**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de
preparações (*sushi* e *sashimi*) a base de pescado cru
servidos em bufês na cidade de São Paulo.**

Fernanda de Oliveira Martins

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Saúde Pública.**

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Matté

São Paulo

2006

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de
preparações (*sushi* e *sashimi*) a base de pescado cru
servidos em bufês na cidade de São Paulo.**

Fernanda de Oliveira Martins

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública da Faculdade de
São Paulo da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.**

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Matté

São Paulo

2006

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

À minha mãe,

a verdadeira responsável por minha chegada até aqui.

Ao meu pai,

que, com certeza, estaria muito orgulhoso...

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria Helena Matté pela orientação, dedicação e também pela amizade desde o aprimoramento.

Ao Prof. Dr. Glavur Rogério Matté pela revisão e ajuda durante etapas de conclusão.

Aos membros da banca examinadora pelas produtivas observações durante o exame de qualificação e pré-banca.

Aos meus pais, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e por acreditarem em mim quando eu mesma duvidava.

Ao Marcio por sempre arranjar uma maneira de participar de tudo na minha vida, arrumando soluções mesmo antes de eu inventar os problemas...

À Milena por todos os ensinamentos, científicos e humanos, conselhos e pela grande amizade, desde 10 de março de 2003!

À Martha e Vandréa pela grande ajuda e amizade, além das muitas risadas dentro e fora do laboratório.

À Sosô, Tiago, Rosinha, RONALDA, Lívia e Lícia pelo apoio profissional e pessoal, além de terem tornado o ambiente de trabalho mais alegre.

Ao Shamyrr por tornar as aulas da disciplina obrigatória mais agradáveis e pela grande ajuda com a análise estatística desta pesquisa.

Aos meus amigos do curso de Nutrição: Patrícia, Larissa, Luciana, Vinícius, Valesca e Daniela por tornarem as aulas noturnas mais divertidas e por terem compreendido minha correria sob a justificativa: “tenho que terminar umas coisinhas do mestrado”.

A todos os meus verdadeiros amigos, que estiveram sempre me ajudando e torcendo pelo sucesso na conclusão desta dissertação.

Ao Centro Colaborador em Vigilância Sanitária/Faculdade de Saúde Pública (CECOVISA/USP) Convênio CA nº06/99-44-ANVS/MS, processo nº2001.1.1048.6.9 pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Martins FO. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (*sushi* e *sashimi*) a base de pescado cru servidos em bufês na Cidade de São Paulo.** 2006
[Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

Introdução. Doenças de origem alimentar são causadas por organismos que entram no corpo humano através da ingestão de alimentos contaminados. O pescado pode veicular uma variedade de microrganismos patogênicos para o homem, aumentando a preocupação com a qualidade sanitária de peixes e suas preparações devido a globalização do consumo de peixe cru. **Objetivo.** Avaliar a qualidade microbiológica de *sushis* e *sashimis* servidos em restaurantes de auto-serviço na cidade de São Paulo, e estabelecer a relação entre os resultados e a forma com que estes pratos são apresentados aos consumidores. **Métodos.** Vinte amostras de diferentes estabelecimentos foram submetidas a análises microbiológicas, de acordo com a American Public Health Association (APHA) para coliformes termotolerantes, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* e espécies de *Aeromonas*. **Resultados.** Das amostras estudadas, 50% apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira RDC 12/2001. *Escherichia coli* foi observada em 45% das amostras, 15% das amostras tinham contagem de *S. aureus* acima do limite e, em 35%, espécies potencialmente patogênicas de *Vibrio* foram isoladas. *Aeromonas* e *Bacillus cereus* foram obtidos de 75% e 15% das amostras respectivamente e *Salmonella* não foi isolada nas amostras estudadas. **Discussão.** Levando em conta o potencial patogênico dos microrganismos isolados das amostras, considera-se que o consumo de *sushi* e *sashimi* pode representar um fator de risco para a saúde pública.

Descritores: saúde pública, vigilância sanitária, segurança alimentar, microbiologia de alimentos, pescado cru, *sushi* e *sashimi*.

ABSTRACT

Martins FO. **The evaluation of sanitary conditions of raw fish based preparations (*sushi* and *sashimi*) served in buffet in the city of São Paulo.** 2006 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

Introduction. Foodborne diseases are those caused by organisms entering the human body through the ingestion of contaminated food. Fish can carry a variety of pathogenic microorganisms increasing the concern with the sanitary quality of fish and its preparations due to the globalization of raw fish consumption. **Objective.** To evaluate microbiologic quality of *sushi* and *sashimi*, served in self service restaurants in the city of São Paulo and to establish the relationship between the results and the form in which the dish is presented to consumers. **Methods.** Twenty samples, from different establishments were subjected to microbiological analysis according to the American Public Health Association (APHA) for thermo-tolerant coliform bacteria, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Aeromonas* species. **Results.** From the studied food samples, 50% presented counts of thermo-tolerant coliform above the limits established by the Brazilian Legislation RDC 12/2001. *Escherichia coli* was observed in 45% of the samples, 15% of the samples had *S. aureus* counts above the limits and in 35% potentially pathogenic species of *Vibrio* were recovered. *Aeromonas* and *Bacillus cereus* were obtained from 75% and 15% of the samples respectively and *Salmonella* was not recovered from the samples studied. **Discussion.** Taking into account the pathogenic potential of the microorganisms isolated from the samples, one can consider that the consumption of *sushi* and *sashimi* dishes can pose a public health risk.

Describers: Public Health, sanitary surveillance, food safety, food microbiology, raw fish, *sushi* and *sashimi*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Serviços de bufê	4
1.2 Pescado	6
1.2.1 O mercado de pescado.....	7
1.2.2 Consumo de pescado cru	9
1.2.3 Pescado como veiculador de microrganismos	11
1.3 Microrganismos em alimentos	15
1.3.1 Microrganismos indicadores: Coliformes termotolerantes.....	16
1.3.2 <i>Escherichia coli</i>	17
1.3.3 <i>Staphylococcus</i> spp	20
1.3.4 <i>Salmonella</i> spp.....	22
1.3.5 <i>Vibrio</i> spp	25
1.3.6 <i>Bacillus cereus</i>	29
1.3.7 <i>Aeromonas</i> spp.....	31
1.4 Surto e casos de DTAs	34
1.4.1 Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	37
1.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	39
1.4.3 <i>Salmonella</i> spp.....	39
1.4.4 <i>Vibrio</i> spp	42
1.4.5 <i>Bacillus cereus</i>	46
1.4.6 <i>Aeromonas</i> spp.....	46
1.5 Padrões Microbiológicos para alimentos.....	48
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos Específicos	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1 Amostragem.....	54
4.2 Coleta e Preparo das Amostras para Análise	54
4.3 Isolamento dos microrganismos e identificação fenotípica.....	55

4.3.1 Pesquisa de Coliformes e <i>E. Coli</i>	56
4.3.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp	58
4.3.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	60
4.3.4 Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp	62
4.3.5 Pesquisa de <i>Bacillus cereus</i>	64
4.3.6 Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp.....	66
4.4 Identificação molecular	66
4.4.1 Extração do DNA genômico pelo método descrito por MATTÉ et al. (2006b)	67
4.4.2 Extração do DNA genômico pelo método descrito por CHAPMAN et al. (2001)	68
4.4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	69
4.4.3.1 PCR para confirmação da espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	69
4.4.3.2 PCR para confirmação de <i>Salmonella</i> spp, <i>S. Enteritidis</i> e <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	69
4.4.4 Eletroforese em gel de agarose	70
4.4.4.1 Eletroforese em gel para espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	71
4.4.4.2 Eletroforese em gel para gênero <i>Salmonella</i>	71
4.5 Análise estatística dos resultados	72
4.6 Aspectos Éticos	72
5. RESULTADOS.....	73
5.1 Características dos estabelecimentos e forma de apresentação dos alimentos .	73
5.2 Qualidade microbiológica.....	77
5.2.1 Resultado da análise quantitativa de coliformes termotolerantes e qualitativa de <i>Escherichia coli</i>	77
5.2.2 Resultado da análise de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
5.2.3 Resultado da análise de <i>Salmonella</i> spp.....	81
5.2.4 Resultado da análise de <i>Vibrio</i> spp	81
5.2.5 Resultado da análise de <i>Bacillus cereus</i>	82
5.2.6 Resultado da análise de <i>Aeromonas</i> spp.....	83
5.2.7 Resultado geral.....	83
5.3 Análise estatística dos dados.....	85

6. DISCUSSÃO	88
6.1 Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	89
6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	92
6.3 <i>Salmonella</i> spp.	94
6.4 <i>Vibrio</i> sp.....	94
6.5 <i>Bacillus cereus</i>	96
6.6 <i>Aeromonas</i> sp.....	96
6.7 Interação entre os microrganismos.....	98
6.8 Resultado geral.....	99
7. CONCLUSÕES	102
8. RECOMENDAÇÕES.....	104
9. REFERÊNCIAS	105

ANEXOS

Anexo 1 - Glossário da culinária nipônica.....	Anexos I
Anexo 2 - Forma de preparo de <i>sushis</i>.....	Anexos IV

LISTA DE QUADROS

Introdução

Quadro 1.1. Número de casos confirmados, óbitos e letalidade para cólera. Brasil, 1991 a 2004.....	44
Quadro 1.2. Quantidade de microrganismos tolerada para pratos prontos para o consumo a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi etc.), segundo RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.....	49
Quadro 1.3. Quantidade de microrganismos tolerada para pratos prontos para o consumo a base de cereais, farinhas, grãos e similares; saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho, exceção das adicionadas de molho de maionese e similares, segundo RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001.....	49

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1.1. Número de surtos e casos de DTAs, no Estado de São Paulo, notificados ao CVE, segundo agente etiológico, em 2003.....	36

Resultados

Tabela 5.1. Resultado da análise microbiológica de <i>sushi</i> e <i>sashimi</i> de cada amostra analisada, São Paulo, 2006.....	84

Tabela 5.2. Resultados (p^*) do teste t de Student, para contagem de microrganismos nas amostras, segundo tipo de estabelecimento (especializado ou não especializado), forma de exposição dos alimentos no bufê (sob refrigeração ou à temperatura ambiente) e composição dos <i>sushis</i> e <i>sashimis</i> (peixe, arroz e alga ou demais ingredientes).....	86

Tabela 5.3. Resultados (pr^*) do teste <i>qui</i> quadrado (χ^2), para contagem acima do estabelecido pela RDC nº12 (BRASIL 2001) ou presença de microrganismos nas amostras, segundo tipo de estabelecimento (especializado ou não especializado), forma de exposição dos alimentos no bufê (sob refrigeração ou à temperatura ambiente) e composição dos <i>sushis</i> e <i>sashimis</i> (peixe, arroz e alga ou demais ingredientes).....	86

Tabela 5.4. Resultados (r^*) do teste de correlação linear de Pearson, para contagem ou presença de microrganismos em amostras de <i>sushi</i> e <i>sashimi</i> , São Paulo, 2006.....	87

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.1.** Casos autóctones confirmados de febre tifóide, na área metropolitana de São Paulo e no Estado de São Paulo, notificados ao CVE, de 1960 a 2004..... 41
- Figura 1.2.** Número de óbitos notificados ao CVE, no Estado de São Paulo, em decorrência da febre tifóide, de 1980 a 2004..... 42

Materiais e Métodos

- Figura 4.1.** Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de Coliformes e *Escherichia coli*..... 57
- Figura 4.2.** Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de *Staphylococcus* spp..... 59
- Figura 4.3.** Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa qualitativa de *Salmonella* spp..... 61
- Figura 4.4.** Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de *Vibrio* spp e pesquisa qualitativa de *Aeromonas* spp..... 63
- Figura 4.5.** Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de *Bacillus cereus*..... 65

Resultados

- Figura 5.1.** Exemplo de exposição de *sushis* nos estabelecimentos amostrados..... 75
- Figura 5.2.** Forma de conservação dos *sushis* e *sashimis*, segundo o tipo de estabelecimento (especializado ou não na culinária nipônica), São Paulo, 2006..... 76
- Figura 5.3.** Número de amostras de *sushi* e *sashimi* contaminadas por coliformes termotolerantes, segundo quantidade, em NMP/g, e tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica), São Paulo, 2006... 78
- Figura 5.4.** Número de amostras de *sushi* e *sashimi* contaminadas por *Escherichia coli*, segundo o tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica), São Paulo, 2006..... 78

Figura 5.5. Resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase de amostras identificadas por métodos bioquímicos, utilizando os iniciadores correspondentes a regiões específicas dos genes 16S rRNA das espécies de <i>Staphylococcus</i> , segundo MASON et al. (2001). Corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo.....	80
Figura 5.6. Número de amostras de <i>sushi</i> e <i>sashimi</i> contaminadas com <i>Staphylococcus aureus</i> , segundo o tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica) e contagem do microrganismo, São Paulo, 2006.....	81
Figura 5.7. Número de amostras de <i>sushi</i> e <i>sashimi</i> contaminadas com <i>Bacillus cereus</i> , segundo o tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica), São Paulo, 2006.....	82

1. INTRODUÇÃO

Nunca na história os alimentos foram tão abundantes, variados e disponíveis quanto na atualidade, e um dos temas mais frequentemente discutidos mundialmente refere-se à segurança alimentar, em que o produto deve ser seguro para quem o produz, consome e para o meio ambiente (CDC 2003; SPERS 2003). Durante anos, o desenvolvimento na produção de alimentos e a recente preocupação com a qualidade* têm contribuído para a produção, em muitos países, de alimentos seguros, sendo uma medida eficiente de prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Contudo, o número de problemas relacionados a alimentos permanece ainda significativo, como o alto índice de doenças de origem alimentar, e que vem aumentando durante as últimas décadas (SCHLUNDT 2002).

Alimento é definido, pela legislação brasileira, como “toda substância ou mistura de substâncias, no estado sólido, líquido, pastoso ou qualquer outra forma adequada, destinada a fornecer ao organismo humano os elementos normais à sua formação, manutenção e desenvolvimento” (BRASIL 1969).

Doenças de origem alimentar são, segundo a Organização Mundial de Saúde, aquelas, de origem infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos (WHO 2002b). Todas as pessoas correm risco de ter uma doença de origem alimentar, sendo que indivíduos mal nutridos, imunodeficientes, crianças e idosos estão entre os mais suscetíveis (SCHLUNDT 2002).

---

*Qualidade, segundo a *International Standard Organization* (ISO), refere-se à totalidade das características de um produto ou serviço que suportam a sua capacidade para satisfazer necessidades especificadas ou implícitas (ISO 2006).

Patógenos de origem alimentar são numerosos e têm muitas maneiras de entrar na cadeia do alimento, o que torna a prevenção de doenças muito complexa. Muitos deles são encontrados em alimentos de origem animal, incluindo gado, aves e pescados. Embora tais animais possam parecer saudáveis, a carne, ovos, leite, ou outros produtos derivados desses podem estar contaminados com *Escherichia coli*, *Salmonella*, ou outros patógenos. Produtos frescos como frutas e vegetais também podem ser fontes de infecção se forem contaminados no campo ou após a colheita. Além disso, muitos patógenos são propagados aos alimentos por pessoas infectadas que os manipulam. A produção de alimento seguro e aplicação de boas práticas de preparação em toda a indústria alimentícia podem reduzir o risco de contaminação (CDC 2003).

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando um indivíduo contrai uma doença devido à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis; condição denominada toxinfecção alimentar. Muitos casos de enfermidade causados por alimentos não são notificados aos órgãos de inspeção ou agências de saúde, pois seus sintomas são geralmente brandos e a vítima não busca auxílio médico (FORSYTHE 2002). Além disso, certas sociedades não associam a diarreia, por exemplo, a um sintoma de doença, mas a ocorrências naturais não relacionadas à contaminação do alimento, tais como: indigestão, excesso de condimentos e superstição (MOTARJEMI & KÄFERSTEIN 1997). Esse desconhecimento sobre a origem das DTAs faz com que muitos consumidores subestimem a frequência das sérias consequências de se ingerir um alimento contaminado (HANASHIRO 2002).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) constituem um problema mundial de saúde pública e, durante as última décadas, vêm aumentando em muitas partes do mundo (KRUSE 1999; TAUXE 2002). Diversos fatores colaboram com o aumento global de DTAs, entre eles, viagens e negócios internacionais, mudanças de hábito alimentar e fluxo de pessoas entre estados e países. Essa globalização tem sido responsabilizada por surtos de DTAs em consequência do transporte de patógenos em alimentos que atravessam fronteiras (KRUSE 1999).

Mais de 250 diferentes doenças de transmissão alimentar têm sido relatadas, apresentando diferentes sintomas. Entretanto, o patógeno e/ou toxina entram no corpo através do trato gastrintestinal, onde, freqüentemente, provocam os primeiros sintomas como náusea, vômito, dor abdominal e diarreia, comuns às DTAs. Em alguns casos, as manifestações clínicas só ocorrem após um longo período de exposição, o que, associado à etiologia multifatorial, faz com que estas não figurem nas estatísticas como DTAs (MEAD et al. 1999; CDC 2005a).

Embora a diarreia seja o sintoma mais comum de DTA, outras sérias consequências, incluindo problemas nos rins e fígado, desordens neurológicas e até morte, podem ocorrer (SCHLUNDT 2002).

A real incidência das DTAs não é conhecida. Apenas poucos países têm estabelecido um sistema de notificação de DTAs. A OMS estima que a incidência de DTA relatada seja menor que 1% da real (HUSS et al. 2000; SCHLUNDT 2002).

Além disso, surtos de DTAs não são bem documentados na literatura científica, já que normalmente a publicação destes precisa satisfazer pré-requisitos como: grande número de pessoas afetadas ou epidemia, patógeno incomum ou

emergente, ocorrência de um tipo incomum (sorotipo ou ribotipo) do patógeno ou um novo ou incomum alimento envolvido (REIJ & DEN AANTREKKER 2004).

Os manipuladores de alimentos, ou seja, todas as pessoas que podem entrar em contato com um produto comestível em qualquer etapa da cadeia alimentar, têm papel importante para a qualidade das preparações. A saúde e higiene destes profissionais são fundamentais para garantir um alimento seguro (GERMANO 2002; REIJ & DEN AANTREKKER 2004).

A necessidade de apropriadas medidas de base científica para descrever e controlar o problema de DTAs tem sido reconhecida por entidades internacionais como *World Health Organization* (WHO), *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *Codex Alimentarius*. Essas organizações estão envolvidas no desenvolvimento de sistemas de análise de risco que objetivam a proteção ao consumidor e facilitar o comércio de alimentos (KRUSE 1999). Hoje, segurança alimentar é um dos onze tópicos prioritários da Organização Mundial de Saúde (SCHLUNDT 2002).

As doenças transmitidas por alimentos representam uma contínua ameaça para todos os segmentos da sociedade, independente da idade, sexo, estilo de vida, etnia e nível socioeconômico (CDC 2003).

1.1 Serviços de bufê

Bufê é definido, segundo ROCHA & PIRES (1997), como sendo “mesa ou balcão onde se colocam as comidas e bebidas em festa ou banquete”. Este aparato é amplamente utilizado em restaurantes comerciais e em eventos. O serviço tipo bufê é caracterizado pela informalidade, pois os próprios clientes se servem das iguarias que

ficam expostas, à sua disposição. Nesse tipo de serviço os alimentos ficam expostos durante horas, principalmente se as quantidades forem grandes e não houver reposição freqüente das preparações (GARCIA 2002).

GARCIA (2002) alerta que deve-se utilizar para alimentos frios como saladas, carpaccio, *sushi*, antepastos e sobremesas, balcão frigorífico e acompanhar rigorosamente a temperatura. O tempo de exposição não deve ser superior a 30 minutos em temperatura na faixa de risco (entre 28 e 35°C) e, assim, as porções não consumidas devem ser desprezadas e substituídas por outras recém preparadas.

Segundo as legislações pertinentes ao Estado e Cidade de São Paulo, na fase de distribuição, os alimentos frios podem permanecer expostos por até 4 horas se mantidos até 10°C. Em temperaturas entre 10 e 21°C só podem permanecer na distribuição por 2 horas, e se ultrapassarem estes limites de tempo e temperatura devem ser desprezados (SÃO PAULO 1999; SÃO PAULO 2003).

As temperaturas baixas podem diminuir o metabolismo bacteriano, inibindo a multiplicação destes e contribuindo para a conservação dos alimentos. A refrigeração, porém, não pode ser considerada como um processo bactericida pois muitos patógenos se multiplicam na temperatura de refrigeração, como *Salmonella* sp a 6°C, *Vibrio cholerae* a 5°C e *Bacillus cereus* a 5°C (SILVA JR. 2002).

Alimentos expostos durante as etapas de distribuição e exposição ao consumo devem estar devidamente protegidos contra poeira, insetos e outras pragas urbanas (SÃO PAULO 2003).

1.2 Pescado

Pescado é um termo genérico que engloba peixes e frutos do mar, incluindo crustáceos, moluscos, anfíbios e quelônios, de todas as águas -doce e salgada, quente e fria, destinados à alimentação (BRASIL 1952). Segundo a Portaria nº185 (BRASIL 1997), peixes são animais aquáticos de sangue frio, excluídos os mamíferos aquáticos, animais invertebrados e os anfíbios. Peixe fresco é definido como aquele conservado somente pelo resfriamento a uma temperatura próxima a do ponto de fusão do gelo (BRASIL 1997).

Em geral, a biota microbiana do pescado é reflexo da água onde vive, ou seja, da natureza do habitat e variação da temperatura. A microbiota normal é geralmente encontrada em três regiões: no muco interno, nas guelras e no intestino. Os tecidos internos de um peixe saudável são estéreis, sendo que a contaminação nestes é indício de manipulação sem os devidos cuidados. Baixos índices de contaminantes encontrados nas guelras e na pele são comumente associados às águas limpas e frias, e os índices mais elevados às águas tropicais, subtropicais e áreas poluídas (WARD 1994; JAY 2000; CARDOSO et al. 2003; MORITA 2005). Patógenos ou indicadores de poluição fecal são raramente encontrados nos pescados recém-capturados. Após captura, a microbiota inicial é alterada pelo transporte, manipulação, contato com gelo, superfície e equipamentos, estocagem e comercialização (CARDOSO et al. 2003).

O pescado é uma fonte de proteína tão importante para o homem quanto a carne bovina e com, aproximadamente, 60% menos calorias (HANASHIRO 2002). Pescados correspondem a 5,6% do total de proteína e a 15,6% do total de proteína animal consumida mundialmente (CATO 1998). Além disso apresenta teor

satisfatório de vitaminas e minerais e, devido à quantidade mínima de tecido conjuntivo, os peixes são de alta digestibilidade (FRANCO & LANDGRAF 2003; HOLUB & HOLUB 2004; BAUTISTA & ENGLER 2005). Dentre os produtos cárneos, o pescado é tido como o mais suscetível às alterações devido algumas características intrínsecas. A presença de proteínas de alto valor biológico, atividade de água elevada e pH próximo à neutralidade favorecem o desenvolvimento microbiano; o teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e ação dos sucos digestivos e enzimas dos tecidos promovem deterioração química do alimento (OETTERER 1991; HANASHIRO 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003; PHILIPPI 2003).

