

ORIGINAL ARTICLE

Ocorrência de bactérias patogênicas e deteriorantes em sashimi de salmão: avaliação de histamina e de susceptibilidade a antimicrobianos

Occurrence of pathogenic and spoilage bacteria in salmon sashimi: histamine and antimicrobial susceptibility evaluation

Karina Silva Cordeiro^{1*} , Lygia Silva Galeno¹, Cáritas de Jesus Silva Mendonça², Isabel Azevedo Carvalho¹, Francisca Neide Costa¹

¹Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Departamento de Patologia, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, São Luís/MA - Brasil

²Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Mestrado Profissional Energia e Ambiente, São Luís/MA - Brasil

*Corresponding Author: Karina Silva Cordeiro, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, Cidade Universitária Paulo VI, s/n, Tirirical, CEP: 65055-310, São Luís/MA - Brasil, e-mail: cordeiro.k@outlook.com

Cite as: Cordeiro, K. S., Galeno, L. S., Mendonça, C. J. S., Carvalho, I. A., & Costa, F. N. (2020). Occurrence of pathogenic and spoilage bacteria in salmon sashimi: histamine and antimicrobial susceptibility evaluation. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23, e2019085. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08519>

Resumo

O estudo das condições higiênicas sanitárias de alimentos cárneos consumidos crus, como o sashimi, é necessário para definir sua qualidade e possíveis consequências para a saúde humana. Foram coletadas 60 amostras de sashimi de salmão (*Salmo salar*), de dez restaurantes na cidade de São Luís, Maranhão - Brasil, sendo seis de cada local. As amostras foram analisadas para contagem de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, identificação da presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* e *Aeromonas* spp, teste de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados e quantificação de histamina nas amostras. Os resultados mostraram elevadas contagens de coliformes a 35 °C e 12 amostras com >10² NMP/g de coliformes a 45 °C, presença de *E. coli* e de *Salmonella* sp. em 3 amostras cada, ausência de *V. parahaemolyticus* e *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa entre <20 e 5,0x10⁴ UFC/g, presença de *Aeromonas* spp. em 95% das amostras, sendo 60 isolados *A. hydrophila* e 6 *A. caviae*. Para susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados de *E. coli* foram sensíveis a CPM, CTX, LVX, PPT e SUT, dois resistentes a AMP; um resistente a GEN, um a AMI e um a AMC. Os isolados de *Salmonella* foram sensíveis a AMC, CPM, CFO, CRX, GEN, LVX e PPT, um resistente a AMI e um a AMP e SUT. Os isolados de *Aeromonas* foram resistentes em média a cinco dos antimicrobianos, sendo a AMP (97%), a CRX (90,9%) e a AMC (77,3%), e 81,8% foram sensíveis ao CPM. Os níveis de histamina variaram de 44,06 ± 0,74 a 505,46 ± 8,83 mg/kg, sendo 21 das amostras com níveis superiores a 100 mg/kg. As amostras apresentaram condições higiênicas sanitárias insatisfatórias e riscos para a saúde pública, por identificação de bactérias patogênicas e elevadas concentrações de histamina capazes de causar intoxicação escombroide, e ainda, isolados com multirresistência aos antimicrobianos testados.

Palavras-chave: Peixe cru; Microrganismo; Escombrotoxina; Segurança alimentar; Histamina; *Salmonella*; *Vibrio*; *Staphylococcus*.



Este é um artigo publicado em acesso aberto (*Open Access*) sob a licença *Creative Commons Attribution*, que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições desde que o trabalho original seja corretamente citado.

Abstract

The study of the hygienic sanitary conditions of raw consumed meat foods, such the sashimi, is necessary to define their quality and possible health consequences for the population. Sixty samples of salmon sashimi (*Salmo salar*) were collected from ten restaurants in the city of São Luís, Maranhão, Brazil, six from each site. The samples were analyzed for coliform counts at 35 °C, coliforms at 45 °C and positive and negative coagulase *Staphylococcus*, presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas* spp, antimicrobial susceptibility test of the isolates and quantification of histamine in the samples. The results showed high counts of coliforms at 35 °C and 12 samples with $>10^2$ NMP/g of coliforms at 45 °C, presence of *E. coli* and *Salmonella* in 3 samples each, absence of *V. parahaemolyticus* and coagulase positive *Staphylococcus* and coagulase negative *Staphylococcus* count between <20 and 5.0×10^4 CFU/g, presence of *Aeromonas* in 95% of the samples, 60 isolates being *A. hydrophila* and 6 *A. caviae*. For susceptibility to antimicrobials, *E. coli* isolates were sensitive to CPM, CTX, LVX, PPT and SUT, two isolates were resistant to AMP; one resistant to GEN, one to AMI and one to AMC. *Salmonella* isolates were sensitive to AMC, CPM, CFO, CRX, GEN, LVX and PPT, one resistant to AMI and one to AMP and SUT. The isolates of *Aeromonas* were resistant on mean to five of the antimicrobials, with AMP (97%), CRX (90.9%) and AMC (77.3%), and 81.8% were sensitive to CPM. Histamine levels ranged from 44.06 ± 0.74 to 505.46 ± 8.83 mg/kg, 21 of the samples with levels higher than 100 mg/kg. The samples presented unsatisfactory sanitary hygiene conditions and public health risks, due to the detection of pathogenic bacteria and high concentrations of histamine capable of causing scombroid poisoning, and isolates show multiresistance to the tested antimicrobials.

Keywords: Raw fish; Microorganism; Scombrototoxin; Food safety; Histamine; *Salmonella*; *Vibrio*; *Staphylococcus*.

1 Introdução

Os peixes são alimentos de alto valor nutricional e são base de preparações como o sashimi, no qual o consumo é em forma de filés do pescado cru. Cerca 151 milhões de toneladas (t) de peixe foram utilizados para consumo humano em 2016, sendo o salmão um dos produtos mais populares no mercado mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018). O consumo de preparações da culinária japonesa apresentou um incremento mundial na demanda por peixe fresco (Centre for the Promotion of Imports, 2016). No Brasil, esse aumento tem sido evidenciado pelo crescente número de restaurantes e lojas especializadas (Alves et al., 2017).

A microbiota dos peixes pode refletir o seu habitat e representa a contaminação inicial do alimento, como as Enterobacteriaceae que refletem a poluição do ambiente aquático por efluentes (World Health Organization, 2012). Além de fatores relacionados: temperatura, alimentação animal e salinidade da água (Ghanbari et al., 2015) que, associados às incorretas condições de armazenamento e manipulação podem resultar na degradação da musculatura do peixe por ação enzimática e multiplicação microbiana, afetando a qualidade sanitária do alimento e segurança alimentar (Cai et al., 2015).

A criteriosa observação do fluxo de preparo de alimentos pode certificar a segurança deste. A falta de boas práticas de higiene pode resultar na contaminação por patógenos (Prado et al., 2014). Preparações como sashimi, são servidas após intensa manipulação e, portanto, sujeitas à contaminantes na ausência de procedimentos de boas práticas. A qualidade dos alimentos está associada a índices de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), um problema de saúde pública com elevada ocorrência mundial, sendo igualmente necessária a vigilância em relação a patógenos emergentes (Chau et al., 2017).

No processo de deterioração bacteriana de alimentos com elevados níveis de amins biogênicas – onde se inclui o pescado, produtos lácteos, carnes e produtos fermentados – quando degradados podem produzir substâncias tóxicas aos humanos. Como exemplo, temos a histamina, uma amina biogênica não volátil, resultante da descarboxilação enzimática da histidina, resistente ao tratamento térmico e detectável em níveis baixos no pescado recém - capturado (Shalaby, 1996; Food and Drug Administration, 2011). A intoxicação

por histamina, também denominada escombrotóxina pode resultar do desenvolvimento de Enterobacteriaceae no pescado (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012).

