 2006; BRASIL, 2014). Segundo Amson et al. (2006), microrganismos presentes no organismo dos animais podem ser encontrados após o abate na carne crua e ainda causar contaminação cruzada em outros produtos. Além disso, diversos microrganismos com potencial patogênico podem ser veiculados através de alimentos, e a presença desses patógenos está relacionada intimamente a muitos fatores, como a contaminação do *habitat* onde os peixes foram pescados ou criados, contaminação do ambiente de produção, falta de higiene na manipulação, processamento, armazenamento e venda desses produtos (SOARES e GONÇALVES, 2012).

Ainda de acordo com o Ministério da Saúde, os principais agentes etiológicos envolvidos em surtos de DVA, com 90% dos surtos identificados, no período de 2007 a dezembro de 2016 no Brasil foram: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., e *Staphylococcus aureus*, porém cerca de 70% dos casos não tiveram o agente etiológico

identificado (BRASIL, 2016). Já nos EUA, os principais agentes etiológicos identificados em surtos de DVA em 2015 foram microrganismos do gênero *Salmonella* spp., em 15,89% dos casos, *Campylobacter* spp., em 12,97% dos casos, *Shigella* spp, em 5,53%, *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC), em 1,64% e *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) O157 em 0,95% dos casos, em dados percentuais para 100 mil pessoas (CDC, 2015).

#### **4. *Escherichia coli***

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Escherichia* fazem parte da família Enterobacteriaceae. Essa família compreende mais de 30 gêneros e 100 espécies (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). As bactérias desse grupo são caracterizadas como bacilos Gram-negativos, sem capacidade de formar esporos, anaeróbios facultativos, catalase-positiva, oxidase-negativa, capazes de fermentar a glicose e reduzir nitrato a nitrito, além de outras competências metabólicas no que diz respeito a outras substâncias como aminoácidos, lipídios e carboidratos. Essas características de caráter bioquímico são utilizadas para identificação das diversas espécies pertencentes à família das enterobactérias (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2008; KONEMAN et al., 2010).

*Escherichia coli* pertence ao grupo dos coliformes, mais precisamente o grupo dos coliformes termotolerantes ou coliformes a 45°C. Os microrganismos desse grupo são de grande importância na saúde pública, pois podem indicar a contaminação recente do alimento por fezes de humanos e/ou animais de sangue quente (ARAÚJO e NASCIMENTO, 2013). São bactérias com a principal característica de continuar fermentando a lactose com produção de gás, quando incubadas em temperaturas que variam de 44°C a 44,5°C em até 48h. Macroscopicamente apresentam-se como colônias verdes ou pretas, com brilho metálico em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (KONEMAN et al., 2010). Nos laboratórios clínicos do mundo todo, é o microrganismo isolado mais frequentemente e já foi relacionado com inúmeras complicações em diversos sistemas orgânicos dos seres humanos (KONEMAN et al., 2010; ARAÚJO e NASCIMENTO, 2013).

Apresentam antígenos somáticos O, relacionados com os polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares (MENG et al., 2001).

Considerando que a bactéria é constituinte natural da microbiota intestinal de animais de sangue quente, inclusive seres humanos, sendo possível encontrá-la nas fezes de todos os indivíduos saudáveis (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005), o aparecimento da *E. coli* em alimentos tem que ser avaliado por dois fatores: o contato direto ou indireto do alimento com fezes de animais e/ou humanos (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005); e a patogenicidade do microrganismo ao ser humano e aos animais (SILVA e SILVA, 2005; KONEMAN et al., 2010).

A contaminação de alimentos prontos para o consumo por *E. coli* pode ter como origem o uso de matéria-prima contaminada ou condições insatisfatórias de higiene do ambiente de preparo dos alimentos. Além disso, durante o preparo pode ocorrer a contaminação cruzada, permitindo a proliferação bacteriana no alimento (JIANG et al., 2014). A bactéria pode ser facilmente disseminada em diferentes ecossistemas através da cadeia alimentícia e água, e tem demonstrado trocar o seu material genético com outras espécies bacterianas e, é possível que este patógeno possa transferir genes de resistência a antimicrobianos a bactérias transitórias patogênicas que causam doenças em humanos (RYU et al., 2012a).

Várias linhagens patogênicas da *E. coli* são conhecidas e normalmente são divididas de acordo com sinais clínicos que apresentam, além dos seus mecanismos de patogenicidade (FORSYTHE, 2005). Dentre elas se destacam: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (SILVA e SILVA, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010).

#### 4.1. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) se caracteriza por atravessar a barreira gástrica e causar lesões em forma de pedestal na mucosa intestinal, diminuindo as vilosidades, e conseqüentemente, a área de absorção do intestino,

causando quadro de diarreia aquosa contendo muco, porém sem sangue. Os sintomas incluem ainda o vômito e a febre (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010) (Figura 4).

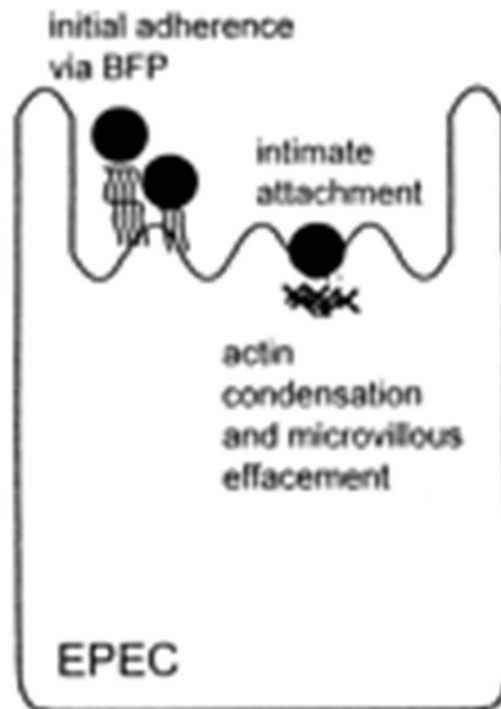


Figura 4 – Mecanismo de patogenicidade da *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC). Fonte: <http://www.mikrobik.net/>

De acordo com estudos, a EPEC tem como reservatório natural apenas os humanos, raramente sendo encontrada em animais. Os principais indivíduos acometidos são as crianças, principalmente aquelas que vivem em grandes centros urbanos, pertencentes a famílias de baixa renda (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

As cepas EPEC são classificadas em dois grupos: EPEC típicas, que apresentam o gene *eae* e plasmídeo EAF, e EPEC atípicas que apresentam somente o gene *eae*. As cepas EPEC típicas, ou simplesmente EPEC, são bastante homogêneas em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo plasmídeo EAF. Por outro lado, as EPEC atípicas não são portadoras do plasmídeo EAF, mas possuem o gene *eae* e demais fatores de virulência codificados na região LEE (NGUYEN et al., 2006).

#### 4.2. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

*Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) tem como característica uma infecção muito semelhante à ocorrida em casos de infecção por microrganismos do gênero *Shigella*, pela sua capacidade de invasividade, visto que adentra as células epiteliais do intestino, principalmente na região do cólon, causando inflamação (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010; TORTORA; BERDELL; CASE, 2012) (Figura 5).

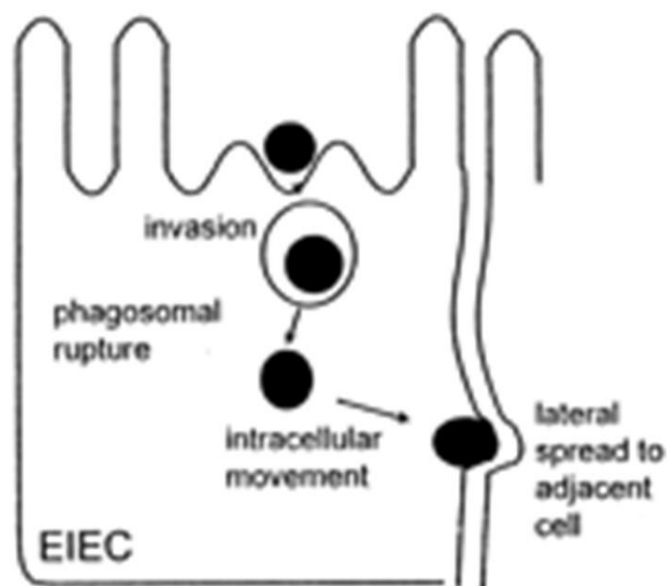


Figura 5 – Mecanismo de patogenicidade da *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC).

Fonte: <http://www.mikrobik.net/>

Os indivíduos acometidos têm diarreia aquosa com muco e sangue, muitos leucócitos nas fezes, podendo apresentar, ainda, febre, mal-estar e cólicas abdominais, sendo esse quadro de infecção mais comum em adultos (FORSYTHE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010; TORTORA; BERDELL; CASE, 2012).



#### 4.3. *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)

A produção de toxinas do tipo shiga (stx1), semelhantes a produzidas em infecções por *Shigella* (stx), é uma das principais características da *E. coli* Enterohemorrágica (KONEMAN et al., 2010; BILINSKI et al., 2012) (Figura 6). Além disso, a EHEC é tipicamente conhecida por causar colites hemorrágicas e principalmente por um comprometimento mais grave, a síndrome hemolítica urêmica (HUS) (KAPER et al., 2004), entretanto, relatada apenas em 5% dos casos e o índice de mortalidade em casos mais graves é baixo, cerca de 5%, porém a sua prevalência é maior em países desenvolvidos, onde muitos casos não são tratados (HEUVELINK et al., 1998; RIVAS et al., 2008).