1.2.1 O mercado de pescado

Peixes e outros frutos do mar representam um terço do consumo mundial de proteína (DIAZ 2004) e em muitos países, principalmente da Europa e da Ásia, o pescado é a principal proteína animal consumida (HUSS et al. 2000).

Desde o final da Segunda Guerra Mundial, em 1945, o consumo de pescado vem aumentando ano após ano. A produção mundial de pescado cresceu de 19 milhões de toneladas em 1950, para 39 milhões em 1961 e mais de 130 milhões em 2001. Isto representa um crescimento anual contínuo de 3,84% por cinquenta anos (FAO 1999; WIEFELS 2003; FAO 2005).

Considerando somente os tipos de carne, no ano 2000 foram produzidas 130,5 milhões de toneladas de produtos pesqueiros no mundo, dos quais 74% foram destinados ao consumo humano direto. Este número supera qualquer tipo de carne proveniente do ambiente terrestre (WIEFELS 2003). O Brasil produzia 150 mil

toneladas de pescados em 1950 e no ano de 2003 produziu mais de 1 milhão de toneladas (FAO 1999; FAO 2005). Hoje é o 25º maior produtor de pescado (FRITSCH 2004), e sua produção vem crescendo. Segundo LOVSHIN & CYRINO (1998), o Brasil tem potencial para se tornar o maior produtor de pescado cultivado no mundo.

Assim como a produção, o consumo anual *per capita* de produtos pesqueiros está também aumentando, de cerca de 9 quilos em 1961 para mais de 15 quilos em 1999. Estima-se que em 2020 o consumo mundial anual de pescado chegue a 30 quilos por pessoa. No Brasil o consumo é de 6,5 quilos por pessoa por ano (WIEFELS 2003).

O consumo *per capita* relativamente pequeno no Brasil pode ser explicado pela composição da população brasileira, de diversas origens e, portanto, tradições; e por um deficiente sistema de distribuição. O custo relativamente elevado dos pescados para os brasileiros também colabora para um menor consumo, mas não é o principal fator, já que as espécies mais consumidas no Brasil são importadas e caras, como bacalhau norueguês, merluza argentina e salmão chileno (WIEFELS 2003).

A partir de 1991 observa-se um relativo estacionamento da quantidade de processamento de produtos pesqueiros e um crescimento no consumo de pescado fresco (WIEFELS 2003).

O pescado fresco comercializado na região de São Paulo é proveniente de cidades do litoral paulista, como Santos, e de estados como Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. Além desses, outros estados e países também contribuem. Uma parte dos pescados que chega à São Paulo é levada para ser vendida no Centro de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo

(CEAGESP), e outra parte é distribuída diretamente às peixarias, restaurantes e supermercados (RUIVO & POLLONIO 1998).

1.2.2 Consumo de pescado cru

Sushi e *sashimi* são alimentos típicos da culinária nipônica, a base de pescado cru, e/ou arroz japonês e/ou alga marinha, preparados manualmente. Estes pratos estão tornando-se populares, também, em outros países além do Japão (YANO et al. 2004; HAMADA-SATO et al. 2005; WATANABE et al. 2005).

O hábito de ingerir peixes, em especial crus, é de introdução recente no cardápio dos estabelecimentos de alimentos, em São Paulo e outras cidades brasileiras, e vem aumentando nos últimos anos (RUIVO & POLLONIO 1998; MATTÉ et al. 2006a). RESENDE (2004) relata que o consumo de pratos típicos da culinária japonesa cresceu, em Brasília-DF, 20% entre 2001 e 2002.

Segundo o Sindicato de Hotéis, Restaurantes, Bares e Similares, atualmente, em São Paulo, há mais restaurantes japoneses do que churrascarias. Nos últimos cinco anos ocorreu uma explosão de *sushi*-bares em São Paulo. Espalhados pelos mais variados bairros, contabilizam cerca de 600 estabelecimentos, que servem uma média de 12 milhões de *sushis* por mês, o que equivale a 278 por minuto. O número de restaurantes nipônicos em São Paulo cresceu mais de sete vezes desde 1993, quando somavam 80 (CANECHIO 2003; CUTOLO et al. 2006). Na hora do almoço muitas casas funcionam em sistema de rodízio ou bufê, na categoria dos *fast food* o que aumenta sua popularização.

As lojas especializadas em *sushi* e *sashimi*, anteriormente restritas a regiões onde predominavam imigrantes asiáticos, como o bairro da Liberdade em São Paulo,

tornaram-se comuns, estando presentes em quase todos os *shoppings*, na categoria dos *fast food* e havendo também lojas especializadas de entrega em domicílio (*delivery*).

Os paulistanos, tradicionais apreciadores de churrasco, arroz, feijão e massa encontram, desde 1995, um farto bufê de pescados e suas preparações em churrascarias, evidenciando claramente uma incorporação de novos hábitos (RUIVO & POLLONIO 1998).

Tais iguarias são também encontradas em restaurantes comerciais de auto-serviço por quilo ou rodízio. Como estes estabelecimentos não são especializados na culinária oriental, em alguns casos os *sushi* e *sashimi* são preparados com os mesmos utensílios e pelos mesmos funcionários que manipulam os demais alimentos, aumentando o risco de contaminação do pescado cru. Além disso, os estabelecimentos nem sempre oferecem adequadamente o alimento, no que se refere à temperatura, local e tempo de exposição; oferecendo grande risco à saúde de quem o consome.

Com o crescente mercado de *sushis*, aumentou também a forma de preparação e os ingredientes utilizados nestes pratos. Preparações que antes incluíam apenas peixes, arroz e alga; estão sendo montadas utilizando frutas e legumes. Porém, os pescados crus ainda são presença obrigatória em pratos japoneses. Os mais utilizados são o atum, o salmão, namorado, o cara-pau, o camarão e as lulas (MATTÉ et al. 2006a).

Com a crescente popularização do consumo de peixe cru (*sushi* e *sashimi*) aumenta a preocupação com a qualidade higiênico-sanitária dos pescados e de suas

preparações, uma vez que pescados crus são veículos de agentes causadores de toxinfecções alimentares.

1.2.3 Pescado como veiculador de microrganismos

O pescado pode ser veiculador de uma variedade de microrganismos patogênicos para o homem, sendo grande parte fruto da contaminação ambiental. O lançamento de esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e no mar, contamina os pescados, oferecendo riscos a quem os consome. Outra fonte de contaminação importante é o manejo do pescado, desde a captura, ainda nos barcos pesqueiros, até sua destinação final, passando por fases de processamento e transporte (HUSS et al. 2000; SCHLUNDT 2002; REIJ & DEN AANTREKKER 2004; HAMADA-SATO et al. 2005; BASTI et al. 2006). Na Coreia e Japão, peixes e frutos do mar são os principais veículos de transmissão de doenças de origem alimentar (LEE et al. 1996).

Algumas bactérias patogênicas estão presentes naturalmente na água (espécies patogênicas de *Vibrio*, *Aeromonas*) e no ambiente (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*). Estes patógenos podem, portanto, também ser encontrados em peixes vivos e em seu material cru (HUSS et al. 2000; BASTI et al. 2006).

A contaminação pré-captura com patógenos de reservatórios animal/humano (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, vírus entéricos) pode oferecer risco, pois em alguns casos uma dose infectante baixa é suficiente para provocar uma doença (1-10 células para alguns sorotipos de *Shigella* e *Salmonella*, uma partícula infecciosa para vírus Norwalk). A cocção de alimentos com esta contaminação elimina o risco destes patógenos, sendo que a principal preocupação com segurança se relaciona ao

consumo destes crus, como nos casos de *sushi* e *sashimi* (HUSS et al. 2000; MILLARD & ROCKLIFF 2003; REIJ & DEN AANTREKKER 2004).

Manipuladores de alimentos devem ser cuidadosos no manuseio de peixes recém-capturados, já que os microrganismos presentes na superfície, guelras e vísceras do animal podem contaminar a carne durante a manipulação (MORITA 2005).

Dentre os microrganismos de maior importância no controle da qualidade de pescados destacam-se os do gênero *Vibrio*. *V. parahaemolyticus* é comumente encontrado na água do mar, principalmente nas regiões costeiras, e causa no homem gastroenterite aguda, em geral após o consumo do peixe *in natura*. *V. cholerae*, de origem humana, atinge as águas do mar, rios e lagos através do despejo de esgotos, e é responsável por pandemias. Ostras, mariscos, caranguejos e peixes *in natura* são veículos naturais do *V. cholerae* (MATTE et al. 1994; BARBONI 2003; MATTE 2003; BASTI et al. 2006).

Destacam-se também as bactérias do gênero *Salmonella*, encontradas em águas poluídas por esgotos ou por excretas animais. Como consequência direta da manipulação inadequada é apontado o *Staphylococcus aureus*, de origem humana, encontrado nas mucosas e superfície da pele, e que encontra, no pescado, ambiente favorável para sua multiplicação (FRANCO & LANDGRAF 2003; BASTI et al. 2006).

Outros agentes bacterianos podem, também, contaminar o pescado e causar risco à saúde. Cepas psicrótróficas de *Bacillus cereus* produzem enterotoxinas nos preparados de peixe, sobretudo em pH superior a 6,0, acarretando surtos de diarreia. Coliformes fecais, *Escherichia coli* e *Aeromonas* spp podem ser encontrados em

peixes frescos ou congelados, frutos do mar e produtos industrializados. Muitos destes microrganismos estão relacionados com a qualidade da água, principalmente do gelo utilizado na conservação, e/ou procedimento pós-captura (HUSS et al. 2000; SCHLUNDT 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003; MATTÉ 2004).

Prevenir a contaminação do pescado pré-captura é muito difícil ou impossível. O ambiente natural não pode ser modificado facilmente e os agentes causadores de doenças que ocorrem naturalmente (algumas bactérias patogênicas, parasitas, biotoxinas) estarão sempre presentes. Já a contaminação química e poluição fecal podem ser prevenidas, com o monitoramento das áreas de pesca, pela verificação de presença de algas tóxicas e de coliformes fecais e *Escherichia coli* (HUSS et al. 2000; REIJ & DEN AANTREKKER 2004).

Durante a preparação de vários pratos a partir de pescado, agentes patogênicos presentes no material cru podem ser eliminados ou sobreviverem e estarem presentes no produto final. Quando o produto é armazenado sob refrigeração, a preocupação concentra-se na sobrevivência e multiplicação de microrganismos psicotróficos. O tratamento com calor, como cocção, é eficiente na destruição de alguns patógenos, quando realizado sob temperatura e tempo adequados. Porém, o hábito de consumir pescados crus torna a prevenção de DTAs difícil ou até impossível (HUSS et al. 2000; HAMADA-SATO et al. 2005).

Contaminação adicional, com novos patógenos, também pode ocorrer nesta etapa de manipulação do alimento. Medidas preventivas incluem boas práticas de manipulação e programas eficazes de higiene e sanitização (HUSS et al. 2000).

Segundo REIJ & DEN AANTREKKER (2004), a recontaminação, ou seja, contaminação após preparo, é importante causa de surtos de DTAs. Em seu estudo,

afirmam que equipamentos e utensílios não limpos ou inadequadamente limpos são fontes de numerosos patógenos. Além disso, os manipuladores de alimentos e vetores como insetos, pássaros e roedores, são importantes transmissores de microrganismos (REIJ & DEN AANTREKKER 2004).

O número de casos de DTAs causados por pescados é geralmente baixo quando comparado aos causados por aves, laticínios e outras carnes. Entretanto, a importância do pescado como veiculador de patógenos depende de fatores como a dieta e forma de preparo. Assim, no Japão, onde o peixe é importante parte da dieta, sendo muitas vezes consumido cru, a proporção de DTAs oriunda de pescados é maior (HUSS et al. 2000).

Moluscos filtradores e peixes consumidos crus são produtos de alto risco, já que não há como obter completo controle de agentes patogênicos destes produtos. O consumo de pescados que sofreram cocção é mais seguro do ponto de vista microbiológico (MATTÉ 1993; HUSS et al. 2000).

No caso de iguarias como *sushi* e *sashimi*, preparadas manualmente, além da contaminação do pescado, o contato direto do alimento com as mãos pode levar ao aumento da incidência de patógenos como *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes (JAY 2000). Segundo SILVA et al. (2001), preparações muito manipuladas são consideradas de alto risco, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuem treinamento adequado. Além disso, preparações a base de pescado cru oferecem risco ainda maior à saúde pelo fato de não serem submetidos a tratamentos bactericidas como cocção (HUSS et al. 2000; HAMADA-SATO et al. 2005).

De acordo com HUSS et al. (2000), os consumidores devem ser informados dos riscos envolvidos no consumo de pescados crus.

1.3 Microrganismos em alimentos

Um alimento produzido ou manipulado com condições precárias de higiene pode oferecer risco à saúde de quem o ingere. Alguns microrganismos que podem contaminar o alimento são patogênicos, causando doenças em seu hospedeiro. Outros não causam enfermidades nos seres humanos, mas são indícios de condições higiênicas inadequadas, e sua presença sugere a existência de outros microrganismos patogênicos. Além disso, alguns microrganismos fazem parte da microbiota natural de peixes, mas, se ingeridos pelo homem, podem ocasionar doenças (BASTI et al. 2006).

As bactérias patogênicas geralmente não alteram a aparência, odor, nem sabor do alimento; portanto, na maioria das vezes é impossível saber se o alimento oferece risco em termos de contaminantes sem que se realize uma análise microbiológica, o que agrava os riscos de se consumir alimentos não seguros (JACOB 1989).

As DTAs são divididas, segundo FRANCO & LANDGRAF (2003), em dois grupos: intoxicações e infecções.

Intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas pré-formadas, produzidas por microrganismos como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (FRANCO & LANDGRAF 2003).

Infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos. Estes se aderem à mucosa do intestino humano, onde proliferam, colonizando-o. No caso de *Salmonella*, *Shigella*,

Escherichia coli invasora, *Yersinia enterocolitica* a bactéria invade a mucosa e penetra nos tecidos. Enquanto que *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni*, produzem toxinas dentro do trato gastrointestinal, o que altera o funcionamento normal das células epiteliais (FRANCO & LANDGRAF 2003).

1.3.1 Microrganismos indicadores: Coliformes termotolerantes

Coliformes totais e coliformes termotolerantes são grupos de bactérias indicadoras de contaminação utilizados na avaliação da qualidade sanitária de alimentos. A pesquisa destes microrganismos, como indicadores, deve-se ao fato de terem detecção e enumeração mais rápidas e com menor custo do que a pesquisa de cada patógeno (JAY 2000; MEAYS et al. 2004; WEBSTER et al. 2004).

Os coliformes são um grupo de bactérias em forma de bastonetes, Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não esporogênicas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Distribuídos amplamente na natureza, esses microrganismos são encontrados no solo, água, plantas e no trato intestinal de seres humanos e animais (KONEMAN et al. 2001; SILVA et al. 2001; FORSYTHE 2002).

O grupo dos coliformes totais é composto por bactérias, entéricas ou não, da família *Enterobacteriaceae*, predominando os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Como a maioria destes é encontrada no ambiente, onde permanecem tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal, a presença de coliformes totais num alimento não indica, necessariamente a contaminação fecal recente. Portanto, a contagem de coliformes termotolerantes

fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (JAY 2000; FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Coliformes termotolerantes é um subgrupo de coliformes totais, definidos como aqueles capazes de continuar fermentando lactose com produção de gás, no período de 48 horas, quando incubados à temperatura de 45,5°C. Este grupo inclui pelo menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais os dois últimos incluem também cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a pesquisa de coliformes termotolerantes em alimentos é menos eficiente do que a pesquisa direta de *E. coli*. (SILVA et al. 2001; FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, *Escherichia coli* - componente natural da flora intestinal humana- é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais, sendo o melhor indicador de contaminação fecal conhecido (SILVA et al. 2001).

A ocorrência de números elevados de organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em alimentos frescos de origem animal, pode indicar falhas de higiene durante a manipulação e/ou armazenamento inadequado. E a contagem de coliformes termotolerantes indica a possibilidade da presença de microrganismos patogênicos entéricos (SILVA et al. 2001; FRANCO & LANDGRAF 2003).

1.3.2 *Escherichia coli*

Bactéria anaeróbia facultativa que faz parte da flora intestinal de animais de sangue quente. É bacilo gram-negativo, não esporulado, capaz de fermentar a glicose com a produção de ácido e gás, pertencente à família *Enterobacteriaceae*.

A presença de *E. coli* em alimentos pode ter dois significados. Primeiro, por ser uma enterobactéria, uma vez no alimento indica contaminação de origem fecal, apontando condições higiênicas insatisfatórias. Por outro lado, diversas linhagens de *E. coli* são patogênicas para o homem, e não devem estar presentes nos alimentos (FRANCO & LANDGRAF 2003).

As linhagens patogênicas de *E. coli* são agrupadas em cinco categorias (FRANCO & LANDGRAF 2003; ANVISA 2004).

1. EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica): adere à mucosa do intestino e destrói as microvilosidades das células epiteliais intestinais. São dezenas de sorotipos de *E. coli* não produtoras de enterotoxinas e não invasoras, que provocam dores abdominais, vômitos, febre e diarreia grave, associada à má absorção e desnutrição. Os sintomas aparecem de 17 a 72 horas após o contato com o patógeno e duram de seis horas a três dias.
2. EIEC (*E. coli* enteroinvasora): invade o eritrócito e rompe-o após multiplicar-se. Dá sequência à infecção ao invadir células vizinhas. A pessoa infectada apresenta, de oito a 24 horas após a ingestão do microrganismo, diarreia aquosa, cólicas abdominais, fezes com muco e sangue, febre e mal-estar geral.
3. ETEC (*E. coli* enterotoxigênica): adere à mucosa do intestino delgado e produz toxinas, que provocam diarreia aquosa normalmente acompanhada de febre, dores abdominais e náuseas. Em casos muito graves há desidratação, como ocorre na cólera. O período de incubação varia de oito a 44 horas.
4. EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica): neste grupo estão incluídas as cepas de *E. coli* produtoras de citoxinas. A *E. coli* O157:H7 é a mais conhecida e está relacionada à síndrome hemolítica urêmica, caracterizada por trombocitopenia,

anemia hemolítica e insuficiência renal aguda, além de dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta, com ausência de febre. O período de incubação varia de três a nove dias, e os sintomas duram de dois a nove dias. Os bovinos são reservatórios naturais da EHEC, sendo alimentos de origem animal, principalmente carne bovina, os principais veículos deste patógeno. Como a dose infectante é baixa, também é transmitida pessoa a pessoa.

5. EaggEC (*E. coli* enteroagregativa): sua patogenicidade parece estar relacionada com adesão à mucosa intestinal, principalmente do cólon. Alguns relatos indicam que são capazes de produzir toxinas. Sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada.

Infecções com *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 foram primeiramente descritas em 1982 e emergiu rapidamente como a maior causa de diarreia aguda, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU). São conhecidos casos esporádicos, geralmente associados com carne, na Austrália, Canadá, Japão, Estados Unidos, e vários países da Europa, e sul da África (WHO 2002a).

Em 1996, um surto de *E. coli* O157:H7 no Japão afetou mais de 6.300 crianças escolares e resultou em duas mortes. Foi o maior surto já registrado para este patógeno (WHO 2002a).

Em 18 de julho de 2001, o Laboratório Instituto Adolfo Lutz (IAL) notificou ao CVE o isolamento de *E. coli* O157:H7 em fezes sanguinolentas de uma criança de 1 ano e 9 meses, de Campinas, que apresentou, por sete dias, dor abdominal, cólicas, febre e diarreia com sangue. No dia seguinte, o IAL notificou outro caso com isolamento de *E. coli* O157:H7 em fezes, de um adulto de 20 anos de idade, com os seguintes sintomas: diarreia com sangue, dor abdominal e mal-estar. O alimento

provavelmente envolvido foi carne moída. As duas cepas isoladas foram submetidas, no IAL, à subtipagem, utilizando-se o método da eletroforese em campo pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Como as cepas apresentaram o mesmo perfil genético, trata-se, provavelmente, de uma fonte alimentar comum entre os dois casos, configurando, assim, um surto por *E. coli* O157:H7. Esses dois casos somam-se a um outro, de um paciente de 18 anos residente no município de São Paulo, com diarreia e AIDS, a primeira cepa detectada pelo IAL, a partir de uma análise retrospectiva de cepas realizada em 1999, e isolada em 1990. Contabilizam-se, assim, três casos para o Estado de São Paulo. Há também o registro de isolamento da bactéria a partir de uma amostra de água de poço de um sítio em Parelheiros, São Paulo - SP, em 1997 (EDUARDO et al. 2003a; CVE 2004).

1.3.3 *Staphylococcus* spp

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, pertencentes à família *Micrococcaceae*. Algumas cepas produzem uma enterotoxina termoestável, responsável, no homem, pelos quadros de intoxicação alimentar (JABLONSKI & BOHACH 1997; FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são mesófilas com crescimento entre 7°C e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima de desenvolvimento. Enterotoxinas termorresistentes são produzidas em alimentos que permanecem neste intervalo de temperatura por tempo viável. Em temperatura ótima a enterotoxina se torna evidente em quatro a seis horas (FRANCO & LANDGRAF 2003; FDA 2005).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são habitantes usuais da pele, das membranas mucosas, do trato respiratório superior e do intestino do homem e animais. A partir destes as bactérias podem atingir ar, água, solo, leite, esgoto e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com infectados. Dessa forma, todos os alimentos ficam sujeitos à contaminação; e se os mesmos apresentarem boas condições para o crescimento do patógeno, serão uma fonte de intoxicação (FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

A espécie *S. aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não formadoras de esporos, e está entre as mais frequentemente associadas a surtos de intoxicações, devido ao importante papel desempenhado pelos manipuladores durante o processamento dos alimentos, somado aos riscos de contaminação das matérias-primas desde sua origem (FRANCO & LANDGRAF 2003; FDA 2005).

A intoxicação em decorrência do *S. aureus* é provocada pela ingestão do alimento com a toxina pré-formada. O período de incubação médio é de duas a quatro horas, e os sintomas variam com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento e quantidade deste ingerido. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e sudorese, e a recuperação dá-se, na maior parte dos casos, em 24 a 48 horas (SILVA JR. 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Quando a contagem de *S. aureus* no alimento é superior a 10^4 células por grama, uma quantidade suficiente de enterotoxina pode ser produzida para causar intoxicação no consumidor (JAY 2000). Uma dose de toxina menor que $1\mu\text{g}$ no alimento contaminado é suficiente para provocar sintomas de intoxicação (FDA 2005).

S. aureus apresenta distribuição mundial, e estima-se que 20 a 60% da população humana possam ser portadoras da bactéria, nas vias nasais e na garganta, no cabelo e pele, sem apresentar qualquer tipo de doença (FDA 2005). Nestas circunstâncias, os portadores humanos, mesmo em condições normais de saúde, sempre representam risco quando lidam com alimentos, pois podem contaminá-los durante as diferentes fases de preparação, através das mãos e das secreções oronasais (FORSYTHE 2002).

A pesquisa de *S. aureus* em alimentos permite avaliar a qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, servindo como indicador de contaminação pós-processo (SILVA et al. 2001).

Produção de coagulase é uma importante característica utilizada na identificação de *S. aureus* (SILVA & SILVA 2005), portanto, a legislação brasileira, através da RDC nº12 (BRASIL 2001), indica a pesquisa de estafilococos coagulase positiva como indicativo de *S. aureus*.