Os sintomas da intoxicação escombróide são dependentes da quantidade de histamina ingerida, sensibilidade individual e capacidade de desintoxicação do organismo, e ocorrem logo após o consumo (até 2h). Envolvem alterações no sistema cardiovascular, queimação na boca e garganta, dificuldade de deglutição, urticária, rubor, cefaléia, secreção nasal, broncoespasmo, taquicardia, edema, náusea, vômito e diarreia (Lohiya et al., 2015; Comas-Basté et al., 2009).

O pescado pode veicular contaminantes patogênicos e tóxicos durante a cadeia produtiva. Métodos aplicados ao controle microbiano na aquicultura, como o uso de antimicrobianos, podem resultar em multirresistência bacteriana; assim, discussões e medidas de controle para mitigar o problema são necessárias (Topp et al., 2018). Os antimicrobianos afetam os humanos e o ambiente, e devem seguir orientações específicas, bem como incluir-se testes de eficácia e sistemas de vigilância (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016; Manyi-Loh et al., 2018).

A contaminação bacteriana de peixes, resistência a antimicrobianos e produção de histamina podem ser atribuídas a falhas na cadeia produtiva e/ou no armazenamento dos alimentos. Os objetivos deste estudo incluíram a investigação da qualidade microbiológica, com detecção e enumeração de micro-organismos, do filé de salmão na preparação de sashimi, produzido e coletado no mercado de varejo brasileiro, na cidade de São Luís – Maranhão, bem como a avaliação da resistência bacteriana a antimicrobianos dos microrganismos isolados e avaliação do alimento em estudo, como veículo de histamina.

2 Material e métodos

2.1 Amostras de sashimi de salmão

Um total de 60 amostras de sashimi (*Salmo salar*) foi obtido de dez restaurantes ou lojas de culinária japonesa, sendo seis amostras por local, uma a cada mês, durante seis meses, na cidade de São Luís, MA - Brasil. Todas as amostras foram adquiridas e acondicionadas na embalagem individual descartável de cada estabelecimento, colocada em caixa isotérmica com gelo reciclável e levadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão. Cada amostra foi pesada e separada para a realização de todas as análises, somente as porções das amostras para análise de histamina foram armazenadas sob congelamento para realização posterior, de acordo com a sequência abaixo.

2.2 Análises microbiológicas

A realização das análises microbiológicas seguiu o método da *American Public Health Association* (APHA) (Vanderzant & Splitts-Toesser, 1992). Para coliformes a 35 °C e 45 °C a cada amostra previamente homogeneizada foi adicionada à água peptonada (Kasvi®, Brasil) e preparadas diluições decimais. De cada diluição foi transferida alíquota para o caldo Lauril Sulfato Triptose - LST (Merck®, Alemanha) e incubados a 35 °C por 48 h. Para a identificação de *E. coli*, as culturas positivas do caldo LST foram transferidas para o caldo EC (*E. coli*) (Himedia®, USA). Seguindo semeadura em ágar Eosina Azul de Metileno (Kasvi®, Brasil) a 35 °C por 24 h. Colônias típicas foram submetidas a coloração de Gram (Synth, Brasil) seguindo a confirmação bioquímica, com testes INViC: indol (I), Vermelho de metila (MV), Voges-Proskauer (VP) e do citrato (C).

Para *Salmonella* sp., a amostra homogeneizada foi diluída em água peptonada e incubada a 35 °C por 24 h, a partir do crescimento nos caldos de enriquecimento foram realizadas semeadura em meio ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Acumedia®, Neogen®, Brasil) e ágar Hektoen (Merck®, Alemanha),

submetidos a 37 °C por 24 h; colônias típicas seguiram a identificação bioquímica, em ágar *Triplíce Sugar Iron* (TSI) e *Lysine Iron Agar* (LIA) (Isosfar) e teste sorológico polivalente anti-salmonela somático e flagelar (Probac do Brasil).

Para *Aeromonas* spp., a amostra homogeneizada foi diluída em caldo Trypticase Soja (TSB), alíquotas foram transferidas para o ágar Vermelho de Fenol amido-ampicilina (Himedia®, USA) (Palumbo et al., 1985), ágar Dextrina Ampicilina (Merck®, Alemanha) (Havelaar & Vonk, 1988), incubados a 28 °C por 24 h. Colônias típicas foram semeadas em ágar Trypticase Soy Agar (TSA), submetidas a coloração de Gram e repicadas em ágar TSI. As culturas positivas foram submetidas à prova de oxidase e catalase. Seguiram testes de acordo com a chave de identificação Aerokey II, testes de fermentação, produção de gás, motilidade, produção de indol, teste ácido de arabinose, manitol, ornitina, H₂S, lisina e sacarose, reação de Voges-Proskauer (Carnahan et al., 1991).

Para *Staphylococcus*, foram feitas diluições decimais da amostra em água peptonada e alíquotas semeadas em ágar Baird-Parker (Merck®, Alemanha) e submetidos a 35 °C por 48 h, colônias típicas foram contadas e seguiram os testes de catalase, coloração de Gram e coagulase (Probac, Brasil). Para *Vibrio parahaemolyticus*, a amostra homogeneizada foi diluída em água peptonada salina – NaCl 3% e diluições seriadas até 10⁻⁴, submetidos a 37 °C por 24 h. Coleta da película superficial do meio e semeadura em ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (Merck, Alemanha), colônias típicas foram transferidas para ágar TSI com NaCl (3%) incubados nas mesmas condições. Seguindo-se coloração de Gram, motilidade, testes bioquímicos para oxidase, arginina, lisina, lactose, sacarose, arabinose, ornitina, manose, manitol, Voges – Proskauer, gelatinase e urease.

Os resultados foram interpretados segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 - Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Que foi atualizada recentemente para RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019, que dispõe sobre os padrões microbiológicos para os alimentos e sua aplicação. E complementada pela Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001, 2019a, 2019b). Onde foram acrescentadas as avaliações de *E. coli* e concentração de histamina e entram em vigor no prazo de um ano, a partir da data de publicação.

2.3 Análise de suscetibilidade a antimicrobianos

As análises de susceptibilidade *in vitro* dos isolados a antimicrobianos foi realizada de acordo com o método descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute de 2015. Os antimicrobianos testados seguiram as recomendações para cada grupo de organismos e incluíram: Ampicilina (AMP) 10 µg, Gentamicina (GEN) 120 µg, Amicacina (AMI) 30 µg, Amoxicilina-clavulanato (AMC) 20/10 µg, Cefuroxima (CRX) 30 µg, Cefepime (CPM) 30 µg, Cefoxitina (CFO) 30 µg, Cefotaxima (CTX) 30 µg, Levofloxacina (LVX) 5 µg, Piperacilina (PPT) 100 µg e Sulfa-Trimetoprim (SUT) 25 µg (Laborclin, PR, Brasil).