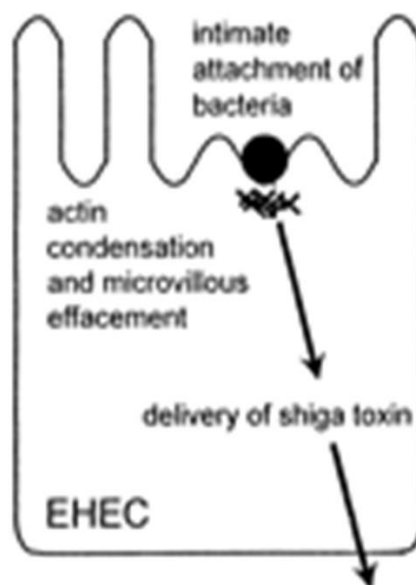


Figura 6 – Mecanismo de patogenicidade da *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC). Fonte: <http://www.mikrobik.net/>

#### 4.4. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) se caracteriza por possuir a capacidade de produzir toxinas, após atravessar a barreira gástrica no intestino delgado (Figura 7). Nessa região há a produção de enterotoxinas, uma termolábil e outra termoestável, que tem como função a anulação da capacidade das células entéricas em

reter líquidos celulares e eletrólitos, o que resulta numa eliminação profusa de fezes líquidas, característica marcante da enfermidade, e que se assemelha com casos de cólera. Infecções por ETEC acometem particularmente pessoas que transitam em viagens de países desenvolvidos para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, e é conhecida como “diarreia dos viajantes” (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010; TORTORA; BERDELL; CASE, 2012). Em países subdesenvolvidos acometem crianças, correspondendo a grande parte dos quadros de diarreia. As vias de transmissão do patógeno são a ingestão de água e alimentos contaminados, mas há relatos de que o microrganismo possa ser transmitido em áreas de maternidade e pediatria de hospitais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

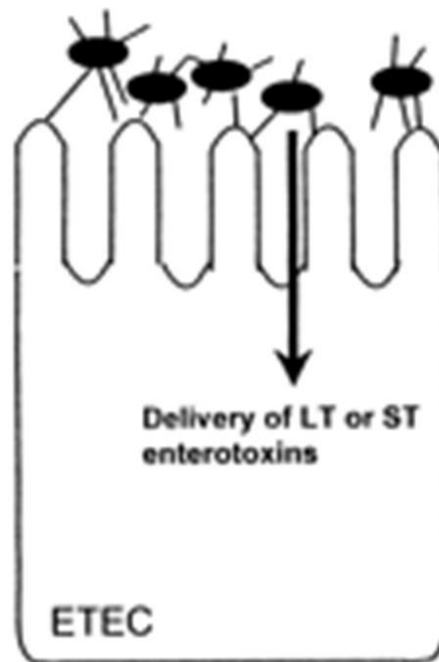


Figura 7 – Mecanismo de patogenicidade da *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) Fonte: <http://www.mikrobik.net/>

#### 4.5. *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

A aderência na superfície das células epiteliais é a principal característica da *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC). O microrganismo se adere de forma exclusiva, organizando-se em conjunto, numa configuração similar a tijolos

empilhados ou uma pilha de ladrilhos (Figura 8) (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010; TORTORA; BERDELL; CASE, 2012), e que pode vir a formar organizações contínuas, lineares ou de forma heterogênea (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Os indivíduos afetados por esse patógeno apresentam diarreia mucosa aquosa persistente (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010), podendo apresentar o sintoma da infecção por até 14 dias (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Os adultos e crianças são susceptíveis à infecção da EAEC e essa linhagem é citada como a segunda causa mais comum da “diarreia dos viajantes” (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; TORTORA; BERDELL; CASE, 2012).

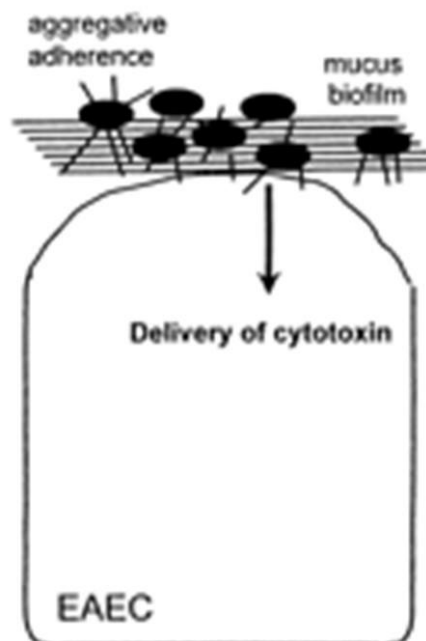


Figura 8 – Mecanismo de patogenicidade da *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC). Fonte: <http://www.mikrobik.net/>

#### 4.6. *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC)

Cepas de *E. coli* de aderência difusa são identificadas pelo seu padrão de aderência em cultura de células epiteliais *in vitro* e são reconhecidas como a sexta classe de *E. coli* diarreio gênicas (BARBOSA, 2010). Várias estruturas envolvidas na

virulência desse grupo são relatadas, e quatro adesinas relacionadas com o fenótipo de aderência difusa estão bem caracterizados: F1845, AIDA-I, CF16k, e uma proteína de 57 kDa (BARBOSA, 2010). Contudo, não existem dados suficientes para confirmar o papel dessas adesinas na diarreia (TADDEI et al., 2003).

DAEC também tem sido implicada em infecções do trato urinário e algumas cepas carregam fatores de virulência encontrados em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (BARBOSA, 2010).

Uma nova classificação das cepas DAEC foi proposta por SERVIN (2005), ou seja, típicas e atípicas. As típicas incluem cepas que carregam adesinas da família Dr com idêntica organização genica, permitindo ligação ao DAF, enquanto a classe atípica se relaciona às cepas que não possuem adesinas Dr e nem outros tipos de adesinas. Dados a respeito da relação entre cepas DAEC e diarreia permanecem controversos e a patogenicidade enterica deste grupo ainda é questionável (BARBOSA, 2010).

## **5. Principais surtos envolvendo *Escherichia coli* em alimentos**

A epidemiologia de casos de infecção associado a *Escherichia coli* varia bastante de acordo com a cepa envolvida (ALLOCATI, 2013). Nos últimos anos na Europa, a maioria dos surtos foram causados por cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Em 2011, houve um surto que se iniciou na Alemanha com vegetais contaminados com *E. coli* O104:H4 e atingiu diversos países no continente. Cerca de 4.000 pessoas foram acometidas, registrando-se que mais de 900 casos evoluíram para o caso mais grave da infecção, a síndrome hemolítica urêmica (ECDC, 2013; BILINSKI, 2012; KARCH, 2012; MAREJKOVA, 2012; ALLOCATI 2013). Devido à elevada incidência de mortes entre idosos e crianças, a ocorrência de EHEC em alimentos possui grande importância para a saúde pública. Estima-se que a infecção pelo microrganismo é responsável por 70% dos casos de insuficiência renal aguda em crianças (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2009).

Os primeiros surtos causados por EHEC foram relacionados à ingestão de carne bovina crua ou mal cozida. Atualmente, existem registros também de surtos envolvendo vegetais crus, brotos, frutas, produtos derivados de carne (salames), suco de maçã não pasteurizado, leite cru e água de consumo ou recreativas. Esse aumento da variedade de alimentos envolvidos em surtos demonstra a versatilidade da

população bacteriana de *E. coli* na cadeia alimentar (NEWELL et al., 2010; WHO, 2011). Além disso, uma pequena população de células viáveis de EHEC é suficiente para desencadear a infecção. A dose infectante é estimada em 10 a 10<sup>2</sup> células e para os outros sorotipos não há muita informação, no entanto, suspeita-se de que seja um valor um pouco maior (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2009; FDA, 2012).

Dentre os mais de 50 sorotipos de EHEC, a *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais associado a doenças em todo o mundo (em torno de 75% dos casos); é a melhor caracterizada, devido a facilidade de diferenciá-la bioquimicamente. Entretanto, atualmente, os sorotipos denominados não-O157:H7 estão emergindo como causa de surtos, destacando-se O26, O103, O111 e O145 (NEWELL et al., 2010; FDA, 2012). A transmissão do sorotipo se dá principalmente através do consumo de alimentos contaminados, como carne moída crua ou mal cozida, hambúrgueres, salame curado, leite cru, iogurte, e queijos, que já estiveram envolvidos em surtos com *E. coli* O157:H7 (WHO, 2011).