1.3.4 *Salmonella* spp

A nomenclatura do gênero *Salmonella* tem sofrido alterações e ainda não está estável, portanto, neste estudo será adotada a sugerida por EUZÉBY (1999) e CLAVIJO et al. (2006).

Este gênero compreende bacilos Gram-negativos não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Esses organismos multiplicam-se entre as temperaturas de 5 a 47°C e pH entre 4,0 e 9,0, tendo crescimento ótimo entre 35-38°C e pH 7,0; valores que podem variar de acordo com o sorotipo, sendo que alguns se adaptam facilmente a condições ambientais

extremas. Catabolizam D-glicose e outros carboidratos, com produção de ácido e gás (exceto *Salmonella Typhi*), são anaeróbios facultativos, catalase-positivos e oxidase-negativos (D'AOUST 1997; FORSYTHE 2002; SILVA JR. 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Espécies de *Salmonella* são amplamente distribuídas na natureza, sendo que os principais reservatórios naturais são o trato intestinal de mamíferos, pássaros e répteis. Elas podem alcançar o ambiente aquático através de contaminação fecal e, então, serem detectadas em peixes e produtos pesqueiros. As aves têm papel importante na transmissão do patógeno, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente salmonelas pelas fezes. Além disso, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis pode colonizar o canal ovopositor das galinhas e, assim, contaminar a gema durante a formação do ovo (EUZÉBY 1999; FRANCO & LANDGRAF 2003; KUMAR et al. 2003).

Hortaliças plantadas em ambientes onde haja esterco contaminado podem também vir a apresentar o microrganismo. Como o calor é eficiente na destruição desta bactéria, alimentos submetidos a altas temperaturas não costumam oferecer risco. Portanto, as infecções provocadas por bactérias do gênero *Salmonella* podem decorrer da ingestão de carnes, principalmente insuficientemente cozidas ou cruas, produtos de ovos, leite cru e hortalças contaminados (SILVA JR. 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Cepas de *Salmonella* têm sido isoladas em todo o mundo, e as doenças infecciosas causadas por elas costumam ser divididas em três grupos: febre tifóide, febres entéricas e enterocolites (salmoneloses).

A febre tifóide é causada pela *Salmonella Typhi*, que é um patógeno especificamente humano. É uma doença endêmica em muitos países em desenvolvimento, particularmente, no Subcontinente Indiano, na América do Sul e Central, e África. A doença pode ser fatal se não tratada e mata cerca de 10% de todas as pessoas infectadas. Possui alta infectividade e baixa patogenicidade, o que explica a existência de portadores (fontes de infecção não doentes) que desempenham importante papel na manutenção e disseminação da doença na população (FRANCO & LANDGRAF 2003; EDUARDO & MELLO 2004).

A transmissão se dá por via fecal-oral, na maioria das vezes, através de alimentos contaminados por portadores, durante o processo de preparação e manipulação. A água também pode ser um veículo de transmissão, podendo ser contaminada no próprio manancial (rio, lago ou poço), por ser tratada inadequadamente ou ainda por contaminação na rede de distribuição (quebra de encanamento, pressão negativa na rede, conexão cruzada). O período de transmissibilidade dura enquanto existirem bacilos sendo eliminados nas fezes ou na urina, o que geralmente acontece desde a primeira semana de doença até a convalescença. Cerca de 10% dos doentes eliminam bacilos até 3 meses após o início do quadro clínico e 1 a 5% até 1 ano e provavelmente por toda a vida - são os portadores crônicos (EDUARDO & MELLO 2004). O período de incubação pode variar de três dias a três meses, os sintomas podem ser muito graves incluindo febre alta, diarreia e vômitos e pode haver septicemia. Uma vez no sangue as bactérias podem atingir diversos órgãos até estabelecer uma infecção sistêmica. O reservatório de *S. Typhi* é o homem, sendo este a principal fonte de contaminação (FRANCO & LANDGRAF 2003).

As febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B e C) são semelhantes à febre tifóide, porém os sintomas clínicos são mais brandos. Enquanto a febre tifóide pode durar de uma a oito semanas, as entéricas têm duração de no máximo três semanas (FRANCO & LANDGRAF 2003).

As salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas, caracterizam-se por sintomas como diarreia, febre, dores abdominais e vômitos. Estes sinais clínicos aparecem, normalmente, de 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo e duram de um a quatro dias. A sintomatologia clínica em animais é semelhante à humana (FRANCO & LANDGRAF 2003).

Salmonella spp. é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive no Brasil (SCHLUNDT 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

1.3.5 *Vibrio* spp

O gênero *Vibrio* é composto por bacilos Gram-negativos, retos ou curvos, móveis, catalase e oxidase positivas, fermentadores de glicose sem produção de gás e sensíveis às temperaturas superiores a 43°C. Pertencem à família *Vibrionaceae*, que agrupa inúmeras bactérias patogênicas ao homem, que causam desde gastroenterites autolimitantes até quadros graves de septicemia, podendo levar os pacientes ao óbito (MATTÉ et al. 1994; FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003; MATTÉ 2003).

Microrganismos do gênero *Vibrio* estão amplamente distribuídos em ambientes aquáticos, tanto em água salgada como doce, e em associação com os animais aquáticos (MATTÉ 2003; HUANG & HSU 2005; ROUX et al. 2005).

Existem atualmente mais de 90 espécies de *Vibrio* propostas, das quais 63 foram validadas até 2004 (ROUX et al. 2005). Uma grande diversidade destas pode estar relacionada com doenças em humanos, entre elas *Vibrio cholerae* sorogrupos O1, O139 e não O1/não O139, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii* e *V. vulnificus* (MATTÉ 2003).

Um importante membro deste gênero é o *Vibrio cholerae*, muito conhecido por ser o agente etiológico da cólera, doença responsável pela morte de milhares de pessoas no mundo. Este microrganismo apresenta uma grande variedade de sorogrupos, sendo o O1 e o O139 os mais relacionados às grandes epidemias mundiais (MATTÉ 2003).

V. cholerae cresce em intervalos de temperatura de 10 a 43°C; e pH de 5,0 a 9,6. O período de incubação da cólera varia de seis horas a cinco dias, e uma vez ultrapassada a barreira gástrica, o *V. cholerae* liga-se à superfície da mucosa do intestino delgado e produz uma enterotoxina, a toxina colérica. Essa toxina não causa danos aparentes à mucosa, mas pode alterar o equilíbrio eletrolítico, resultando em diarreia intensa por até sete dias. As pessoas infectadas com o vibrião podem permanecer assintomáticas, apresentar diarreia moderada ou intensa, ou, em casos mais graves, perda rápida de líquidos gerando colapso circulatório e até morte (FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Cólera é um importante problema de saúde pública, causando também grandes perdas econômicas. Na América Latina, além da água, o gelo e pescados crus ou mal cozidos são importantes veículos de transmissão da cólera (WHO 2002a; WHO 2002b).

Vibrio parahaemolyticus é responsável por surtos de toxinfecção alimentar, intimamente relacionada ao consumo de pescados. Ocorre em água de estuários de todo mundo, sendo facilmente encontrado em águas costeiras, no sedimento, em partículas suspensas, plâncton e uma variedade de peixes e frutos do mar. Vive em temperaturas que variam de 5 a 43°C e pH entre 5 e 11. Gastreenterites ocasionadas por *V. parahaemolyticus* estão quase sempre relacionadas a alimentos marinhos consumidos crus ou insuficientemente cozidos. Os principais sintomas da doença alimentar gerada por tal espécie são diarréias, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, febre e calafrios; durante cerca de três dias. Em casos mais graves há disenteria com fezes mucóides e sanguinolentas. Infecções extraintestinais como oculares, de ouvidos e ferimentos, também podem ocorrer após exposição ao ambiente marinho. *V. parahaemolyticus* é bastante sensível à desidratação e ao calor assim, os surtos devem-se, freqüentemente, à ingestão de alimentos marinhos crus e submetidos a processos de manipulação inadequados (OLIVER & KAPER 1997; FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003; MATTÉ 2003).

Vibrio parahaemolyticus foi primeiramente relacionado à gastreenterite em 1950, após um surto de intoxicação alimentar no Japão; e, desde então, tem sido apontado como a principal causa de intoxicação alimentar em Taiwan e no Japão (MATTÉ 2003).

Vibrio vulnificus é habitante natural do ambiente marinho e, portanto contaminante natural de alimentos de origem marinha, o que torna difícil a prevenção da contaminação de produtos crus. *Vibrio vulnificus* é um dos patógenos humanos que apresenta maior poder de invasão e letalidade. Ele pode entrar no organismo através de lesões na epiderme, gerando dor intensa e edema local, podendo levar à

amputação do membro afetado; ou através da ingestão de alimentos marinhos crus ou mal cozidos, provocando febre, calafrios, náuseas, hipotensão, septicemia e morte em cerca de 50% dos casos. (FRANCO & LANDGRAF 2003; MATTÉ 2003; YANO et al. 2004).

V. vulnificus é extremamente patogênico, sendo responsável por 95% das mortes relacionadas a alimentos marinhos nos Estados Unidos. Este microrganismo multiplica-se entre 8 e 43°C, e pH entre 5,0 e 10,0. Diferentemente das demais espécies patogênicas de *Vibrio*, o *V. vulnificus* invade e se multiplica na corrente sanguínea, ocorrendo, em pacientes com disfunções hepáticas, óbito em 40 a 60% dos casos. Este microrganismo é rapidamente destruído pelo calor (70°C), sendo mais comum a enfermidade estar relacionada a ingestão de alimentos crus (FORSYTHE 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Vibrio metschnikovii foi pela primeira vez identificado como causador de infecção em humanos em 1978, quando JEAN-JACQUES et al. (1981) isolaram este microrganismo do sangue de uma senhora em Chicago, Estados Unidos. Desde então *V. metschnikovii* tem sido apontado como causador de diarreias, infecções, septicemias e pneumonias (MATTÉ et al. 2006a). *V. metschnikovii* se diferencia de outras espécies de *Vibrio* por não produzir citocromo oxidase nem reduzir nitrato, embora a morfologia da colônia em ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) seja típica do gênero. Por estas características atípicas, esta espécie é muitas vezes negligenciada em pesquisas de *Vibrio* e, provavelmente, está presente com mais frequência no ambiente e em peixes crus do que tem sido reportado (JEAN-JACQUES et al. 1981; MATTÉ et al. 2006a).

V. fluvialis é outro importante microrganismo potencialmente patogênico para o homem. Esta espécie foi isolada pela primeira vez em 1977 e tem sido relacionada a infecções e surtos de diarreia (HUANG & HSU 2005; RATNARAJA et al. 2005; LAI et al. 2006).

Outras espécies como *V. alginolyticus*, *V. furnissii* e *V. mimicus* são potencialmente patogênicas e constituem risco para a saúde humana (MATTE 2003).

1.3.6 *Bacillus cereus*

São grandes bacilos Gram-positivos, móveis, formadores de esporos, mesófilos, aeróbios ou aeróbios facultativos, catalase-positivos e oxidase variável, com atividade hemolítica e produtores de uma exo-enterotoxina. A presença de quantidades de *Bacillus cereus* superiores a 10^6 organismos por grama de alimento é um indício de multiplicação do agente e constitui um fator de elevado risco à saúde (NETTEN & KRAMER 1992; GRANUM 1997; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Bacillus cereus multiplica-se bem entre 10°C e 48°C, com o ótimo entre 28°C e 35°C. A faixa de pH em que ocorre multiplicação é de 4,9 a 9,3, sendo entre 6,0 e 7,0 o ótimo (FRANCO & LANDGRAF 2003).

Este organismo está amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. Alimentos em contato direto com o solo, como vegetais, cereais e condimentos são facilmente contaminados com este microrganismo. Podem também ser encontrados na superfície de carnes bovina, suína e de frango, certamente devido à contaminação com o solo (NETTEN & KRAMER 1992; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Sua facilidade de formar esporos garante a sobrevivência através de todas as fases de processamento dos alimentos, exceto após tratamento em autoclave. A reversão para a forma vegetativa pode resultar na multiplicação bacteriana e conseqüente deterioração do alimento ou produção de enterotoxinas. Alimentos a base de cereais ou que contenham proteínas, que foram cozidos e mantidos sob resfriamento inadequado (10 a 50°C) permitirão a germinação dos esporos e a multiplicação de *B. cereus*. Assim, a prevenção de enfermidades por *B. cereus* requer o controle da germinação dos esporos e a prevenção do crescimento das células vegetativas nos alimentos prontos para o consumo (NETTEN & KRAMER 1992; ICMSF 1996; FRANCO & LANDGRAF 2003).

O grande número de células viáveis de *Bacillus cereus* em alimentos pode causar dois tipos de gastroenterites, de acordo com o tipo de toxina produzida (SHINAGAWA 1990; FRANCO & LANDGRAF 2003).

A síndrome diarréica é provocada por uma enterotoxina termolábil, que é destruída quando aquecida a 55°C por 20 minutos. Esta enterotoxina é produzida durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano e, quando ingerida, provoca, em 8 a 16 horas, sintomas como diarréia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, raramente ocorrendo náuseas e vômito, com duração de 12 a 24 horas. Os alimentos envolvidos nestes casos de gastroenterite são vegetais crus e cozidos, produtos cárneos, pescados, massas, leite, e outros (SHINAGAWA 1990; GRANUM 1997; SILVA JR. 2002; FRANCO & LANDGRAF 2003).

A síndrome emética é gerada pela toxina emética, que causa, após curto período de ingestão, vômitos, náuseas e mal-estar geral e, em alguns casos, diarréia com seis a 24 horas de duração. Esta toxina é produzida na fase final da fase

logarítmica do crescimento bacteriano, sendo liberada em grandes quantidades na lise bacteriana. A síndrome emética está quase exclusivamente associada a alimentos farináceos, contendo cereais, principalmente arroz. Um grande número de casos envolve o arroz preparado à moda chinesa (cozido no vapor e mantido à temperatura ambiente), já que o aquecimento, neste caso, é insuficiente para destruir os esporos, que germinam e se multiplicam devido à temperatura favorável. O problema se agrava quando se mistura tal preparação com outros ingredientes, como carne, ovos, vegetais e frango, comum na comida oriental (SHINAGAWA 1990; GRANUM 1997; FRANCO & LANDGRAF 2003).

1.3.7 *Aeromonas* spp

Microorganismos do gênero *Aeromonas* não são relacionados a condições sanitárias inadequadas por não terem correlação com microorganismos indicadores de contaminação fecal. São habitantes de ambientes aquáticos e a contaminação normalmente ocorre neste local, sendo os pescados muito suscetíveis a esta contaminação (MATTE 2004). A pesquisa de *Aeromonas* spp não é um parâmetro de qualidade microbiológica considerada pela legislação brasileira (BRASIL 2001), porém diversos estudos têm mostrado espécies patogênicas relacionadas a alimentos, evidenciando a importância desse microorganismo para a saúde pública.

Há grande similaridade do processo de enriquecimento e isolamento de organismos do gênero *Vibrio* e os pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Os dois grupos de organismos compartilhavam inicialmente da mesma família, e também apresentam preferências similares no requerimento nutricional para o cultivo. As cepas de *Aeromonas* isoladas no meio de cultivo ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose

(TCBS) compartilham, algumas vezes, características da colônia muito semelhantes às de *V. cholerae* (MATTÉ 2004).

Neste gênero incluem-se microrganismos gram-negativos de forma cocóide a bacilar, retos ou curvos, móveis ou imóveis. A temperatura de crescimento varia de 0 a 41°C em pH entre 5,5 e 9,0. Inicialmente o gênero *Aeromonas* era considerado como pertencente a família *Vibrionaceae*, mas com o avanço de técnicas e práticas moleculares, sugeriu-se a criação da família *Aeromonadaceae*, da qual o gênero *Aeromonas* hoje faz parte (GRANUM et al. 1998; MATTÉ 2004).

O gênero *Aeromonas* pode ser dividido em dois grupos. O primeiro é formado pela espécie *A. salmonicida*, organismo imóvel, psicrotrófico, incapaz de crescer a 37°C, não patogênico para o homem, mas causador de furunculose em peixes. É responsável por perdas econômicas significativas e programas de vacinação em criadouros de peixes (KIROV 1997; GARCÍA et al. 2000; JOSEPH & CARNAHAN 2000; CASTRO-ESCARPULLI et al. 2003; HARF-MONTEIL et al. 2004; MATTÉ 2004).

O segundo grupo é formado por bacilos Gram-negativos, móveis, mesófilos, anaeróbicos facultativos, oxidase e catalase positivos, fermentadores de carboidratos, com produção de ácido e gás. Neste grupo incluem-se 17 espécies que podem ser patogênicas para o homem, entre elas *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*, *A. media*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*, *A. popoffii*. A temperatura de crescimento é entre 5°C e 45°C, sendo o ótimo em 28°C; e a faixa de pH entre 4,0 e 10,0 (KIROV 1997; GRANUM et al. 1998; FRANCO & LANDGRAF 2003; MATTÉ 2004).

Aeromonas são patógenos emergentes, comuns no ambiente aquático, e habitantes naturais do intestino de peixes. São encontradas em água tratada e não tratada, em muitos alimentos de origem animal como peixes, camarões, ostras, caranguejos, carnes bovina e suína, frangos, leite cru, vegetais e saladas pré-preparadas e água mineral engarrafada (JOSEPH & CARNAHAN 2000; CASTRO-ESCARPULLI et al. 2003; HARF-MONTEIL et al 2004; SZCZUKA & KAZNOWSKI 2004).

Em humanos, as espécies móveis de *Aeromonas* são responsáveis por gastroenterites, diarreia aquosa, febre moderada, infecções nos tratos respiratório e urinário, peritonite, septicemia e outros sintomas, dependendo da cepa causadora e da condição imunológica do hospedeiro (JOSEPH & CARNAHAN 2000; CASTRO-ESCARPULLI et al. 2003; MATTÉ 2004; SZCZUKA & KAZNOWSKI 2004). Apesar do aumento do número de publicações a respeito das patogenias provocadas por microrganismos deste gênero, poucos relatos de surtos foram publicados, e ainda pouco se sabe sobre o impacto de *Aeromonas* spp. patogênicas em doenças relacionadas com alimentos (KINGOMBE et al. 2004; MATTÉ 2004).

Aeromonas spp. são capazes de sobreviver e multiplicar-se em uma variedade de produtos alimentícios armazenados entre -2 e 10°C. Devido a esta característica psicrofílica de algumas espécies do gênero *Aeromonas*, o armazenamento sob refrigeração não é um método suficiente para prevenção da transmissão desta bactéria pelos alimentos (CASTRO-ESCARPULLI et al. 2003; FRANCO & LANDGRAF 2003).

Segundo KINGOMBE et al. (2004) uma das razões para a falta de informações da implicação de *Aeromonas* em patologias relacionadas a alimentos é a

inexistência de um método padronizado simples e rápido para a detecção da diferença entre *Aeromonas* patogênica e não patogênica em alimentos.

1.4 Surtos e casos de DTAs

Dados de DTAs podem ser coletados por meio de atividades de vigilância e de investigação de surtos (SCHLUNDT 2002). Trabalhos de vigilância são importantes no controle da qualidade higiênico-sanitária e na prevenção de surtos. Já a investigação destes últimos fornece dados a respeito de agentes etiológicos, fontes de infecção e epidemiologia de doenças (REIJ & DEN AANTREKKER 2004). Porém, heterogêneos sistemas de informações sobre DTAs, diferentes proporções relatadas, e variáveis níveis aceitáveis pela legislação de áreas diversificadas, dificulta a comparação de dados e a identificação do real risco oferecido por cada patógeno (KRUSE 1999).

Considera-se *surto* de DTA a ocorrência de dois casos ou mais de uma manifestação clínica semelhante, relacionados entre si no tempo e no espaço, resultante da ingestão de um item alimentar comum (HALL et al. 2002; CDC 2005b).

Entre 1993 e 1997 o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relatou, nos Estados Unidos, a ocorrência de 2.751 surtos, envolvendo 29 patógenos conhecidos. Do total, 878 surtos (32%) tiveram agente etiológico identificado por testes laboratoriais, e destes, 75% foram causados por agentes bacterianos, 17% por químicos, 6% por vírus e 2% parasitas. Sessenta e oito por cento, dos 2.751 casos, tiveram etiologia desconhecida, ou por falta de amostra para análise ou por resultados negativos para os patógenos pesquisados. No período citado 86.058

pessoas adoeceram e 29 morreram. Porém, essa é uma pequena fração da realidade. O CDC estima que 76 milhões de casos de DTAs, 325.000 internações e 5.000 mortes ocorram cada ano nesse país. (HALL et al. 2002; WHO 2002b; CDC 2005b).

Como a maioria dos casos de DTAs não é relatada, a real dimensão do problema não é conhecida. Com exceção da cólera, que, junto com febre amarela e peste, são de notificação obrigatória segundo a OMS, não há obrigatoriedade do relato de DTAs internacionalmente. Em muitos países, apenas poucas doenças que são ou podem ser de origem alimentar aparecem na lista de doenças notificadas. Além disso, o relato de doenças não é feito de maneira uniforme. Enquanto um país pode reportar, por exemplo, a incidência de shigelose e amebíase separadamente, outro pode relatá-las juntas sob o termo disenteria. Outro agravante é que um mesmo termo, como intoxicação alimentar, pode ser usado por diferentes países representando grupos de doenças diferentes (MEAD et al. 1999; SCHLUNDT 2002).

Como dados confiáveis de DTAs são necessários para avaliar riscos quantitativos, os países devem estimular a coleta de dados de incidência das doenças, de patógenos na cadeia de alimentos, e do consumo de alimentos (KRUSE 1999).

Surtos transmitidos por água e alimentos são de notificação compulsória no Estado de São Paulo e desde 1992 o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) é o responsável pela coordenação estadual de suas investigações e coleta de dados (EDUARDO et al. 2004; BRASIL 2005). A identificação e investigação precoce destes surtos é essencial na prevenção e controle das DTAs. Surtos com etiologia ignorada têm geralmente como causas, a notificação tardia, a ausência de coleta de amostras clínicas e/ou de alimentos em tempo oportuno, ou testes laboratoriais inadequados (EDUARDO et al. 2003b).

Entre 1999 e 2002, foram notificados à Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA) do CVE, no Estado de São Paulo, 878 surtos, com 20.471 casos, de doenças transmitidas por alimentos. Os agentes etiológicos incluíram bactérias (24,6%), vírus (26,8%), parasitas (2,5%), múltiplos agentes (4,7%), químicos (0,7%) e desconhecido (40,7%). Destes, 113 surtos (12,6%) e 3.245 casos (15,8%) foram associados a restaurantes. As bactérias foram as responsáveis por quase metade dos surtos em restaurantes, sendo as mais freqüentes: *Salmonella* (25,6% dos surtos), *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (juntos, responsáveis por 13,2% dos surtos). *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis foi responsável por 15,9% dos surtos, representando 62% entre as salmonelas. Nove surtos (8%) estavam associados a múltiplos agentes, e apenas um caso de manipulador doente foi relacionado (EDUARDO et al. 2003b; CVE 2004).

Tabela 1.1. Número de surtos e casos de DTAs, no Estado de São Paulo, notificados ao CVE, segundo agente etiológico, em 2003.

