

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

**Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes  
comercializados em Mercados Municipais da cidade  
de São Paulo, SP.**

**Rosa Maria dos Santos**

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

**Área de Concentração: Serviços de  
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel  
Leal Germano**

**São Paulo  
2006**

**Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em Mercados Municipais da cidade de São Paulo, SP.**

**Rosa Maria dos Santos**

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

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano**

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, desde que na reprodução figure a identificação, do autor, título, instituição e ano da dissertação.

## RESUMO

Santos RM. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em Mercados Municipais da cidade de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

**Introdução.** Devido ao aumento do consumo de peixe cru, observado especialmente na culinária japonesa, e ao fato dos peixes poderem carrear microrganismos capazes de produzir doença de origem alimentar, este trabalho foi delineado. **Objetivos.** Avaliar as condições sanitárias dos locais de coleta e a qualidade higiênico-sanitária de peixes vendidos em Mercados Municipais da cidade de São Paulo com o propósito de serem consumidos crus, e comparar os dados com a legislação vigente. **Métodos.** Observação dos locais de coleta, através de 10 itens pré-determinados. Contagem microbiológica de coliforme termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* em 25g e *Vibrio* sp, de acordo com a APHA em 20 amostras de peixes. **Resultados.** A Pontuação obtida variou entre 2 e 8 pontos, representando o atendimento dos 10 itens selecionados. Das 20 amostras, 2 (10%) tinham coliformes termotolerantes e 1 (5%) *S. aureus* acima do limite estabelecido. Três amostras apresentaram cepas características na série bioquímica e sorologia positiva, para *Salmonella* spp, porém após triagem pela PCR nenhuma foi considerada positiva. *E. coli* foi obtida em 2 amostras. A presença de *Vibrio* sp potencialmente patogênicas (*V. metschnikovii* e *V. Fluvialis*) foi obtida em 3 amostras de peixe. **Conclusão.** Apesar da boa infra-estrutura na maioria das peixarias observadas, foi possível identificar a deficiência na adoção das boas práticas de manipulação. Os métodos tradicionais de identificação de *Salmonella* spp, podem fornecer resultados falso-positivos. A existência de espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas, que não são contempladas pela legislação vigente, pode representar um perigo à saúde pública.

**Descritores:** Saúde Pública, sushi e sashimi, alimentos, vigilância sanitária.

**ABSTRACT**

Santos RM. Evaluation of the sanitary quality of fish commercialized in Municipal Market at the city São Paulo. [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2006.

**Introduction.** Due to the increase consumption of raw fish, observed mainly in the Japanese culinary, and the fact of the fish can carry a number of microorganism capable of producing food borne disease, this research was delineated. **Objective.** To evaluate the sanitary conditions of collection sites and the sanitary quality of fishes sold in the Municipal Market in São Paulo city with the purpose to be consumed raw and compare the data with the current legislation.

**Methods.** Observation of the environment through 10 predetermined items. Microbiological enumeration of thermo-tolerant coliform bacteria, *Staphylococcus aureus*, presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* in 25g and *Vibrio* sp, according to APHA in 20 fish samples. **Results.**

Punctuation obtained varied from 2 to 8 points representing attendance to the 10 selected items. From the 20 samples, 2 (10%) presented thermo-tolerant coliform and 1 (5%) *S. aureus* above the established limits. Three samples presented strain characteristic in the biochemical test and positive serum, for *Salmonella* sp, however after the selection for the PCR none was considered positive. *E. coli* was obtained from two samples. The presence of potentially pathogenic *Vibrio* sp (*V. fluvialis* and *V. Metschnikovii*) was observed in 3 fish samples.

**Conclusion.** Despite the good infrastructure in the majority of fish shop observed, it was possible to identify a deficiency in the adoption of good manufacturing practices. The traditional methods of identification of *Salmonella* spp, can result in false-positives. The existence of potentially pathogenic *Vibrio* species, which are not contemplated by the current legislation, may represent a risk to the public health.

**Key words:** Public health, sushi e sashimi, food, sanitary surveillance.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 O CRESCIMENTO NO CONSUMO DE PEIXES E A SEGURANÇA ALIMENTAR	<b>2</b>
1.2 ALTERAÇÕES MAIS FREQUENTES DOS PEIXES	<b>6</b>
1.3 FATORES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE PEIXES COM QUALIDADE	<b>7</b>
1.4 RELEVÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA NA FABRICAÇÃO DO GELO	<b>10</b>
1.5 MICRORGANISMOS PRESENTES NOS PEIXES	<b>11</b>
1.5.1 Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	<b>12</b>
1.5.2 Salmonelas	<b>15</b>
1.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>18</b>
1.5.4 <i>Vibrio</i> spp	<b>20</b>
1.6 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	<b>25</b>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<b>25</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1 LOCAIS DE COLETA	<b>26</b>
3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	<b>29</b>
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	<b>30</b>
3.4 ORGANISMOS PESQUISADOS	<b>30</b>
3.4.1 Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	<b>31</b>
3.4.2 <i>Salmonella</i> spp	<b>32</b>
3.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>35</b>
3.4.4 <i>Vibrio</i> spp	<b>36</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1 LOCAIS DE COLETA	<b>38</b>
4.2 AMOSTRAS	<b>40</b>
4.3 RESULTO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	<b>42</b>
4.3.1 Análise de coliformes termotolerantes a 45C e <i>Escherichia coli</i>	<b>42</b>
4.3.2 Análise de <i>Salmonella</i> spp	<b>42</b>
4.3.3 Análise de <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>43</b>
4.3.4 Análise de <i>Vibrio</i> spp potencialmente patogênico	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
5.1 LOCAIS DE COLETA	<b>45</b>
5.2 AMOSTRAS	<b>53</b>
5.3 RESULTO MICROBIOLÓGICO	<b>54</b>
5.3.1 Coliformes termotolerantes a 45C e <i>Escherichia coli</i>	<b>55</b>
5.3.2 <i>Salmonella</i> spp	<b>58</b>
5.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>61</b>
5.3.4 <i>Vibrio</i> spp	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>67</b>