A EHEC O157:H7 vem causando muitos surtos tanto na Europa como nos EUA, e outros países desenvolvidos (ALLOCATI 2013; CDC, 2015), sendo a principal causa de casos de síndrome hemolítica urêmica (ALLOCATI, 2013; BIELASZEWSKA, 2013). De acordo com o CDC (CDC, 2015), cepas de *E. coli* EHEC O157 causaram 463 casos de infecção nos Estados Unidos no ano de 2015, e EHEC não O157 causaram 796 casos de infecção. De acordo com o órgão, a incidência dessas cepas de *E. coli* no ano de 2015 foi 40% maior do que aquela registrada nos três anos anteriores, 2012-2013-2014. Em 2014, dos 88 casos de síndrome hemolítica urêmica registrados 67 (76%) foram associados a infecção por *E. coli* EHEC, sendo que 53 desses casos foram confirmados para a infecção por EHEC O157 (CDC, 2015). O surto mais recente aconteceu em 2016, no qual produtos cárneos de um matadouro, carne de bovino e bisão, foram contaminados por EHEC O157:H7. Nesse surto, 11 pessoas foram acometidas pela infecção, sendo que sete foram hospitalizadas e um indivíduo desenvolveu a síndrome hemolítica urêmica (CDC, 2016).

Existem relatos (esporádicos) de surtos envolvendo a cepa ETEC nos Estados Unidos relacionados ao consumo de água, queijos e vegetais crus contaminados (FDA, 2011). Estima-se que a dose infectante para adultos saudáveis seja de, pelo menos, 10<sup>8</sup> células. Entretanto, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos são susceptíveis a uma população menor do microrganismo. A contaminação ocorre

durante a manipulação do alimento por um indivíduo portador da doença ou através do uso de água contaminada durante a preparação do alimento (FDA, 2012).

A gastroenterite causada pela ETEC é geralmente leve e curta, ocorrendo de 8 a 44 horas após a ingestão do alimento contaminado. Nos casos mais graves, a duração da enfermidade pode ser estendida por até 19 dias, com mais de cinco dejeções diárias, desidratação severa, cólicas abdominais, febrícula, náuseas e mal estar (FDA, 2012).

No caso da cepa EPEC, atualmente as infecções são menos frequentes nos países desenvolvidos, porém, apresentam significativa morbi-mortalidade em crianças menores de dois anos de idade em países em desenvolvimento (NEWELL et al., 2010). Estima-se que a dose infectante da cepa bacteriana seja em torno de  $10^6$  células para adultos saudáveis. Normalmente é encontrada em produtos cárneos (bovino e ave) e água (NEWELL et al., 2010). Geralmente, após quatro horas da ingestão do alimento contaminado, instala-se o quadro de diarreia leve, vômito e febre baixa por um período de 12 a 120 dias. A diarreia causada pela EPEC é clinicamente mais grave em relação às demais *E. coli* diarreiogênicas (FDA, 2012).

Na tentativa de reduzir a ocorrência de doenças, a vigilância das doenças veiculadas por alimentos e da presença de patógenos na cadeia alimentícia tem sido implementada adotando uma abordagem conhecida como “da-fazenda-ao-garfo”, incentivando todos os setores da cadeia de produção de alimentos para melhorar a higiene e incorporar os princípios do sistema APPCC. Subjacente a tais mudanças, na indústria tem se observado um grande esforço de investigação levando a geração de métodos mais adequados para o diagnóstico da doença intestinal e a detecção de agentes patogênicos de origem alimentar. Nos últimos 20 anos estas investigações também tem usado tecnologia mais modernas para determinar as sequências do genoma, identificar mecanismos patogênicos, fornecer provas - com base em avaliações de risco para o desenvolvimento de políticas e, até mesmo desenvolver algumas estratégias de intervenção eficazes, tais como vacinas para animais produtores de gêneros alimentícios ou tratamentos pós-colheita. Com o uso de todas estas ferramentas, uma substancial diminuição na tendência de ocorrência de doença de origem alimentar é esperada. No entanto, evidências da vigilância das doenças veiculadas por alimentos demonstram que a obtenção de um impacto positivo nessa direção ainda permanece esparsa (NEWELL et al., 2010).

## 6. *Escherichia coli* e a resistência a antimicrobianos

A evolução da disseminação da resistência antimicrobiana aos tratamentos convencionais é um importante motivo de preocupação no mundo todo (VAN DEN BOGAARD e STOBBERINGH, 2000), principalmente devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos. A elevada prevalência de resistência dos microrganismos patogênicos a antimicrobianos verificada atualmente em alguns estudos, possivelmente está relacionada ao uso indiscriminado e cada vez mais elevado de antimicrobianos com finalidade profilática e/ou promotora de crescimento na medicina veterinária e no tratamento de doenças na medicina humana (SOUFI et al., 2011; JIANG et al., 2014). A prescrição indiscriminada de antimicrobianos por médicos, somada ao uso excessivo desses agentes pela população tem sido causas associadas a esse aumento de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos em diversos países (DIAS et al., 2010)

Microrganismos resistentes a antimicrobianos provenientes de animais ou residentes da microbiota normal, podem infectar ou atingir a população humana não somente pelo contato direto, mas também através dos produtos de origem animal. Assim, é possível colonizar o organismo do indivíduo e/ou transferir informação genética com genes de resistência para outro microrganismo pertencente à microbiota endógena do organismo (VAN DEN BOGAARD e STOBBERINGH, 2000).

Além disso, estudos epidemiológicos apontam que microrganismos patogênicos de peixes do gênero *Aeromonas* spp. são capazes de transmitir informações genéticas de resistência aos antimicrobianos para bactérias isoladas de seres humanos, tais como *E. coli* (RHODES et al., 2000; SØRUM, 2006).

Poucos dados têm sido relatados sobre a caracterização da resistência aos antimicrobianos de *E. coli* isolada de alimentos marinhos, embora existam muitos estudos sobre esta resistência em *E. coli* proveniente de outros alimentos de origem animal e cepas de origem humana (RYU et al., 2012a).

Sempre que agentes antimicrobianos são utilizados, os microrganismos tendem a desenvolver mecanismos de resistência, seja através de algum tipo de mutação espontânea ou ao adquirir informação genética de outro microrganismo (BARBOSA,

2000; LIVERMORE, 2003; COSTA 2013) além disso, uma vez obtida a capacidade de resistência a determinado agente antimicrobiano, os microrganismos podem rapidamente dar origem a um vasto número de progênes resistentes (LIVERMORE, 2003). Esse último mecanismo pode ocorrer através de processos de transdução, mediado por bacteriófagos, conjugação, que envolve contato direto das células bacterianas e transferência plasmidial ou de transposons, ou transformação, que envolve a captação de DNA livre resultante de lise bacteriana (BARBOSA, 2000; LIVERMORE, 2003; COSTA 2013). A seleção natural favorece mecanismos de resistência que conferem resistência com o menor custo de aptidão e cepas resistentes com maior capacidade de sobrevivência ou virulência. A este potencial genético e bioquímico deve ser acrescentada a grande variedade de bactérias que causam infecções oportunistas em pacientes imunodeficientes e o fato de que o número desse grupo de risco cresce constantemente com os avanços em outros campos da medicina (LIVERMORE, 2003; COSTA 2013).

As mutações genéticas que levam ao surgimento de resistência aos antimicrobianos acontecem na etapa de replicação do DNA. Incorretas substituições de bases ocorrem de maneira aleatória, e além disso, erros de cópia podem resultar em deleção parcial ou completa de genes. Como resultado, o alvo dos agentes antimicrobianos pode ser alterado, sistemas de inativação das drogas podem ser desregulados e vias de absorção celular podem ser desativadas ou ativadas. Além disso, genes de resistência ou seus repressores podem ter seu local alterado por migração de sequência genética, e serem ativados ou inativados (LIVERMORE, 2003).

A transferência de DNA entre células bacterianas é fundamental para o êxito da disseminação da resistência aos antimicrobianos. Os plasmídeos são a principal ferramenta de transferência de DNA, e consistem de moléculas extra-cromossomais capazes de carregar informações genéticas (Figura 9). São moléculas que já existiam antes da utilização dos antimicrobianos pela medicina humana, mas não carregavam informação genética de resistência ou raramente existia a transmissão genética através delas (HUGHES, 1983; LIVERMORE, 2003). Entretanto, desde o início da utilização mais efetiva dos antimicrobianos pela medicina humana e medicina veterinária, os plasmídeos têm se mostrado como veículo ideal de transferência e disseminação de genes de resistência (LIVERMORE, 2003).



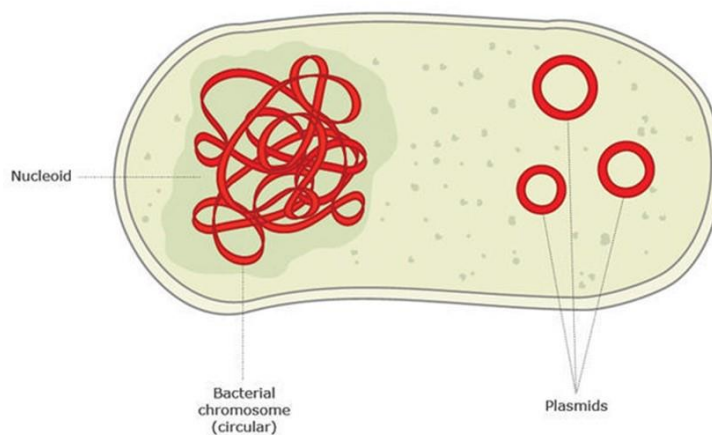


Figura 9 – Plasmídeos e estruturas genéticas bacterianas. Fonte: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1900-bacterial-dna-the-role-of-plasmids>

Dentro dos plasmídeos, os genes de resistência são normalmente transportados por segmentos chamados transposons (Figura 10), que tem a função de transferir genes através de deslocamento de segmentos de DNA no mesmo plasmídeo, entre os plasmídeos, de plasmídeos para cromossomos ou entre cromossomos. (LIVERMORE, 2003).