AGENTE(S) ETIOLÓGICO(S)	NÚMERO DE SURTOS	NÚMERO DE CASOS
<i>E. coli</i>	9	1.591
<i>Salmonella</i> sp	12	452
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	3	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	18
Coliformes	6	941
<i>Bacillus cereus</i>	1	29
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	113
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1	23
<i>Salmonella</i> sp + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	28
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>B. cereus</i>	1	36
<i>E. coli</i> + <i>Salmonella</i> sp	1	35
TOTAL	37	3.303

Fonte: CVE 2004.

No Estado de São Paulo, durante o ano de 2003, foram notificados ao CVE 225 surtos e 9243 casos de DTAs. Destes, 37 surtos (16,4%) e 3.303 casos (35,7%) tiveram como agente etiológico coliformes ou bactérias pertencentes aos gêneros *Aeromonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella* e *Vibrio* (Tabela 1.1). Outros 140 surtos (62,2%) e 3.260 casos (35,3%) tiveram etiologia desconhecida.

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apontam que 12,5% dos óbitos hospitalares ocorridos na Cidade São Paulo, no ano de 2004, tiveram como causa doenças infecciosas e parasitárias (IBGE 2006). Diarréia aguda é uma das mais importantes causas infecciosas de morbidade e letalidade prevenível em crianças menores de cinco anos (AZEVEDO FILHO et al. 2004).

1.4.1 Coliformes e *Escherichia coli*

Diversos trabalhos de avaliação da qualidade de alimentos através da pesquisa de coliformes estão disponíveis na literatura científica. Além disso, a pesquisa de *Escherichia coli* também é comum por este microrganismo ter potencial patogênico. Alguns trabalhos, de pesquisa destes organismos, relacionados a pescados e/ou *sushis* e *sashimis* estão citados na sequência.

RESENDE (2004) coletou, em 2001, 87 pratos de *sushi* ou *sashimi*, preparados a partir de três tipos de peixes: salmão, robalo e atum; em oito restaurantes de Brasília. Como resultado encontrou contaminação com coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira, 10^2 NMP/g (BRASIL 2001), em 25% das amostras.

A sub-gerência de vigilância de alimentos do município de São Paulo, publicou, no Diário Oficial do Município do dia seis de outubro de 2004, um laudo

de infração aplicado a um restaurante que comercializava *sushis*, por seus produtos apresentarem coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido pela Resolução nº 12, ANVISA/MS, de 02/01/01, anexo I, grupo 22, item b (BRASIL 2001; SÃO PAULO 2004b).

FANG et al. (2003) analisaram 22 *sushis* em Taiwan e verificaram coliformes em 68,2% e *E. coli* em 4,6% das amostras. MILLARD & ROCKLIFF (2003) coletaram 55 amostras de *sushis* em 14 diferentes estabelecimentos, na Austrália em 2003. Os resultados da análise microbiológica revelaram que 7,3% das amostras (4/55) apresentaram contaminação com *Escherichia coli* entre 3 e 10² unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g); e outros 7,3% (4/55) com contagem acima de 10² UFC/g. A legislação brasileira não aponta parâmetros de contagem de *E. coli* em *sushis* (BRASIL 2001), mas sua presença neste tipo de alimento não é desejável.

Em 1998, no Japão, ocorreu um surto de *E. coli* O157:H7, envolvendo 49 pacientes com manifestações clínicas e 13 assintomáticos, após consumo de *Ikura-sushi* (bolo de arroz com ovas de salmão). TERAJIMA et al. (1999) realizaram análise de PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) para as cepas isoladas de amostras dos afetados e das ovas de salmão; e a análise do perfil molecular das cepas confirmou a fonte de contaminação como sendo as ovas de salmão, utilizadas na montagem do *Ikura-sushi*, originárias de um único fornecedor do município Hokkaido.

1.4.2 *Staphylococcus aureus*

Amostras de *sushis* de salmão, atum, carapau e “rockfish” foram coletadas em 50 restaurantes em Seattle, Estados Unidos, e analisadas. *Staphylococcus aureus* foram detectados em arroz de seis restaurantes (12%) (ADAMS et al. 1994).

RESENDE (2004) identificou 1,14% das amostras (1/87) com contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do preconizado pela legislação brasileira, de 5×10^3 UFC/g (BRASIL 2001).

A análise realizada por MILLARD & ROCKLIFF (2003) revelou 5,4% das amostras (3/55) com contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva entre 10^3 e 10^4 UFC/g. FANG et al. (2003) identificaram *S. aureus* em 13,6% das 22 amostras de *sushis* analisadas em Taiwan. O Governo Chinês preconiza ausência deste microrganismo em alimentos prontos para o consumo.

No Japão, *S. aureus* é responsável por 20 a 25% das doenças transmitidas por alimentos, sendo que o *nigiri* (bolinho de arroz usado na preparação de *sushi*) é um problema potencial (JABLONSKI & BONACH 1997).

Morte decorrente da intoxicação por *S. aureus*, apesar de rara, já foi notificada entre idosos, crianças e pessoas debilitadas (FDA 2005).

1.4.3 *Salmonella* spp

DTA causada por espécies de *Salmonella* representam um importante problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, aproximadamente 1.4 milhões de casos de salmoneloses ocorrem todo ano, sendo 95% de origem alimentar. Uma grande variedade de alimentos são veículos de salmonelas, sendo que os alimentos crus demonstram maior taxa de contaminação (ZHAO et al. 2003).

Surtos de salmoneloses têm sido relatados há décadas, mas nos últimos 25 anos a incidência desta doença tem aumentado em muitos continentes (WHO 2002a).

HEINITZ et al. (2000) analisaram, nos Estados Unidos, mais de doze mil alimentos de origem marinha no período de 1990 a 1999 e, em mais de 13% dos produtos crus, encontraram *Salmonella* ssp.

No Estado de São Paulo, além da implementação da vigilância epidemiológica de surtos, a vigilância de *Salmonella* inclui a notificação obrigatória e encaminhamento da cepa identificada para o Instituto Adolfo Lutz (IAL) para confirmação e sorotipagem (EDUARDO et al. 2004; BRASIL 2005).

Entre 1999 e 2003 foram notificados ao CVE 1.024 surtos de diarreia, envolvendo 27.499 casos, no Estado de São Paulo. Dos 459 surtos com etiologia identificada, 325 (70,8%) foram causados por bactérias. Dentre os surtos por bactéria, 140 (43,1%) foram devido à *Salmonella*, envolvendo 3.001 pacientes. Dos 74 surtos por *Salmonella* com identificação do sorotipo, 66 (89,2%) foram devido à *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis. Anualmente, ocorrem mais de 50 mil casos de diarreia e cerca de 6.000 internações devido a esse sorotipo (EDUARDO et al. 2004).

Dia 20 de setembro de 2004 ocorreu um surto por intoxicação alimentar em um evento científico realizado por uma instituição pública, na Cidade de São Paulo. A instituição contratou um bufê para servir o almoço para 55 pessoas. Em algumas horas alguns participantes começaram a apresentar sintomas como diarreia líquida ou pastosa, cefaléia intensa, náusea, mal-estar, febre de até 39°C, dor abdominal, anorexia e vômito. Após dois dias, 28 pessoas (51%) apresentaram sintomas, sendo que seis delas necessitaram de atendimento médico. *Salmonella enterica* subsp.

enterica serovar Typhimurium foi isolada das fezes de cinco participantes do evento, sendo considerada como causadora do surto. Estudos epidemiológicos indicaram que o veículo da contaminação foi o sanduíche de tomate seco com queijo branco servido pelo bufê. Análise de matérias-primas indica que a contaminação ocorreu durante o processamento da preparação, já que as análises dos ingredientes foram negativas para o patógeno em questão. Não foi determinada como ocorreu a contaminação, mas a identificação de um manipulador portador assintomático da bactéria confirma a hipótese da contaminação no preparo (SILVA et al. 2004).

Os casos de febre tifóide na região metropolitana de São Paulo vêm diminuindo no decorrer dos anos, como mostra a Figura 1.1.

Fonte: EDUARDO & MELLO 2004; CVE 204.

Figura 1.1. Casos autóctones confirmados de febre tifóide, na área metropolitana de São Paulo e no Estado de São Paulo, notificados ao CVE, de 1960 a 2004.

Embora a incidência venha diminuindo, *Salmonella Typhi* continua provocando mortes (Figura 1.2), sendo ainda um importante problema de saúde pública.

Fonte: EDUARDO & MELLO 2004; CVE 2004.

Figura 1.2. Número de óbitos notificados ao CVE, no Estado de São Paulo, em decorrência da febre tifóide, de 1980 a 2004.

1.4.4 *Vibrio* spp

Há diversos casos relatados de infecções humanas causadas por *Vibrio* spp, principalmente em associação com gastroenterite e doenças diarreicas. Muitas dessas infecções estão relacionadas com história de ingestão de pescado, principalmente cru (RATNARAJA et al. 2005).

Assim como os casos suspeitos de febre tifóide, os de cólera são de notificação compulsória no Estado de São Paulo, devendo ter notificação imediata (SÃO PAULO 2004a; BRASIL 2005).

Entre as doenças causadas por espécies de *Vibrio*, a cólera é a que tem mais atenção das autoridades de Saúde Pública. Os relatos de cólera são muito antigos e

no século XIX foi relatada uma grande epidemia na Índia, em 1817, seguida de seis pandemias que atingiram inúmeros países de hemisfério Sul, América do Norte e Europa. A sétima pandemia começou em 1961, na Indonésia, espalhando-se por toda a Índia e Oriente Médio, atingindo a África em 1970 e América do Sul em 1991 (MATTÉ 2003).

A cólera permaneceu em níveis epidêmicos e/ou endêmicos em vários estados do nordeste brasileiro até o ano de 2001. Em abril de 2004, a Secretaria de Estado da Saúde de Pernambuco notificou à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde o isolamento de *V. cholerae* O1 Ogawa em amostras de fezes de um paciente com diarreia aguda, residente em São Bento do Una, Pernambuco. Após esta notificação, foi realizada uma busca retrospectiva e outros 20 casos de cólera foram confirmados (EDUARDO & KATSUYA 2003, AZEVEDO FILHO et al. 2004).

Para o Estado de São Paulo, o CVE tem registro, em 1993, de onze casos autóctones, com dois óbitos; e quinze casos importados, com um óbito. Em 1994 este número subiu para 77 casos autóctones que determinaram seis óbitos; e dezesseis casos importados. Desde esta data há apenas um caso registrado (1999), sendo este importado (EDUARDO & KATSUYA 2003).

Os dados de cólera para o Brasil são apresentados no Quadro 1.1.

Embora o número de casos de cólera tenha reduzido nos últimos anos, não sendo registrados casos em 2002 e 2003, o potencial epidêmico da doença tem estado presente, demonstrando o risco da reemergência do agente e a importância da manutenção de ações de vigilância epidemiológica (AZEVEDO FILHO et al. 2004).

Apesar da epidemiologia e bacteriologia da cólera já terem sido descritas a mais de um século, esta doença continua sendo um importante problema de saúde pública, sendo fundamental o monitoramento de *Vibrio cholerae* no meio ambiente (MATTE 2003).

Quadro 1.1. Número de casos confirmados, óbitos e letalidade para cólera. Brasil, 1991 a 2004.

ANO	CASOS	ÓBITOS	LETALIDADE
1991	2.103	33	1,6
1992	37.572	462	1,2
1993	60.340	670	1,1
1994	51.324	542	1,1
1995	4.954	96	1,9
1996	1.017	26	2,6
1997	3.044	54	1,8
1998	2.745	39	1,4
1999	4.759	93	2,0
2000	733	20	2,7
2001	7	0	0
2002	0	0	0
2003	0	0	0
2004	21	0	0

Fonte: EDUARDO & KATSUYA 2003; AZEVEDO FILHO et al. 2004.

Além do *Vibrio cholerae*, o *Vibrio parahaemolyticus* é de grande importância para pescados, principalmente de origem marinha. BASTI et al. (2006) concluíram que peixes capturados em lagoas de criação apresentaram contaminação muito pequena de *V. parahaemolyticus*, quando comparados aos capturados no mar perto da costa. Além disso, demonstraram que os peixes frescos salgados apresentaram maior contaminação do que aqueles não submetidos a este processo, o que é explicado pelos autores como fruto de contaminação cruzada.

Outro importante patógeno deste gênero é o *V. vulnificus*. TATEYAMA et al. (1989) relataram o caso de um homem de 53 anos, com cirrose hepática, que faleceu 22 dias após ter consumido *sushi*. Cultura sanguínea revelou a presença de *V. vulnificus*. YANO et al. (2004) pesquisaram 20 amostras de pescados comercializados em cidades costeiras da China e encontraram *V. vulnificus* em 16 delas (80%).

Vibrio metschnikovii foi pela primeira vez identificado como causador de gastroenterite no Brasil em 1992, quando foi isolado de seis pacientes em Recife, durante a epidemia de cólera (MAGALHÃES et al. 1996).

RATNARAJA et al. (2005) relataram um caso de peritonite devido a *Vibrio fluvialis* em uma mulher de 55 anos, na Nova Zelândia. Os autores levantaram a hipótese de que a paciente tenha adquirido tal infecção após o consumo de pescado cru preparado sob condições sanitárias inadequadas. HUANG & HSU (2005) descreveram outro caso, o de uma mulher de 45 anos, que faleceu devido a infecção provocada por *V. fluvialis*. O consumo de ostra crua ou pescado cru foi relacionado ao caso.

Amostras de pescados, comercializados em mercados e supermercados da Malásia, foram examinados, entre julho de 1998 e junho de 1999, por ELHADI et al. (2004) para verificar a presença de 9 espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas. Foram analisadas 768 amostras e oito espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas foram encontradas, sendo que 4,6% das amostras apresentaram *V. cholerae*, 4,7% *V. parahaemolyticus*, 6,0% *V. vulnificus*, 11% *V. alginolyticus*, 9,9% *V. metschnikovii*, 1,3% *V. mimicus*, 13% *V. damsela*, 7,6% *V. fluvialis* e 52% das amostras apresentaram populações combinadas dos microrganismos citados.

Diversos tipos de pescados, provenientes de mercados da cidade de Santos, foram coletados em 1994, como parte da vigilância do surto de cólera no Brasil. MATTÉ et al. (2006a) analisaram 25 amostras e obtiveram os seguintes resultados: oito (32%) amostras apresentaram contaminação por *V. metschnikovii*, duas (8%) por *V. cholerae* não O1/não O139, quatro (16%) por *V. parahaemolyticus*, duas (8%) por *V. mimicus*, duas (8%) por *V. alginolyticus* e três (12%) amostras contaminadas por *V. vulnificus*.

1.4.5 *Bacillus cereus*

Na pesquisa realizada em Seattle por ADAMS et al. (1994), dos 50 restaurantes visitados, seis (12%) ofereciam *sushis* contaminados com *Bacillus cereus*, porém em quantidades inferiores aos valores de referência em saúde pública, que é 10^3 UFC/g (BRASIL 2001). Outros seis restaurantes tinham *sushis* contaminados por *Staphylococcus aureus*, mas não foram encontradas amostras contaminadas, ao mesmo tempo, pelos dois microrganismos.

MILLARD & ROCKLIFF (2003), encontraram 2 (3,6%) em 55 amostras de *sushis* com contagem de *B. cereus* entre 10^3 e 10^4 UFC/g, e uma (1,8%) com mais de 10^4 UFC/g. FANG et al. (2003) quantificaram *B. cereus* acima de 10^2 UFC/g em 18,2% das 22 amostras de *sushis* analisadas em Taiwan.

1.4.6 *Aeromonas spp*

Em 2004 ocorreu uma investigação epidemiológica no Estado de Pernambuco em decorrência da notificação do isolamento e identificação de *Vibrio cholerae* O1 Ogawa em amostra de uma paciente com diarreia aguda. Após a detecção do vibrião

colérico, foram coletadas amostras clínicas dos casos suspeitos de diarreia para pesquisa de microrganismos das famílias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae*. Nas 528 amostras analisadas houve predominância de isolamentos de *Aeromonas* (19,5%) em relação às etiologias clássicas (*Vibrio cholerae*, *Salmonella* e *Shigella*) (AZEVEDO FILHO et al. 2004; HOFER et al. 2006). As espécies de *Aeromonas* isoladas nessa investigação foram *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. media*, *A. jandaei*, *A. hydrophila*, *A. schubertii* e *A. trota* (HOFER et al. 2006).

KINGOMBE et al. (2004) analisaram amostras de diversos tipos de alimentos, como queijo, frango, peixe, camarão, salame, salsicha, presunto. Como resultado, a maior contaminação por *Aeromonas* foi observada nos alimentos crus, 68%, e em especial os peixes, 83%.

Não há muitos casos descritos na literatura de *Aeromonas* spp veiculadas por alimentos, mas ITOH et al. (1999) descreveram um caso, em 1998, ocorrido no Japão, em um homem de 49 anos, com cirrose hepática por abuso de álcool, que apresentou febre repentina e dor nos músculos esqueléticos, sendo, então, internado. Após três dias o paciente teve morte de múltiplos órgãos, provavelmente devido a uma septicemia. Os exames de sangue e fluidos corporais detectaram a presença de *Aeromonas sobria*. O paciente havia ingerido peixe cru com arroz (*sushi*) um dia antes de apresentar os primeiros sintomas, sendo este o provável veículo de contaminação.

1.5 Padrões Microbiológicos para alimentos

Segundo a Constituição da República Federativa do Brasil, “a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doenças e de outros agravos (...)” (BRASIL 1988). Assim, a defesa e a proteção da saúde dos indivíduos no tocante a alimentos, desde a origem até o seu consumo, são estabelecidas pela legislação (MIGUEL et al. 2000).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, preconiza, através da RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL 2001), parâmetros microbiológicos para alimentos. No item 22 do anexo I desta legislação, estão estabelecidos os valores máximos para microrganismos em “pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares)”. As iguarias *sushi* e *sashimi* estão enquadradas no sub-item “b) a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)”. Porém, sabendo que *sushis* são pratos elaborados com pescado cru e arroz, considerou-se relevante adotar, como parâmetro também, os microrganismos e valores empregados no sub-item “d) a base de cereais, farinhas, grãos e similares (...)”.

Nos Quadros 1.2 e 1.3 estão apresentadas as tolerâncias para alimentos prontos para o consumo a base de pescados crus e de cereais, que serão usadas como parâmetro de análise.

Quadro 1.2. Quantidade de microrganismos tolerada para pratos prontos para o consumo a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi etc.), segundo RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa^A
Coliformes a 45°C ^B	10 ² NMPC/g
Estafilococos coagulase positiva	5x10 ³ UFC/g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10 ³ NMP/g
<i>Salmonella</i> sp	Ausência/25 g

^A Quantidade de microrganismos, em número mais provável por grama (NMP/g) ou unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

^B Coliformes termotolerantes

Fonte: BRASIL 2001.

Quadro 1.3. Quantidade de microrganismos tolerada para pratos prontos para o consumo a base de cereais, farinhas, grãos e similares; saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho, exceção das adicionadas de molho de maionese e similares, segundo RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001.

Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa^A
Coliformes a 45°C ^B	10 ² NMP/g
Estafilococos coagulase positiva	10 ³ UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	10 ³ NMP/g
<i>Salmonella</i> sp	Ausência/25 g

^A Quantidade de microrganismos, em número mais provável por grama (NMP/g) ou unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

^B Coliformes termotolerantes

Fonte: BRASIL 2001.

Ainda conforme a RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001; os resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano devem ser comparados com os valores estabelecidos por esta Resolução, e a interpretação deve ser feita da seguinte maneira (BRASIL 2001):

- Produtos em condições sanitárias satisfatórias: são aqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual aos estabelecidos;
- Produtos em condições sanitárias insatisfatórias: são aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos e/ou aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem riscos à saúde do consumidor.

A vigilância epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos é fundamental para orientar programas de higiene e segurança de alimentos. A investigação de surtos pode fornecer parâmetros para intervenções em práticas de preparação de alimentos, para programas de educação de manipuladores, revisões de regulamentos sanitários, condutas para tratamento da doença e medidas para a redução dos riscos e do número e gravidade dos surtos (EDUARDO et al. 2003b; REIJ & DEN AANTREKKER 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A recente e crescente popularização do consumo de peixe cru no Brasil aumenta a preocupação com a qualidade higiênico-sanitária dos pescados e de suas preparações. Por não sofrerem cocção, *sushis* e *sashimis* são importantes veiculadores de microrganismos, frutos de contaminação ambiental ou de falhas no processo de manipulação. Além disso, o tempo decorrido entre a pesca, preparo e consumo pode agravar o risco de toxinfecção, se a preparação for mantida em temperatura que propicie o crescimento e multiplicação de microrganismos ou a produção de toxinas.

O modo de preparo destas iguarias japonesas também contribui para o risco de toxinfecções (Anexo 2). O arroz que compõe estas preparações é previamente cozido, e mantido à temperatura ambiente para resfriar e poder ser utilizado. Esta prática possibilita a germinação de esporos de *Bacillus cereus* que possam estar no alimento, já que nesta forma são resistentes ao processo de cocção. Além disso, o uso de utensílios de madeira, tradicionais da cozinha japonesa, pode contribuir para a contaminação das preparações por ser de difícil higienização.

A investigação microbiológica dos alimentos pode contribuir para definir o risco de exposição a patógenos potenciais e para enfocar a importância relativa de diferentes produtos como veiculadores destes.

A presença de coliformes termotolerantes no alimento pronto pode indicar falha no processo de higiene durante a manipulação dos alimentos. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de serem indícios de falha higiênico-sanitária, podem oferecer riscos à saúde por serem potencialmente patogênicos e produtores de toxina termoestável, respectivamente. *Salmonella* spp é um importante microrganismo

causador de doenças, fruto de contaminação da matéria-prima ou de contaminação cruzada. Espécies de *Vibrio* podem causar sérias doenças em seus hospedeiros e provocar grandes perdas econômicas de pescados. Por serem autóctones do ambiente aquático contaminam o pescado no próprio ambiente, podendo permanecer neste se não houver um processo de cocção adequado. Assim como *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp. é habitante natural do ambiente aquático, fazendo parte da flora natural de pescados. A pesquisa de *Aeromonas* spp. em alimentos não é preconizada pela legislação brasileira (BRASIL 2001), porém é um patógeno emergente, que vem sendo, cada vez mais, relacionado a doenças transmitidas por pescados.

O risco oferecido pelos microrganismos citados agrava-se quando as preparações prontas são expostas em balcões, nem sempre com temperatura controlada, onde permanecem por tempo às vezes prolongado, até serem consumidas.

Os aspectos acima relacionados justificam, do ponto de vista de Saúde Pública, estudos que avaliem a qualidade sanitária de alimentos *sushi* e *sashimi* expostos em bufê, considerando a magnitude da popularização de seu consumo e ponderando-se o risco relativo à ingestão de alimentos crus, em especial de pescado.

Os resultados desta pesquisa podem servir como parâmetro para se avaliar as práticas do processo de produção de *sushis* e *sashimis*, e alertar autoridades de saúde e consumidores sobre os possíveis riscos potenciais à saúde associados ao consumo desses alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa visa identificar a qualidade microbiológica de preparações a base de pescado cru servidos em restaurantes de auto-serviço por peso ou rodízio, na cidade de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a qualidade sanitária de *sushis* e *sashimis* servidos em bufês, comparando os resultados obtidos aos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira, por meio de:

- Pesquisa quantitativa de coliformes termotolerantes;
- Pesquisa quantitativa de *Staphylococcus aureus*;
- Pesquisa qualitativa de *Salmonella* spp
- Pesquisa quantitativa de *Vibrio parahaemolyticus*;
- Pesquisa quantitativa de *Bacillus cereus*.