<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>68</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>71</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>A1</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>A 2</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Quantidade de peixes coletados em mercado municipais da cidade de São Paulo, segundo espécie e origem, origem marinha ou água doce, São Paulo, 2003.	41
---	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Itens selecionados com base na legislação vigente para pontuação das peixarias de mercados municipais da cidade de São Paulo, 2003.	27
<b>Quadro 2:</b> Iniciadores empregados para identificação de cepas presuntivamente identificadas como <i>Salmonella</i> spp, isoladas de amostras de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo, segundo metodologia descrita por SOUMET e col. (1999).	34
<b>Quadro 3:</b> Resultados das análises microbiológicas, local de coleta, pontuação dos itens predeterminados, tipo de peixe e origem das amostras que apresentaram resultados positivos, coletadas em mercados municipais da cidade de São Paulo, 2003.	44

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Resultado da avaliação dos locais de coleta de amostra, segundo roteiro de avaliação, de acordo com os itens pré-determinados, realizados nos mercados municipais da cidade de São Paulo, 2003.	40
--	----



## 1 INTRODUÇÃO

A pesca é uma das atividades mais primitivas do homem na obtenção de proteína de origem animal para a alimentação. Desde os primórdios dos tempos o pescado faz parte da alimentação do homem, porém nos últimos anos é possível constatar um aumento considerável do consumo de peixes, os quais constituem fonte protéica acessível através da extração direta da fauna natural.

Pescado é definido como o conjunto de animais aquáticos que vive normalmente em água doce ou salgada, e que é aproveitado na alimentação. Considera-se pescado fresco aquele que não sofreu qualquer processo de conservação, exceto pelo resfriamento e que mantém suas características sensoriais essenciais inalteradas (SÃO PAULO, 1978).

Os mercados municipais, como um dos responsáveis pelo suprimento de alimentos dentro do sistema de comercialização varejista e atacadista para uma grande parcela da população paulistana, há 60 anos fornecem, dentre outros gêneros alimentícios, o pescado para a população da grande São Paulo (SEMAB, 2006).

## 1.1 O CRESCIMENTO NO CONSUMO DE PEIXES E A SEGURANÇA ALIMENTAR

O consumo de peixe vem sendo cada vez mais estimulado por médicos, nutricionistas e até mesmo pela mídia por causa das inúmeras vantagens que este alimento oferece: fonte de proteína de alto valor nutritivo com lipídeos insaturados de fácil digestibilidade; pequena quantidade de tecido conjuntivo presente na musculatura; 21% a mais de aminoácidos essenciais do que a carne bovina, com altos níveis protéicos e baixa taxa de gordura, sendo indicado na prevenção do ateroma (FERRETTI e col., 1994). Em 100 gramas de peixe, por exemplo, estão contidos 80 Kcal, enquanto na mesma quantidade de carne bovina magra existem 210 Kcal (GERMANO e GERMANO, 2003).

Devido aos benefícios dos ácidos graxos insaturados, a carne de peixe constitui um alimento quase que ideal para as pessoas que procuram a boa forma, associada com uma alimentação saudável. Indicada para pessoas convalescentes (LEDERLE, 1991; PACHECO e col., 2004), também é uma excelente fonte de vitaminas e sais minerais, além de conter substancial teor de ômega 3 (PACHECO e col., 2004).

A oferta de peixe fresco é cada vez maior, e, no intuito de estimular o consumo, hoje existem novas formas de apresentação desse alimento perecível, que antes era oferecido freqüentemente apenas enlatado ou em conserva (GERMANO e GERMANO, 2003).

O hábito de consumir peixe cru vem aumentando gradativamente, sendo cada vez maior a oferta deste alimento para consumo “in natura”, tanto em restaurantes quanto nos próprios pontos-de-venda, como peixarias, até mesmo em regiões onde não predominam imigrantes asiáticos. O amplo consumo de peixe, sob a forma de sushi e sashimi, faz crescer proporcionalmente a preocupação com a qualidade higiênico-sanitária deste alimento, uma vez que os peixes crus ou malcozidos podem veicular toxinfecções alimentares (SATO e col., 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doença de origem alimentar pode ser definida como aquela, de natureza infecciosa ou tóxica, causada por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos (WHO, 2003).

Existem basicamente duas maneiras de os microrganismos provocarem doenças nos consumidores: através de intoxicação, quando se refere à ingestão da toxina previamente formada pelo microrganismo no alimento – estas patologias são incluídas no grupo das denominadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs); ou infecção provocada pela presença de células em concentração suficientes para se tornarem prejudiciais à saúde (VIEIRA e col., 2004).