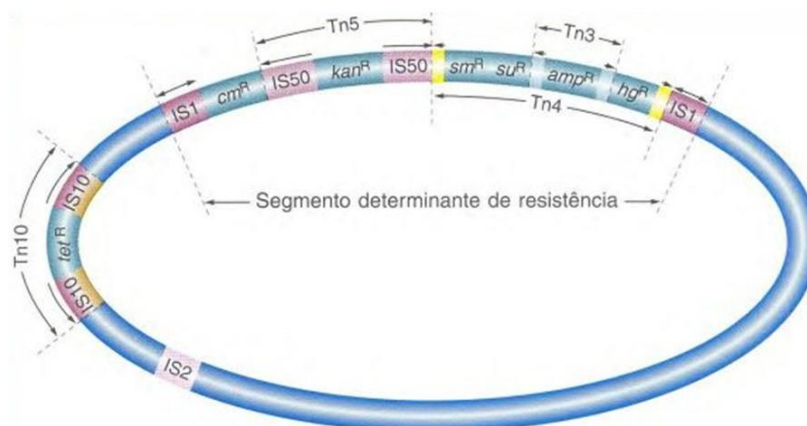


Figura 10 – Segmentos de transposons: Tn3, Tn4, Tn5 e Tn10.

Fonte: <http://scienceblogs.com.br/meiodecultura/tag/plasmideo/>

Em estudo realizado com amostras de peixe e frutos do mar por Ryu et al. (2012a), a resistência de *Escherichia coli* foi avaliada em 179 isolados. Foi observada resistência a tetraciclina, estreptomicina e ampicilina em 30,7%, 12,8% e 6,7%, respectivamente. Outros estudos que analisaram amostras de intestinos de peixe e amostras de alimentos prontos para consumo, como filés de peixe, realizados por Jiang et al (2012) e Ryu et al (2012b), respectivamente, também relataram resistência a ampicilina e tetraciclina (JIANG et al., 2012), e ampicilina, tetraciclina e estreptomicina (RYU et al., 2012b).

De forma similar, Soufi et al (2011) investigaram amostras de carcaça de perus e frangos a fim de avaliar a resistência aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*. Os autores identificaram alta resistência, ou seja, cerca de 90% dos isolados foram considerados multirresistentes aos antimicrobianos, ou resistentes a pelo menos três diferentes antimicrobianos, com maiores índices de resistência a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina.

### 6.1. Produção de $\beta$ -lactamases de espectro estendido

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) são  $\beta$ -lactamases da classe A ou D que possuem algumas características específicas, como a presença de sítio ativo-serina; a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro; e a inibição *in vitro* por inibidores de  $\beta$ -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos carbapenems e cefamicina. A cefoxitina não é uma cefalosporina, e sim uma cefamicina e, é importante mencionar que, embora as amostras apresentem sensibilidade à cefoxitina, a sua utilização para tratamento das infecções por ESBL não é recomendada (BRADFORD et al., 2001).

Essas enzimas são geralmente codificadas por genes contidos em plasmídeos, os quais podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. São mais frequentes entre amostras clínicas de enterobactérias, principalmente as das espécies *Klebsiella.pneumoniae* e *E. coli* (BRADFORD et al., 2001).

Surgiram, provavelmente a partir de mutações na estrutura de  $\beta$ -lactamases com menor atividade hidrolítica, que alteram as propriedades do sítio ativo da enzima, tornando-as capazes de hidrolisar antimicrobianos como ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima. Os testes realizados dividem-se em testes de triagem e testes confirmatórios para ESBL. O teste confirmatório é baseado no fato destas enzimas serem inibidas pelo ácido clavulânico. O teste é considerado positivo se houver aumento da zona de inibição de uma ou mais cefalosporinas de amplo espectro na presença do ácido clavulânico. Caso os testes sejam positivos para a presença da enzima, a amostra é considerada como resistente a todas as cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (BRADFORD et al., 2001).

Nesse contexto, estudos que investigam a presença de cepas diarréiogênicas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos em alimentos merecem atenção especial, considerando a contribuição que podem trazer para o uso de terapias alternativas para o controle da infecção em seres humanos.

## REFERÊNCIAS

ALLOCATTI, N. et al. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 6235-6254, 2013.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. Ed. Washington: American Public Health Association, p. 659, 2013.

ARAÚJO, M. F. M.; NASCIMENTO, V. S. F. Ocorrência de bactérias patogênicas oportunistas em um reservatório do semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 7, n. 1, p. 91-104, 2013.

BADARÓ, A. C. L.; AZEREDO, R. M. C.; ALMEIDA, M. E. F. Vigilância Sanitária de Alimentos: Uma Revisão. **Nutrir Gerais**, v. 1, n. 1, 2007.

BARBOSA, T.; LEVY, S. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. **Drug Resist. Update**, v. 3, p. 303–311, 2000.

BARBOSA, M. M. C. **Identificação sorológica e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de peixe e água de pesque-pagues**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. 67f.

BIELASZEWSKA, M. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H–: A new virulent clone emerges in Europe. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p. 1373–1381, 2013.

BILINSKI, P. et al. Public health hazards in Poland posed by foodstuffs contaminated with *E. coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 19, p. 3–10, 2012.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 933-951, 2001

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2011. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf). (Acessado em: 30/09/2014)

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Balanco 2013**, 2013. <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/Cartilha-Balan%C3%A7o-2013-Minist%C3%A9rio-Pesca-Aquicultura.pdf>. (Acessado em: 15/10/2016)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**, 2014. Disponível em: [http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_Apresentacao-RejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_Apresentacao-RejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf) (Acessado em: 05/10/2014).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**, 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf> (Acessado em 05/10/2014)

BRASIL. Portal Brasil. **Produção de peixes no Brasil cresce com apoio de pesquisas da Embrapa**, 2017 Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa> (Acessado em 05/10/2014).

CARROLL, W.F. Sushi; Globalization through food culture; towards study of global food networks. **Education Research**, v. 2, p. 451-456, 2009.

CARVALHO et al. Antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Escherichia coli* strains of environmental origin. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, p. 1249-1255, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network**, 2015. Disponível em: [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a2.htm?s\\_cid=mm6514a2\\_w#T2\\_down](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a2.htm?s_cid=mm6514a2_w#T2_down) (Acessado em 05/10/2014).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. **Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Beef Products Produced by Adams Farm**, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2016/O157H7-09-16/index.html> (Acessado em 05/10/2014).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-third informational supplement**, 2013.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Características microscópicas de queijos prato, muçarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, p. 296-301, 2002.

COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 278-294, 2013.

D'ANDREA, M.M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G.M. CTX-M-type b-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, p. 305–317, 2013.

DIAS, M. T. et al. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) à antimicrobianos. **Ciê. Tecnol. de Alim.**, v. 30, p. 319-324, 2010.

EDWARD, P. Global sushi: eating and identity. **Perspectives on Global Development and Technology**, v.11, n.1, p.211-225, 2012.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, ECDC. **Annual Epidemiological Report 2012**, 2013.

FDA. **BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli***, 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> (Acessado em 20/02/2016).

FDA. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**, 2012. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/> > (Acessado em 10/03/2016).

FIDÉLIS, G.A. **Avaliação das Boas Práticas de Preparação em restaurantes institucionais**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. **O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio, 2006**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf> (Acessado em 15/10/2016).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture, 2009**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i0250e.pdf> (Acessado em 30/09/2014).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture, 2014**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/publications/sofia/en> (Acessado em 15/10/2016).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO, 2014b. Disponível em: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo\\_salar/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en) (Acessado em 30/09/2014).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO, 2014c. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/species/3296/en> (Acessado em 30/09/2014).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture, 2016**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf> (Acessado em 04/01/2017).

FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT, HKSAR. **Risk assessment studies report No. 2. Microbiological hazards evaluation. Sushi and sashimi in Hong Kong**. 2000. Disponível em: [http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_haccp/files/ss\\_ras2\\_eng.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_haccp/files/ss_ras2_eng.pdf) (Acessado em 04/01/2017).

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole; 2008.

HEALTH PROTECTION AGENCY. **Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods**. Londres: Health Protection Agency, 2009. 33p.

HEUVELINK, A. E. et al. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3480-3487, 1998.

HUGHES, V. M.; DATTA, N. Conjugative plasmids in bacteria of the “preantibiotic” era. **Nature**, v. 302 p. 725–726, 1983.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES, IUCN. **Salmo salar. The IUCN Red List of Threatened**. United Kingdom, 1996. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/19855/0> (Acessado em: 30/09/2014).

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES, IUCN. **Thunnus thynnus. The IUCN Red List of Threatened Species.**, United Kingdom, 2011. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/21860/0> (Acessado em: 30/09/2014).

JIANG, H. et al. Prevalence and characteristics of b-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. **J. Antim. Chemother.**, v. 67, p. 2350–2353, 2012.

JIANG, X. et al. Detection of qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* isolated from cooked meat products in Henan, China. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 187, p.22-25, 2014.

KARCH, H. et al. The enemy within us: Lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. **EMBO Mol. Med**, v. 4, p. 841–848, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LEE, J.H. et al. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. **Nature Rev.**, v. 6, p. 753-758, 2009.