2.4 Análise de histamina

A identificação e quantificação de histamina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento HPLC *proeminence* (LC-10AT, SPD-M20A, CTO-20A, CBM-20A e DGU-20A_{5R}) (Shimatzu, Japão). Detector UV-Vis PhotoDiode Array Detector (DAD) a 254 nm e coluna de fase reversa Shim-Pack VP-ODS (250.4.6 mm, 12 nm, 4,6 µm, 100Å), com *loop* de 20 µL. Sob gradiente de eluição e fase móvel Acetonitrila (Sigma-Aldrich, USA)/água, fluxo de 1 mL/min, pressão da bomba em 50 kgf/cm² e temperatura de 40 °C. Para extração, 50 g de cada amostra foi homogeneizada em equipamento tipo Turrax NT138 (Novatecnica, Brasil). Deste homogeneizado, pesou-se 1,0 g em balança analítica, que foi transferido para tubo de polipropileno de 50 mL. Seguindo com a adição de 2,0 mL de ácido tricloroacético

(TCA) a 5% mol/L (Sigma-Aldrich, USA) (European Food Safety Authority, 2011) e agitou-se em vortex por 1 min. Submeteu-se a centrifuga 420R (Hettich, Brasil) 6 min, 4 °C e 11000 rpm e retirou-se o sobrenadante para tubos de polipropileno 15 mL. A derivatização foi segundo Ben-Gigirey et al. (1998), com adaptações. A histamina foi identificada de acordo tempo de retenção em cromatografia e comparado a Curva Padrão, obtida a partir da diluição do padrão de Histamina $\geq 97\%$ C₅H₉N₃ (Sigma Aldrich, USA) em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L, nas concentrações 1,0; 5,0; 25; 50; 100 e 150 mg/L. A quantificação foi determinada a partir da medida das áreas sob os picos cromatográficos e equação da curva.

Parâmetros de estudo da curva - O método de quantificação de histamina nas amostras foi avaliado nos termos dos parâmetros analíticos: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação (LQ). A análise das amostras foi realizada em duplicata.

2.5 Análise estatística

Para analisar os resultados microbiológicos, os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA e classificação de médias e foram tratados pelo teste de *Scott-Knott*, no programa ASSISTAT Versão 7.7 beta, ao nível de 5% de probabilidade.

3 Resultados e discussão

As amostras exibiram coliformes a 35 °C sendo 65% (39) $>10^2$ NMP/g e variação de 0,4.10 a $\geq 2,4.10^2$ NMP/g (Tabela 1). Para coliformes a 45 °C 20% (12) das amostras exibiram valores $> 10^2$ NMP/g, e variação de 0 a $\geq 2,4.10^2$ NMP/g (Tabela 2). Não houve diferença estatística significativa entre as médias. Em três amostras foi detectada a presença de *E. coli*, sendo duas da mesma loja (R6). Também foi detectada presença de *Salmonella* sp. em três amostras de lojas diferentes.

Tabela 1. Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 35 °C em amostras de *sashimi* de salmão de dez restaurantes, 2017.

Local de Coleta	rA	rB	rC	rD	rE	rF	Média ^b /Desvio Padrão
R1	2,4x10 ²	2,4x10 ²	1,1x10 ²	2,4x10 ²	4,6x10	2,4x10 ²	1,9x10 ² a ± 0,9x10 ²
R2	2,4x10 ²	0,5x10	2,4x10 ²	2,1x10	2,1x10	2,4x10 ²	1,3x10 ² a ± 1,2x10 ²
R3	2,4x10 ²	1,1x10 ²	0,9x10	2,4x10 ²	4,6x10	2,4x10 ²	1,5x10 ² a ± 1,0x10 ²
R4	2,4x10 ²	2,4x10 ²	4,6x10	2,4x10 ²	1,5x10	0,4x10	1,3x10 ² a ± 1,2x10 ²
R5	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,4x10 ²	1,1x10 ²	2,4x10	1,8x10 ² a ± 0,9x10 ²
R6	2,4x10 ²	2,4x10 ²	0,9x10	1,1x10 ²	1,1x10 ²	2,4x10 ²	1,6x10 ² a ± 1,0x10 ²
R7	1,5x10	2,4x10 ²	1,5x10	2,4x10 ²	4,6x10	2,4x10 ²	1,3x10 ² a ± 1,2x10 ²
R8	4,6x10	2,4x10 ²	0,9x10	2,4x10 ²	2,4x10 ²	4,6x10	1,4x10 ² a ± 1,1x10 ²
R9	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,4x10 ²	1,1x10 ²	2,2x10 ² a ± 0,5x10 ²
R10	0,9x10	2,4x10 ²	4,6x10	2,4x10 ²	1,1x10 ²	2,4x10 ²	1,5x10 ² a ± 1,1x10 ²

Coefficiente de Variação de coliformes a 35 °C (CV) = 26,54%. ^aMédias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatística. ^bOs dados foram transformados para log X+1 para entrar na normalidade. r: repetição. R: restaurante.

Tabela 2. Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45 °C em amostras de *sashimi* de salmão em dez restaurantes, 2017.

Local de Coleta	rA	rB	rC	rD	rE	rF	Média ^b /Desvio Padrão
R1	2,4x10 ²	0,4x10 ²	0,9x10	0,5x10 ²	0,5x10 ²	0,1x10 ²	0,6x10 ^{2 a} ± 0,9x10 ²
R2	2,4x10 ²	0,2x10	0,2x10	0,4x10	0,2x10	0,2x10	0,4x10 ^{2 a} ± 1,0x10 ²
R3	2,4x10 ²	0,6x10 ²	0,2x10	2,4x10 ²	0,2x10 ²	0,2x10 ²	0,9x10 ^{2 a} ± 1,2x10 ²
R4	2,4x10 ²	0,1x10	0,1x10	0,2x10	0,2x10	0,4x10	0,4x10 ^{2 a} ± 1,0x10 ²
R5	2,4x10 ²	0,5x10 ²	0,9x10	0,1x10 ²	0,7x10	0,9x10	0,5x10 ^{2 a} ± 0,9x10 ²
R6	2,4x10 ²	0,2x10	0,1x10	1,1x10 ²	1,1x10 ²	0,2x10 ²	0,8x10 ^{2 a} ± 0,9x10 ²
R7	0,1x10 ²	0,2x10	0,0	0,2x10 ²	0,5x10 ²	2,4x10 ²	0,5x10 ^{2 a} ± 0,9x10 ²
R8	0,4x10 ²	0,4x10	0,1x10	0,5x10 ²	0,5x10 ²	0,2x10	0,2x10 ^{2 a} ± 0,2x10 ²
R9	2,4x10 ²	0,1x10 ²	0,1x10	0,2x10 ²	1,1x10 ²	0,1x10	0,6x10 ^{2 a} ± 0,9x10 ²
R10	0,2x10 ²	0,1x10	0,2x10	0,1x10	0,5x10 ²	0,4x10	0,9x10 ^{2 a} ± 0,2x10 ²

Coefficiente de Variação de coliformes a 45 °C (CV) = 49,53%. ^aMédias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatística. ^bOs dados foram transformados para log X+1 para entrar na normalidade. r: repetição. R: restaurante.

A elevada contagem de coliformes a 35 °C não implica necessariamente um risco para saúde, mas apresenta precária qualidade sanitária do alimento. E considerando a presença de *E. coli* em amostras com baixas contagens de coliformes a 45 °C, deve se ter atenção redobrada aos critérios de boas práticas de manipulação dos alimentos. Sendo, as contagens acima de 10² NMP/g para coliformes a 45 °C, consideradas como em condições sanitárias insatisfatórias, de acordo com a RDC n.º 12/01 (Brasil, 2001).

A qualidade e infraestrutura do local de preparo de alimentos pode ter impacto na segurança e qualidade microbiológica dos alimentos produzidos. Surtos causados por bactérias patogênicas têm gerado maior atenção à segurança dos alimentos, especialmente quanto ao tamanho da população do patógeno. Pois, mesmo um pequeno número de patógenos podem resultar em contaminação cruzada, alimentos inseguros e causar surtos de origem alimentar (Liang et al., 2016).

