

ESTUDO SOBRE A PRESENÇA DE *Staphylococcus* e *Salmonella* EM FILÉS DE PESCADO CONGELADOS PARA CONSUMO NO RIO DE JANEIRO¹

PASCHOAL GUIMARÃES ROBBS², GLÊNIO CAVALCANTI DE BARROS³ e CARLOS SOLÉ-VERNIN⁴

SINOPSE.- A qualidade sanitária dos filés de pescado congelados comercializados na área do Grande Rio foi estudada através do exame bacteriológico de 34 amostras, de 10 marcas comerciais. *Staphylococcus* coagulase positiva foi encontrado em 17 amostras (de oito marcas), mas apenas quatro apresentaram contagens superiores a 100 *Staphylococcus* por grama. A fagotipagem das culturas obtidas desse microrganismo revelou os seguintes tipos: 53, 6/47/53/54/75, 53/54, 3C/55, 29/52/52A/80/42D/84, 3A, 81, 81/6, 29/81, 79 e 29/52.

A presença de *Salmonella* não foi constatada em nenhuma das amostras.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos antes do aparecimento da pasteurização e da obrigatoriedade da inspeção sanitária dos produtos de origem animal era freqüente, sendo comum a transmissão de enfermidades através do leite, da carne, do pescado e de outros produtos.

Segundo Jay (1970), entre as causas importantes no aparecimento de surtos de intoxicação alimentar estão as condições higiênico-sanitárias empregadas na manipulação dos alimentos em fábrica. Tal fato influi decisivamente na quantidade e na qualidade dos microrganismos presentes nos alimentos industrializados. O mesmo autor faz referências a pesquisadores ingleses que responsabilizaram alimentos com altas contagens de microrganismos (acima de 10^7 cels/g) como causadores de intoxicações. Entretanto, Elliot e Michener (1961), analisando amostras de carne, e embora encontrando baixas contagens de viáveis totais, evidenciaram a presença de *Salmonella* causando infecções alimentares. Vê-se, então, que somente a quantidade total de microrganismos presentes nos alimentos não fornece um quadro real da situação microbiológica dos mesmos, sendo importante, portanto, a pesquisa de bactérias responsáveis por toxinfecções alimentares.

Entre os produtos da pesca que sofrem manipulação, segundo Nickerson e Goldblith (1964), os filés de pescado apresentam contaminação que depende diretamente das condições higiênico-sanitárias aplicadas na filetagem e nas operações subseqüentes.

Dack (1962) informa que a produção de toxina pelas cepas de *Staphylococcus* ocorre durante a sua multiplicação nos alimentos, e esses são considerados como causadores de intoxicações quando contém cerca de 10^8 *Staphylococcus* por grama.

Allison (1949) sugeriu um número mínimo de 500.000 *Staphylococcus* por grama para que um alimento possa ser julgado como causador de intoxicação.

A presença de qualquer sorotipo de *Salmonella* em alimentos é potencialmente perigosa como fonte de enfermidades para o homem. No que diz respeito à quantidade, para ocorrer infecção é necessária a ingestão de certo número desses microrganismos (Hobbs 1970).

Elliot e Michener (1961) propuseram para pescado os seguintes limites: 100 *Staphylococcus* por grama e ausência de *Salmonella*.

Nickerson *et al.* (1962) examinaram 78 amostras de filés de pescado congelados abrangendo 24 cidades dos USA e verificaram que 19% destas continham 50.000 células de microrganismos por grama e que apenas duas estavam contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva. A presença de *Salmonella* foi detectada em somente uma amostra.

Kalligeris (1964), verificando as condições microbiológicas de 31 amostras de filés de pescado congelados coletados no comércio francês, constatou que 45% das mesmas estavam contaminadas com 10 a 100 *Staphylococcus* coagulase positiva por grama. Isolou um total de 140 colônias de *Staphylococcus*, sendo que 64,2% se mostraram coagulase e DNase positivas. Não evidenciou, entretanto, a presença de *Salmonella*.

Custot (1968), analisando filés de pescado congelados, encontrou 12% das amostras contaminadas por *Staphylococcus* e não observou a presença de *Salmonella*.