- Verificar a presença de *Escherichia coli* nas amostras;

- Pesquisar a existência de outras espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas;

- Pesquisar a presença de microrganismos do gênero *Aeromonas* nas amostras;

- Correlacionar a qualidade microbiológica das preparações a base de pescado cru com o modo de apresentação destes, no bufê;

- Correlacionar a qualidade microbiológica do *sushi* e *sashimi* com a especialidade do estabelecimento que os oferecem.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Considerou-se como objeto de pesquisa as preparações a base de pescado cru encontradas sob as seguintes condições:

- apresentadas em horário de almoço (das 11h00 às 14h00);
- expostas em sistema de bufê;
- expostas para auto-serviço (rodízio ou quilo);
- apresentadas por estabelecimentos especializados ou não na cozinha nipônica.

A área pré-estabelecida para coleta compreendeu toda a cidade de São Paulo, com base em informações de CANECCHIO (2003), que afirma que a comida japonesa deixou o reduto exclusivo do bairro da Liberdade, espalhando-se por bairros como Jardins, Itaim Bibi, Vila Olímpia, além de *shopping centers* de toda a cidade.

4.2 Coleta e Preparo das Amostras para Análise

As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro e abril de 2004, em segundas-feiras, entre onze e quatorze horas. Vinte estabelecimentos foram selecionados, entre eles 8 (40%) especializados na culinária nipônica e 12 (60%) não especializados. As amostras foram submetidas à pesquisa de bactérias indicadoras e patogênicas, num total de 7 parâmetros por amostra, conforme detalhado a seguir.

Cerca de 200 gramas de preparações a base de pescado cru foram retiradas do balcão (bufê) onde estavam expostas e acondicionadas em embalagens para viagem, oferecidas pelos próprios estabelecimentos. As amostras foram armazenadas em isopor isotérmico de forma a conservar a temperatura de exposição até a chegada ao

laboratório e o momento da análise. As condições de apresentação do produto ao consumidor, como refrigeração e tipo de aparadores foram registradas para confronto com os dados microbiológicos.

As amostras foram processadas dentro do período máximo de duas horas a partir do momento da coleta.

As análises foram efetuadas no Laboratório de Saúde Pública (Departamento de Prática de Saúde Pública) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

4.3 Isolamento dos microrganismos e identificação fenotípica

Os procedimentos para a análise microbiológica foram realizados com base na metodologia preconizada pela American Public Health Association (APHA) e descritos no Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (APHA 1992, VANDERZANT & SPLITTSTOESSER 1992; SILVA et al. 2001).

Para cada coleta, todo o alimento contido na embalagem de viagem foi homogeneizado assepticamente, em liquidificador, a fim de formar uma mistura em proporções idênticas ao da amostra original. Deu-se início, então, à pesquisa de microrganismos em cada amostra, como representado nas Figuras 3 a 8.

As colônias típicas dos seis microrganismos analisados foram, então, transferidas, com alça bacteriológica devidamente flambada, para um microtubo de 1,5mL (tipo eppendorf®) contendo ágar Lúria semi sólido (0,5% ágar), meio para armazenamento de colônias bacterianas. Após a fase de coleta e processamento estas cepas foram identificadas através de testes bioquímicos e/ou métodos moleculares.

4.3.1 Pesquisa de Coliformes e *E. Coli*

A pesquisa de coliformes foi realizada através da técnica dos tubos múltiplos, com série de três tubos de cada diluição seriada, até 10^{-8} ; para determinação do número mais provável de organismos por grama (NMP/g) (MOMESSO 2002).

Após homogeneização da amostra, 25 gramas da mistura inicial foram adicionados a 225mL de água peptonada estéril com 0,1% de NaCl (AP 0,1%), e feitas diluições sucessivas pela transferência de 10mL da mistura para frasco com 90mL de AP 0,1%, sete vezes. De cada diluição, foi transferido 1mL a três tubos contendo 9mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Merck) estéril, com tubo de durham invertido, e incubados a 35°C por até 48 horas. Foram considerados positivos para coliformes totais os tubos que apresentaram turvação e formação de gás, visível no tubo de durham. Com o auxílio de alça microbiológica tripla, três alçadas foram transferidas dos tubos positivos para tubos com 9mL de Caldo *Escherichia coli* (EC) (Merck) estéril, com tubo de durham invertido em seu interior. Após incubação a 45°C por até 48 horas, foram considerados para contagem do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes os tubos que apresentaram turvação e formação de gás (Figura 4.1).

A pesquisa de *E. coli* foi realizada a partir dos tubos positivos no meio EC, por inoculação em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Merck). As colônias presuntivas de serem *E. coli*, que apresentaram, neste meio, brilho verde metálico, foram reisoladas em placas com meio MacConkey (Merck) e incubadas por 24 horas a 35°C. Colônias puras foram, então, transferidas, através de alça bacteriológica devidamente flambada, para microtubos contendo ágar Lúria semi sólido (0,5% ágar).

Figura 4.1. Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

Na identificação bioquímica das colônias foi utilizado meio de Rugai e lisina – motilidade Instituto Adolfo Lutz (IAL), sendo a leitura feita após incubação a 35°C/24 horas (HANASHIRO 2002).

4.3.2 Pesquisa de *Staphylococcus* spp

Para contagem presuntiva de *Staphylococcus* spp foi utilizado o método de contagem direta em placas, segundo VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992) e SILVA et al. (2001).

A partir das diluições seriadas preparadas para pesquisa de coliformes, foram transferidas alíquotas de 100µL de cada uma das diluições 10^{-1} a 10^{-8} em placas contendo meio Baird Parker (BP) (Merck) adicionados de 5% de solução de gema de ovo com telurito, e espalhadas com alça de Drigalski estéril. As amostras foram incubadas por 48 horas a 37°C. Colônias negras com bordas regulares, apresentando halo de hidrólise foram contadas e transferidas para microtubos com ágar Lúria semi sólido (0,5% ágar) (Figura 4.2).

As cepas foram então reisoladas em placas com ágar Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED) (Merck) e identificadas através de testes de catalase, DNase e coagulase. Os isolados positivos para os três testes foram submetidos à coloração de Gram e observados em microscópio óptico. Os esfregaços de cultura com forma cocóide, agrupados em cacho de uva e de cor roxa foram considerados para a contagem de *S. aureus* coagulase positiva e submetidos a métodos moleculares para determinação da espécie (MATTOS 2005).

A quantidade de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g) foi determinada em função do número de colônias típicas contadas, diluição

inoculada e porcentagem de colônias confirmadas (SILVA et al. 2001).

Figura 4.2. Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de *Staphylococcus* spp.

4.3.3 Pesquisa de *Salmonella* spp

Uma porção de 25 gramas da mistura inicial foi adicionada em 225 mL de Caldo Rappaport (Merck) e incubada a 35°C. Após 24 horas, 1mL deste caldo enriquecido foi transferido, através do uso de pipeta estéril, para dois tubos: um contendo 9mL de Caldo Tetrionato (TT) e outro com 9mL de Caldo Selenito-Cistina (SC) (Merck); e estes novamente incubados a 35°C/24h (Figura 4.3).

Após este período, semeou-se, pelo método de esgotamento, uma alçada de cada caldo em três placas contendo Ágar Sulfito de Bismuto (BS) (Merck) e três placas contendo Ágar Salmonella-Shigella (SS) (Merck), placas estas incubadas invertidas a 35°C/24h. No meio BS as colônias típicas de *Salmonella* têm coloração preta ou marrom, de centro negro, com ou sem brilho metálico e mudança gradativa na coloração do meio em redor das colônias, tornando-se marrom ou preto (SILVA et al. 2001). No meio SS são pequenas e transparentes ou transparentes de centro negro (HANASHIRO 2002). Estas colônias foram selecionadas e transferidas, através do uso de alça bacteriológica estéril, para microtubo contendo o meio ágar Lúria semi sólido (0,5% de ágar).

As colônias selecionadas foram reisoladas, em placas contendo meio BS, para confirmação da existência de um único organismo, o qual foi transferido para tubo com meio IAL, incubado a 35°C/24h, para identificação (RAZZOLINI 2003). Os isolados com resultados, no meio IAL, típicos de *Salmonella* spp tiveram seus DNAs genômicos extraídos pelo método descrito por CHAPMAN et al. (2001) e submetidos à técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), para confirmação da posição taxonômica, de acordo com SOUMET et al. (1999).

Figura 4.3. Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa qualitativa de *Salmonella* spp.

4.3.4 Pesquisa de *Vibrio* spp

Após a homogeneização da amostra, alíquotas de 10 e 1 grama da mistura inicial foram adicionadas, cada uma, a três frascos com 100mL de água peptonada alcalina estéril, pH 8,6, contendo 3% de NaCl (APA 3%); obtendo-se as diluições 10^1 e 10^0 , respectivamente. Outros 25 gramas da mistura inicial da amostra foram adicionados a 225mL de água peptonada estéril com 0,1% de NaCl (AP 0,1%). A partir desse, obteve-se três diluições seriadas, transferindo-se alíquotas de 10mL da mistura para frasco com 90mL de AP 0,1%. Em seguida, 1mL de cada diluição foi acrescentado a 3 tubos de ensaio contendo 9mL de APA 3%, resultando nas diluições de 10^{-1} a 10^{-3} (Figura 4.4).

Após de incubação a 35°C por 24 horas, foi recolhida, com alça bacteriológica devidamente flambada, a película formada na superfície do meio de cultura de cada frasco e tubo e semeou-se, de forma a obter colônias isoladas, em superfície de placas contendo o meio ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) (Merck). Cada película formada na superfície dos meios de cultura foi semeada em três placas de TCBS, e estas incubadas invertidas por 24 horas em estufa a 35°C.

Ambas as colônias, sacarose-positiva (de coloração amarela) e sacarose-negativa (verde) foram armazenadas em microtubo contendo ágar Lúria semi sólido (0,5%). Ao fim das coletas as cepas armazenadas foram reisoladas em placas de TCBS para garantir a presença de apenas uma colônia.

Figura 4.4. Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de *Vibrio* spp e pesquisa qualitativa de *Aeromonas* spp.

As colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Vibrio* foram triadas por testes de Gram e oxidase, e ágar Ferro de Kligler (Merck). Além disso foram realizados os testes bioquímicos: fermentação da glicose, redução de nitrato, hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina e ornitina, crescimento em peptona sem ou com NaCl (3%, 6%, 8% e 10%), produção de acetoina (Voges-Proskauer test) (Merck), teste vermelho de metila (VM) (KONEMAN et al. 2001), fermentação da lactose, manose, manitol e salicina, hidrólise da esculina, e motilidade. O número mais provável foi estimado para cada espécie de *Vibrio*, após confirmação. Os resultados foram expressos em NMP por 100 gramas de amostra (MATTÉ et al. 1994).

4.3.5 Pesquisa de *Bacillus cereus*

Para contagem presuntiva de *Bacillus cereus* foi utilizado o método de contagem direta em placas, segundo VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992).

A partir das diluições preparadas para pesquisa de coliformes, foram semeadas alíquotas de 100µL de cada uma das diluições 10^{-1} a 10^{-5} em placas contendo Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) (SIQUEIRA 1995), e espalhados com alça de Drigalski estéril. As placas foram então incubadas invertidas a 30°C por 24 horas. Neste meio as colônias de *B. cereus* apresentam-se de forma esférica, com bordas perfeitas, planas, secas, cerosas e rodeadas por um grande halo de precipitação claro (HANASHIRO 2002) (Figura 4.5).

As colônias presuntivas de *Bacillus cereus* foram reisoladas no mesmo meio de cultura e incubadas pelo mesmo período e temperatura para confirmação da existência de apenas um microrganismo. Colônias puras foram, então, transferidas,

através do uso de alça bacteriológica devidamente flambada, para um microtubo contendo ágar Lúria semi sólido (0,5% ágar).

Figura 4.5. Esquema dos procedimentos microbiológicos para pesquisa quantitativa de *Bacillus cereus*.

Para confirmação bioquímica, as colônias foram inoculadas em tubos de Ágar Nutriente inclinados e incubados a 30°C/24h. Após o crescimento, as colônias foram submetidas aos testes bioquímicos: reação de Voges-Proskauer (caldo de VP

modificado), redução de nitrato a nitrito, hidrólise da gelatina, decomposição da gelatina e oxidação e fermentação da glicose e motilidade (HANASHIRO 2002).

4.3.6 Pesquisa de *Aeromonas* spp

Para pesquisa de *Aeromonas* spp foi empregada a mesma metodologia utilizada para a pesquisa de *Vibrio* spp (Figura 4.4), e o isolamento em ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS).

As cepas foram reisoladas no mesmo meio de isolamento e transferidas para tubos contendo meio Ágar Ferro de Kligler, inclinado; incubado à 35°C/24 horas. Além desta prova de triagem, foram realizados testes para a pesquisa acidificação dos carboidratos: sacarose, manose, manitol e salicina; crescimento em concentrações de 6, 8 e 10% de cloreto de sódio e na ausência deste sal; hidrólise da esculina, lisina e ornitina descarboxilase e arginina dehidrolase. Através destes resultados, as cepas foram identificadas segundo HARF-MONTEIL et al. (2004) e MATTÉ (2004).

4.4 Identificação molecular

Após o isolamento e identificação fenotípica, os microrganismos de interesse, das amostras analisadas, tiveram seu material genético extraído e submetido à técnica de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), para confirmação da posição taxonômica.

4.4.1 Extração do DNA genômico pelo método descrito por MATTE et al. (2006b)

Este método de extração de DNA foi utilizado para cepas classificadas, fenotipicamente, como *Staphylococcus* spp.

As cepas foram inoculadas em tubos de 10mL (tipo Falcow®) contendo 1,5mL de caldo de cultura (Caldo Lúria 0,1%) e incubos a 30°C. Após 24 horas, as culturas foram transferidas para microtubos, e centrifugadas a 12.000rpm durante 5 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram, então, descartados e os *pellets* ressuspensos em 1mL de tampão TE I [10mM Tris-HCl (pH7,5) + 1mM EDTA (pH8,0)]. Em seguida, foram centrifugados a 12.000rpm por 5 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram, então, descartados e os *pellets* ressuspensos com 200µL de TE I. Em seguida, foi adicionado 500µL de uma solução de lise contendo β-mercaptoetanol [50µL de 100mM Tris-HCl (pH 8.0) + 50µL 50mM EDTA (pH 8.0) + 50µL SDS 10% + 3,5µL 70mM β-mercaptoetanol + 346,5µL de água Milli-Q] e os tubos incubados em banho-maria a 65°C, por 1 hora. Passado o período determinado, foram acrescentados 20µL de Proteinase K, incubando-se novamente em banho-maria a 65°C por mais 1 hora.

Para a extração de DNA acrescentou-se 500 µL da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e agitou-se vigorosamente cada tubo. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12.000rpm por 15 minutos, a 4°C. Com o auxílio de pipeta automática, os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos e, em seguida, acrescentou-se 5µL de RNase. Após 1 hora em estufa a 37°C, acrescentou-se 500µL de clorofórmio puro e agitou-se vigorosamente. Os tubos foram, então, centrifugados a 12.000rpm por 15 minutos, a 4°C. Os

sobrenadantes foram novamente transferidos, com pipeta automática, para outros microtubos. Em seguida, 500 µL de isopropanol gelado foram acrescentados e os tubos submetidos a lentos movimentos giratórios. Após 10 minutos no gelo, os tubos foram novamente centrifugados a 12.000rpm por 3 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 500µL de etanol gelado e centrifugando-se a 12000rpm por 3 minutos. Descartados os sobrenadantes, os tubos foram secos a vácuo por 12 horas. Os DNAs foram diluídos com 50µL do tampão TE II [10mM Tris-HCl (pH7,5) + 0,1mM EDTA (pH8,0)] e armazenados a 4°C até o momento de serem utilizados na amplificação pela reação em cadeia pela polimerase.

4.4.2 Extração do DNA genômico pelo método descrito por CHAPMAN et al. (2001)

Este método foi utilizado para as cepas cuja classificação fenotípica indicou pertencerem ao gênero *Salmonella*.

As cepas foram inoculadas em tubos tipo Falcow® contendo 10mL de caldo de cultura (Caldo Lúria 0,5%) e incubadas a 37°C. Após 18 horas, os tubos com a cultura foram centrifugados a 5.000rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos, a 24°C. Os sobrenadantes foram, então, descartados e os *pellets* ressuspensos com 1mL de água *MilliQ* estéril. Após homogeneização o conteúdo dos tubos foi transferido para microtubos, e centrifugado, a 24°C, a 12.000rpm. Passados 3 minutos os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos com 200µL de água *MilliQ* estéril. Os tubos foram então levados ao banho em água fervente (95°C) por 10 minutos. Passado o período determinado, os tubos foram levados diretamente para o freezer a -20°C, onde permaneceram por 30 minutos. Após descongelamento em

temperatura ambiente, os tubos foram novamente centrifugados a 12.000rpm, a 24°C. Passados 10 minutos, o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo microtubo, e conservado em freezer -20°C.

4.4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.4.3.1 PCR para confirmação da espécie *Staphylococcus aureus*

Para confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* utilizou-se os iniciadores (*primers*) correspondentes a regiões específicas dos genes 16S rRNA, segundo MASON et al. (2001):

Sa 16S F: CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G-5'

Sa 16S R: CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG-3'

Para cada 25µL de reação foram utilizados 5µL de DNA (50µg/µL); 14,95µL de água *MilliQ* estéril; 2,5µL de tampão 10X; 1,5µL de 3mM MgCl; 0,2µL de solução Dntp 200µL; 0,3µL de cada *primer* e 0,25µL de 1,25U *Taq* DNA polimerase. Para amplificação foi empregado um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1,5 minutos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; um único ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos; e manutenção a 4°C até a retirada do produto do termociclador.

4.4.3.2 PCR para confirmação de *Salmonella* spp, *S. Enteritidis* e *S.*

Typhimurium

O produto da extração de DNA foi submetido à técnica Multiplex PCR para identificação de *Salmonella* spp, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium descrita por SOUMET et al. (1999). Os iniciadores utilizados, descritos pelo mesmo

autor, foram:

ST11: 5'- GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA -3' e ST15: 5'- GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G - 3'; específicos para o gênero *Salmonella* spp;
 S1: 5'- GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA -3' e S4: 5'- ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC -3'; específicos para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis e
 Fli15: 5'- CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T -3' e Typ04: 5'- ACT GGT AAA GAT GGC T -3'; específicos para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.

Para cada 25µL de reação foram utilizados 5µL de DNA (50µg/µL); 6,9µL de água *MilliQ* estéril; 2,5µL de tampão 10X; 0,75µL de 1,5mM MgCl 50mM; 0,2µL de solução Dntp 200µL; 1,5µL dos dois primeiros pares de *primers* e 1,7µL do terceiro par de *primer*; e 0,25µL de *Taq* DNA polimerase (1,25U). Para amplificação foi empregado um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; um único ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos; e manutenção a 4°C até a retirada do produto do termociclador.

4.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os *amplicons* resultantes da reação de PCR, juntamente com marcador de peso molecular, foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose.

Para detecção das bandas, o gel de agarose foi submetido a uma fonte de luz ultravioleta; e a imagem capturada através do sistema de aquisição de imagens EPI Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP).

As imagens dos géis foram analisadas visualmente, estimando-se os pesos moleculares das bandas por comparação com o marcador. Através da comparação deste resultado com as bandas de cepa padrão para cada gênero e espécie de

organismo, identificaram-se as cepas presentes nas amostras coletadas.

4.4.4.1 Eletroforese em gel para espécie *Staphylococcus aureus*

Os *amplicons* resultantes da reação de PCR, juntamente com marcador de peso molecular de 100-pb ladder, foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%, corado com Brometo de Etídio, por 40 minutos com intensidade de corrente elétrica de 6V/cm.

Foram consideradas positivas para a espécie *S. aureus* as cepas que apresentaram banda com tamanho aproximado de 800 pares de base (pb), conforme MASON et al. (2001).

4.4.4.2 Eletroforese em gel para gênero *Salmonella*

Os *amplicons* resultantes da reação de PCR, juntamente com marcador de peso molecular de 100-pb ladder, foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1,8%, corado com Brometo de Etídio, por uma hora com intensidade de corrente elétrica de 6V/cm.

Foram consideradas positivas para o gênero *Salmonella* as cepas que apresentaram bandas com tamanho aproximado de 429 pares de base (pb); positivas para a espécie *S. Enteritidis* as cepas com bandas de 270 pares de base e positivas para *S. Typhimurium* aquelas com bandas de 600 pares de base, conforme SOUMET et al. (1999).

Os microrganismos isolados e identificados estão estocados em microtubos contendo 0,5mL de caldo Lúria e 0,5mL de glicerina estéril, e conservados em

freezer a -70°C , como parte da coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

4.5 Análise estatística dos resultados

Para análise descritiva das variáveis em estudo, foram realizados testes estatísticos (teste t de student, qui quadrado e correlação linear de Pearson) utilizando o programa de computador: STATA 9.1.

4.6 Aspectos Éticos

Será garantido o sigilo da identificação dos estabelecimentos comerciais de coleta.

5. RESULTADOS

5.1 Características dos estabelecimentos e forma de apresentação dos alimentos

Os restaurantes selecionados para amostragem foram classificados em dois grupos, segundo tipo de alimentos comercializados. Aqueles que comercializavam apenas pratos típicos da culinária japonesa, como *sushis* e *sashimis*, foram definidos como “estabelecimentos especializados na culinária nipônica”. Os considerados “não especializados” foram os que ofereciam cardápio variado, com diversos tipos de alimentos e preparações, incluindo os da culinária japonesa, objetos do presente estudo.

Os restaurantes especializados amostrados apresentavam decorações típicas japonesas e os funcionários, a maioria com feições orientais, trajavam roupas também típicas. Em alguns destes estabelecimentos, o *sushiman* (pessoa que prepara os pratos nipônicos) preparava os *sushis* e *sashimis* em um balcão próximo ao bufê de exposição, de forma visível aos consumidores. Em outros locais de coleta os pratos eram preparados dentro de cozinhas, sem que os clientes pudessem observar. Os *sushiman* que puderam ser observados utilizavam proteção para o cabelo (touca), alguns trajavam aventais e nenhum utilizava luvas. O balcão de exposição, normalmente, estava decorado com barcas e adornos típicos nipônicos. Em dois dos oito estabelecimentos especializados (25%), os balcões eram térmicos (refrigerados), e os demais (75%) ofereciam os alimentos em barcas de madeira ou travessas sem refrigeração. Os balcões térmicos dos dois estabelecimentos citados eram também fechados com vidros, sendo abertos apenas para consumo ou reposição do alimento.

Além disso, alguns estabelecimentos expunham pequenas quantidades de preparações, e os balcões eram reabastecidos com frequência; mas, em outros, grande quantidade de alimento ficava exposta no balcão, onde permaneciam por períodos maiores.