LIEBANA, E. et al. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum b-lactamases or AmpCb-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p.1030–1037, 2013.

LIVERMORE, D. Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 11–23, 2003.

MAREJKOVA, M. et al. An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011. **Folia Microbiol.**, v. 57, p. 85–89, 2012.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ed. Washington, APHA, 2001. p. 331-341.

MOLINA-AJA, A. et al. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penned shrimp. **FEMS Microbiol. Letters**, Amsterdam, v. 213, p. 7-12, 2002

MUSCOLINO, D. et al. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. **Italian J. Food Safety**, v. 3, n.1701, p. 134-136, 2014.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones contribute to emerge. **Int. J. Food Microbiol.**, Addlestone, v. 139, p. S3-S15, 2010.

NGUYEN, R. N. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n.1, p.597–603, 2006.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole; 2006.

OKEN, E. et al. Which Fish Should I Eat? Perspectives Influencing Fish Consumption Choices. **Environ. Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 790-798, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos de Origem Animal**, v. 2. São Paulo: Artmed; 2005.

RHODES, G. et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p. 3883–3890, 2000.

RIVAS, M., et al. Risk factors for sporadic Shiga toxin e producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, p. 763-771, 2008.

RYU, S.-H. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 152, p. 14-18, 2012a.

RYU, S-H. et al. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 159, p. 263–266, 2012b.

SANTOS, C. A. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 55, n. 4,: p. 219-228, 2013.



- SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. **Environ. Int.**, v. 34, p. 1215–1226, 2008.
- SERVIN A. A. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, n.18, p.264-292, 2005.
- SIKORSKI, Z.E. **Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación**. Zaragoza: Acribia, 1990.
- SILOCHI, R. H. Q.; TABAI, K. C.; ZAMBLAZI, R. C. Qualidade higiênico-sanitária da alimentação escolar no município de Francisco Beltrão – PR. **Revista Faz Ciência**, v. 7, n. 1, p. 151-169, 2005.
- SILVA, J. A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.3, p. 175-196, 2005.
- SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A.A. Qualidade e segurança do pescado, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SØRUM, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *In Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, ed F. M. Aarestrup (Washington, DC: ASM Press), p. 213–238, 2006.
- SOUFI, L. et al. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 144, p. 497-502, 2011.
- TADDEI, C. R.; MORENO, A. C. R.; FILHO, A. F.; MONTENOR, L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.227, n.2, p.249-253, 2003.
- TESSARI, E. N. C. et al. Prevalência de *Salmonella Enteritidis* em carcaça de frango industrialmente processados. **Higiene Alimentar**, v.17, n.107, p.52-55, 2003.
- TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CASE, L. C. **Microbiologia**. 10ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- TURUNEN, A. W. et al. Fish consumption in relation to other foods in the diet. **British J. Nutrition**, v. 106, p. 1570-1580, 2011.
- WHO. **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)**, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Int. J. Antim. Agents**, v.14, n. 4, p.327-335, 2000.

**Capítulo 2:****Ocorrência de *Escherichia coli* em sashimi e perfil antimicrobiano dos isolados****Occurrence of *Escherichia coli* in sashimi and antimicrobial profiles of the isolates**

Antenor Ferreira Leal Neto<sup>a</sup>, Luana Milen Varjão<sup>b</sup>, Isabela Maciel Melo<sup>b</sup>, Alaise Gil Guimarães<sup>a</sup>, Rogeria Comastri de Castro Almeida<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, Cep: 40.170-290, Salvador, BA, Brasil.

<sup>b</sup>Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia. Av. Araújo Pinho, n° 32, Canela, Cep: 40.110-160, Salvador, BA, Brasil.

\*Autor para correspondência: Rogeria C.C. Almeida (rogeriac@ufba.br).

Endereço: Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA - Brasil.

Telefone/fax: +5571-32837700

## ABSTRACT

Sashimi, a product of Japanese culinary made from raw seafood, usually salmon and tuna fish, is very popular in many countries around the world, including Brazil. The aim of the present study was to investigate the presence of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* in sashimi commercialized in restaurants in Salvador, Bahia, Brazil, and to evaluate the susceptibility of the isolates to antimicrobials. Sashimi samples (n = 127) were collected from 16 Japanese culinary restaurants and assessment of *E. coli* was carried out using EC broth and L-EMB agar, and confirmation by IMViC tests. The isolates were subjected to disk diffusion test to 14 antibiotics. *E. coli* was detected in 14.7% of sashimi samples, 19% in sashimi samples prepared with tuna and 11% in those prepared with salmon. No relationship between the type of fish used in the preparation of sashimi and presence of *E. coli* in the samples was observed. *E. coli* isolates were not EPEC, EIEC or EHEC strains. Regarding the susceptibility of isolates to antimicrobials, 66.6% and 62.5% were resistant to ampicillin and streptomycin, respectively. It was verified that 29.16% of the isolates presented multiple resistance to antimicrobials (MRA), index higher than 20%, characterizing them as multiresistant strains. Regarding the production of  $\beta$ -lactamases extended spectrum (ESBL), it is verified that 12% of the isolates were positive. The presence of multiresistant isolates and production of ESBL for some of them in the samples analyzed is a concern, indicating the need to monitor and intensify the control of the use of antimicrobials in veterinary's and human's therapy.

**Keywords:** Japanese culinary, fish, diarrheagenic strains, multiresistant

## RESUMO

*Sashimi*, produto da culinária japonesa elaborado com pescado cru, geralmente das espécies salmão e atum, é muito popular em vários países do mundo, inclusive no Brasil. Esse estudo teve como objetivo investigar a presença de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* em *sashimi* comercializados em restaurantes de Salvador, BA, Brasil, e avaliar a susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos. Amostras de *sashimi* (n = 127) foram coletadas em 16 restaurantes da culinária japonesa e a investigação de *E. coli* foi conduzida usando Caldo EC e ágar EMB -L, e confirmação pelos testes do IMViC. Os isolados foram submetidos ao teste de discodifusão a 14 antibióticos. *E. coli* foi detectada em 14,7% das amostras de *sashimi*, sendo que 19% em amostras de *sashimi* preparadas com atum e em 11% naquelas preparadas com salmão. Nenhuma relação foi encontrada entre o tipo de peixe usado na preparação do *sashimi* e a presença de *E. coli* nas amostras. Os isolados de *E. coli* não foram identificados como cepas do tipo EPEC, EIEC ou EHEC. Quanto à susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos, 66,6% e 62,5% foram resistentes a ampicilina e estreptomicina, respectivamente. Verificou-se que 29,16% dos isolados apresentaram Resistência Múltipla a Antimicrobianos (RMA), índice superior a 20%, caracterizando-se como cepas multirresistentes. Em relação à produção da enzima  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), foi verificado que 12% dos isolados foram positivos. A presença de isolados multirresistentes e produção de ESBL por alguns deles nas amostras analisadas é um dado preocupante, indicando a necessidade de monitorar e intensificar o controle do uso de antimicrobianos na terapia veterinária e humana.

**Palavras chaves:** Culinária japonesa, peixe, cepas diarreio gênicas, multirresistência

## 1. Introdução

Em diversas regiões do mundo, a carne de peixe contribui para uma alimentação saudável, visto que é considerada uma excelente fonte de proteína animal, além de possuir outros nutrientes essenciais. Isso é relevante principalmente em países em desenvolvimento, onde a população consome esse produto como principal fonte de proteína (FAO, 2006). Alguns especialistas relatam que a ingestão de peixes, ditos gordos, é uma importante fonte de ômega-3, ácidos graxos e nutrientes essenciais, como a vitamina D, na dieta (LEE et al., 2009; TURUNEN et al., 2011; OKEN et al., 2012).

No ano de 2014 a produção mundial oriunda das atividades de pesca e aquicultura atingiu cerca de 168 milhões de toneladas, de acordo com relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO). A China lidera a lista dos países maiores produtores de pescado, seguida da Indonésia, Estados Unidos da América e Rússia. Os principais grupos de pescado são as espécies de atuns, lagostas e camarões, com registro de recorde na pesca de atum, atingindo mais de 7 milhões de toneladas em 2014.

Ainda de acordo com o órgão, nos últimos 50 anos o consumo *per capita* anual de peixe no mundo aumentou bastante. Na década de 60, o consumo *per capita* de peixe anual era de 9,9 kg, em 2013 de 19,7 Kg e a estimativa para os anos de 2013 e 2014 era de que esse consumo anual chegasse a 20 Kg *per capita*. Entretanto, em países em desenvolvimento, o consumo *per capita* anual ficou um pouco abaixo da média mundial, atingindo 18,8 Kg em 2013, e em países desenvolvidos foi de 26,8 Kg no mesmo ano. Esse aumento significativo do consumo de peixe tem influenciado positivamente a dieta e a saúde das pessoas no mundo todo (FAO, 2016).

De acordo com levantamento do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), os brasileiros consomem em torno de 14,4 Kg de pescado *per capita*/ano, número que está acima da média mundial divulgada pela Organização Mundial de Saúde, 12,0 Kg (BRASIL, 2017). Associadas ao grande consumo de pescado por parte dos brasileiros estão a ascensão e popularização da culinária japonesa em restaurantes, em especial o consumo do *sushi* e *sashimi*, fato que pode ter contribuído para o aumento no consumo *per capita*/ano de pescado em todo o país.