As DTAs, de modo geral, são identificadas por sintomas gastrintestinais, sobretudo diarreia, vômitos e dores abdominais. Ressalte-se que, além das bactérias, outros organismos podem causar diarreia mediante a ingestão de peixe, como protozoários e vírus. No entanto, as bactérias são

de maior importância e maior ocorrência, sendo as únicas cujos percentuais são limitados pela legislação para alimentos (ANVISA, 2001).

A verdadeira incidência das doenças transmitidas pelos alimentos é desconhecida, e apenas alguns países possuem sistemas de informação sobre essas doenças. Nesses países, somente uma pequena parcela dos casos são registrados – acredita-se que os registros da incidência das doenças de origem alimentar é menor que 1% da verdadeira incidência (HUSS e col., 2000).

Em geral, o aumento da incidência das DTAs resulta em impacto socioeconômico para a população humana e prejudica as negociações internacionais de alimentos (WHO, 1995; MOLINS e col., 2001, HANASHIRO, 2002). As autoridades de saúde pública do mundo todo propõem métodos para garantir a segurança dos alimentos, em que os pontos críticos são controlados por meio de um sistema de qualidade, conhecido como “Hazard Analysis and Critical Control Point” (HACCP) (MOLINS e col., 2001).

No Brasil, o HACCP é chamado de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). O APPCC, associado às Boas Práticas de Fabricação (BPF), tem-se revelado como ferramenta básica do sistema moderno de gestão de qualidade nas indústrias de alimentos. Trata-se de um método preventivo, que busca garantir a inocuidade do alimento e inclui aspectos que vão desde a produção até o consumidor final, passando pela industrialização e distribuição (SENAI, 2000; PANISELLO e col., 2000).

Assim, o sistema APPCC vem sendo adotado em todo o mundo, não só por garantir a segurança dos produtos alimentícios, mas também por reduzir os custos e aumentar a lucratividade, já que minimiza as perdas e o retrabalho; por otimizar o processo, tornando desnecessária uma grande parte das análises laboratoriais realizadas no sistema de controle tradicional; e por tornar o processo de controle transparente e confiável. O APPCC fundamenta-se na identificação dos perigos potenciais à segurança do alimento, bem como nas medidas para o controle das condições que geram os perigos (SENAI, 2000).

O plano APPCC segue sete princípios: análise dos perigos e medidas preventivas; identificação dos pontos críticos de controle; estabelecimento dos limites críticos e de segurança (para as medidas preventivas monitoradas em cada ponto crítico de controle); estabelecimento dos procedimentos para monitorar os pontos críticos de controle; estabelecimento das ações corretivas; estabelecimento dos procedimentos de verificação; e estabelecimento dos procedimentos de registro (SENAI, 2000).

## 1.2 ALTERAÇÕES MAIS FREQUENTES DOS PEIXES

Qualquer produto alimentício de origem animal pode alterar-se por autólise, atividade bacteriana e oxidação. A diferença básica consiste no fato de que o músculo dos peixes é mais susceptível à deterioração do que a carne dos mamíferos. Esse processo está relacionado às diferentes características deste produto como pH próximo à neutralidade; elevada atividade de água ( $A_w$ ) nos tecidos, elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos (presente em sua superfície, guelras e trato intestinal); elevado teor de lipídeos insaturados, rápida ação destrutiva das enzimas naturalmente presentes nos tecidos; e a alta atividade metabólica da microbiota (GRAM e HUSS 1996; LIRA e col., 2001; PIMENTEL e PANETTA, 2003; VIEIRA e col., 2004).

No “pré-*rigor mortis*” dos peixes ocorrem dois fenômenos: autólise e degradação do ATP (Adenosina Trifosfato). No “pós-*rigor mortis*” ocorre a proteólise dos miofilamentos e estroma, levando a um amolecimento da musculatura e perda da elasticidade, a produção de aminoácidos di, tri e polipeptídios começam a aumentar, favorecendo as bactérias, principalmente pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Aeromonas* (BARROS, 2003; VIEIRA e col., 2004).

A alteração microbiana dos peixes não tem início enquanto não houver passado o estado do *rigor mortis*, quando as fibras musculares começam a liberar o seu líquido intracelular (VIEIRA e col., 2004). Por estas razões, para a manutenção do produto, é extremamente importante

conservar os peixes em condições de higiene e temperatura adequada em torno de 0°C (OGAWA e MAIA, 1999; AGNESE e col., 2001; VIEIRA e col., 2004).

### 1.3 FATORES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE PEIXES COM QUALIDADE

Estudos demonstram que o fator fundamental para o sucesso da produção comercial de peixes é o trinômio: tempo x temperatura x higiene. O tempo está intimamente relacionado com a rapidez com que se desencadeiam as reações autolíticas e bacterianas que, por outro lado, estão relacionadas com o grau de higiene do barco e dos manipuladores do peixe, somados às baixas temperaturas, as quais, se devidamente aplicadas, evitarão ou, pelo menos, retardarão as reações anteriormente mencionadas. Portanto, não é suficiente que apenas um dos fatores seja cumprido (VIEIRA e col. 2004; SATO e col., 2005).

PACHECO e col. (2004) relatam a importância das condições higiênico-sanitárias adequadas durante toda a cadeia produtiva, que vai desde a pesca até a distribuição ao consumidor final, no intuito de garantir a qualidade do pescado. Os principais meios de contaminação terrestre que os peixes sofrem são provenientes das contaminações cruzadas que ocorrem durante a descarga do produto. GERMANO e GERMANO (2003) salientam, também, o papel desempenhado pelo manipulador de alimentos como

origem do problema para os consumidores e grandes responsáveis pela contaminação cruzada.