Os restaurantes não especializados ofereciam aos consumidores diversos tipos de preparações em seus bufês, e apenas uma pequena área destes era destinada à exposição das iguarias japonesas (Figura 5.1). Nesses estabelecimentos, *sushis* e *sashimis* estavam localizados próximos às saladas e pratos frios, ou entre estes e os pratos quentes. Apenas em alguns restaurantes havia uma área específica para exposição dos pratos japoneses, separada das demais preparações servidas pelo estabelecimento. Assim como nos restaurantes especializados, nos não especializados, a forma de apresentação dos *sushis* e *sashimis* aos consumidores diferiu de acordo com o restaurante. Em alguns casos esses alimentos ficavam expostos em travessas sobre o gelo e, em outros, não havia nenhum tipo de refrigeração. Nos estabelecimentos não especializados amostrados, não foi possível visualizar a preparação dos pratos japoneses, já que eram preparados na cozinha e apenas levados ao balcão para exposição e consumo.

A Figura 5.2 ilustra a distribuição de amostras quanto à forma de conservação nos restaurantes (temperatura ambiente, sobre gelo ou balcão refrigerado), segundo tipo de estabelecimento (especializado ou não especializado).

Figura 5.1. Exemplo de exposição de *sushis* nos estabelecimentos amostrados.

Figura 5.2. Forma de conservação dos *sushis* e *sashimis*, segundo o tipo de estabelecimento (especializado ou não na culinária nipônica), São Paulo, 2006.

Foram objetos deste trabalho *sushis* e *sashimis* preparados com peixe cru, expostos em balcão de auto-serviço. Existem, porém, vários tipos de *sushis*, de acordo com sua composição (Anexo 1). Normalmente são ‘recheados’ apenas com peixes crus, como salmão, atum, robalo e peixe prego; mas podem também conter pepino, manga, pele de peixe assada, *kanikama* e outros ingredientes. Em geral, os estabelecimentos especializados na culinária nipônica ofereciam *sushis* contendo apenas pescado cru; porém, muitos restaurantes não especializados produziam *sushis* mistos, de pescado e outro ingrediente. Portanto, algumas amostras continham outros ingredientes, além do pescado cru, arroz e alga.

Quando solicitada, aos funcionários dos restaurantes, a preparação de porção “para viagem”, os estabelecimentos forneceram embalagens descartáveis de alumínio ou isopor, que seriam fechadas com tampa de alumínio ou filme plástico, respectivamente. Um estabelecimento visitado, classificado como não especializado,

não permitiu a preparação desta porção, alegando que os alimentos ali produzidos deveriam ter consumo imediato e, portanto, não participou do estudo. As embalagens “para viagem” foram preparadas pela própria pesquisadora, com exceção de uma, de estabelecimento não especializado, que foi montada por um funcionário do local, sob a supervisão e escolha da pesquisadora.

5.2 Qualidade microbiológica

O resultado da análise microbiológica das amostras foi comparado com os valores preconizados pela legislação brasileira, para pratos prontos para o consumo a base de pescados crus e a base de cereais, descritos na RDC nº12 (BRASIL 2001).

5.2.1 Resultado da análise quantitativa de coliformes termotolerantes e qualitativa de *Escherichia coli*

Cinquenta por cento das amostras coletadas (10/20) apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima do limite permitido pela legislação Brasileira para alimentos a base de cereais e de pescados crus (10^2 NMP/g), conforme a Figura 5.3.

Escherichia coli foi isolada em nove das vinte amostras (45%). Quatro, das oito amostras de estabelecimentos especializados (50%), estavam contaminadas; e entre os não especializados, esse número foi 41,7% (5/12); como apresentado na Figura 5.4.

Figura 5.3. Número de amostras de *sushi* e *sashimi* contaminadas por coliformes termotolerantes, segundo quantidade, em NMP/g, e tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica), São Paulo, 2006.

Figura 5.4. Número de amostras de *sushi* e *sashimi* contaminadas por *Escherichia coli*, segundo o tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica), São Paulo, 2006.

A quantificação de coliformes termotolerantes, estabelecido pela RDC nº12 (BRASIL 2001), é usada com indício da presença de bactérias potencialmente patogênicas de origem fecal, como *Escherichia coli*. Porém, das nove amostras em que foram identificadas *E. coli*, três tiveram quantificação de coliformes termotolerantes abaixo de 10^2 NMP/g, parâmetro estabelecido pela legislação brasileira.

5.2.2 Resultado da análise de *Staphylococcus aureus*

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº12 (BRASIL 2001) estabelece parâmetros para a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, como sugestivo da presença de *Staphylococcus aureus*. No presente trabalho, não se limitou ao teste de coagulase, e foi realizada identificação molecular das cepas isoladas das amostras, segundo MASON et al. (2001). O resultado da eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* resultantes da PCR está apresentado na Figura 5.5. Os fragmentos de tamanho aproximado de 800 pares de base (pb) correspondem à espécie *aureus*.

A RDC nº12 (BRASIL 2001) estabelece limites máximos para presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras, conforme o tipo de alimento. A tolerância para amostras de “pratos prontos para o consumo a base de pescados crus” é de 5×10^3 UFC/g. Para “pratos prontos para o consumo a base de cereais” esse limite é de 10^3 UFC/g. Como um dos objetos de estudo, o *sushi*, é preparado com arroz, além do pescado, considerou-se como limite máximo aceitável o menor valor, 10^3 UFC/g.

Legenda: M = marcador de peso molecular de 100-pb ladder.

1-10 = *amplicons* resultantes da PCR, segundo MASON et al. (2001), oriundos das amostras analisadas.

Figura 5.5. Resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase de amostras identificadas por métodos bioquímicos, utilizando os iniciadores correspondentes a regiões específicas dos genes 16S rRNA das espécies de *Staphylococcus*, segundo MASON et al. (2001). Corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo.

Das 8 amostras provenientes de restaurantes especializados na culinária nipônica, 2 (25%) apresentavam *Staphylococcus aureus*, sendo que uma delas (12,5%) com contagem acima de 10^3 UFC/g. Entre as 12 amostras de restaurantes não especializados, 7 (58,3%) foram positivas para *S. aureus*, sendo 2 (16,7%) acima do valor de referência. No total de 20 amostras, 9 (45%) apresentaram *S. aureus*, sendo 3 (15%) com contagem acima de 10^3 UFC/g, como apresentado na Figura 5.6.

Figura 5.6. Número de amostras de *sushi* e *sashimi* contaminadas com *Staphylococcus aureus*, segundo o tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica) e contagem do microrganismo, São Paulo, 2006.

5.2.3 Resultado da análise de *Salmonella* spp

Não foram isolados microrganismos do gênero *Salmonella* em nenhuma das 20 amostras analisadas, estando estas de acordo com o parâmetro preconizado pela RDC nº12 (BRASIL 2001), de ausência para este patógeno em pratos prontos para o consumo a base de pescados crus e cereais.

5.2.4 Resultado da análise de *Vibrio* spp

A legislação brasileira (BRASIL 2001) só fornece valores de referência para a pesquisa quantitativa de *V. parahaemolyticus* (limite de 10^3 NMP/g). A pesquisa microbiológica realizada, porém, revelou a existência de outras espécies potencialmente patogênicas, em quantidade inferior ao limite preconizado para *V. parahaemolyticus*.

Do total de 20 amostras, 7 (35%) apresentaram bactérias do gênero *Vibrio*, classificadas segundo testes bioquímicos (MATTE et al. 1994). As espécies isoladas foram: *V. metschnikovii*, *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. iliopiscarius* e *V. ordalli*. Dentre os estabelecimentos especializados, 37,5% (3/8) apresentaram contaminação por microrganismos do gênero *Vibrio*; e dentre os estabelecimentos não especializados, esta porcentagem foi 33,3 (4/12). Três das 7 amostras apresentaram contaminação por mais de uma espécie, sendo estas provenientes de estabelecimentos não especializados.

5.2.5 Resultado da análise de *Bacillus cereus*

Uma amostra (12,5%), das oito de estabelecimentos especializados apresentou microrganismo classificado, através de testes bioquímicos, como *Bacillus*

Figura 5.7. Número de amostras de *sushi* e *sashimi* contaminadas com *Bacillus cereus*, segundo o tipo do estabelecimento (especializado ou não em culinária nipônica), São Paulo, 2006.

cereus. Dentre os restaurantes não especializados, duas amostras (16,7%) apresentaram essa contaminação (Figura 5.7). A contagem desta bactéria, porém, foi inferior ao limite estabelecido pela RDC nº12, de 10^3 UFC/g (BRASIL 2001), nos três casos.

5.2.6 Resultado da análise de *Aeromonas* spp

Quinze das 20 (75%) amostras apresentaram microrganismos do gênero *Aeromonas*. As espécies identificadas segundo testes bioquímicos (HARF-MONTEIL et al. 2004; MATTÉ 2004) foram: *A. schubertii*, *A. popoffii*, *A. media*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. salmonicida*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*. Algumas cepas foram identificadas apenas pelo gênero, *Aeromonas* spp.

Todas as oito (100%) amostras de estabelecimentos especializados na culinária japonesa apresentaram contaminação por *Aeromonas*. Entre os estabelecimentos não especializados esse número foi 58,3% (7/12). Do total, em 15 (75%) das 20 amostras analisadas, foram isolados microrganismos do gênero *Aeromonas*. A legislação brasileira não estabelece parâmetros para este microrganismo.

5.2.7 Resultado geral

Considerando-se apenas os parâmetros de qualidade, para pratos prontos para consumo a base de pescado cru e cereais, citados na RDC nº12 (BRASIL 2001), oito (40%) amostras podem ser consideradas em “condições sanitárias satisfatórias”: amostras número 1, 6, 7, 8, 16, 18, 19 e 20. Estas, porém, continham microrganismos potencialmente patogênicos não citados pela legislação em questão como espécies de

Tabela 5.1. Resultado da análise microbiológica de *sushi* e *sashimi* de cada amostra analisada, São Paulo, 2006.

Amostra	CT (NMP/g)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp (NMP/g)	<i>B. cereus</i> (UFC/g)	<i>Aeromonas</i> spp.
^a Padrão	10 ²	sd	^b 10 ³	ausência	^c 10 ³	10 ³	Sd
1 (NE)	23	+	-	-	-	-	-
2 (E)	2,1x10 ³	+	-	-	-	-	<i>A. schubertii</i> , <i>A. popoffii</i>
3 (E)	4,6x10 ³	+	-	-	<i>V. metschnikovii</i>	-	<i>A. allosaccharophila</i>
4 (E)	1,5x10 ²	+	-	-	<i>V. fluvialis</i>	-	<i>A. media</i>
5 (E)	3	+	3,3x10 ⁴	-	-	-	<i>A. spp.</i> , <i>A. schubertii</i> , <i>A. media</i>
6 (E)	23	-	-	-	-	-	<i>A. spp.</i> , <i>A. encheleia</i> , <i>A. popoffii</i>
7 (E)	<3	-	-	-	-	-	<i>A. encheleia</i>
8 (E)	43	-	3,3x10 ²	-	-	-	<i>A. media</i>
9 (NE)	64	-	3,3x10 ³	-	-	-	<i>A. schubertii</i> , <i>A. eucrenophila</i> , <i>A. encheleia</i> , <i>A. popoffii</i>
10 (NE)	2,1x10 ³	-	10 ²	-	-	-	-
11 (NE)	4,6x10 ²	+	2,2x10 ³	-	-	-	-
12 (E)	1,2x10 ²	-	-	-	<i>V. anguillarum</i>	+	<i>A. schubertii</i> , <i>A. popoffii</i>
13 (NE)	1,4x10 ²	-	1,3x10 ²	-	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. illopiscarius</i>	-	<i>A. encheleia</i> , <i>A. salmonicida</i>
14 (NE)	4,6x10 ²	-	50	-	-	-	-
15 (NE)	1,1x10 ³	+	33	-	-	-	-
16 (NE)	7	-	6,6x10 ²	-	-	-	<i>A. encheleia</i>
17 (NE)	4,6x10 ²	+	-	-	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. ordalli</i>	-	<i>A. allosaccharophila</i>
18 (NE)	93	+	-	-	<i>V. metschnikovii</i> , <i>V. anguillarum</i>	+	<i>A. encheleia</i> , <i>A. trota</i> , <i>A. eucrenophila</i>
19 (NE)	23	-	-	-	-	-	<i>A. salmonicida</i> , <i>A. media</i>
20 (NE)	9	-	-	-	<i>V. metschnikovii</i>	+	<i>A. popoffii</i> , <i>A. encheleia</i>
Total	50% acima de 10 ² NMP/g	45%	15% acima de 10 ³ UFC/g	-	35% de presença	15% de presença	75% de presença

Legenda: ^a Parâmetros estabelecidos pela RDC n°12, para pratos prontos para o consumo a base de pescado cru e cereais (BRASIL 2001)

^b Valor referente a “pratos prontos a base de cereais”. Para “pratos prontos a base de pescado cru” o valor de referência é 5x10³UFC/g (BRASIL 2001)

^c Valor de referência para contagem de *Vibrio parahaemolyticus*. A presença de outras espécies deve ser indicada (BRASIL 2001)

CT = coliformes termotolerantes

sd = sem dado, pois a pesquisa deste microrganismo não é preconizada pela RDC n°12 (BRASIL 2001)

E = estabelecimento especializado em culinária nipônica

NE = estabelecimento não especializado

(+) = positivo/presença

(-) = negativo/ausência

Aeromonas e *Vibrio*, além de *Escherichia coli* (Tabela 5.1).

5.3 Análise estatística dos dados

Nas amostras analisadas não foi identificada a presença de microrganismos do gênero *Salmonella*, portanto, este parâmetro não participou das análises estatísticas.

Ao serem comparadas as contagens médias de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus aureus* nas amostras dos diferentes restaurantes, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as provenientes de estabelecimentos especializados e as de não especializados (Tabela 5.2). O mesmo foi observado ao se comparar as amostras segundo seus ingredientes, ou seja, se continham apenas pescado cru, arroz e alga marinha ou se continham ingredientes adicionais, como legumes e frutas.

Diferença significativa também não foi observada na comparação das médias de contagem de *S. aureus* segundo a temperatura de exposição. Porém, a média de contagem de coliformes termotolerantes apresentou diferença estatística ($p=0,0415$) em relação a esse parâmetro. Houve maior quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras que ficavam sem refrigeração no balcão de exposição, do que naquelas sob temperatura controlada, sobre gelo ou em balcão refrigerado. Os dados da análise estatística encontram-se resumidos na Tabela 5.2.

Em seguida foram comparados os dados qualitativos da pesquisa microbiológica, segundo o tipo de estabelecimento, temperatura de exposição e ingredientes nas amostras. Para coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus* foram consideradas “positivas” as amostras com contagem acima dos valores

máximos de presença permitidos pela legislação brasileira (BRASIL 2001). Os resultados do teste Qui-Quadrado (χ^2) estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.2. Resultados (p^*) do teste t de Student, para contagem de microrganismos nas amostras, segundo tipo de estabelecimento (especializado ou não especializado), forma de exposição dos alimentos no bufê (sob refrigeração ou à temperatura ambiente) e composição dos *sushis* e *sashimis* (peixe, arroz e alga ou demais ingredientes).

Microrganismo	Tipo de estabelecimento	Temperatura de exposição	Ingredientes
Coliformes termotolerantes	0,8086	0,0415	0,3947
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8542	0,1444	0,2125

* p = nível descritivo do teste t de Student.

Diferença significativa entre médias quando $p < 0,05$.

Tabela 5.3. Resultados (pr^*) do teste Qui-Quadrado (χ^2), para contagem acima do estabelecido pela RDC nº12 (BRASIL 2001) ou presença de microrganismos nas amostras, segundo tipo de estabelecimento (especializado ou não especializado), forma de exposição dos alimentos no bufê (sob refrigeração ou à temperatura ambiente) e composição dos *sushis* e *sashimis* (peixe, arroz e alga ou demais ingredientes).

Microrganismo	Tipo de estabelecimento	Temperatura de exposição	Ingredientes
Coliformes termotolerantes	1,000	0,361	0,639
<i>Escherichia coli</i>	0,714	0,714	0,423
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,798	0,798	0,168
<i>Vibrio spp.</i>	0,848	0,251	0,658
<i>Bacillus cereus</i>	0,798	0,306	0,948
<i>Aeromonas spp.</i>	0,035	0,292	0,417

* pr = nível descritivo do teste *qui* quadrado.

Diferença significativa entre médias quando $pr < 0,05$.

Os dados da Tabela 5.3 indicam que houve diferença significativa entre os

resultados de presença de *Aeromonas* spp. e o tipo de estabelecimento que oferecia as amostras ($p=0,035$). Todas as amostras provenientes de restaurantes especializados na culinária nipônica estavam contaminadas com alguma espécie de *Aeromonas* e, entre os estabelecimentos não especializados, 58,3% continham este gênero de microrganismo.

Foi realizado, também, teste de correlação linear entre os parâmetros analisados nas amostras, da seguinte forma: contagem de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus aureus* acima do preconizado pela legislação brasileira, presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus cereus* e *Aeromonas* spp. Como resultado, apenas foi observada correlação positiva ($r=0,5725$) entre presença de *Bacillus cereus* e espécies de *Vibrio*. Entre os demais parâmetros não houve correlação, nem positiva nem negativa (Tabela 5.4). Com relação à presença de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp., porém, houve indício de correlação positiva ($r=0,4237$), indicando que a presença de um sugere a existência do outro microrganismo.

Tabela 5.4. Resultados (r^*) do teste de correlação linear de Pearson, para contagem ou presença de microrganismos em amostras de *sushi* e *sashimi*, São Paulo, 2006.

Microrganismo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
Coliformes termotolerantes	0,3253	-0,1394	0,1301	-0,1983	0,1100
<i>Escherichia coli</i>		0,2430	0,1791	-0,0985	-0,1741
<i>Staphylococcus aureus</i>			-0,2020	-0,1167	0,1220
<i>Vibrio</i> spp.				0,5725	0,4237
<i>Bacillus cereus</i>					0,2425

* r = nível descritivo do teste de correlação linear de Pearson.
Correlação significativa quando $|r| > 0,444$; para $\alpha=0,05$.

6. DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alimentos deve ser feita, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela comparação de resultados de análises microbiológicas com os valores estabelecidos pela legislação brasileira. No sub-item b) do item 22 do anexo I da RDC nº12 (BRASIL 2001) estão especificados os microrganismos que devem ser pesquisados em amostras de *sushis* e *sashimis*, definidos como “pratos prontos para o consumo a base de pescados crus”: coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* sp. *Sushis*, porém, são pratos nipônicos preparados com arroz, além do pescado cru, portanto, considerou-se relevante adotar também os parâmetros especificados no sub-item d), para “pratos prontos para o consumo a base de cereais”. Em pratos com cereais a legislação preconiza a pesquisa dos mesmos microrganismos, exceto *Vibrio parahaemolyticus*, e também *Bacillus cereus* (BRASIL 2001). Os limites para coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp são iguais nos dois casos. O limite máximo de *Staphylococcus* coagulase positiva, porém, permitido em pratos a base de pescado cru é 5×10^3 UFC/g e em pratos com cereais é 10^3 UFC/g. No presente estudo considerou-se o limite menor, 10^3 UFC/g, para a interpretação dos dados.

Produtos cujos resultados analíticos sejam iguais ou inferiores aos limites estabelecidos, são considerados em “condições sanitárias satisfatórias”. Se os resultados forem superiores aos preconizados, ou houver presença e/ou quantificação de outros microrganismos patogênicos não especificados pela resolução, o produto é considerado em “condições sanitárias insatisfatórias”.

6.1 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

A pesquisa do grupo dos coliformes termotolerantes é tradicionalmente empregada, sobretudo em saúde pública, como indicador das condições higiênico-sanitárias de uma amostra. A presença de coliformes termotolerantes em alimentos é um indicativo de contaminação fecal durante alguma etapa de sua produção (FRANCO & LANDGRAF 2003; WEBSTER et al. 2004).

Do total de amostras analisadas, coliformes termotolerantes estavam presentes em contagem acima de 10^2 NMP/g em 50% delas. Esta mesma porcentagem foi observada quando analisados separadamente os estabelecimentos especializados na culinária nipônica e os não especializados (Figura 5.3). Tal dado, associado às análises estatísticas (Tabelas 5.2 e 5.3), indica que ambos os tipos de restaurantes tiveram resultados similares no que se refere a coliformes termotolerantes. Com relação aos ingredientes utilizados no preparo dos *sushis* e *sashimis*, a comparação entre alimentos “recheados” apenas com pescado cru e aqueles “recheados” com outros ingredientes, como legumes e frutas, indica que a contagem de coliformes termotolerantes foi semelhante, estatisticamente.

Diferentemente dos parâmetros anteriores, a média de contagem de coliformes termotolerantes, ou seja, a análise quantitativa apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à temperatura de exposição no balcão de auto-serviço. Alimentos não refrigerados assumem a temperatura ambiente e, como as coletas foram realizadas em meses quentes na Cidade de São Paulo, de janeiro a abril, e no período normalmente mais quente do dia, das onze às quatorze horas, alimentos sem controle de temperatura tornavam-se quentes. Além disso, muitos estabelecimentos não tinham sistema de refrigeração ambiente o que, associado ao

grande número de pessoas no horário de almoço, contribuiu para o aumento da temperatura no interior dos restaurantes. Os *sushis* e *sashimis* expostos em temperatura ambiente tiveram média de contagem de coliformes termotolerantes maior do que aqueles mantidos em balcão refrigerado ou sobre o gelo (Tabela 5.2). O resultado observado pode ser compreendido por saber-se que este grupo de microrganismo cresce em temperaturas mais elevadas, características do trato intestinal de animais de sangue quente. Assim, o tempo de exposição no balcão, associado a uma temperatura elevada, favorece o crescimento de microrganismos do grupo coliformes termotolerantes.

Quando os dados de coliformes termotolerantes, porém, são analisados de maneira qualitativa, ou seja, amostras com contagem acima de 10^2 NMP/g consideradas como insatisfatórias (BRASIL 2001), não se observa diferença estatisticamente significativa com relação à temperatura de exposição (Tabela 5.3).

A análise dos resultados deste estudo indica que o processo de produção de *sushis* e *sashimis* comercializados na Cidade de São Paulo pode apresentar falhas de higiene, ocasionando a contaminação do produto com microrganismos de origem fecal. O tipo de estabelecimento e a composição dos *sushis* e *sashimis* não tiveram relação com a contagem de coliformes termotolerantes, porém a temperatura elevada de exposição favoreceu o crescimento de bactérias deste grupo, sendo um fator de risco para a saúde da população que consome este tipo de alimento.

RESENDE (2004) ao analisar amostras de *sushis* e *sashimis* na Cidade de Brasília observou quantificação acima do permitido em 25% delas. BASTI et al (2006), porém, não observou tal contaminação em peixes recém-capturados, o que

indica que coliformes termotolerantes não são parte da microbiota natural de peixes, e sim falha no processo de higiene durante a manipulação.

A presença de microrganismos do grupo coliformes termotolerantes é um indicativo da presença de bactérias de origem fecal, entre elas, linhagens patogênicas de *Escherichia coli* (KONEMAN et al. 2001; FRANCO & LANDGRAF 2003). A legislação brasileira, através da RDC nº12, estabelece parâmetros, tolerância máxima, para coliformes termotolerantes na avaliação de amostras de alimentos. Com relação a *Escherichia coli*, a mesma norma indica que “caso seja determinada a presença de *E. coli*, deve constar no laudo analítico”, porém, não determina como deve ser classificada a amostra, se considerada imprópria ou em condições satisfatórias para o consumo.