O *sashimi* é um produto oriundo da culinária japonesa, elaborado com pescado cru, geralmente salmão e atum (HKSAR, 2000; MUSCOLINO, 2014). Esse produto, muito popular no Brasil e em vários outros países do mundo, pode representar

importante fonte de contaminação bacteriana para o homem devido às etapas envolvidas no preparo do peixe cru, seu armazenamento e distribuição. Entretanto, dados sobre a ocorrência de patógenos nesse produto são escassos na literatura (CORREIA e RONCADA, 2002; CARROL, 2009; SANTOS, 2013; MUSCOLINO, 2014).

De acordo com Amson et al. (2006), microrganismos presentes no organismo dos animais podem ser encontrados após o abate na carne crua e causar contaminação cruzada em outros produtos. Além disso, diversos microrganismos com potencial patogênico podem ser veiculados através de alimentos, e a presença desses patógenos está ligada intimamente a muitos fatores como a contaminação do *habitat* onde os peixes foram pescados ou criados, contaminação do ambiente de produção, falta de higiene na manipulação, processamento, armazenamento e venda desses produtos (SOARES e GONÇALVES, 2012).

*Escherichia coli* pode ser facilmente disseminada em diferentes ecossistemas através da cadeia alimentícia e água, e tem demonstrado trocar o seu material genético com outras espécies bacterianas e, é possível que este patógeno possa transferir genes de resistência a antimicrobianos às bactérias transitórias patogênicas que causam doenças em humanos (RYU et al., 2012a). Apresentam antígenos somáticos O, relacionados com os polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares (MENG et al., 2001).

Considerando que a bactéria é constituinte natural da microbiota intestinal de animais de sangue quente, inclusive seres humanos, sendo possível encontrá-la nas fezes de todos os indivíduos sadios (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005), o aparecimento da *E. coli* em alimentos tem que ser avaliado por dois fatores: o contato direto ou indireto do alimento com fezes de animais e/ou humanos (FORSYTHE, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005); e a patogenicidade do microrganismo ao ser humano e aos animais (SILVA e SILVA, 2005; KONEMAN et al., 2010).

A contaminação de alimentos prontos para o consumo por *E. coli* pode ter como origem o uso de matéria-prima contaminada ou condições insatisfatórias de higiene do ambiente de preparo dos alimentos. Além disso, durante o preparo pode ocorrer a contaminação cruzada, permitindo a proliferação bacteriana no alimento (JIANG et al., 2014).

Várias linhagens patogênicas da *E. coli* são conhecidas e normalmente são divididas de acordo com sinais clínicos que apresentam, além dos seus mecanismos de

patogenicidade (FORSYTHE, 2005). Dentre elas se destacam: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (SILVA e SILVA, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2010).

A elevada prevalência de resistência dos microrganismos patogênicos a antimicrobianos verificada atualmente em alguns estudos, possivelmente está relacionada ao uso indiscriminado e cada vez mais elevado de antimicrobianos com finalidade profilática e/ou promotora de crescimento na medicina veterinária e no tratamento de doenças na medicina humana (SOUFI et al., 2011; JIANG et al., 2014).

Poucos dados têm sido relatados sobre a caracterização da resistência aos antimicrobianos de *E. coli* isolada de alimentos marinhos, embora existam muitos estudos sobre esta resistência em *E. coli* proveniente de outros alimentos de origem animal e cepas de origem humana (RYU et al., 2012a).

As cefalosporinas de amplo espectro, principalmente as de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações, são listadas como antimicrobianos importantes para o tratamento de humanos e animais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização para a Saúde Animal, respectivamente (COLLIGNON et al., 2009; RAO et al., 2014). Geralmente, as infecções causadas por *E. coli* são tratadas com cefalosporinas, entretanto, nos últimos anos tem se observado resistência a esses agentes devido à produção de  $\beta$ -lactamases pela bactéria (RAO et al., 2014).

Considerando a importância epidemiológica da presença de *E. coli* em alimentos e o crescente aumento no consumo de pescado pelos brasileiros, esse trabalho teve como objetivo investigar a presença de cepas diarreiogênicas de *E. coli* em *sashimi*, avaliar a susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos comumente usados no tratamento da infecção em humanos e verificar a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido pelos isolados.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Investigação da ocorrência de *Escherichia coli* em *sashimi*.

*Amostragem e procedimentos laboratoriais:* Um total de 127 amostras de *sashimi*, sendo 80 amostras de *sashimi* preparados com salmão e 47 amostras de *sashimi* preparados com atum, foi coletado em 16 restaurantes especializados na

culinária japonesa (taxa de adesão = 30%), localizados na cidade de Salvador, BA, Brazil, no período de junho a outubro de 2016. Cada amostra consistiu de 100 g de *sashimi*, compreendendo de cinco ou seis fatias de filé de peixe cru, salmão ou atum, obtidas por filetagem pelos manipuladores de alimentos de cada estabelecimento, tradicionalmente chamados de “*sushiman*”. A colheita das amostras foi realizada em visitas distintas, totalizando 10 amostras em nove restaurantes, sete em um restaurante e cinco em seis restaurantes. A diferença entre o número de amostras de salmão e atum investigadas foi devida à disponibilidade da matéria prima nos estabelecimentos no momento da aquisição.

Para detecção de *E. coli*, aproximadamente 25 g do alimento foram adicionados a 225 mL de solução tampão fosfato e homogeneizados usando um *Stomacher* (240 bpm; Bagmixer® 400, São Paulo, SP, Brasil) por 2 min. Em seguida, em cabine de fluxo laminar, Classe II (Labconco Corporation, Labconco Purifier Class IIb, Total Exhaust, model 36210-04, certified ISO 9002, Kansas City, MO, USA) 1 mL do homogeneizado foi inoculado em tubos contendo 9 mL de caldo EC (Acumedia, São Paulo, SP, Brasil) e incubado em banho-maria a 44,5°C por 24h. Alíquotas de cada tubo apresentando turbidez e produção de gás foram estriadas em placas de Petri contendo Agar Eosina-Azul de Metileno de Levine (L-EMB, Acumedia, São Paulo, SP, Brasil) e incubadas em estufa a 35°C ± 2°C por 24 h (adaptado de JEFFREY et al., 2001).

Para identificação de *E. coli*, pelo menos duas colônias típicas (com centro escuro e brilho metálico) foram selecionadas do L-EMB e os isolados foram confirmados através dos testes morfotinturiais pelo Gram e pelas reações bioquímicas do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato), sendo utilizada como referência a cepa *E. coli* ATCC 25822 (adaptado de RYU et al., 2012a).

## 2.2. Identificação dos sorogrupos dos isolados de *Escherichia coli*

Os isolados confirmados como *E. coli* foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina, inicialmente com os antissoros polivalentes A, B e C (*E. coli* enteropatogênica), polivalentes A e B (*E. coli* enteroinvasiva) e polivalente O157 (*E. coli* enterohemorrágica). Os isolados que demonstraram aglutinação nessa primeira etapa foram submetidos aos testes com soros monovalentes para os sorotipos *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), seguindo as instruções do fabricante (Probac do Brasil®, São Paulo, SP, Brasil).



### 2.3. Susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* aos antimicrobianos

Os isolados identificados como *E. coli* foram submetidos ao teste de susceptibilidade a 14 antibióticos (Laborclin, São Paulo, SP, Brasil) através da técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton (BAUER et al., 1966), de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).

Os antibióticos utilizados foram: amicacina (AMI) 30 µg, amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) 20/10 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, cefoxitina (CFO) 30 µg, ceftadizima (CAZ) 30 µg, cefotaxime (CTX) 30 µg, cefalotina (CFL) 30 µg, cloranfenicol (CLO) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, ácido nalidíxico (NAL) 30 µg, estreptomicina (EST) 10 µg, tetraciclina (TET) 30 µg, e trimetoprim/sulfametazol (SUT) 1.35/23.75 µg. Os isolados foram classificados como susceptíveis, intermediários ou resistentes de acordo com os padrões de interpretação do diâmetro da zona de inibição (CLSI, 2013). Para cada isolado de *E. coli* foi calculado o Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA), ou seja, o número de antimicrobianos para o qual o teste demonstrou resistência dividido pelo número total de antimicrobianos para o qual o organismo teste foi avaliado para susceptibilidade (KRUMPERMAN, 1983).

### 2.4. Produção de $\beta$ -lactamases de espectro estendido pelos isolados

Para investigar a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), os isolados foram submetidos ao teste de sinergismo de dupla difusão (SANDERS e SANDERS, 1979; JARLIER et al., 1988; DRIEUX et al., 2008), seguindo critérios do CLSI (CLSI, 2013). Os antibióticos utilizados foram: amoxicilina + ácido clavulânico (AMC) 20/10 µg, aztreonam (ATM) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg, e ceftriaxona (CRO) 30 µg.