Os diferentes métodos de captura, tempo de arraste, áreas de pesca, tempo de exposição no convés, resfriamento inadequado e higiene do porão influenciam, significativamente, no grau de frescor da matéria-prima final (JACKSON e col., 1997; OGAWA e MAIA, 1999; ANDRADE e col., 2002).

Peixes capturados próximos da costa, provenientes de rios ou lagos poluídos ou próximos a locais poluídos podem ocasionar infecções por parasitas, doenças associadas a bactérias, vírus, resíduos de drogas veterinárias e contaminação por agrotóxicos ou metais pesados (FELDHUSEN, 2000).

O número inicial e as espécies de bactérias da superfície do peixe estão relacionados à temperatura da água. Altos percentuais de bactérias geralmente são mais isolados em peixes de água morna (tropical e subtropical) do que em peixes de água fria. Peixes capturados em água temperada abrigam predominantemente bactérias psicotróficas, enquanto as bactérias mesófilas são mais comuns em peixes de água tropical. A microflora de peixes vindos de água doce é também influenciada pela temperatura e será maior do que a de ambientes marinhos. Além do local da pesca, outros fatores são responsáveis pela microflora do peixe, como por exemplo os métodos e condições de pesca, cuidados com o pescado a bordo, proximidade da costa, época do ano, manipulação, processamento e qualidade da água do gelo utilizado (JACKSON e col., 1997; VIEIRA e col., 2004). Da mesma forma, os métodos de cultivo e criação podem estar



associados à qualidade higiênico-sanitária do pescado (ROHAYA e col., 1997).

Por outro lado, a microbiota dos peixes recém-capturados reflete o ambiente terrestre próximo aos ambientes hídricos e as condições microbiológicas do local de captura (MURATORI e col., 2004). Após a captura, a microbiota inicial pode sofrer alterações em decorrência do transporte, manipulação, contato com o gelo, superfícies, equipamentos, ambiente de estocagem e modo de comercialização (HUSS, 1997; CARDOSO e col., 2003).

A portaria N° 185, de 13 de maio de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado) diz no item 4.2.3.3. que: “No acondicionamento do peixe, deverá empregar-se quantidade de gelo finamente triturado, suficiente para assegurar temperatura próxima do ponto de fusão do gelo na parte mais interna do músculo” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

Diversos autores reforçam a importância da conservação do pescado em baixas temperaturas, logo após a etapa de captura até a comercialização, para impedir que os processos autolíticos se instalem e que ocorra multiplicação bacteriana responsável pela deterioração do produto. Por esta razão, torna-se essencial a manutenção da cadeia de frio durante todo o processo de transporte, industrialização e comércio do pescado e de seus derivados (HUSS, 1997; FELDHUSEN, 2000; PIMENTEL e PANETTA, 2003; VIEIRA e col., 2004; SATO e col., 2005 e BRIEN e col., 2006).

No processo de conservação, faz-se necessário rigoroso controle de qualidade, da captura à comercialização dos produtos pesqueiros, conforme mencionado anteriormente. A manutenção da cadeia de frio constitui ponto de maior importância na obtenção de um produto final de qualidade, uma vez que as baixas temperaturas retardam reações químicas e bioquímicas. Além da manutenção da temperatura, a higiene no local de comercialização é outro ponto importante para manutenção da qualidade (ALVES e col. 2002).

#### 1.4 RELEVÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA NA FABRICAÇÃO DO GELO

Enfatiza-se a importância da qualidade microbiológica do gelo com a finalidade de conservar alimentos, especialmente os peixes.

GERMANO e col. (1993) afirmam que o contato dos peixes com gelo produzido com água de má qualidade é um dos meios mais frequentes de contaminação destes produtos. Destacam ainda que o pescado é importante veiculador de agentes patogênicos, responsáveis por diversas enfermidades no homem, notadamente as toxinfecções bacterianas.

VIEIRA e col. (1997), em pesquisa sobre a qualidade microbiológica do gelo usado na feira de Mucuripe, um dos principais pontos de comercialização de Fortaleza – Ceará, isolaram 90 cepas pertencentes a diferentes gêneros bacterianos.

A importância do uso de gelo de qualidade é citada também por PIMENTEL e PANETTA (2003), salientando que a deterioração do pescado na ausência de gelo é acelerada. Estes autores verificaram que na ausência de gelo o pH, a produção de histamina, a produção de trimetilamina (TMA), bases voláteis totais e principalmente a multiplicação microbiana aumentam significativamente. Na presença de gelo a proliferação bacteriana é reduzida. Portanto, a qualidade e a quantidade de gelo são imprescindíveis para a manutenção do frescor do pescado. Esse tema é destacado por diversos autores quando se trata de qualidade higiênico-sanitária ou microbiológica do pescado (OGAWA e MAIA, 1999; GERMANO e GERMANO; PIMENTEL e PANETTA, 2003; VIEIRA e col., 2004; SOULTOS e col., 2006).