Na presente pesquisa *E. coli* foi observada em 45% das amostras (Figura 5.4). Ao se comparar os resultados de contagem de coliformes termotolerantes e de *E. coli* se observa que três (33,3%), das nove amostras com *E. coli*, apresentaram contagem de coliformes termotolerantes abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira (Tabela 5.1). Segundo a legislação para coliformes a 45°C, estas três amostras são consideradas em condições sanitárias satisfatórias, porém apresentaram *E. coli*. Este resultado indica que a quantificação abaixo de 10^2 NMP/g de coliformes termotolerantes não é garante a qualidade higiênico-sanitária e a inocuidade do produto.

Análises estatísticas indicaram que não houve diferença significativa entre a presença de *E. coli* e cada um dos três parâmetros analisados: tipo de estabelecimento, temperatura de exposição no balcão de auto-serviço e ingredientes dos *sushis* e *sashimis* (Tabela 5.3).

No Brasil, poucos trabalhos de avaliação da qualidade higiênico-sanitária de pescados apresentam dados de pesquisa de *E. coli*, já que este parâmetro não é estabelecido pela RDC nº12 (BRASIL 2001). Em outros países, porém, a pesquisa de *E. coli* faz parte dos parâmetros de qualidade de alimentos, por exemplo, na Austrália, onde MILLARD & ROCKLIFE (2003) identificaram 14,5% de amostras de *sushis* contaminadas com *E. coli*. Em Taiwan, FANG et al. (2003) identificaram 4,6% de amostras de *sushis* com *E. coli*.

6.2 *Staphylococcus aureus*

A legislação brasileira (BRASIL 2001) preconiza a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva como indicativo da presença de *Staphylococcus aureus*. No presente trabalho, porém, foi realizada identificação molecular das cepas isoladas, confirmando-se a espécie *S. aureus*.

Cepas de *S. aureus* foram isoladas em 45% das amostras analisadas (Figura 5.6). No trabalho realizado por BASTI et al. (2006), *S. aureus* não foi isolado de peixes recém-capturados e de peixes cultivados, indicando que não é parte da flora natural de pescados. Portanto, a presença deste microrganismo em pescados crus e suas preparações é devido a contaminação durante a captura e/ou subsequente processo de manipulação sem a devida higiene. MILLARD & ROCKLIFF (2003) e REIJ & DEN AANTREKKER (2004) afirmam ainda que a presença deste microrganismo em *sushi* é em grande parte resultado do contato humano e que essa contaminação pode ser minimizada com boas práticas de manipulação e prevenção do crescimento de microrganismos com controle adequado de temperatura.

BASTI et al. (2006) afirmam também que pequeno número desta bactéria em produtos pesqueiros não representa um grave problema, porém, se houver manipulação sem cuidado e tempo suficiente para sua multiplicação, *S. aureus* pode produzir toxina e, assim, o consumo deste produto pode causar intoxicação.

Dentre as amostras positivas para *S. aureus*, 33% continham quantidade superior ao limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL 2001), de 10^3 UFC/g.

Contaminação com *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g, valor máximo estabelecido pela legislação brasileira, foi verificada em 15% das amostras (Figura 5.6).

Análises estatísticas indicaram que não houve diferença significativa entre a quantificação de *S. aureus* e cada um dos três parâmetros analisados: tipo de estabelecimento, temperatura de exposição no balcão de auto-serviço e ingredientes dos *sushis* e *sashimis* (Tabelas 5.2 e 5.3).

ADAMS et al. (1994) isolaram *Staphylococcus aureus* em 12% das amostras de *sushis* analisadas, nos Estados Unidos. Em Brasília, RESENDE (2004) identificou *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 5×10^3 UFC/g em apenas 1,14% das amostras de *sushis* e *sashimis*, e MILLARD & ROCKLIFF (2003) observaram 5,4% das amostras de *sushis* coletadas na Austrália com quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva entre 10^3 e 10^4 UFC/g.

O governo chinês preconiza ausência de *S. aureus* em alimentos prontos para consumo, porém, FANG et al. (2003) isolaram este microrganismo em 13,6% de amostras de *sushis* analisadas em Taiwan.

6.3 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* não foi isolado em nenhuma amostra analisada, estando todas as amostras em acordo com a legislação brasileira, que preconiza ausência deste microrganismos em 25 gramas de amostra (BRASIL 2001). MILLARD & ROCKLIFF (2003) e RESENDE (2004) analisaram amostras de *sushis* e *sashimis* e também não isolaram este microrganismo.

KUMAR et al. (2003) evidenciaram a presença de *Salmonella* spp. em peixes, mas acreditam que a incidência de bactérias deste gênero em pescados seja oriunda de contaminação durante o processamento e manipulação, como também relatado por ZHAO et al (2003). BASTI et al. (2006), em estudo com peixes, não identificaram microrganismos do gênero *Salmonella* naturais da microbiota de pescados. Estes estudos indicam que a presença de *Salmonella* spp. em pescados seja devida a falta de controle e higiene no processo de manipulação.

6.4 *Vibrio* sp

Existem, atualmente, 63 espécies de *Vibrio* validadas, sendo que pelo menos 8 delas são potencialmente patogênicas ao homem (MATTE 2003; ROUX et al. 2005). A legislação brasileira preconiza, através da RDC nº12 (BRASIL 2001), a pesquisa apenas de uma espécie patogênica, *Vibrio parahaemolyticus*, em amostras de pratos prontos para o consumo a base de pescado cru.

Nas amostras analisadas não foi isolado *V. parahaemolyticus*, porém outras cinco espécies foram identificadas, entre elas *V. fluvialis* e *V. metschnikovii*, reconhecidas como potencialmente patogênicas. Sete das vinte amostras (35%)

estavam contaminadas com ao menos uma espécie de *Vibrio*, sendo que cinco destas (71,4%) continham *V. fluvialis* e/ou *V. metschnikovii*.

Análises estatísticas indicaram que não houve diferença significativa entre a presença de espécies de *Vibrio* e cada um dos três parâmetros analisados: tipo de estabelecimento, temperatura de exposição no balcão de auto-serviço e ingredientes dos *sushis* e *sashimis* (Tabela 5.3).

Uma grande variedade de espécies de *Vibrio* em amostras de peixes também foi observada por ELHADI et al. (2004), que isolaram oito espécies potencialmente patogênicas em pescados comercializados na Malásia. Populações combinadas foram observadas em mais de 50% das amostras. MATTÉ et al. (2006a) isolaram seis espécies potencialmente patogênicas em amostras de pescados. Estes resultados indicam que outras espécies patogênicas de *Vibrio*, além do *V. parahaemolyticus*, estão presentes em pescados crus; portanto, profissionais da área de saúde devem avaliar melhor o impacto destes microrganismos como causadores de doenças em humanos e recomendar a pesquisa de outras espécies de *Vibrio* em pratos prontos para o consumo a base de pescado cru.

Espécies de *Vibrio* são autóctones de ambiente aquático (MATTÉ 2003; HUANG & HSU 2005; ROUX et al. 2005). BASTI et al. (2006) isolaram *V. parahaemolyticus* em peixes recém-capturados, concluindo que este microrganismo é parte da flora natural de peixes. Outras espécies não foram pesquisadas, mas trabalhos como os realizados por ROUX et al. (2005) indicam que *V. metschnikovii*, *V. fluvialis* e *V. vulnificus* também são naturais da microbiota de pescados. BASTI et al. (2006) afirmam ainda que a presença de *V. parahaemolyticus* em pescados pode ser oriunda de contaminação cruzada.

6.5 *Bacillus cereus*

Cepas de *Bacillus cereus* foram isoladas em 15% das amostras (Figura 5.7), porém em contagem inferior ao preconizado pela legislação brasileira, 10^3 UFC/g (BRASIL 2001). Análises estatísticas (Tabela 5.3) revelaram que não houve diferença significativa entre as médias de contagem deste microrganismo segundo os três parâmetros estudados: tipo de estabelecimento (especializado ou não especializado na culinária nipônica), temperatura de exposição no balcão (refrigerado/gelo ou temperatura ambiente) e ingredientes utilizados para “recheiar” os pratos nipônicos (só peixe cru ou demais ingredientes). Portanto, nenhum dos três critérios pôde ser considerado como fator predisponente para a presença de *Bacillus cereus*.

A porcentagem de amostras contaminadas por *Bacillus cereus* observada nesta pesquisa é próxima à relatada por ADAMS et al. (1994), de 12%, em amostras de *sushis* nos Estados Unidos. A quantificação deste microrganismo realizada por estes autores também foi inferior ao limite estabelecido pela legislação, de 10^3 UFC/g. Em Taiwan, porém, o limite de *B. cereus* em amostras de alimentos prontos para o consumo é 10^2 NMP/g, e FANG et al. (2003) identificaram cepas deste microrganismo em 18,2% das amostras de *sushis* analisadas. MILLARD & ROCKLIFF (2003) obtiveram 3,6% das amostras de *sushis* com contagem de *B. cereus* entre 10^3 e 10^4 UFC/g, e 1,8% superior a 10^4 UFC/g.

6.6 *Aeromonas* sp

A pesquisa de microrganismos do gênero *Aeromonas* não é preconizada pela legislação brasileira (BRASIL 2001), porém, este gênero inclui espécies

potencialmente patogênicas para o homem. Nas amostras de *sushis* e *sashimis* analisadas, *Aeromonas* foi o gênero observado com maior frequência (75%).

Todas as amostras provenientes de estabelecimentos especializados na culinária nipônica estavam contaminadas com pelo menos uma espécie de *Aeromonas* potencialmente patogênica; e dentre os estabelecimentos não especializados, o resultado foi 58,3%. Análise estatística revelou que esta diferença foi significativa (Tabela 5.3), ou seja, o tipo de estabelecimento fornecedor da amostra influenciou no isolamento de *Aeromonas* sp. A maior incidência deste microrganismo foi em amostras provenientes de restaurantes especializados.

A maior adaptabilidade de espécies de *Aeromonas* a temperaturas mais baixas é uma característica que confere a esses organismos vantagens competitivas em relação ao conjunto da microbiota, favorecendo sua ocorrência em alimentos refrigerados e processados, principalmente em alimentos ricos em proteínas como a carne de peixes (GRANUM et al. 1998; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al. 2002; CASTRO-ESCARPULLI et al. 2003; KINGOMBE et al. 2004; MATTÉ 2004).

Diversos autores como MATTÉ (1993), GRANUM et al. (1998), CASTRO-ESCARPULLI et al. (2003), KINGOMBE et al. (2004) já haviam observado que peixe consumido cru pode ser um importante veículo de transmissão de *Aeromonas*. Sabe-se que para uma doença se manifestar são necessários outros fatores além da presença do(s) microrganismo(s), como sua virulência, número presente e resistência específica do hospedeiro (MATTÉ 1993). Entretanto, a elevada frequência de *Aeromonas* spp encontrada nos *sushis* e *sashimis* estudados, constitui um fator de risco para a população, o que deve ser melhor considerado pelas autoridades de saúde pública.

A ausência de exames diagnósticos de rotina para estes agentes nos serviços de saúde, talvez seja um fator da baixa casuística dessas infecções no Brasil.

Se considerarmos as longas extensões do litoral e dos rios brasileiros, o que conseqüentemente expõe uma elevada parcela da população ao contato com o ambiente aquático e favorece o consumo de pescados, pode-se supor um risco mais elevado de contrair infecções causadas por espécies de *Vibrio* e *Aeromonas*.

6.7 Interação entre os microrganismos

O teste de correlação linear entre os parâmetros microbiológicos analisados indicou haver correlação positiva entre a presença de espécies *Vibrio* e de *Bacillus cereus* nas amostras. Resultado similar, porém, não foi identificado na bibliografia consultada. Trabalhos de pesquisa com estes microrganismos revelam que ocupam *habitats* diferentes: espécies de *Vibrio* são autóctones de ambientes aquáticos, enquanto o solo é o reservatório natural de *Bacillus cereus*. Além disso, *Vibrio* sp é contaminante de peixes, determinando enfermidades principalmente quando relacionado ao consumo de pescado cru e *Bacillus cereus* é contaminante de cereais, o arroz no caso dos *sushis*. Estes microrganismos têm distribuição diferente no ambiente e a presença em pratos nipônicos está relacionada a diferentes matérias-primas, portanto não se identifica correlação teórica entre a presença destes. Pode-se pressupor que a baixa prevalência de amostras com *Bacillus cereus* e a baixa contagem dos mesmos tenha ocasionado a correlação positiva estatística com espécies de *Vibrio*. Um trabalho com mais amostras positivas de *Bacillus cereus* poderia esclarecer ou confirmar tal resultado.

Entre os demais microrganismos não foi verificada correlação, nem positiva, nem negativa.

Índices de contaminação fecal não tiveram correlação com a presença de espécies de *Aeromonas* e de *Vibrio*. Houve o isolamento destes microrganismos sem indícios positivos de contaminação fecal. Este evento pode ser explicado pelo fato dessas bactérias serem autóctones no ambiente aquático (MATTÉ 1993; PIANETTI et al. 2004).

Na pesquisa realizada em Seattle por ADAMS et al. (1994), foram identificadas amostras contaminadas por *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, porém, estes microrganismos não foram observados na mesma amostra.

6.8 Resultado geral

Das vinte amostras de *sushis* e *sashimis* analisadas, oito (40%) puderam ser consideradas em “condições sanitárias satisfatórias”, considerando-se apenas os microrganismos especificados na RDC nº12 (BRASIL 2001) para esses tipos de alimentos. Porém, nestas oito amostras foram identificados outros microrganismos potencialmente patogênicos, como espécies de *Aeromonas* e *Vibrio*, além de *Escherichia coli*, o que indica que apenas os parâmetros considerados para qualidade higiênico-sanitária podem não ser suficientes para garantir a inocuidade de um alimento.

Uma análise mais rigorosa dos resultados deste trabalho indica que nenhuma amostra pôde ser considerada segura para o consumo, pois todas apresentaram ao menos um fator de riscos à saúde humana.

Como concluído por ZUGARRAMURDI et al. (2004), a qualidade final de um alimento tem correspondência direta e linear com a qualidade da matéria-prima. Do ponto de vista microbiológico é difícil manter a qualidade de *sushis* e *sashimis*, pois são elaborados com pescados crus, que não passam por etapa de redução da carga microbiana, como cocção. Na produção deste tipo de produto é fundamental adotar práticas higiênicas em todos os processos da cadeia de produção (HUSS et al. 2000; HAMADA-SATO et al. 2005). O manipulador deve ser cuidadoso ao manusear o peixe para evitar contaminar a carne com microrganismos de sua superfície, guelras e vísceras (MORITA 2005).

O grande problema relacionado ao consumo de pescado cru exposto durante um período de tempo é a combinação de uma possível contaminação microbiana durante a cadeia produtiva do alimento e a possibilidade de multiplicação destas bactérias, por ser um substrato favorável do ponto de vista nutritivo; como observado por HUSS et al. (2000) e GONZÁLEZ-FANDOS et al. (2004). Uma carga microbiana inicial pequena, que pode não oferecer risco à saúde do consumidor, torna-se grande se a temperatura e tempo forem favoráveis e o alimento passa a ser um importante veículo de toxinfecção ao homem (HUSS et al. 2000; GONZÁLEZ-FANDOS et al. 2004).

A diversidade de espécies potencialmente patogênicas ou produtoras de toxinas isoladas dos *sushis* e *sashimis* estudados indica que é prudente que se evite seu consumo e que sejam adotadas práticas adequadas para manipulação e estocagem destes alimentos, visando reduzir a possibilidade de contaminação dos mesmos.

Considera-se, portanto, necessária a adoção de medidas específicas, que possam proteger o consumidor destes microrganismos. Para tanto, faz-se necessária

uma reavaliação das condições de comercialização de *sushis* e *sashimis*, bem como a adoção de medidas preventivas durante a manipulação e preparo destes alimentos. Além disso, o consumidor deve ser informado sobre os riscos da ingestão desses produtos crus.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- Segundo os critérios estabelecidos pela RDC nº12 (BRASIL 2001), para pratos prontos para o consumo a base de pescados crus e a base de cereais, 40% das amostras de *sushis* e *sashimis* analisadas foram consideradas em “condições sanitárias satisfatórias”;
- *Escherichia coli* foi isolada de 45% das amostras estudadas, sendo que em 33,3% dessas foi observada contagem de coliformes termotolerantes inferior a 10^2 NMP/g de alimento;
- Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* não foram isoladas das amostras, porém, 35% destas estavam contaminadas com outras espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas;
- Espécies de *Aeromonas* potencialmente patogênicas estavam presentes em 75% dos *sushis* e *sashimis* estudados;
- Os alimentos expostos nos bufês em temperatura ambiente apresentaram maior quantificação de coliformes termotolerantes, do que aqueles mantidos refrigerados ou sobre gelo;
- As amostras oriundas de estabelecimentos especializados na culinária nipônica apresentaram maior contaminação por espécies de *Aeromonas* potencialmente patogênicas, do que as coletadas em restaurantes não especializados.

O grande número de organismos indicadores de contaminação e potencialmente patogênicos detectados nas amostras de *sushi* e *sashimi* estudadas revela que o consumo destes alimentos representa perigo a saúde dos consumidores,

independente do tipo de estabelecimento que os ofereciam (especializados ou não na culinária nipônica) e a temperatura de exposição nos bufês de auto-serviço.

Os parâmetros microbiológicos preconizados pela legislação brasileira não foram suficientes para garantir a inocuidade do alimento em estudo, sendo que outros microrganismos não citados pela RDC nº12 (BRASIL 2001), e isolados das amostras, são potencialmente patogênicos para o homem.

A pesquisa de outras espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas, além do *V. parahaemolyticus*, e organismos do gênero *Aeromonas* podem auxiliar na elucidação da distribuição destes microrganismos neste tipo de alimento, para a determinação do real risco envolvido.

8. RECOMENDAÇÕES

Com base nas conclusões desta pesquisa, e considerando-se que o risco de toxinfecção é associado com a presença de células viáveis de microrganismos potencialmente patogênicos ou produtores de toxinas nos alimentos e com as condições imunológicas do hospedeiro, recomenda-se que profissionais responsáveis por produção e distribuição de alimentos adotem medidas mais rigorosas de higiene, principalmente na manipulação de produtos a serem servidos crus. Os consumidores devem ser informados dos riscos do consumo de pescados crus.

Tendo em vista a diversidade de espécies de *Aeromonas* potencialmente patogênicas e a elevada frequência de sua ocorrência nas amostras de *sushis* e *sashimis*, recomenda-se a pesquisa destes organismos em pratos a base de pescados crus.

A legislação brasileira recomenda, em pratos a base de pescados crus, apenas a pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*. Nas amostras de *sushis* e *sashimis* analisadas esta espécie não foi observada, mas outras espécies potencialmente patogênicas foram isoladas. Recomenda-se, portanto, a pesquisa de outras espécies que também podem causar doenças no homem quando ingeridas.

Recomenda-se a pesquisa de microrganismos dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* em casos de diarreia em humanos para elucidar a real participação destes e os riscos que oferecem à saúde humana.

9. REFERÊNCIAS*

Adams AM, Leja LL, Jinneman K, Beeh J, Yuen GA, Wekell MM. Anisakid parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in sushi and sashimi from Seattle area restaurants. **Journal of Food Protection** 1994; 57(4): 311-317.

APHA – American Public Health Association. **Compendium of methods for microbiological examination of foods** 1992 (3rd ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Principais Síndromes Infecciosas. In: **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**; 2004 [on line]. Available from <URL:http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/microbiologia/mod_1_2004.pdf>. [2005 jan 12]

Azevedo Filho AC, Romano APM, Barros AML de, Dimech CP, Santos DA dos, Hatch DL et al. Investigação de surto de diarreia aguda com isolamento de *V. cholerae* O1 Ogawa toxigênico no Município de São Bento do Una-PE. **Boletim eletrônico epidemiológico** 2004; 8:1-6. Available from <URL:http://www.saude.gov.br/svs/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0804.pdf>. [2006 jan 09]

Barboni SAV. **Ocorrência de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil**. São Paulo; 2003. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

---

* Apresentadas segundo Guia de Apresentação de teses - Biblioteca/CIR. São Paulo: FSP/USP; 1998.

Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Kamkar A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control** 2006; 17: 183-188.

Bautista MC, Engler MM. The Mediterranean diet: is it cardioprotective? **Progress in Cardiovascular Nursing** 2005; 20(2):70-76.

Brasil. **Constituição da República Federativa**, promulgada em 05 de outubro de 1988 Brasília, 1988. Título VIII cap. II seção II, p. 36-37.

Brasil. Decreto nº 30691 de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília/DF, 07 jul 1952. Seção 1, p. 10785. Available from: <URL:<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/riispoa.htm#decreto30691>>. [2003 oct 28]

Brasil. Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, retificação. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de outubro de 1969. Seção I pt. I, p. 8935-8.

Brasil. Portaria nº33, de 14 de julho de 2005. Inclui doenças à relação de notificação compulsória, define agravos de notificação imediata e a relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 julho 2005.

Brasil. Portaria nº185, de 13 de maio de 1997. Aprova o regulamento técnico de Identidade e Qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 maio 1997. Seção I, p.10282.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan 2001. [on line]. Available from

<URL:<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=sushi>>. [2004 dez 30]

Canecchio, O. Chegamos a 278 *sushis* por Minuto. **Veja São Paulo**. 2003 jul 23:14-22.

Cardoso NLC, André MCDPB, Serafini AB. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar** 2003; 17(109):81-87.

Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology** 2003; 84: 41-49.

Cato JC. Economic values associated with seafood safety and implementation of seafood - Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programmes. **FAO Fisheries Technical Paper**. Rome: FAO; 1998, n°381 70p.

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **Preventing Emerging Infectious Diseases: A Strategy for the 21st Century**. [on line] Available from: <URL:<http://www.cdc.gov/ncidod>>. [2003 oct 9]

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **Foodborne illness**, jan 2005a. [on line] Available from: <URL:<http://www.cdc.gov/ncidod>>. [2006 jan 10]

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). Preliminary foodnet data on incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites, United States, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report** 2005b; 54(14): 352-356. [on line] Available from: <URL:<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm>>. [2006 mar 03]

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology** 2001; 68: 11-20.

Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lui S. Identification of Genes Associated with Survival of *Salmonella enterica* Seroovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. **Applied and Environmental Microbiology** 2006; 72(2): 1055–1064.

Cutolo AS, Matté MH, Matté GR, Rocha AA. Occurrence of *Diphyllbothrium* and *Paragonimus* species in Brazil. 2006 Submetido.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). Secretaria de Estado as Saúde de São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Dados de surtos de DTA por semana epidemiológica e municípios (dados preliminares) revisados em ago/2004**. [on line]. In: Surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados ao CVE; 2004. Available from <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm>. [2005 jan 11]

D'Aoust JY. *Salmonella* Species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Thomas JM. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press; 1997. p.129-132.

Diaz JH. Is fish consumption safe? **Journal of the Louisiana State Medical Society** 2004;156(1):42-9.