### 2.5. Análise dos dados

Os resultados obtidos na ocorrência de *E. coli* nas amostras foram tabulados e analisados por meio de análise descritiva e testes de associação qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), considerando-se um nível de confiança de 0,95 (SPSS 17.0 for Windows) para verificar a existência de correlação entre o tipo de peixe utilizado para produção do *sashimi* e a presença da bactéria.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Ocorrência de *Escherichia coli* em *sashimi*

*Escherichia coli* é amplamente utilizada como indicador de condição higiênicossanitária de alimentos e ambientes, visto que a sua origem é exclusivamente fecal (CARSON et al., 2001). Embora, seja menos observada na contaminação de pescado, visto que não faz parte do grupo de microrganismos patogênicos constituintes da microbiota natural desses animais, *E. coli* está diretamente ligada a práticas higiênicas deficientes na preparação e no armazenamento do *sashimi* (MIGUÉIS, 2016). Ainda, segundo Lateef et al. (2004), a presença do patógeno em peixes frescos pode estar associada à contaminação recente por manipuladores infectados pelo microrganismo ou por gelo contaminado. A presença de *E. coli* no alimento como indicador de higiene é bastante útil, visto que é possível vislumbrar se as boas práticas de higiene e fabricação estão implementadas, bem como alertar para a possível presença de microrganismos patogênicos nos alimentos (MIGUÉIS, 2015).

No presente estudo, entre as 127 amostras investigadas, 80 foram provenientes de *sashimi* preparados com salmão e 47 de *sashimi* preparados com atum. *E. coli* foi detectada em 18 (14,17%) amostras de *sashimi*, sendo que 9 (19,14%) em amostras de *sashimi* preparados com atum e 9 (11,25%) em amostras de *sashimi* preparados com salmão (Tabela 1). A frequência de detecção de *E. coli* no alimento foi menos expressiva do que aquela relatada em estudo conduzido na Índia por Kumar et al. (2005), que analisou peixes frescos, e encontrou 38% das amostras contaminadas. Entretanto, em estudo realizado na Coreia do Sul, também com pescado, a ocorrência da bactéria foi menos expressiva, ou seja, apenas 7,6% das amostras de peixe estavam contaminadas (RYU et al., 2012a). Já estudo conduzido em Portugal, a partir da investigação de amostras de *sashimi* em 23 restaurantes especializados na culinária japonesa, demonstrou que nenhuma amostra estava contaminada com *E. coli* (MIGUÉIS et al., 2015).

#### 3.2. Identificação sorológica dos isolados de *Escherichia coli*

Um total de 24 isolados de *E. coli* foram recuperados das amostras de *sashimi*, porém, nenhum deles demonstrou resultado positivo para aglutinação a partir dos soros.

**Tabela 1** Ocorrência de *Escherichia coli* em *sashimi* comercializados em Salvador, BA, Brazil.

Restaurantes	<i>Sashimi</i> de salmão		<i>Sashimi</i> de atum		Total	
	Número de amostras	Amostras Positivas	Número de amostras	Amostras Positivas	Número de amostras	Amostras Positivas
	(n)	n (%)	(n)	n (%)	(n)	n (%)
1	5	0 (0,0)	5	1 (20,0)	10	1 (10,0)
2	5	1 (20,0)	0	0 (0,0)	5	1 (20,0)
3	5	0 (0,0)	0	0 (0,0)	5	0 (0,0)
4	5	0 (0,0)	0	0 (0,0)	5	0 (0,0)
5	5	0 (0,0)	5	0 (0,0)	10	0 (0,0)
6	5	1 (20,0)	0	0 (0,0)	5	1 (20,0)
7	5	1 (20,0)	0	0 (0,0)	5	1 (20,0)
8	5	0 (0,0)	5	1 (20,0)	10	1 (10,0)
9	5	1 (20,0)	5	0 (0,0)	10	1 (10,0)
10	5	0 (0,0)	0	0 (0,0)	5	0 (0,0)
11	5	0 (0,0)	5	0 (0,0)	10	0 (0,0)
12	5	1 (20,0)	5	2 (40,0)	10	3 (30,0)
13	5	1 (20,0)	5	1 (20,0)	10	2 (20,0)
14	5	2 (40,0)	5	2 (40,0)	10	4 (40,0)
15	5	1 (20,0)	2	2 (40,0)	7	3 (42,9)
16	5	0 (0,0)	5	0 (0,0)	10	0 (0,0)
<b>TOTAL</b>	<b>80</b>	<b>9 (11,25)</b>	<b>47</b>	<b>9 (19,14)</b>	<b>127</b>	<b>18 (14,17)</b>

As cepas isoladas foram consideradas não patogênicas para os sorogrupos EPEC, EHEC e EIEC. Os resultados desse estudo, indicando a ausência de cepas diarreio gênicas do tipo EPEC, EIEC e EHEC no *sashimi*, diferem dos relatados por Kumar et al. (2001), que demonstraram que o pescado e o gado são reservatórios dessas cepas patogênicas de *E. coli*.

Levando-se em conta que o *sashimi* se consiste em um produto pronto para consumo e é consumido cru, devem ser consideradas as contaminações provenientes da matéria-prima e da contaminação cruzada, no intuito de controlar adequadamente as etapas de produção e manipulação do produto. Ferramentas como as Boas Práticas de

Fabricação (BPF) e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são fundamentais para o controle eficaz na produção do alimento seguro (MIGUÉIS, 2015).

### 3.3. Susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* aos antimicrobianos

A tabela 2 mostra o perfil de resistência/susceptibilidade dos isolados de *E. coli* (n=24) a 14 agentes antimicrobianos.

Os antimicrobianos que apresentaram maior índice de resistência foram: ampicilina (AMP) em 66,6% (16 dos isolados) e estreptomicina (EST) em 62,5% (15) dos isolados. A resistência intermediária a esses mesmos antimicrobianos foi verificada em 16,66% (4) e em 29,16% (7) dos isolados, respectivamente. Trimetoprim/sulfametazol (SUT), cefalotina (CFL) e tetraciclina (TET) apresentaram índices de resistência em 25% (6), 20,83% (5) e 20,83% (5) dos isolados, respectivamente. Não foi observado nenhum isolado resistente aos agentes antimicrobianos ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX), cloranfenicol (CLO), ciprofloxacina (CIP) e ácido nalidíxico (NAL).

Com relação à susceptibilidade/resistência de várias cepas do microrganismo aos antimicrobianos, verifica-se altos índices apresentando resistência ao antimicrobiano ampicilina, e alta susceptibilidade aos antimicrobianos ciprofloxacina, ácido nalidíxico e cefotaxima (JIANG et al, 2012), corroborando com os resultados aqui relatados.

A susceptibilidade dos isolados às cefalosporinas de 3ª geração, ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX), vem comprovar que a terapêutica atualmente utilizada em humanos está correta, apesar desses agentes serem mais sensíveis à hidrólise pelas  $\beta$ -lactamases (RAO et al., 2014).

Geralmente, altas taxas de resistência antimicrobiana estão associadas ao extenso contato com resíduos de antimicrobianos oriundos da terapêutica humana e/ou da utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal, principalmente na aquicultura (SOUFI et al., 2011; JIANG et al., 2012).

**Tabela 2** Susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* oriundos de amostras de *sashimi*, de salmão ou atum, aos antimicrobianos.

Antimicrobianos	Resistente	Intermediário	Susceptível
	N (%)	N (%)	N (%)
Amicacina (AMI)	1 (4,16)	0 (0,0)	23 (95,83)
Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC)	1 (4,16)	3 (12,5)	20 (83,33)
Ampicilina (AMP)	16 (66,6)	4 (16,66)	4 (16,66)
Cefoxitina (CFO)	2 (8,33)	0 (0,0)	22 (91,16)
Ceftazidima (CAZ)	0 (0,0)	0 (0,0)	24 (100,0)
Cefotaxima (CTX)	0 (0,0)	2 (8,33)	22 (91,16)
Cefalotina (CFL)	5 (20,83)	0 (0,0)	19 (79,16)
Cloranfenicol (CLO)	0 (0,0)	0 (0,0)	24 (100,0)
Ciprofloxacina (CIP)	0 (0,0)	0 (0,0)	24 (100,0)
Gentamicina (GEN)	1 (4,16)	0 (0,0)	23 (95,83)
Ácido nalidíxico (NAL)	0 (0,0)	1 (4,16)	23 (95,83)
Estreptomicina (EST)	15 (62,5)	7 (29,16)	2 (8,33)
Tetraciclina (TET)	5 (20,83)	0 (0,0)	19 (79,16)
Trimetoprim/sulfametazol (SUT)	6 (25,0)	5 (20,83)	13 (54,16)

N = número de isolados

O Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) (Tabela 3) dos isolados resistentes aos antimicrobianos, variou de 0 a 0,428. Verificou-se que sete isolados (29,16%) apresentaram valores acima de 0,2, caracterizando-se como multirresistentes ao antimicrobianos testados (KRUMPERMAN, 1983).

É bastante amplo o rol de antimicrobianos que é utilizado na aquicultura, incluindo as tetraciclina, anfenicóis, sulfonamidas, aminopenicilinas, macrolídeos e aminoglicosídeos. Historicamente, anfenicóis, tetraciclina e sulfonamidas têm sido utilizados como promotores de crescimento na alimentação para peixes (HEUER, 2009).

Talvez por isso, todos os isolados multirresistentes (IRMA > 0,2) identificados nesse estudo foram oriundos das amostras de salmão, visto que essas espécies são obtidas da produção (aquicultura) e não da pesca extrativa como espécies de atum, em

alto mar, sendo mais expostas aos agentes antimicrobianos e aos reflexos da pressão seletiva de resistência que causam.