## 1.5 MICRORGANISMOS PRESENTES NOS PEIXES

O peixe, como qualquer outro alimento, tem sua microbiota própria e sofrerá alterações, dependendo de alguns fatores externos, como a contaminação de seu habitat, seja ele estuário, lacustre ou marinho, através de esgotos e curso de água poluída. Algumas bactérias são típicas de ambientes marinhos e outras de água doce. Apesar de a microbiota dos peixes de ambos os habitat serem semelhantes, existem algumas bactérias de interesse para a saúde pública que figuram na legislação brasileira (ANVISA, 2001).

As mais freqüentes nestas circunstâncias e isoladas em peixes são: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* (OGAWA e MAIA, 1999; SILVA Jr., 2002; GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004).

Para avaliação microbiológica dos alimentos, alguns grupos de microrganismos são considerados importantes por serem indicadores gerais das condições higiênico-sanitárias, cuja presença em maior ou menor número é indício da qualidade da matéria-prima e do processamento realizado. É o caso do grupo dos coliformes, cuja presença está diretamente relacionada com falhas no processamento e contaminação de origem fecal recente, evidenciando a ocorrência de bactérias enteropatogênicas (OPAS/INPPAZ, 2001).

#### 1.5.1 Coliformes e *Escherichia coli*

As bactérias do grupo coliforme pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, compreendendo bastonetes Gram-negativos, não-esporulados, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, tendo como habitat o intestino normal ou patológico. Estes microrganismos também estão distribuídos na natureza, tanto em animais quanto em vegetais, e são os mais importantes indicadores das condições sanitárias de alimentos *in natura* ou processados, os quais são importantes

pela sua implicação em saúde pública (FRANCO e LANDGRAF, 2003; SILVA Jr., 2002; VIEIRA e col., 2004).

Essas bactérias são os organismos aeróbios mais freqüentes no trato digestivo do homem e dos animais de sangue quente, são comensais inofensivos e desempenham um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal (DOYLE e col., 1997; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A *E. coli* é um indicador de contaminação de origem fecal recente, uma vez que esse microrganismo pode estar no conteúdo intestinal do homem e animais de sangue quente (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A água e os alimentos são freqüentes veículos de *E. coli*. Algumas cepas podem causar gastroenterites agudas afetando adultos e crianças, estando relacionadas a surto de diarréia dos viajantes (JACOB, 1989). Diversos alimentos estão envolvidos em surtos causados por *E. coli*, inclusive os sushis (ADAMS e MOSS, 1997).

A espécie *E. coli* é uma das bactérias mais conhecidas e estudadas até o momento. É constituída por uma variedade relativamente grande de bactérias patogênicas ao homem e outros animais. Podem causar infecções intestinais e urinárias, septicemias, meningites entre outros tipos de infecções (DOYLE e col., 1997; KONEMAN e col. 2001). As *E. coli* causadoras de gastroenterites podem ser divididas em cinco grupos de acordo com seus mecanismos patogênicos: enterotoxigênica, enteropatogênica, enteroinvasiva, enteroagregativa e enterohemorrágica (DOYLE e col., 1997; KONEMAN e col., 2001; GERMANO e GERMANO, 2003; FIGUEIREDO, 2004).

Essas cepas, em sua maioria, provocam diarreia aquosa, cólicas abdominais e náuseas (GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004). A diarreia é caracterizada principalmente por desidratação e acidose causada pela perda excessiva de fluidos e eletrólitos (AYULO e col., 1994). Todavia, este quadro pode ser agravado quando a diarreia é hemorrágica e evolui ao lado de outros sintomas graves, os quais podem conduzir a vítima ao óbito, quando provocado pelos sorovares de maior virulência (KONEMAN e col., 2001).

No caso particular dos peixes, estas bactérias não fazem parte de sua microbiota, por isso a relevância de sua identificação para a avaliação das condições higiênico-sanitárias do processamento. A pesquisa destes microrganismos permite comprovar o contato direto ou indireto dos peixes com matéria fecal. A presença deste grupo de bactérias indica também a possível presença de outros agentes patogênicos entéricos (ICMSF, 1985; ADAMS e MOSS, 1997; VIEIRA e col., 2004).

Os doentes eliminam as bactérias em grandes quantidades pelas fezes, contaminando facilmente suas mãos e vestes, propiciando a contaminação dos alimentos. Esta infecção ocorre mais comumente nos locais em que às condições de saneamento básico são precárias e quando as boas práticas de fabricação não são implementadas no âmbito da indústria e do comércio de alimentos, bem como no âmbito das unidades de alimentação e nutrição industriais e comerciais, onde a possibilidade de contaminação fecal é uma constante (PARDI e col., 2001).

### 1.5.2 *Salmonella* spp

O gênero *Salmonella*, pertencente também à família das *Enterobacteriaceae*, é constituído por bactérias Gram-negativas, geralmente móveis, não-formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, catalase positivas, oxidase negativas, desenvolvendo-se no intervalo de temperatura entre 5°C e 47°C, porém idealmente na faixa de 35°C a 37°C (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Atualmente, as salmonelas estão classificadas em 2.324 sorotipos dos quais 1.367 pertencem à subespécie entérica (CVE, 2005a). Sua localização primordial é o trato-gastrointestinal de aves, mamíferos domésticos e silvestres, além de répteis (KUMAR e col., 2003).