O presente trabalho foi realizado para complementar o estudo feito por Barros e Robbs (1974) e teve por objetivo verificar, através da presença de *Staphylococcus* e *Salmonella*, microrganismos de grande importância em intoxicações e infecções alimentares, a qualidade sanitária dos filés de pescado congelados comercializados na área do Grande Rio.

MATERIAL E MÉTODOS

Tanto as amostras quanto as metodologias empregadas para a obtenção das suspensões de 10^{-1} a 10^{-6} foram as mesmas utilizadas por Barros e Robbs (1974).

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram seguidas as recomendações de Mossel e Quevedo (1967), empregando o meio ágar de Baird-Parker

¹ Aceito para publicação em 9 de janeiro de 1975.

² Auxiliar de Ensino do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26.

³ Professor Assistente do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Tecnologia da UFRRJ.

⁴ Professor Titular do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

(Oxoid) adicionado de 5% de emulsão de gema de ovo concentrada⁶ e 0,3 ml de solução a 3,5% de telurito de potássio esterilizada. Após as contagens, colônias em número igual à raiz quadrada do total contado nas placas, e nunca menor do que cinco, foram purificadas e as culturas obtidas submetidas aos testes de coagulase e DNase. Descartou-se posteriormente, das contagens das placas, o número de colônias apresentado pelas culturas que deram resultado negativo nos testes.

Para a simples evidênciação da presença de *Staphylococcus* nas amostras de filé, foi feita ainda a sementeira de 1 ml do material diluído a 10⁻² juntamente com cerca de 1 g de fragmentos de filé, em tubo contendo 15 ml de caldo manitol (meio de enriquecimento) com a seguinte composição: 1,0 g de extrato de carne (Difco), 10,0 g de peptona (Difco), 10,0 g de manitol, 75,0 g de cloreto de sódio e 1.000 ml de água destilada. O pH foi ajustado a 7,5 e o meio distribuído e esterilizado a 120°C por 15 minutos. Após 24-48 horas de incubação a 37°C, as culturas foram semeadas em placas contendo meio ágar de Baird-Parker e em placas de manitol - cloreto de sódio-ágar⁶. As culturas obtidas desses isolamentos foram submetidas à prova da coagulase, seguindo-se a técnica adotada por Blobel *et al.* (1965), que recomenda colocar em um tubo de ensaio 0,2 ml da cultura crescida em caldo simples a 37°C por 18 horas e 0,5 ml de plasma de coelho, citratado e diluído a 1/3 com salina estéril, e incubar a mistura a 37°C, procedendo à leitura após 3 horas. Na prova de DNase, utilizou-se o meio DNase ágar (Oxoid). As culturas coagulase e DNase positivas foram fagotipadas, utilizando-se o Conjunto Internacional Básico de 22 fagos, a saber: 29, 52, 52A, 79, 80, 3A, 3C, 55, 71, 81, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 42D, 187, 83A, 84, 85

e o fago experimental 86. As culturas que não deram reações significativas no "Routine Test Dilution" (RTD) foram testadas na concentração de 100 x RTD.

Na pesquisa de *Salmonella* foi empregada a técnica descrita por Thatcher e Clark (1968), recomendada para exames de ovos em pó, ovos líquidos pasteurizados e congelados e alimentos preparados liofilizados. O procedimento foi o seguinte:

a) enriquecimento não seletivo: aproximadamente 25 g de cada amostra foram colocados em erlenmeyer contendo 225 ml de caldo lactosado e incubados por 24 horas a 37°C;

b) enriquecimento seletivo: 1 ml de enriquecimento não seletivo foi inoculado em tubo contendo 10 ml de caldo selenito cistina⁷ (B.B.L.) e 1 ml em tubo contendo 10 ml de tetrationato⁸ (2 repetições); os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas;

c) sementeira em meio sólido diferencial-seletivo: para cada tubo de enriquecimento seletivo foram semeadas quatro placas, sendo duas de ágar verde brilhante⁹ e duas de ágar citrato desoxicolato¹⁰; as placas foram incubadas a 37°C e examinadas após 24-48 horas.