**Tabela 3** Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) dos isolados de *E. coli* oriundos de *sashimi*, comercializados na cidade de Salvador, BA, Brazil.

Isolados resistentes	Nº de antimicrobianos	IRMA	Tipo de <i>sashimi</i>	Multirresistência
A02	1	0,071	Salmão	Negativo
A09	1	0,071	Atum	Negativo
<b>A53a</b>	<b>6</b>	<b>0,428</b>	<b>Salmão</b>	Positivo
<b>A53b</b>	<b>5</b>	<b>0,357</b>	<b>Salmão</b>	Positivo
<b>A53c</b>	<b>4</b>	<b>0,285</b>	<b>Salmão</b>	Positivo
<b>A70</b>	<b>6</b>	<b>0,428</b>	<b>Salmão</b>	Positivo
A75	2	0,142	Atum	Negativo
A83	1	0,071	Atum	Negativo
A87a	2	0,142	Atum	Negativo
A87b	1	0,071	Atum	Negativo
A93	1	0,071	Atum	Negativo
<b>A94</b>	<b>3</b>	<b>0,214</b>	<b>Salmão</b>	Positivo
A96a	2	0,142	Atum	Negativo
A96b	1	0,071	Atum	Negativo
A106a	2	0,142	Atum	Negativo
A106b	1	0,071	Atum	Negativo
<b>A108</b>	<b>3</b>	<b>0,214</b>	<b>Salmão</b>	Positivo
A110	2	0,142	Salmão	Negativo
A115	2	0,142	Atum	Negativo
<b>A116</b>	<b>4</b>	<b>0,285</b>	<b>Salmão</b>	Positivo

#### 3.4. Produção de $\beta$ -lactamases de espectro estendido pelos isolados de *Escherichia coli*

Entre os membros da família Enterobacteriaceae, a disseminação de cepas capazes de produzir  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) vem apresentando interesse urgente de ordem mundial, visto que há grande incidência

dessas bactérias em diversas implicações relacionadas à saúde (SILVA e LINCOPAN, 2012).

No presente estudo, atendendo aos critérios do CLSI (CLSI, 2013) para a detecção de cepas de *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), verificou-se que três (12,5%) entre os 24 isolados da bactéria nas amostras apresentaram resultado positivo. Esses três isolados foram oriundos de duas amostras de *sashimi de salmão*.

Observa-se que as taxas de prevalência de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL são bastante distintas no mundo todo. Na Europa, essa prevalência corresponde a 11% das cepas, nos EUA a 3,3%, no Canadá, 4%, e na América Latina, como um todo, 8,5%. Especificamente no Brasil, cerca de 9% das cepas de *E. coli* são produtoras de ESBL (WINOKUR, 2001).

Estudos realizados por Boonyasiri et al. (2014) e Brahmi et al. (2014) com *E. coli* isoladas de amostras de peixes, relatam percentuais inferiores aos observados nesse estudo, ou seja, 7,3% das cepas foram positivas para a produção de  $\beta$ -lactamases. Entretanto, Jiang et al. (2012) e Nguyen et al. (2016), com estudos pesquisando o mesmo tipo de amostras de peixe, encontraram índices superiores de cepas de *E. coli* produtoras da enzima aos encontrados no presente estudo, com 17% identificadas como produtoras de  $\beta$ -lactamases e 29,3% identificadas como produtoras de  $\beta$ -lactamases, respectivamente.

O surgimento desse tipo de mecanismo de resistência antimicrobiana é justificado pelas práticas atuais de utilização de antibióticos na produção animal, principalmente na aquicultura (NGUYEN et al., 2016). A adição de agentes antimicrobianos na ração, como promotores de crescimento é uma das principais causas de surgimento de resistência antimicrobiana em patógenos, tais como *E. coli*.

#### **4. Conclusão**

Apesar dos resultados do presente estudo demonstrarem que os isolados de *E. coli* das amostras de *sashimi* não apresentarem reação positiva para a presença das cepas diarreiogênicas EPEC, EIEC e EHEC, alguns isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos comumente empregados no controle da infecção. A presença da *E. coli* por si só já demonstra o não atendimento às Boas práticas de Fabricação (BPF) no preparo do alimento nos restaurantes. Como agravante, verificou-se a presença de

isolados multirresistentes a alguns dos antibióticos e a produção de ESBL, o que se traduz em preocupação, necessitando alertar os profissionais de saúde pública e os profissionais da área de produção de pescado para o monitoramento constante na utilização de antimicrobianos na terapêutica veterinária, principalmente na aquicultura, para o controle da disseminação do microrganismo e dos seus genes de resistência.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, Ary, Luiz e Ayze da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, e à Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia pelo fornecimento da Bolsa de Estudos.

### **Conflito de interesse**

Todos os autores declaram que não existe conflito de interesse, incluindo suporte financeiro ou outra relação com outras pessoas ou organizações, no período de três anos do início dessa submissão, que possa inapropriadamente influenciar ou ter qualquer influência nesse trabalho.

### **Submissão e verificação**

Nós declaramos que esse trabalho não foi publicado anteriormente (exceto em forma de resumo, ou como parte de uma palestra, ou como dissertação) e que não está sob avaliação em nenhum lugar. Esse manuscrito foi aprovado por todos os autores, e se aceito não será publicado em nenhum outro veículo na língua inglesa ou em outra língua, incluindo eletronicamente, sem o consentimento do Editor.

### **Financiamento**

Essa pesquisa não recebeu nenhum tipo de financiamento de agências públicas, comerciais ou de outros setores.

### **Referências**

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*, 30, 1139-1145, 2006.



BAUER, A. W. et al. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496, 1996.

BOOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327–335, 2000.

BOONYASIRI, A. et al. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. *Pathogens and Global Health*, v. 108, 235-245, 2014.

BRAHMI, S. et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clinical Microbiology Infection*, v. 21, 18-20, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 2016. Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>

BRASIL. Portal Brasil. Produção de peixes no Brasil cresce com apoio de pesquisas da Embrapa. *Economia e Emprego*, 2017 Disponível em:

<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa>. (Acessado 10/02/2017)

CARROL, W.F. 2009. Sushi; Globalization through food culture; towards study of global food networks. *Education Research*, 2, 451-456, 2009.

CARSON, C. A. et al. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1503–1507, 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 33, 2013.

COLLIGNON, P. et al. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 132–141, 2009.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. *Revista Saúde Pública*, 31, 296-301, 2002.

DRIEUX L. et al. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*, 14 (Suppl 1):90-103, 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio, 2006.

<http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf> (Acessado 15/10/2016)

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf> (Acessado em 04/01/2017)

HKSAR. Food and Environmental Hygiene Department. Risk assessment studies report No. 2. Microbiological hazards evaluation. Sushi and sashimi in Hong Kong, 2000. Disponível em:

[http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_haccp/files/ss\\_ras2\\_eng.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_haccp/files/ss_ras2_eng.pdf)

HEUER, O. E. et al. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1248–1253, 2009.

GHADERPOUR, A. et al. Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-13, 2015.

JARLIER, V. et al. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactamases agentes in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review Infections Diseases*, v. 10, p. 867-878, 1988.

JEFFREY, L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2001.

JIANG, H. X. et al. Prevalence and characteristics of  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 10, 2350-2353, 2012.

- JIANG, X. et al. Detection of qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* isolated from cooked meat products in Henan, China. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 22-25, 2014.
- KUMAR, H.S. et al. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 334-338, 2001.
- KUMAR, H.S. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 619-623, 2005.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 165-170, 1983.
- LATEEF, A. et al. The microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Ogbomoso Metropolis, Southwest, Nigeria. *Internet Journal of Food Safety*, 8, 39-43, 2004.
- LEE, J.H. et al. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nature Reviews*, 6, 753-758, 2009.
- MIGUÉIS, S. et al. Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, 47, 32-36, 2015.
- MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, F. P.; Ito, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington, APHA, 331-341, 2001.
- MIGUÉIS, S. et al. Influence of season and type of restaurants on sashimi microbiota. *The European Journal of Public Health*, 26, 877-881, 2016.
- MÜLLER, A.; STEPHAN, R.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, 541, 667-672, 2016.
- MUSCOLINO, D. et al. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 3, 134-136, 2014.

- NGUYEN, D. P. et al. Dissemination of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. *BioMed Research International*, v. 2016, 1-9, 2016.
- OKEN, E. et al. Which Fish Should I Eat? Perspectives Influencing Fish Consumption Choices. *Environmental Health Perspectives*, 120, 790-798, 2012.
- RAO, L. et al. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin- resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. *Veterinary Microbiology*, 172, 534–541, 2014.
- RYU, S. H. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 14-18, 2012 a.
- RYU, S. H. et al. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 263-266, 2012 b.
- SANDERS, C.C.; SANDERS JR, W.E. Emergence of resistance to cefamandole: possible role of ceftioxin inducible beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 15, p.792-797, 1979.
- SANTOS, C. A. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 55, 219-228, 2013.
- SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab*, 48, 91-99, 2012.
- SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71, 1-10, 2012.
- SOUFI, L. et al. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 497-502, 2011.
- TURUNEN, A. W. et al. Fish consumption in relation to other foods in the diet. *British Journal of Nutrition*, 106, 1570-1580, 2011.

WINOKUR, P. L. et al. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum B-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis*, v. 32, suppl. 2, p. 94-103, 2001.