Uma vez que a infecção por *Salmonella* é possível com apenas dez cepas viáveis (Liang et al., 2016) é necessária atenção redobrada a higiene e sanitização de ambientes. Lee et al. (2014) relataram 298 surtos de 2001 a 2009 em um banco de dados do Centers for Disease Control and Prevention (2012) associado a preparações da culinária japonesa; dos quais, 211 foram devidos a enterite por *Salmonella*.

Com semelhantes resultados, Nespolo et al. (2012) ratificaram que o congelamento é a melhor prática de armazenamento para salmão e Chau et al. (2017) destacou a necessidade de criteriosa escolha dos fornecedores, para garantia de alimento seguro (Trafialek et al., 2017). Segundo Luiz et al. (2017), estratégias como a aplicação de boas práticas não têm sido suficientes, havendo necessidade de novas tecnologias sanitizantes na indústria de pescado, assim como, a busca por produtos bactericidas com ação sobre microrganismos patogênicos emergentes e que sejam seguros sob o ponto de vista químico. Igualmente é importante a avaliação da viabilidade de medidas para eliminação eficiente de *Salmonella* nos alimentos, considerando a matriz alimentar, a forma de consumo dos alimentos e parâmetros econômicos.

A população encontrada de *Staphylococcus* coagulase negativa variou de < 20 a 5,0x10⁴ UFC/g, não tendo sido identificado *Staphylococcus* coagulase positiva (Tabela 3). Não houve diferença estatística significativa entre as médias por local de coleta. A presença de *Staphylococcus*, *Salmonella* sp. e *E. coli* indicam a condição higiênica geral do alimento, e as duas últimas a contaminação por fezes ou efluentes (Vieira, 2003). Raramente os *Staphylococcus* coagulase negativa causam doenças em indivíduos saudáveis, mas são

considerados micro-organismos oportunistas em hospedeiros imunologicamente imaturos ou comprometidos (Medeiros et al., 2008), sendo de elevada importância garantir o mínimo de contaminação por *Staphylococcus* coagulase negativo dos alimentos (Becker et al., 2014; Liang et al., 2016).

Tabela 3. Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase negativa em amostras de sashimi de salmão de dez restaurantes, 2017.

Local de Coleta	rA	rB	rC	rD	rE	rF	Média ^b /Desvio Padrão
R1	1,7x10 ⁴	<20	2,1x10 ³	<20	<20	<20	3,2x10 ³ a ± 7,0x10 ³
R2	2,0x10 ⁴	<20	2,4x10 ²	4,3x10 ³	4,3x10 ³	<20	4,6x10 ³ a ± 7,0x10 ³
R3	8,0x10 ³	<20	1,2x10 ³	5,0x10 ⁴	<20	<20	1,0x10 ⁴ a ± 20x10 ³
R4	8,0x10 ³	<20	4,6x10 ³	<20	4,2x10 ²	<20	2,2x10 ³ a ± 3,0.x10 ³
R5	3,2x10 ³	<20	<20	6,3x10 ²	<20	2,1x10 ²	0,7x10 ³ a ± 1,0x10 ³
R6	3,1x10 ³	<20	1,1x10 ³	6,0x10 ³	7,3x10 ³	<20	3,0x10 ³ a ± 3,0x10 ³
R7	6,0x10 ³	<20	6,4x10 ³	1,3x10 ³	2,2x10 ³	<20	3,0x10 ³ a ± 3,0x10 ³
R8	1,4x10 ³	<20	6,1x10 ²	3,0x10 ²	<20	<20	0,4x10 ³ a ± 0,5x10 ³
R9	1,8x10 ³	<20	1,8x10 ³	7,5x10 ²	<20	<20	0,7x10 ³ a ± 1,0x10 ³
R10	5,0x10 ³	<20	<20	6,0.x10 ³	7,0x10 ³	<20	3,0x10 ³ a ± 3,0x10 ³

Coefficiente de Variação (CV) = 48,77%. ^aMédias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatística. ^bOs dados foram transformados para log X+1 para entrar na normalidade. r: repetição. R: restaurante.

Foi identificada *Aeromonas* spp. em 95% (57) das amostras analisadas, obtendo-se 66 isolados, destes 91% (60) *A. hydrophila* e 9% (6) *A. caviae* (Tabela 4). Não foi identificado *V. parahaemolyticus* nas amostras de sashimi de salmão.

Tabela 4. Espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de amostras de sashimi de restaurantes, 2017.

Espécies	Restaurantes										Total
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	
<i>A. hydrophila</i>	5	7	6	6	5	7	6	7	5	6	60
<i>A. caviae</i>	0	0	1	0	3	1	0	0	1	0	6
Total	5	7	7	6	8	8	6	7	6	6	66

No Brasil, não há critério de pesquisa para *Aeromonas* em produtos cárneos consumidos crus (Brasil, 2001), mas sua presença em alimentos constitui um perigo para a saúde humana (Nespolo et al., 2012). A contaminação ambiental e a natureza psicrotrofica das cepas (Chau et al., 2017) permitem a identificação de células viáveis em produtos sob refrigeração e podem explicar nossos resultados.

Aeromonas são patogênicas para peixes e patógenos emergentes em humanos; frequentemente presentes no esgoto bruto ou tratado, lama, águas estuarinas e praias, são tolerantes a alta salinidade (Cantas et al., 2012) e a concentrações de cloro, usadas para água potável (Ghenghesh et al., 2008), sendo a água um veículo de contaminação.

Estudos mostraram que o uso combinado de mecanismos saneantes pode ser efetivo no controle da população bacteriana. Segundo Al-Qadiri et al. (2016), o uso de água eletrolisada ácida com cloro, disponível

de 10-20 mg/L, pode ser útil na redução da contaminação por *A. hydrophila* e *V. parahaemolyticus* em mexilhões e na assistência ao controle de higiene da produção, sem prejuízo à qualidade do alimento.

A. hydrophila pode ser causa de infecções fatais em humanos (Del Castillo et al., 2013), como causa de DTA, osteomielite, meningite, septicemia e infecções da pele e do trato urinário, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Cantas et al., 2012). *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. sobria* estão associados à diarreia em crianças (Qamar et al., 2016). Portanto, é imperativo incluí-los na avaliação microbiológica de alimentos como o pescado (Herrera et al., 2006).

A não identificação de *V. parahaemolyticus* pode ser devido a sua fragilidade a frio, que as transforma em estado não cultivável (Shi et al., 2017; Huang et al., 2018) e contrasta com sua ampla presença no ambiente marinho. No entanto, o ágar TCBS utilizado para análise é um meio seletivo para isolamento e cultivo de espécies de *Vibrio* sugerindo a possível presença de *Vibrio* sp. (Kaysner et al., 1987). 10 das 38 espécies de *Vibrio* sp. são patogênicas (Alaboudi et al., 2016).

Miguéis et al. (2015) verificaram cepas não patogênicas de *Vibrio* em sashimi e sugeriram a presença de patógenos. A carga microbiana inicial é influenciada pelo armazenamento e exposição dos alimentos, refletindo sua carga final e possível causa da DTA (Møretro et al., 2016).