As colônias suspeitas foram inicialmente testadas em meio ágar triplo açúcar-ferro¹¹ (Merck). Após a triagem, foram submetidas a provas bioquímicas recomendadas por Edwards e Ewing (1955), para a identificação de *Salmonella*.

RESULTADOS

Das 34 amostras analisadas, 17, abrangendo oito das 10 marcas comerciais coletadas, apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva, conforme se pode verificar no Quadro 1.

QUADRO 1. Contagem e fagotipagem de *Staphylococcus coagulase positiva* em filés de pescado congelados coletados no Grande Rio

Amostras	<i>Staphylococcus</i> (cels/g)	Fagotipagem			
		R.T.D.		100 x R.T.D.	
		N.º de cult.	Fagotipo	N.º de cult.	Fagotipo
B ₁	<100	1	53	*	*
C ₁	950	—	—	3	81
C ₂	<100	—	—	2	N.R.
C ₃	<100	—	—	1	N.R.
E ₁	1.650	2	6/47/53/54/75	3	N.R.
E ₃	350	2	53/54	*	*
F ₃	1.500	—	—	5	N.R.
		—	—	1	81
		—	—	1	81/6
		—	—	1	29/81
		—	—	2	N.R.
G ₁	<100	2	6/47/53/54/75	*	*
G ₂	<100	—	—	2	N.R.
G ₃	<100	—	—	1	79
		—	—	1	N.R.
H ₂	<100	3	3C/55	1	29/52
H ₃	<100	4	29/52/52A/80/42D/85	*	*
I ₁	<100	1	6/47/53/54/75	*	*
I ₂	<100	1	53/77/83A/84	*	*
I ₃	<100	—	—	1	81/6
J ₁	<100	—	—	3	N.R.
J ₂	<100	4	3A	*	*

— = não reagiram na R.T.D., N.R. = não reagiram em 100 x RTD., * = não realizado por ser desnecessário.

⁶ "Egg Yolk emulsion concentrated" (Oxoid).

⁸ "Manitol salt agar de Chapman" (Difco).

⁷ "Selenite cystine broth" (B.B.L.).

⁸ "Tetrathionate broth" (B.B.L.).

⁹ "Brilliant green agar" (Difco).

¹⁰ "Desoxycholate citrate agar" (Difco).

¹¹ "Triple sugar iron agar" (Merck).

As 100 culturas de *Staphylococcus* isoladas, tanto em meio de Baird Parker quanto em meio de Chapman, submetidas aos testes de coagulase e DNase, revelaram os seguintes resultados:

coagulase (+) e DNase (+), 48 culturas;
coagulase (-) e DNase (+), 19 culturas;
coagulase (-) e DNase (-), 33 culturas.

A distribuição das 48 culturas coagulase e DNase positivas nas amostras e marcas, bem como a fagotipagem das mesmas, encontram-se no Quadro 1.

Nos filés de peixe examinados não foram encontradas salmonelas.

DISCUSSÃO

A percentagem de amostras contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva obtida (50%) foi semelhante à encontrada por Kalligeris (1964), que foi de 45%. Já Nickerson *et al.* (1962) encontraram a presença desse microrganismo em apenas duas amostras das 78 analisadas. Entretanto, esses autores não utilizaram métodos de enriquecimento.

A baixa percentagem de culturas coagulase positiva (48%) ocorreu devido à utilização do meio de Chapman, que não fornece uma diferenciação tão precisa entre *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, quando comparado com o meio de Baird-Parker. O teste de produção de DNase foi empregado para comprovar as características de *Staphylococcus aureus* (que são coagulase e DNase positivos).

Somente quatro amostras apresentaram contagens superiores a 100 *Staphylococcus* por grama, sendo que duas representavam amostras "E", uma a "C" e uma a "F", o que indica condições microbiológicas precárias das mesmas.

Quanto à fagotipagem, podemos notar, pelo Quadro 1, que o fagotipo 6/47/53/54/75 foi o mais encontrado em diferentes marcas.

A presença de *Salmonella*, como na grande maioria dos trabalhos sobre pescado congelado, não foi detectada em nenhuma amostra.