Devido ao fato de estar presente especialmente em águas contaminadas de regiões próximas à costa marítima, em rios ou lagos, as salmonelas podem ser isoladas a partir de peixes frescos capturados nestes locais. De modo geral, o pescado é um veículo de *Salmonella* spp muito menos freqüente do que outros produtos alimentares. Em conjunto com os denominados frutos do mar, ostras, mariscos e lagostas, são responsáveis apenas por uma pequena porcentagem do número total de casos de salmonelose (LIPP e ROSE, 1997; BUTT e col., 2004; CVE, 2005a). Complementarmente, sua contaminação também pode estar associada com precárias condições de higiene humana (FELDHUSEN, 2000).

As bactérias do gênero *Salmonella* são amplamente distribuídas na natureza, porém são preferencialmente localizadas no trato intestinal de animais e seres humanos (KONEMAN e col., 2001).

A transmissão da *Salmonella* spp ao homem, com maior frequência, dá-se por produtos alimentares, sobretudo os de origem animal (GERMANO e GERMANO, 2003). Como o calor é eficiente na destruição desta bactéria, alimentos submetidos a altas temperaturas não costumam oferecer risco. Alimentos contaminados ingeridos crus ou malcozidos – aliados às más condições de higiene dos locais de armazenamento e processamento, de utensílios e de equipamentos, bem como à falta de treinamento dos manipuladores em boas práticas de fabricação, que facilita a contaminação cruzada – constituem fatores determinantes de surtos de salmonelose (GERMANO e GERMANO, 2003; SILVA Jr., 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003; CVE, 2005a).

A grande maioria das salmonelas é patogênica, razão pela qual é uma das mais importantes causas de DTAs e grande responsável por surtos de origem alimentar no Brasil. A sua patogenicidade varia de acordo com o sorovar, idade e condições de saúde do hospedeiro. A dose infectante em pessoas híidas varia de acordo com o sorovar, o tipo de alimento e a susceptibilidade do indivíduo (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Os principais sintomas das salmoneloses provocados pelos sorotipos não-tifóides são diarreia, dor abdominal, febre, náuseas e vômitos que ocorrem, em geral, de 12 a 36 horas após a ingestão do alimento infectante. Contudo, os sintomas e a evolução do quadro clínico podem variar consideravelmente, desde uma infecção assintomática até uma doença grave com complicações mais sérias (GERMANO e GERMANO, 2003; SILVA Jr., 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003).



A detecção da *Salmonella* ainda é realizada, sobretudo, a partir de métodos tradicionais de bacteriologia, como os testes bioquímicos e sorológicos. O primeiro consiste na diferenciação em espécies distintas a partir da habilidade, de cada uma delas, fermentarem uma grande variedade de carboidratos selecionados. O segundo consiste no emprego de diferentes anti-soros conhecidos, a partir dos quais a bactéria aglutina quando misturada a anticorpos que são produzidos em resposta àquelas espécies ou gênero, configurando, desta forma, um resultado positivo (MORITA, 2005).

Em geral, esse teste demanda no mínimo cinco dias para a confirmação do resultado. Nesse sentido, a metodologia clássica para amostras de alimentos, clínicas ou ambientais, vem sendo substituída cada vez mais por métodos muito mais rápidos e precisos como, por exemplo, o emprego da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica consiste na amplificação de um determinado segmento de DNA, por meio de uma enzima denominada DNA-polimerase, obtendo-se com isso inúmeras cópias da seqüência alvo de DNA de forma que se torna detectável por coloração, após separação pela eletroforese em gel. Deste modo, esta técnica permite que sejam evitados resultados falso-positivos, que são mais freqüentes nos métodos tradicionais (SOURMET e col. 1999).

### 1.5.3 *Staphylococcus aureus*

Bactéria pertencente à família *Micrococcaceae* e ao gênero *Staphylococcus*, no qual se incluem 31 espécies e 17 subespécies (DSMZ, 2002). São cocos gram-positivos, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em formato semelhante a cachos de uva. Anaeróbios facultativos, fermentam glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, o que os diferencia dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose. Tradicionalmente, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa divisão está baseada na capacidade de coagular o plasma, que é uma importante propriedade reveladora de patogenicidade (ICMSF, 1985; ADAMS e MOSS, 1997; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

São microrganismos mesófilos que se desenvolvem entre 7,0°C e 47,8°C, idealmente entre 30°C e 37°C, enquanto suas enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C. O *S. aureus* apresenta grande importância em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos. Além de ser um dos mais frequentes causadores de surtos de toxinfecção alimentar, pode muitas vezes dar origem a infecções assintomáticas devido ao seu alto poder colonizador em diferentes regiões do organismo (GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004).

Amplamente distribuídos na natureza, os estafilococos podem estar presentes em seres humanos, principais reservatórios de *Staphylococcus* spp, na pele, nas membranas mucosas, no trato respiratório superior e

intestinal (KONEMAN e col., 2001; GERMANO e GERMANO, 2003). Podem estar presentes no ar, nas poeiras, nos esgotos, na água, no leite e nas mais variadas superfícies e equipamentos (GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004).

Embora esse microrganismo possa fazer parte da microbiota humana normal, pode produzir infecções oportunistas importantes em condições apropriadas (KONEMAN e col., 2001).

Os alimentos que requerem considerável manipulação para o seu preparo e que permanecem em temperatura ambiente abusiva e por tempo prolongado, após a preparação, são considerados de alto risco (AYULO e col., 1994).