Nos testes de suscetibilidade antimicrobiana, as cepas de *E. coli* isoladas de três amostras de sashimi foram sensíveis a CPM, CTX, LVX, PPT e SUT, apresentando resistência a AMP, GEN, AMI e AMC. As três cepas de *Salmonella* sp. foram sensíveis a AMC, CPM, CFO, CRX, GEN, LVX e PPT; e apenas foi resistente a AMI, a AMP e a SUT. As cepas de *Aeromonas* apresentaram maior resistência aos antimicrobianos testados, sendo a AMP (97%), a CRX (90,9%), a AMC (77,3%) e CFO (74,24%). Por outro lado, 81,8% destas cepas foram sensíveis ao CPM (Figura 1).

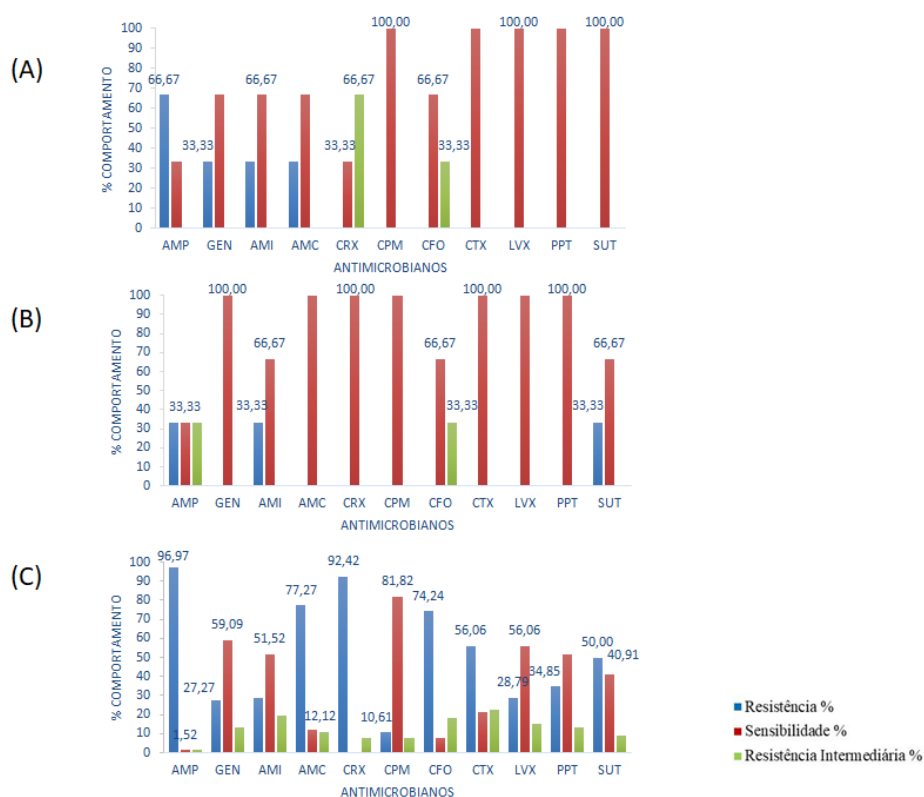


Figura 1. Resultado dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de sashimi de salmão. (A) Análise de comportamento dos isolados de *Escherichia coli* aos antimicrobianos; (B) Análise de comportamento dos isolados de *Salmonella* sp. aos antimicrobianos; (C) Análise de comportamento dos isolados de *Aeromonas* spp. aos antimicrobianos.

O uso indiscriminado de drogas na aquicultura pode afetar organismos e habitat, e produzir pressão seletiva, resistência a drogas e consequências negativas para o tratamento posterior de outras possíveis infecções (Marti et al., 2014). *E. coli* não apresenta resistência intrínseca a β -lactâmicos. No entanto, pode apresentar resistência adquirida. Carvalho et al. (2016), mostraram cepas de *E. coli*, originárias de caranguejos, resistentes a AMP e GEN, para além de multirresistência aos demais antimicrobianos testados.

O mecanismo de resistência aos β -lactâmicos geralmente ocorre por ação das β -lactamases, comuns entre os isolados de *E. coli* em alimentos de origem animal (Carvalho et al., 2016). No ambiente marinho, a família Vibrionaceae é naturalmente resistente a AMP (Radu et al., 2003); assim, a transferência de plasmídeo, que apresenta a sua resistência natural, produz bactérias resistentes aos medicamentos (Marti et al., 2014).

Para *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., aminoglicosídeos, cefalosporinas e cefamicinas podem apresentar eficácia *in vitro*, mas são clinicamente ineficazes. Estes microrganismos não possuem resistência intrínseca aos β -lactâmicos. Portanto, a resistência identificada à AMP pode refletir na aquisição por interação microbiana e troca de plasmídeos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

Resíduos de antimicrobianos em áreas de aquicultura e arredores têm sido associados à presença de genes codificados por plasmídeos, determinação de bactérias multirresistentes, transferência de resistência entre micro-organismos e manutenção do perfil bacteriano em produtos de pesca (Buschmann et al., 2012). Plasmídeos e transposons estão relacionados a isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. Que apresentam resistência a antimicrobianos (Jacobs & Chenia, 2007).

No ambiente aquático é possível o compartilhamento de plasmídeos, integrons e elementos conjugativos integrativos geneticamente relacionados com peixes, moluscos e patógenos humanos, e os peixes constituem um veículo para o carreamento de microrganismos multirresistentes (García-Aljaro et al., 2014).

Na aquicultura, fatores como a densidade da cultura e espécies suscetíveis a doenças estão relacionados à transmissão e difusão de infecções (Cabello et al., 2016). Para a salmônica chilena, foram utilizadas 557,2 toneladas de antimicrobianos em 2015 e 382,5 t em 2016, sendo 95% administrados no mar e 4,5% em água doce. (Chile, 2018), contribuindo para o aumento da resistência de *Aeromonas* spp. no ambiente (Pablos et al., 2009). Portanto, seu uso deve estar associado aos dados de suscetibilidade para a bactéria alvo.

Embora o uso racional de antimicrobianos seja o objetivo da Organização Mundial de Saúde, o uso permanece agressivo. A resistência de *Aeromonas*, a vários antimicrobianos encontrada nas amostras recolhidas, pode ser devida ao salmão consumido no Brasil ser originário do Chile. Em 2016, o salmão foi um dos principais produtos exportados do Chile para o Brasil, totalizando US \$ 438 milhões (Brasil, 2017).

Os valores encontrados para o índice de resistência múltipla a antibióticos (MAR) variaram de 0,18 a 1,00 e mostraram a multirresistência de 100% de isolados de *Aeromonas*, 33% de *E. coli* e 33% de *Salmonella* sp. Duas cepas de *Aeromonas* foram resistentes a nove dos onze antimicrobianos, e uma cepa apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados (MAR = 1,00) (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de Múltipla Resistência aos Antimicrobianos (MAR) de *Aeromonas* sp., *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. provenientes de sashimi de salmão, 2017.

(n)	N (%)										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	T
<i>Aeromonas</i> sp.	4 (6)	5 (7)	10 (15)	9 (17)	16 (24)	12 (18)	7 (11)	2 (3)	-	1 (11)	66
<i>E. coli</i>	-	-	1 (33)	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Salmonella</i> sp.	1 (33)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Índice MAR	0,18	0,27	0,36	0,45	0,54	0,63	0,72	0,81	-	1,00	-

n: Número de antimicrobianos. N (%): Número de isolados que apresentam resistência ao “n” de antimicrobianos e respectiva porcentagem. T: Número total de isolados testados.