Eduardo MB de P, França ACC, Irino K, Vaz TMI, Guth BEC. **Investigação epidemiológica de infecções por *Escherichia coli* O157:H7 – Campinas, São Paulo**. [on line]. In: CVE – Inquéritos e Estudos epidemiológicos. São Paulo; 2003a. Available from <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_mbpe1.doc>. [2005 jan 12].

Eduardo MB de P, Katsuya EM. **Cólera**. [on line]. In: CVE - Dados Estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo. São Paulo; 2003. [on line] Available from <URL:http://www.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm>. [2005 jan 11]

Eduardo MB de P, Katsuya EM, Bassit NP. **Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no Estado de São Paulo – 1999-2002**. [on line]. In: CVE – Inquéritos e Estudos epidemiológicos. São Paulo; 2003b. Available from <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/restaur_mbpe3.doc>. [2005 jan 11]

Eduardo MB de P, Katsuya EM, Bassit NP, Mello MLR de. *Salmonella Enteritidis* - Uma Importante Causa de Surtos Bacterianos Veiculados por Alimentos e a Necessidade de uma Nova Regulamentação Sanitária para os Alimentos Implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003. **Boletim Epidemiológico Paulista** 2004 agosto; 8. [on line]. Available from <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo.htm>. [2004 dez 22].

Eduardo MB de P, Mello MLR de. **Febre Tifóide**. [on line]. In: CVE - Dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo. São Paulo; 2004. Available from <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm>. [2005 jan 12]

Elhadi N, Radu S, Chen CH, Nishibuchi M. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. **Journal of Food Protection** 2004; 67(7): 1469-1475.

Euzéby JP. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved

Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Bacteriology** 1999; 49: 927-930.

Fang TJ, Wei Q-K, Liao C-W, Hung M-J, Wang T-H. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology** 2003; 80: 241-250.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Historical consumption and future demand for fish and fishery products: exploratory calculations for the years 2015/30**. [on line] In: FAO Fisheries Circular n° 946. Rome; 1999. Available from <URL: http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/005/x3216e/x3216e00.htm> [2006 jan 12]

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAOSTAT: **Database Fisheries Data**. 2005. Available from <URL:<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=fisheries>> [2006 jan 12].

FDA (Food and Drug Administration). Center for food safety and applied nutrition. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. 2005. [on line] Available from <URL:<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>>. [2006 abr 30]

Forsythe SJ. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. De MCM Guimarães e C Leonhardt. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Franco BDG de M, Landgraf M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu; 2003.

Fritsch J. A hora e a vez do peixe. **Revista Higiene Alimentar** 2004; 116/117. [on line] Available from <URL:<http://www.higienealimentar.com.br/revista/ed117/edito.htm>>. [2006 abr 12]

García JA, Larsen JL, Dalsgaard I, Pedersen K. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. **FEMS Microbiology Letters** 2000; 190: 163-166.

Garcia MLT. Controle higiênico-sanitário em serviços de bufê. In: Silva Jr. EA da. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5ª edição. São Paulo: Varela; 2002. p.57.

Germano MIS. **Promoção da Saúde: Desafio para os profissionais envolvidos no treinamento de manipuladores de alimentos**. São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

González-Fandos E, García-Linares MC, Villarino-Rodríguez A, García-Arias MT, García-Fernández MC. Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the sous vide method. **Food Microbiology** 2004; 21:193-201.

González-Rodríguez MN, Santos JÁ, Otero A, García-López. PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold-smoked freshwater fish. **Journal of Applied Microbiology** 2002; 93:675-680.

Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Thomas JM. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press; 1997. p.327-336.

Granum PE, O'Sullivan K, Tomás JM, Ormen O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. From food and water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 1998; 21:131-137.

Hall JÁ, Goulding JS, Bean NH, Tauxe RV, Hedberg CW. Epidemiologic Profiling: Evaluation of foodborne outbreaks for which no pathogen was isolated by routine laboratory testing: United States, 1982-1989. **Epidemiology and infection** 2002; 127: 381-387. Available from <<http://www.euro.who.int/document/fos/news72e.pdf>>. [2005 jan 07]

Hamada-Sato N, Usui K, Kobayashi T, Imada C, Watanabe E. Quality assurance of raw fish base on HACCP concept. **Food Control** 2005; 16:301-307.

Hanashiro A. **Avaliação da Qualidade Higiênico-Sanitária e Nutritiva de Bentô Comercializados no Bairro da Liberdade, São Paulo**. São Paulo, 2002. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Harf-Monteil C, Flèche AL, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 2004; 54: 481-485.

Heinitz ML, Ruble RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection** 2000 May; 63(5):579-92.

Hofer E, Reis CMF dos, Theophilo GND, Cavalcanti VO, Lima NV de, Henriques M de FC de M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Uma, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2006; 39(2):217-220.

Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Biochemistry** 2004; 263(1-2): 217-25.

Huang K-C, Hsu RW-W. *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulites and cerebritis. **Clinical Infectious Diseases** 2005;40:75-77.

Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control** 2000; 11:149-156.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Óbitos hospitalares, São Paulo - SP.** [on line] Available from: <URL:<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. [2006 jan 10]

ICMSF. **Microbiologia de los alimentos. Características de los patógenos microbianos.** Trad. Vergés MR. Zaragoza: Acribia; 1996.

ISO (International Standard Organization). **Iso Management Systems.** Available from: <URL:<http://www.iso.ch/iso/en/ISOOnline.opennerpage>>. [2006 abr 12]

Itoh H, Kuwata G, Tateyama S, Yamashita K, Inoue T, Kataoka H et al. *Aeromonas sobria* infection with severe soft tissue damage and segmental necrotizing gastroenteritis in a patient with alcoholic liver cirrhosis. **Pathology International** 1999; 49: 541-546.

Jablonski LM, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Thomas JM. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers.** Washington: ASM Press; 1997. p.353-375.

Jacob M. Safe food handling. **A training guide for managers of food service establishments.** Geneva: WHO; 1989.

Jay JM. **Modern Food Microbiology.** 6^a ed. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.

Jean-Jacques W, Rajashekaraiah KR, Farmer JJ, Hickman FW, Morris JG, Kallick CA. *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. **Journal of Clinical Microbiology** 1981; 14:711-712.

Joseph SW, Carnahan AM. Update on the genus *Aeromonas*. **ASM News** 2000; 66(4):218-223.

Kingombe CIB, Huys G, Howald D, Luthi E, Swings J, Jemmit. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. **International Journal of Food Microbiology** 2004; 94:113-121.

Kirov SM. *Aeromonas* and *Plesiomonas* Species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Thomas JM. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press; 1997. p.265-287.

Koneman EW, Aleen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido**. Trad. de AE Cury. 5ª ed. São Paulo: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda.; 2001.

Kruse H. Globalization of the food supply-food safety implications special regional requirements: future concerns. **Food Control** 1999; 10:315-320.

Kumar HS, Sunil R, Venugopal MN, Karunasagar I. Detection of *Salmonella* spp. in tropical seafood by polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology** 2003 Nov; 88(1): 91-95.

Lai C-H, Hwang C-K, Chin C, Lin H-H, Wong W-W, Liu C-Y. Severe watery diarrhea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*. **Journal of Infection** 2006;52:95-98.

Lee W-C, Sakai T, Lee M-J, Hamakawa M, Lee S-M, Lee I-M. An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan. **International Journal of Food Microbiology** 1996; 29:141-148.

Lovshin LL, Cyrino PEP. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: **Anais do Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes**; 1998, Piracicaba.

Campinas: CBNA; 1998. p.1-20.

Magalhães V, Branco A, Lima RA, Magalhães M. *Vibrio metschnikovii* among diarrheal patients during cholera epidemic in Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 1996; 38:1-3.

Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR Protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. **Journal of Clinical Microbiology** 2001; 39(9): 3332-3338.

Matté GR. **Isolamento de Vibrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves**. São Paulo; 1993. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Matté GR. **Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares**. São Paulo; 2003. [Tese de Livre-Docência – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Matté GR, Matté MH, Sato MIZ, Sanchez PS, Rivera IG, Martins MT. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the coast of Brazil. **Journal of Applied Bacteriology** 1994; 77: 281-287.

Matté MH. **Aplicação de Métodos Moleculares no Estudo de Organismos de Gênero *Aeromonas***. São Paulo, 2004. [Tese de Livre-Docência – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Matté MH, Almeida TTC, Araújo RS, Dropa M, Rojas MVR, Martins FO, Silva ML, Matté GR. Convention method for extraction of genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. 2006b. Trabalho em preparação.

Matté MH, Baldassi L, Barbosa ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matté GR. Virulence factors in *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. **Food Control** 2006a; Available online.

Mattos EC de. **Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos, mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresse JS, Shapiro C et al. Food-Related Illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases** 1999; 5(5):607-625.

Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. **Journal of Environmental Management** 2004; 73:71-79.

Miguel M, Lamardo LCA, Glavão MS, Garbelotti ML, Branciforte M. Legislação em higiene alimentar e suas aplicações. **Revista de Higiene Alimentar** 2000; 14(68/69): 107-114.

Millard G, Rockliff S. **Microbiological quality of sushi**. [on line]. In: Health Services – Food Survey Reports 2002-2003. Australia; 2003. Available from: <URL:<http://www.health.act.gov.au/c/health?a=da&did=10060511&pid=1094601516>>. [2006 abr 05]

Momesso AP. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias de restaurantes tipo *self-service*, por quilo, do município de São Paulo, durante o período de distribuição de refeições**. São Paulo; 2002. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Morita M. **Avaliação da qualidade sanitária e ocorrência de *Aeromonas* spp em lagoas de pesque-pague da Região Metropolitana da São Paulo.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Motarjemi Y, Käferstein FK. Global estimation of foodborne diseases. **World Health Statistics Quarterly** 1997; 50(1/2):124-131.

Netten PV, Kramer JM. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* In foods: a review. **International Journal of Food Microbiology** 1992; 17:85-99.

Oetterer M. **Matéria-prima alimentar: pescado.** São Caetano do Sul: Centro de pesquisas do Instituto Mauá de Tecnologia, 1991. 29p.

Oliver JD, Kaper JB. *Vibrio* Species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Thomas JM. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers.** Washington: ASM Press; 1997. p.228-260.

Philippi ST. **Nutrição e Técnica Dietética.** 1^a edição. São Paulo: Manole; 2003. Carnes. p. 129.

Pianetti A, Sabatini L, Bruscolini F, Chiaverini F, Cecchetti G. Faecal contamination indicators, salmonella, vibrio and aeromonas in water used for the irrigation of agricultural products. **Epidemiology and infection** 2004; 132: 231-238.

Ratnaraja N, Blackmore T, Byrne J, Shi S. *Vibrio fluvialis* peritonitis in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Journal of Clinical Microbiology** 2005; 43(1):514-515.

Razzolini MTP. **Avaliação Sanitária de Águas Residuárias Provenientes de Lagoas de Estabilização para Irrigação de Culturas Agrícolas no Estado de São Paulo.** São Paulo, 2003. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP].

Reij MW, Den Aantrekker ED. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology** 2004;91:1-11.

Resende A. **Análise microbiológica, de metais contaminantes (Hg e Pb), e metais nutricionais (Zn e Cu) em sushis e sashimis comercializados em restaurantes de Brasília.** Brasília, 2004. [Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Instituto de Química].

Rocha R, Pires H da S. **Minidicionário Enciclopédico Escolar.** 10^a edição. Rio de Janeiro: Scipione; 1997.

Roux FL, Goubet A, Thompson FL, Faury N, Gay M, Swings J et al. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 2005; 55:2251-2255.

Ruivo EU, Pollonio MAR. **Infopesca – O mercado de pescado em São Paulo.** Volume 5. Montevideo: Aladi; 1998.

São Paulo (Estado). Centro de Vigilância Sanitária. Portaria CVS-6/99, de 10 de março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 12 de março de 1999. Seção I, 109 (47).

São Paulo (Estado). Resolução SS nº59, de 22 de julho de 2004. Atualiza a lista de doenças de notificação compulsória – DNC no Estado de São Paulo e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 23 jul 2004a. Seção I.

São Paulo (Município). Laudo Laboratorial definitivo nº 1509/04 - TCA nº 871 - Divisão Técnica Laboratório de Controle de Alimentos (Análise de Contra-prova de Laboratório). **Diário Oficial do Município**, São Paulo, 06 out 2004b. Available from

<URL:http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia_saude/publicacao_dom/0001/dom06-10-2004.pdf> [2006 fev 14]

São Paulo (Município). Secretaria Municipal da Saúde. Portaria 2.535, de 24 de outubro de 2003. Estabelece critérios e parâmetros para a produção de alimentos e bebidas, aplicados às empresas de alimentos. **Diário Oficial do Município de São Paulo**, 24 de outubro de 2003.

Schlundt J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology** 2002; 78: 3-17.

Shinagawa K. Analytical method for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology** 1990; 10:125-142.

Silva CC, Rodrigues MM, Martins BR, Eduardo MB de P, Bassit NP, César MLVS et al. Toxinfecção Alimentar por *Salmonella* em São Paulo/SP, setembro de 2004. **Boletim Epidemiológico Paulista** 2004 nov; 11. Available from <URL:http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa11_salmo.htm>. [2004 dez 22]

Silva ER da, Silva N da. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **The Canadian Journal of Veterinary Research** 2005; 69:260-264.

Silva N da, Junqueira VCA, Silveira NF de A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2ª edição. São Paulo: Varela; 2001. 295p.

Silva Jr. EA da. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5ª edição. São Paulo: Varela; 2002.

Siqueira RS de. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: SPI-EMBRAPA; 1995.

Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. Evaluation of a Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. **Applied Microbiology** 1999; 28:113-117.

Spers EE. Mecanismo da regulação da qualidade e segurança em alimentos. São Paulo; 2003. [Tese de Doutorado – Faculdade de Economia e Administração (FEA)/USP].

Szczuka E, Kaznowski A. Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology** 2004; 42: 220-228.

Tateyama M, Higa M, Kakazu T, Miyagi M, Shikiva K, Arakaki T et al. Two case reports of septic shock due to *Vibrio vulnificus* with liver cirrhosis. **Kansenshogaku Zasshi** 1989 Feb; 63(2):156-61.

Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology** 2002 Sep 15;78(1-2):31-41.

Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Tamura K, Watanabe H. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-sushi ingestion. **Japanese Journal of Infectious Diseases** 1999 Apr; 52 (2): 52-53.

Vanderzant C, Splittstoesser DF editors. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington: American Public Health Association (APHA); 1992.

Ward DR. Microbiological quality of fishery products. In: Martin AM. **Fisheries processing, biotechnological application**. London: Chapman and Hall; 1994. p.1-17.

Watanabe E, Tamada Y, Hamada-Sato N. Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on K_1 value. **Biosensors and Bioelectronics** 2005; 21:534-538.

Webster LF, Thompson BC, Fulton MH, Chestnut DE, Dolah RFV, Leighy AK et al. Identification of sources of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 2004; 298:179-195.

WHO (World Health Organization) 2002a. WHO Fact sheet 124: **Emerging Foodborne Diseases**. Available from: <URL:<http://www.who.int/inf-fs/en/fact124.html>>. [2003 oct 8]

WHO (World Health Organization) 2002b. WHO Fact sheet 237: **Food Safety and Foodborne Illness**. Available from: <URL:<http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>>. [2003 oct 8]

Wiefels R. El consumo de pescado y las estrategias de comercialización. **Infopesca Internacional** 2003; 16:11-19.

Yano Y, Yokoyama M, Satomi M, Oikawa H, Chen SS. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. **Journal of Food Protection** 2004; 67(8):1617-23.

Zhao S, Datta AR, Ayers S, Friedman S, Walker RD, White DG. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **International Journal of Food Microbiology** 2003 July; 84(1): 87-92.

Zugarramurdi A, Parin MA, Gadaleta L, Carrizo G, Lupin HM. The effect of improving raw material quality on product quality and operating costs: a comparative study for lean and fatty fish. **Food Control** 2004; 15:503-509.

Anexo 1

Glossário da culinária nipônica

Arroz japonês: constitui o alimento base da culinária nipônica, geralmente cozido sem temperos e servido puro. O arroz típico japonês é de grão curto que, quando cozido, possui uma textura macia e pegajosa, sendo ideal para o preparo de sushis ou onigris. O arroz ingrediente dos sushis é temperado, após cozido, com vinagre de arroz, açúcar e sal em proporções variadas, de acordo com o restaurante ou família.

Futomaki: variedade de **makizushi**, sushi enrolado, mais grosso, que combina diferentes ingredientes levemente cozidos, como cenoura, bardana, vagem, kanpyo e omelete, envoltos por arroz e nori ou omelete fino.

Hossomaki: tipo de **makizushi** fino, em que o arroz e recheio estão envoltos em **nori**. Geralmente com um único recheio: pepino (Kappamaki), atum (Tekamaki), salmão(Shakemaki), *kani* ou nabo e gengibre em conserva.

Kanikama: bastonetes de surimi, imitação de carne de caranguejo a base de carne de peixe branca condimentada com aroma de caranguejo e colorida.

Makizushi: uma classificação geral que teoricamente significa ‘sushi enrolado’. Compreende um rocambole de arroz temperado com vinagre, sal e açúcar enrolado em folha de alga desidratada (**nori**), contendo peixes, legumes ou omelete no centro.

Nigiri: bolinho de arroz temperado para sushi ou não, formatado tradicionalmente com as mãos em formato cilíndrico no tamanho ideal para uma mordida. Normalmente são apresentados cobertos com fatias de peixe cru (**sashimi**).

Nori (*Porphyra tenera* e *P. umbilicalis*): alga marinha encontrada na superfície do mar no Japão, China e Coreia, de coloração variando de verde escuro a púrpura. É

formatada em folhas parecidas com papel, comprimidas e secas sendo utilizada principalmente para ‘embrulhar’ **makizushis**.

Onigiri: arroz branco sem tempero, moldado originalmente na mão em formato triangular ou bola, podendo receber recheios diversos, como salmão cozido e conservas vegetais. Geralmente recebem uma banda de **nori** e gergelim torrado. Diferenciam-se dos **nigiris** pelo tamanho.

Raiz forte (wasabi): condimento indispensável como acompanhamento de sushis e sashimis, a raiz da planta *Wasabia japonica* é um tempero genuinamente japonês.

Sashimi: fatias de peixe ou pescado cru, servidas com molho de soja e pasta de raiz forte (**wasabi**) à parte.

Shoyu: molho de soja obtido da fermentação de feijão de soja, trigo ou cevada, sal e água. Possui aroma e sabor característicos salgado levemente adocicado.

Sushi: o termo sushi vem de *sumeshi* que significa arroz com vinagre, que é o principal componente de todos os sushis. De modo geral, há quatro tipos de sushi: **nigiri** (moldado à mão com um pedaço de peixe cru em cima), **makizushi** (rolos de arroz e recheio, envoltos por **nori**), **oshizushi** (prensado) e **chirashi** (misturado).

Sushi (nigiri zushi): o termo ‘sushi’ é popularmente dado ao nigiri zushi, que é talvez o mais famoso prato japonês. Consiste em fatias finas de pescado cru, tradicionalmente, ou outros ingredientes como omelete, polvo, shiitake e kani, dispostos sobre arroz para sushi formatado com a mão em (**nigiri**) em tamanho ideal para uma mordida. É servido acompanhado de **shoyu**, pasta de raiz forte (**wasabi**) e gengibre em conserva (gari).

Temaki: variação do **sushi**, que significa ‘enrolado à mão’. É um cone de alga, recheado com arroz, peixe e algumas vezes pepino.

Uramaki sushi: tipo de **makizushi** com o arroz exposto, envolvendo geralmente kanikama, manga/abacate, maionese, pepino e alface, com gergelim torrado salpicado no arroz.

Anexo 2

Forma de preparo de *sushis**

Com a popularização do *sushi*, novas formas de preparo e ingredientes foram criadas para elaboração deste prato. A seguir, está detalhada uma forma tradicional* de preparo do nigiri e *makizushi*.

Ingredientes para preparar o arroz

- 1kg de arroz cateto ou polido curto;
- 2 colheres (sopa) de saquê;
- 1 litro de água mineral;
- 10 colheres (sopa) de vinagre de arroz;
- 4 colheres (sopa) de açúcar;
- 3 colheres (sopa) de sal.

Preparo do arroz

Lave bem o arroz em água fria. Escorra o arroz, e o transfira para uma panela. Junte o saquê e a água mineral. Limpe a alga com um pano úmido, faça alguns talhos de um dos lados, para que libere o sabor, e coloque-a no arroz. Leve ao fogo alto e tampe. Quando a água começar a ferver, reduza o fogo ao mínimo e cozinhe 10 minutos. A seguir, retire a alga e prossiga com o cozimento por mais 8 minutos. Desligue o fogo e verifique se o arroz está cozido e a água foi totalmente absorvida. Cubra a panela com um pano de prato, tampe e deixe descansar por 10 minutos.

Despeje o vinagre em uma panela pequena, leve ao fogo baixo com o açúcar e o sal. Depois de 1 minuto desligue o fogo e deixe esfriar completamente.

---

* A forma de preparo do *makizushi* apresentada é a tradicional, o que não significa que seja a recomendada. Algumas etapas de preparo apresentadas, assim como alguns utensílios, não são ideais, segundo a legislação brasileira, e não devem ser utilizados para garantir a segurança do alimento preparado.

Umedeça um pano no vinagre preparado e passe-o no interior de um recipiente com madeira de bordas baixas, ou tábua grande de madeira. Com o auxílio de uma espátula de bambu ou uma colher de pau umedecida, transfira o arroz cozido para o recipiente preparado. Despeje um pouco de vinagre sobre o arroz e mexa com a espátula. Agite um leque próximo ao arroz para que esfrie mais rapidamente, ou ligue um ventilador. Continue juntando o vinagre e esfriando o arroz até que atinja a temperatura ambiente. Ao final, o arroz deve estar brilhante e encorpado, mas não empastado. Cubra com um pano e use-o no mesmo dia, já que não deve ser conservado na geladeira.

Pode ser servido coberto com fatias de peixe cru (sashimi).

Preparo do nigiri (rolinho de arroz)

Coloque em uma tigela, água e vinagre de arroz (de maçã ou vinho branco) em partes iguais, e umedeça as mãos. Coloque cerca de 1 colher (sopa) de arroz cozido na palma de uma das mãos e aperte delicadamente. Com a outra mão modele rolinhos ovais de cerca de 5 cm de comprimento e 2 cm de largura. Os rolinhos devem ser macios e compactos para que não se rompam. Proceda da mesma forma até terminar o arroz, umedecendo as mãos no vinagre com água de vez em quando.

Quando os rolinhos ficarem prontos, pressione com um dedo em um dos lados e espalhe um pouco de wasabi (pasta de raiz forte).

Preparo do makizushi

Coloque uma folha de alga sobre uma pequena esteira de bambu e distribua por cima uma camada de arroz de cerca de 1 cm de altura, deixando um espaço vazio na parte superior. No centro, faça pequenos fossos, que devem ser preenchidos com recheio. Para recheios pode-se utilizar retalhos de peixe cru, kanikama, alguns legumes e frutas.

Com o auxílio da esteira, enrole a alga, pressionando levemente para fixar bem o conteúdo. Para fixar as aberturas, umedeça ligeiramente as extremidades das folhas de algas ou complete com um pouquinho de arroz para *sushi*. Faça cortes distantes aproximadamente 2 cm. Sirva com wasabi (raiz forte), gengibre e shoyu.