Em geral, a transmissão ao homem ocorre através da ingestão de um alimento que havia sido preparado por portador de *S. aureus* – localizado na região da nasofaringe ou nas mãos com ferimentos supurados, abscessos ou lesões cutâneas supurativas – e que permaneceu à temperatura ambiente por tempo excessivo, permitindo a produção da enterotoxina estafilocócica termoestável (ICMSF, 1985; GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004; CVE, 2005b). Outro modo habitual de transmissão refere-se à contaminação cruzada entre alimentos processados e produtos de origem animal crus, contaminados com *S. aureus*.

A manifestação clínica causada pelo *S. aureus* é considerada como uma intoxicação, e os sintomas habituais, incluindo náuseas, vômitos e diarreia, podem aparecer entre trinta minutos e oito horas após o consumo do alimento contaminado. Estes sintomas persistem em geral por 24 horas,

mas em casos graves a desidratação pode levar ao choque hipovolêmico e ao óbito (SILVA Jr., 2002; GERMANO e GERMANO, 2003; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Os *Staphylococcus* spp não são inibidos em concentrações elevadas de cloreto de sódio (até 20%), razão pela qual a pesquisa desses microrganismos se faz necessária em pescados, sobretudo marinhos (VIEIRA e col., 2004).

#### 1.5.4 *Vibrio* spp

O gênero *Vibrio* pertence à família *Vibrionaceae*, a qual inclui também os gêneros *Plesiomonas* e *Photobacterium*. Esta família é a que mais possui espécies potencialmente patogênicas para o homem (HOLT, 1994; MATTÉ e col., 2006).

As espécies do gênero *Vibrio* são representadas por bacilos Gram-negativos, pleomórficos, curvos ou retos, móveis por meio de um ou mais flagelos polares, catalase e oxidase positivos. São anaeróbias facultativas, não formam esporos, são extremamente sensíveis às temperaturas de cocção. São habitantes de ambientes aquáticos, sendo a maioria de origem marinha, requerem 2% a 3% de cloreto de sódio ou uma base de água do mar para crescimento ótimo. Formam a microbiota aquática responsável pela reciclagem de compostos orgânicos, como a quitina.

Várias bactérias do gênero *Vibrio* são habitantes naturais de ambientes aquáticos presentes em águas salgada, salobras e doces, podendo estar presentes nos produtos da pesca (GIBOTTI e col., 2000). Nos meses frios podem estar presentes no lodo marinho e nos meses quentes podem estar livres na água do mar ou nos peixes e moluscos (BUTT e col., 2004; CVE, 2005c).

Atualmente existem mais de 90 espécies de *Vibrio* propostas, das quais 63 foram validadas até 2004 (ROUX e col., 2005). Além do agente causador da cólera, o *V. cholerae* sorogrupos O1 e O139, estão incluídos outros agentes que são considerados potencialmente patogênicos e capazes de causar problemas de saúde pública, relacionados com infecções em humanos como: *V. cholerae* sorogrupos não-O1 e não-O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. furnissii* (MATTÉ, 2003).

Os mecanismos de patogenia dos víbrios não estão completamente esclarecidos. O *V. cholerae* produz um certo número de outras toxinas, incluindo a hemolisina, semelhante à tetrodoxina, e uma idêntica à shiga-toxina. As estirpes patogênicas de *V. parahaemolyticus* são conhecidas por produzirem uma hemolisina termoestável (Vp-TDH) responsável pela reação de Kanagawa (KARUNASAGAR e col., 1996).

O *V. parahaemolyticus* foi primeiramente relacionado à gastroenterite em 1950, após um surto de intoxicação alimentar no Japão. Desde então,

tem sido apontado como a principal causa de intoxicação alimentar em Taiwan e no Japão (MATTÉ, 2003).

Aproximadamente 60% a 80% das doenças associadas ao *Vibrio* spp são caracterizadas por sintomas de gastroenterites, 34% apresentam feridas infecciosas, e 5% septicemia. A taxa de mortalidade é 1% a 4%, e acontecem quando os pacientes desenvolvem a septicemia, entretanto gastroenterites são mais comuns (GERMANO e GERMANO, 2003; BUTT e col., 2004). Outros sintomas incluem dor abdominal, náuseas, vômitos e febre (BUTT e col., 2004).

As infecções por *V. vulnificus*, caracterizadas principalmente por septicemias, são menos freqüentes. Entretanto, 25% a 50% dos casos não-tratados são fatais (BUTT e col., 2004; CDC, 2005).

Os peixes e moluscos (em geral ostras), crus ou malcozidos, estão associados à transmissão do *V. parahaemolyticus*. A bactéria patogênica ou não-patogênica é freqüentemente isolada de estuários, ambiente marinho, peixes e moluscos vivendo nestes meios. Existe uma correlação entre a doença e o consumo dos alimentos nos meses quentes do ano.

A refrigeração inadequada dos alimentos contaminados ou sua permanência em temperatura ambiente favorece a proliferação desses microrganismos (BUTT e col., 2004; CVE, 2005c).

Além da veiculação pela água, as doenças diarréicas causadas por espécies de *Vibrio* podem ser transmitidas pelo consumo de vegetais, peixes e principalmente por moluscos bivalves como mariscos e, em especial,

ostras cruas, malcozidas, preparadas ou cultivadas em condições precárias de higiene (CDC; WHO, 2005).