Alterações genéticas em micro-organismos aquáticos e transferência horizontal são mecanismos decisivos para a multirresistência antimicrobiana e podem ser consequência do transporte de seus resíduos pelas correntes marinhas (Buschmann et al., 2012; Yano et al., 2014). Por exemplo, fatores de virulência, como citotoxinas geneticamente similares à toxina *E. coli* shiga, foram exibidos em plasmídeos de *Aeromonas* (Pablos et al., 2009). A multirresistência com índices $> 0,2$ e $< 0,2$ está associada ao uso ocasional de antimicrobianos (Adeleke & Omafuvbe, 2011).

Da mesma forma, Dib et al. (2018), em análises de sardinha e camarão, observaram uma elevada porcentagem de multirresistência dos isolados de *E. coli*, e a associaram a um alto grau de manipulação de peixes no ambiente de vendas. Além disso, é importante enfatizar que *E. coli* e outras Enterobacteriaceae são produtores de histamina em peixes marinhos, envolvidos com intoxicação alimentar escombróides.

Na produção de salmão chileno, a administração de antimicrobianos é inadequada e resulta em alterações na biodiversidade de sedimentos e águas no entorno de sistemas abertos de aquicultura (Watts et al., 2017). Portanto, medidas de uso controlado desses compostos são necessárias para minimizar esses riscos sem comprometer a aquicultura.

Os resultados sugerem a aquisição de matéria-prima contaminada, armazenamento inadequado e contaminação cruzada nos procedimentos de produção. A sensibilidade reduzida às drogas testadas indica uma diminuição na gama de terapêuticas de possíveis infecções transmitidas por esses alimentos. É vital que a população tenha acesso às informações, que os surtos sejam notificados, que as agências fiscalizadoras deem atenção à prevenção de DTA e ao controle e inspeção de pescado.

Elevados índices de multirresistência, de micro-organismos presentes em alimentos, mostram-se um risco à saúde humana. É importante que investigações em alimentos, especialmente se consumidos crus como sashimis e sushis, assim como investigações de origem de multirresistência e suas possíveis relações com infecções e seus agravos em humanos (Smith et al., 2008; Dias et al., 2010). Sendo o controle sanitário de estabelecimentos e alimentos, através de implementação de legislação (Fortaleza, 2019) um importante passo de segurança de alimentos, visando a proteção à saúde da população.

Das 60 amostras analisadas, 47% (28) apresentaram concentrações de histamina detectáveis pelo método, com variação de $44,06 \pm 0,74$ a $505,46 \pm 8,83$ mg/kg e média de 208,78 mg/kg (LQ $> 38,67$ mg/kg). Dentre elas, 35% (21) das amostras apresentaram concentrações > 100 mg/kg (Mercado Comum Sulamericano, 1994; Brasil, 1997); e 10% (6) entre 50 e 100 mg/kg. Portanto 45% (27) das amostras apresentaram concentrações acima de 50mg/kg - limite preconizado pela Food and Drug Administration (2011), apenas uma amostra dentro do LQ apresentou concentração de $44,06 \pm 0,74$ mg/kg, inferior ao limite (Tabela 6).

Tabela 6. Níveis de histamina em amostras de sashimi de salmão (*Salmo salar*) de dez restaurantes, 2017.

Local de coleta	rA	rB	rC	rD	rE	rF
	CA \pm dp	CA \pm dp	CA \pm dp	CA \pm dp	CA \pm dp	CA \pm dp
R1	Nd	137,85 \pm 4,12	Nd	Nd	Nd	Nd
R2	114,46 \pm 1,36	Nd	Nd	394,20 \pm 22,56	374,68 \pm 2,37	94,06 \pm 2,60
R3	147,64 \pm 2,90	Nd	Nd	102,53 \pm 2,07	117,76 \pm 3,07	157,63 \pm 3,55
R4	339,33 \pm 0,93	Nd	Nd	Nd	Nd	73,52 \pm 3,62
R5	456,29 \pm 3,71	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
R6	Nd	Nd	Nd	427,53 \pm 4,26	Nd	Nd
R7	90,20 \pm 1,81	Nd	Nd	124,75 \pm 3,22	244,09 \pm 9,27	Nd
R8	64,05 \pm 0,91	78,59 \pm 0,03	Nd	Nd	274,49 \pm 3,66	338,89 \pm 0,92
R9	Nd	316,59 \pm 6,45	230,39 \pm 5,01	182,89 \pm 0,15	52,99 \pm 1,85	44,06 \pm 0,74
R10	Nd	175,36 \pm 3,98	Nd	505,46 \pm 8,83	323,48 \pm 0,14	Nd

R: restaurantes. r: repetição. CA: concentração do analito. dp: desvio padrão. Nd: não detectável.

As elevadas concentrações de toxinas representam riscos para a saúde de seus consumidores, constituindo-se alimentos veiculadores de escombrotóxina e corroboram com os níveis encontrados por Chen et al. (2010). Os níveis de histamina entre peixes e dentro de um peixe individual podem ser muito variáveis. Por este motivo a Food and Drug Administration (2011) estabeleceu o nível de 50 mg/kg ou PPM de histamina na porção edível de peixe, considerando que, se esta quantidade for encontrada, existe a possibilidade de em outras porções, a concentração ultrapassar 500 mg/kg.

As bactérias histamina-positivas tais como: *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *E. coli*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Photobacterium* (Tsai et al., 2004), estão associadas a condições de higiene e temperatura inadequadas de alimentos. A Food and Drug Administration (2011) recomenda o uso de temperaturas < 4,4 °C para controle de produção de histamina (escombrotóxina), considerando a ocorrência desta produção a temperaturas > 5 °C e associada à presença de *Photobacterium* spp. em alimentos (Kanki et al., 2004; Bjornsdottir-Butler et al., 2016).

Bactérias histamina-positivas multiplicam-se rapidamente a temperaturas superiores a 20 °C, e apresentam temperatura ótima de crescimento de aproximadamente 32 °C (Food and Drug Administration, 2011; World Health Organization, 2017). Souza et al. (2015) avaliando amostras de *sushi*, encontraram elevadas contagens de coliformes a 45 °C e salientaram que o crescimento deste subgrupo reflete a reduzida aplicação de boas práticas de produção de alimentos.

Os níveis de histamina responsáveis pelos surtos de intoxicação são muito variáveis e baixos níveis eventualmente podem causar sintomas em indivíduos sensíveis. Uma dificuldade em definir uma dose tóxica específica é devida à presença de outras aminas biogênicas nos alimentos envolvidos, que podem potencializar os efeitos adversos da histamina (Comas-Basté et al., 2009).

4 Conclusões

As amostras de sashimi de salmão analisadas apresentaram condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias, com a presença de elevadas contagens de coliformes a 45 °C, alta carga de *Staphylococcus* coagulase-negativo, identificação das bactérias patogênicas *E. coli* e *Salmonella* sp. e presença de bactérias emergentes como *A. hydrophila* e *A. caviae*.