CONCLUSÕES

Conclui-se que as amostras de filés de pescado congelados examinados, de uma maneira geral, estão dentro dos padrões mínimos de higiene no que diz respeito à presença de *Staphylococcus* e *Salmonella*.

Apenas algumas fábricas deveriam melhorar as condições higiênico-sanitárias de manipulação dos filés em fábrica, considerando as contaminações observadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Dras. Ivone Suassuna e Anita Tibana, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelos exames das culturas suspeitas para *Salmonella*, e ao Dr. Jerome Langenegger, do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul, pela ajuda técnica prestada.

REFERÊNCIAS

- Allison, V.D. 1949. Proc. Soc. Med. 42:216-220. (Citado por Fernandez 1967)
- Barros, G.C. & Robbs, P.G. 1975. Bacterimetria e colimetria de filés de pescado congelados coletados no Rio de Janeiro, Pesq. agropec. bras., Sér. Vet., 10:69-73.
- Blobel, H., Gonçalves, P.C., Markus, H.L. & Marjus, R. 1965. Técnicas de laboratório. Introdução à pesquisa veterinária. Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 51-54.
- Campello, F. 1970. Bacteriologie des produits de la mer congelés. Revue Générale du Froid, 11:1445-1459.
- Custot, S.F. 1968. Bulletin D'information Laboratoire Coopératif, 63:4-24. (Citado por Campello 1970)
- Dack, G.K. 1962. Food poisoning. Univ. Chicago Press, Chicago. (Citado por Fernandez 1967)
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H. 1955. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publ. Co., Minneapolis 15, Minnesota. 179 p.
- Elliot, R.P. & Michener, H.D. 1961. Microbial standards and handling codes for chilled and frozen foods. A review. Microb. Proc. Repport. 9(5):452-467.
- Fernandez, G.S. 1967. Enterotoxinas estafilocócicas. An. Fac. Vet. Leon, Oviedo, Espanha, 13:21-45.
- Hobbs, B. 1970. Higiene y toxicologia de los alimentos. Acríbia, Zaragoza, Espanha. 310 p.
- Jay, J.M. 1970. Modern food microbiology. Van Nostrand Reinhold Co., New York. 328 p.
- Kalligeris, J. 1964. Contribution à l'étude bactériologique des filets de poisson congelé. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Veterinaire D'Alfort, Paris. 69 p.
- Mossel, D.A.A. & Quevedo, F. 1967. Control microbiológico de los alimentos. Cleiba, Lima, Peru. 98 p.
- Nickerson, J.T.R. & Goldblith, S.A. 1964. A study of the microbiological quality of haddock fillets and shucked, softshelled clams processed and marketed in the greater Boston area. J. Milk and Food Technol. 27:7-12.
- Nickerson, J.T.R., Silverman, G.J., Solberg, M., Ducan, D.W. & Joselow, M.M. 1962. Microbial analysis of commercial frozen fish sticks. J. Milk and Food Technol. 25:45-47.
- Tratcher, F.S. & Clark, D.S. 1968. Analisis microbiológico de los alimentos. Acríbia, Zaragoza, Espanha. 271 p.

ABSTRACT.- Robbs, P.G.; Barros, G.C.de; Solé-Vernin, C. [Study on the detection of *Staphylococcus* and *Salmonella* in frozen fish fillets in Rio de Janeiro area]. Estudo sobre a presença de *Staphylococcus* e *Salmonella* em filés de pescado congelados para consumo no Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1975) 10, 75-77 [Pt, en] UFRRJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26, Brazil.

A study of the sanitary quality of frozen fish fillets commercialized in Rio de Janeiro, Brazil, was carried out through the examination of 34 samples, representative of 10 commercial brands.

Among the examined samples, 17 (including eight commercial brands) presented *Staphylococcus* coagulase positive, but in only four, the counts were superior to 100 *Staphylococcus* cells per gram. Phage typing of the cultures of the isolated microorganisms showed the following types: 53, 6/47/53/54/75, 53/54, 3C/55, 29/52/52A/80/42D/84, 3A, 81, 81/6, 29/81, 79 e 29/52.

There was no detection of *Salmonella* in all the examined samples.

Additional index words: Phage typing, coagulase, DNase.