Verificou-se multirresistência de cepas, principalmente das cepas de *Aeromonas*. Cepas de *E. coli* e *Salmonella* sp. isoladas apresentaram resistência principalmente ao ampicilina. E, ainda, elevadas concentrações de histamina, são capazes de causar sintomas de intoxicação escombróide e, portanto, devem ser controladas e serem consideradas como uma preocupação para a saúde dos consumidores.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA - Brasil) [edital n.º 40/2015], à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Referências

- Adeleke, E. O., & Omafuvbe, B. O. (2011). Antibiotic resistance of aerobic mesophilic bacteria isolated from poultry faeces. *Research Journal of Microbiology*, 6(4), 356-365. <http://dx.doi.org/10.3923/jm.2011.356.365>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2016). *Antimicrobianos: Bases teóricas e uso clínico*. Brasília. Recuperado em 10 de dezembro de 2019, de http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm
- Alaboudi, A. R., Ababneh, M., Osaili, T. M., & Al Shloul, K. (2016). Detection, identification, and prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in fish and coastal environment in Jordan. *Journal of Food Science*, 81(1), M130-M134. PMID:26554333. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13151>

- Al-Qadiri, H. M., Al-Holy, M. A., Shiroodi, S. G., Ovissipour, M., Govindan, B. N., Al-Alami, N., Sablani, S. S., & Rasco, B. (2016). Effect of acidic electrolyzed water-induced bacterial inhibition and injury in live clam (*Venerupis philippinarum*) and mussel (*Mytilus edulis*). *International Journal of Food Microbiology*, 231, 48-53. PMID:27208583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.012>
- Alves, J. C., Paiva, E. L., Milani, R. F., Bearzoti, E., Morgano, M. A., & Diego Quintaes, K. (2017). Risk estimation to human health caused by the mercury content of Sushi and Sashimi sold in Japanese restaurants in Brasil. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 52(6), 418-424. PMID:28272991. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1293451>
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926. PMID:25278577. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Ben-Gigirey, B., Sousa, J. M. V. B., Villa, T. G., & Barros-Velazquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in Albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, 61(5), 608-615. PMID:9709235. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-61.5.608>
- Bjornsdottir-Butler, K., Sanchez, L. M., Dunlap, P. V., & Benner Junior, R. A. (2016). Draft genome sequences of histamine- and non-histamine-producing *Photobacterium* strains. *Genome Announcements*, 4(5), e01008-e01016. PMID:27660786. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01008-16>
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. (1997, maio 13). Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado) (Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2001, janeiro 10). Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos (RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
- Brasil. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. (2017). *Brasil e Chile assinam memorando sobre Certificado de Origem Digital para agilizar comércio entre os dois países*. Recuperado em 10 de dezembro de 2019, de <http://www.mdic.gov.br/index.php/noticias/2880-brasil-e-chile-assinam-memorando-sobre-certificado-de-origem-digital-para-agilizar-comercio-entre-os-dois-paises>
- Brasil. Ministério da Saúde. (2019a, dezembro 26). Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2019b, dezembro 26). Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. (Instrução Normativa . IN nº 60, de 23 de dezembro de 2019). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
- Buschmann, A. H., Tomova, A., Lopez, A., Maldonado, M. A., Henriquez, L. A., Ivanova, L., Moy, F., Godfrey, H. P., & Cabello, F. C. (2012). Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS One*, 7(8), e42724. PMID:22905164. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042724>
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Dolz, H. J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet. Infectious Diseases*, 16(7), e127-e133. PMID:27083976. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00100-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6)
- Cai, L., Cao, A., Bai, F., & Li, J. (2015). Effect of ϵ -polylysine in combination with alginate coating treatment on physicochemical and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2), 1053-1059. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.002>
- Cantas, L., Midtlyng, P. J., & Sorum, H. (2012). Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Microbiology*, 12(37), 37. PMID:22429905. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-37>
- Carnahan, A. M., Behram, S., & Joseph, S. W. (1991). Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12), 2843-2849. PMID:1757558. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.29.12.2843-2849.1991>
- Carvalho, M. C., Jayme, M. M., Arenazio, G. S., Araujo, F. V., Leite, S. G., & Del Aguila, E. M. (2016). Microbiological quality assessment by PCR and its antibiotic susceptibility in mangrove crabs (*Ucides cordatus*) from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brasil. *International Journal of Microbiology*, 2016, 7825031. PMID:27065187. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7825031>
- Centers for Disease Control and Prevention – CDC. (2012). *Foodborne illness data & statistics*. Atlanta: CDC. Recuperado em 10 de dezembro de 2019, de <http://www.cdc.gov/Features/DataStatistics.html>
- Centre for the Promotion of Imports – CBI. Ministry of Foreign Affairs. (2016). *CBI trade statistics: Fish and seafood*. The Hague: CBI. Recuperado em 10 de dezembro de 2019, de <https://www.cbi.eu/sites/default/files/trade-statistics-fish-seafood.pdf>
- Chau, M. L., Chen, S. L., Yap, M., Hartantyo, S. H. P., Chiew, P. K. T., Fernandez, C. J., Wong, W. K., Fong, R. K., Tan, W. L., Tan, B. Z. Y., Ng, Y., Aung, K. T., Mehershahi, K. S., Goh, C., Kang, J. S. L., Barkham, T., Leong, A. O. K., Gutierrez, R. A., & Ng, L. C. (2017). Group B *Streptococcus* infections caused by improper sourcing and handling of fish for raw consumption, Singapore, 2015-2016. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 1982-1990. PMID:29148967. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2312.170596>
- Chen, H. C., Lee, Y. C., Lin, C. M., Hwang, D. F., & Tsai, Y. H. (2010). Determination of histamine and bacterial isolation in marlin fillets (*Makaira nigricans*) implicated in a foodborne poisoning. *Journal of Food Safety*, 30(3), 699-710. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00234.x>

- Chile. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura – SERNAPESCA. Subdirección de Acuicultura Departamento de Salud Animal. (2018). *Informe sobre o uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional año 2018*. Valparaíso, Chile.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. (2015). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fifth informational supplement* (CLSI document, No. M100-S25). Wayne: CLSI.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2009). Histamine and other biogenic amines in food: from scombroid poisoning to histamine intolerance. In C. Proestos (Ed.), *Biogenic amines*. London: Intechopen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>.
- Del Castillo, C. S., Hikima, J., Jang, H. B., Nho, S. W., Jung, T. S., Wongtavatchai, J., Kondo, H., Hirono, I., Takeyama, H., & Aoki, T. (2013). Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 120-129. PMID:23070174. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01239-12>
- Dias, M. T., Santos, P. C. R. F., Oliveira, L. A. T., & Marin, V. A. (2010). Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna linnaeus*, 1758) à antimicrobianos. *Food Science and Technology*, 30(2), 319-324. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000200005>
- Dib, A. L., Agabou, A., Chahed, A., Kurekci, C., Moreno, E., Espigares, M., & Espigares, E. (2018). Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of enterobacteriaceae isolated from fish and seafood. *Food Control*, 88, 54-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.005>
- European Food Safety Authority – EFSA. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods: EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 9(10), 2393. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2012). *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Rome: FAO.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2018). *The states os world fisheries and aquaculture: Meeting the sustainable development goals*. Rome: FAO.
- Food and Drug Administration – FDA. (2011). *Fish and fishery products hazards and controls guidance* (4th ed., chap. 7, pp. 113-152). Washington: Office of Seafood.
- Fortaleza. Secretária de Saúde. (2019, novembro 29). Requisitos higiênico-sanitários específicos para o preparo, manipulação, comercialização e distribuição de sushis e similares (Portaria nº 1405, de 29 de novembro de 2019). *Diário Oficial do Município*, Fortaleza. Recuperado em 10 de dezembro de 2019, de <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=386988>
- García-Aljaro, C., Riera-Heredia, J., & Blanch, A. R. (2014). Antimicrobial resistance and presence of the SXT mobile element in *Vibrio* spp. isolated from aquaculture facilities. *The New Microbiologica*, 37(3), 339-346. PMID:25180848.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464-475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Ghengehesh, K. S., Ghengehesh, K. S., Ahmed, S. F., El-Khalek, R. A., Al-Gendy, A., & Klena, J. (2008). *Aeromonas*: Associated infections in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(2), 81-98. PMID:19738331. <http://dx.doi.org/10.3855/TJ.2.2.81>
- Havelaar, A. H., & Vonk, M. (1988). The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. *Letters in Applied Microbiology*, 7(6), 169-171. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1988.tb01271.x>
- Herrera, F. C., Santos, J. A., Otero, A., & Garcia-Lopez, M. L. (2006). Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 527-536. PMID:16478492. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02848.x>
- Huang, Y. S., Hwang, C. A., Huang, L., Wu, V. C. H., & Hsiao, H. (2018). The Risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw oysters as affected by processing and distribution conditions in Taiwan. *Food Control*, 86, 101-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.022>
- Jacobs, L., & Chenia, H. Y. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 295-306. PMID:17173998. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030>
- Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., & Tsukamoto, T. (2004). *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 79-87. PMID:15033270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.019>
- Kaysner, C. A., Abeyta Junior, C., Wekell, M. M., Depaola Junior, A., Stott, R. F., & Leitch, J. M. (1987). Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States West Coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1344-1348. PMID:3606111. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.53.6.1344-1348.1987>
- Lee, J. H., Hwang, J., & Mustapha, A. (2014). Popular ethnic foods in the United States: A historical and safety perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 2-17. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12044>
- Liang, W. L., Pan, I. L., Cheng, H. L., Li, T. C., Yu, P. F., & Chan, S. W. (2016). The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. *Food Control*, 69, 45-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.015>
- Lohiya, G.-S., Lohiya, S., Lohiya, S., & Krishna, V. (2015). Scombrototoxicity: Protracted Illness following Misdiagnosis in the Emergency Department. *Case Reports in Emergency Medicine*, 2015, 597934. PMID:26357577. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/597934>

- Luiz, D. B., Silva, C. D. F., Campelo, S. R., Santos, V. R. V., Lima, L. K. F., Chicrala, P. C. M. S., & Iwashita, M. K. P. (2017). Evaluation of the effectiveness of ozone as a sanitizer for fish experimentally contaminated with *Salmonella* sp. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20(0), e2016150. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.15016>
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules*, 23(4), 795. PMID:29601469. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23040795>
- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36-41. PMID:24289955. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>
- Medeiros, E. A. S., Nouer, S. A., Silva, N. F., Grinbaum, R., Pereira, A. P. P., & Long, J. C. (2008). *Tratamento das principais infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde e a profilaxia antimicrobiana em cirurgia*. ATM Racional. Recuperado em 5 de janeiro de 2016, de http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/objetivos.htm
- Mercado Comum Sulamericano – MERCOSUL. Secretaria de Defesa Agropecuária do MAARA. (1994). Recomendação nº 8/94 AR do Subgrupo de Trabalho n. 3, "Normas Técnicas" (Resolução nº 40, 1994). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
- Miguéis, S., Santos, C., Saraiva, C., & Esteves, A. (2015). Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, 47, 32-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.025>
- Møretro, T., Moen, B., Heir, E., Hansen, A. A., & Langsrud, S. (2016). Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 98-108. PMID:27552347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.016>
- Nespolo, N. M., Martineli, T. M., & Rossi Junior, O. D. (2012). Microbiological quality of salmon (*Salmo salar*) sold in cities of the state of São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1393-1400. PMID:24031968. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400021>
- Pablos, M., Rodriguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & Garcia-Lopez, M. L. (2009). Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 158-164. PMID:19720415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.020>
- Palumbo, S. A., Maxino, F., Williams, A. C., Buchanan, R. L., & Thayer, D. W. (1985). Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 1027-1030. PMID:16346899. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.50.4.1027-1030.1985>
- Prado, B. G., Iwatani, J. E., Pereira, M. R., Gollucke, A. P. B., & Toledo, L. P. (2014). Pontos críticos de controle na qualidade higiênico-sanitária do preparo de sushis e sashimis no município de São Vicente, São Paulo. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 21(1), 359-372. <http://dx.doi.org/10.20396/san.v21i1.1661>
- Qamar, F. N., Nisar, M. I., Quadri, F., Shakoob, S., Sow, S. O., Nasrin, D., Blackwelder, W. C., Wu, Y., Farag, T., Panchalingham, S., Sur, D., Qureshi, S., Faruque, A. S., Saha, D., Alonso, P. L., Breiman, R. F., Bassat, Q., Tamboura, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ahmed, S., Hossain, A., Das, S. K., Antonio, M., Hossain, M. J., Mandomando, I., Tennant, S. M., Kotloff, K. L., Levine, M. M., & Zaidi, A. K. (2016). *Aeromonas*-associated diarrhea in children under 5 years: The GEMS experience. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), 774-780. PMID:27527635. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0321>
- Radu, S., Ahmad, N., Ling, F. H., & Reezal, A. (2003). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 81(3), 261-266. PMID:12485753. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00228-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00228-3)
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- Shi, Y., Sun, R., An, D., Lu, W., Zhang, C., Wang, L., Liu, Y., & Wang, Q. (2017). Mathematical quantification of inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on two types of surface soiled with different substrates. *Food Control*, 74, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.025>
- Smith, P. R., Breton, A. L., Horsberg, T. E., & Corsin, F. (2008). Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In L. Guardabassi, L. B. Jensen & H. Kruse (Eds.), *Guide to antimicrobial use in animals* (pp. 207-216). Oxford: WileyBlackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/9781444302639.ch12>
- Souza, T. J. F. F., Silva, J. N., Silva Filho, C. R. M., & Santos, J. G. (2015). Microorganisms of sanitary interest in sushi. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 4(3), 274-279.
- Topp, E., Larsson, D. G. J., Miller, D. N., Van Den Eede, C., & Virta, M. P. J. (2018). Antimicrobial resistance and the environment: assessment of advances, gaps and recommendations for agriculture, aquaculture and pharmaceutical manufacturing. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(3), 1-5. PMID:29309580. <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fix185>
- Trafialek, J., Drosinos, E. H., Laskowski, W., Jakubowska-Gawlik, K., Tzamalís, P., Leksawasdi, N., Surawang, S., & Kolanowski, W. (2017). Street food vendors' hygienic practices in some Asian and EU countries: A survey. *Food Control*, 85, 212-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.030>
- Tsai, Y. H., Kung, H. F., Lee, T. M., Lin, G. T., & Hwang, D. F. (2004). Histamine related hygienic qualities and bacteria found in popular commercial scombroid fish fillets in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 67(2), 407-412. PMID:14968980. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.407>

Ocorrência de bactérias patogênicas e deteriorantes em sashimi de salmão: avaliação de histamina e de susceptibilidade a antimicrobianos

Cordeiro, K. S. et al.

Vanderzant, C., & Splitt-Stoesser, D. F. (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3rd ed.). Washington: American Public Health Association.

Vieira, R. H. S. F. (2003). *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: Teoria e prática* (1. ed.). São Paulo: Livraria Varela.

Watts, J. E. M., Schreier, H. J., Lanska, L., & Hale, M. S. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6), 1-16. PMID:28587172. <http://dx.doi.org/10.3390/md15060158>

World Health Organization – WHO. (2012). *Animal waste, water quality and human health*. London: WHO/IWA.

World Health Organization – WHO. (2017). *Meeting on public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products, joint FAO/expert report*. Geneva: WHO. Recuperado em 5 de janeiro de 2016, de http://www.who.int/foodsafety/publications/histamine_risk/en/

Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., & Aue-Umneoy, D. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control*, 38, 30-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.019>

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, edital n.º 40/2015.

Received: May 29, 2019; Accepted: July 17, 2020