Em um relato de caso descrito por RATNARAJA e col. (2005) sobre um caso de peritonite causada por *V. fluvialis*, em um paciente que recebia diálise peritoneal contínua, os autores acreditaram que o caso estivesse associado ao consumo de peixe e demonstraram a importância das pesquisas e relatos de infecções associadas ao *V. fluvialis*. Outro relato de caso também sobre celulite hemorrágica e cerebrites causadas por *V. fluvialis* foi observado em um paciente com histórico recente de contato com água salobra após ser picado por formigas (HUANG, 2005).

Entre 1995 e 2000, 61 confirmações laboratoriais de casos de *V. cholerae* O1 foram registradas ao CDC, destes, 35 pacientes foram hospitalizados e um morreu (CDC, 2005).

## 1.6 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, através da RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, preconiza parâmetros microbiológicos para alimentos, referindo a pratos prontos para o consumo (alimentos prontos para consumo de cozinha, restaurantes e similares). Na alínea b preconiza como valores de tolerância máxima para amostras analítica à base de carne, pescado e similares crus (quibe cru,

carpaccio, sushi, sashimi etc.): Coliformes a 45°C, 10<sup>2</sup> NMP/g; Estafilococos coagulase positiva, 5x10<sup>3</sup> UFC/g; *V. parahaemolyticus*, 10<sup>3</sup> NMP/g; e *Salmonella* spp, ausência/25 g (ANVISA, 2001).

A presente pesquisa foi idealizada tendo em vista todos os problemas da cadeia produtiva, as precárias condições estruturais dos mercados municipais, o aumento no consumo de peixes crus ou malcozidos, especialmente sushi e sashimi, sabendo-se que o consumo deste tipo de alimento pode veicular microrganismos capazes de produzir DTAs, o que representa um risco para os consumidores e pode constituir-se em um problema de saúde pública.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo com a finalidade de serem consumidos crus.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os procedimentos realizados pelos manipuladores durante o ato de venda, bem como as condições higiênico-sanitárias e estruturais dos locais de comercialização através dos itens predeterminados (anexo 1) e confrontar os resultados com a legislação vigente;
- Avaliar e comparar a qualidade higiênico-sanitária das amostras de peixe por meio da pesquisa, dos microrganismos preconizados pela RDC-12 de 2001 (ANVISA, 2001);
- Verificar a ocorrência de espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas em amostras de peixe pronto para consumo cru.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAIS DE COLETA**

Foram obtidas 20 amostras de 8 peixarias, selecionadas por conveniência, de mercados municipais da cidade de São Paulo, procurando-se obter amostras de diferentes regiões, sendo: Mercado I, dez amostras de quatro peixarias de um mercado da região central; Mercado II, duas amostras de uma peixaria da região sul; Mercado III, três amostras de uma peixaria de um mercado da região leste; Mercado IV, três amostras de uma peixaria de um mercado da região oeste; e Mercado V, duas amostras de uma peixaria de um outro mercado municipal também da região leste.

Para avaliação da condição estrutural, estado de conservação dos utensílios, boas práticas de higiene durante o atendimento, e do aspecto geral do local de venda estudado, foi realizada uma avaliação informal no momento de aquisição das amostras, seguindo-se roteiro predeterminado (anexo 1). E esta observação sempre foi realizada pelo lado de fora do estabelecimento.

Para esta avaliação foram selecionados 10 itens, considerados como os mais relevantes de acordo com a legislação vigente, relacionados abaixo:

**Quadro 1.** Itens selecionados com base na legislação vigente para pontuação das peixarias de mercados municipais da cidade de São Paulo, 2003.

Itens predeterminados*	
1	Condições estruturais adequadas (piso, parede e teto);
2	Estado de conservação dos utensílios utilizados;
3	Limpeza adequada das instalações;
4	Limpeza adequada dos utensílios e superfícies;
5	Presença de pia exclusiva para higiene das mãos;
6	Funcionário exclusivo para cobrar;
7	Manipulação adequada do alimento;
8	Exposição adequada de venda;
9	Uso adequado do uniforme, touca e luva;
10	Asseio pessoal adequado.

\* Os itens foram baseados em leis federais, municipais e estaduais: Portaria CVS 6/99 (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 1999), Portaria SVS/MS nº 326 de 30/07/1997 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997) e Portaria 2.535 da Secretaria Municipal de Saúde (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2003), RDC-216 de 15 de setembro de 2004.

Os itens foram pontuados atribuindo-se 0 (zero) para inadequado e 1 (um) para adequado; o resultado foi apresentado com base na somatória dos pontos obtidos em cada item selecionado para os diferentes locais de comercialização estudados.

Considerou-se como adequada às condições estruturais (piso, parede e teto), quando constituídos de cor clara, impermeável e de fácil limpeza,

sem rachaduras, bolores, pisos ou azulejos faltando ou lascados, ou seja, em bom estado de conservação.

Os utensílios utilizados nas etapas de fracionamento e pré-preparo estavam adequados quando não apresentavam pontos de ferrugem, avarias e quando não eram constituídos de: material poroso, madeira, vidro, esmaltado ou susceptível à oxidação.

A limpeza adequada das instalações foi atribuída ao aspecto geral do piso, parede, balcão e odor do ambiente.

A limpeza adequada dos utensílios e superfícies foi considerada quando não havia o uso indevido de panos para secar as mãos e limpar superfícies, ausência de baldes de água para lavar o pescado e quando a superfície da mesa de manipular os peixes era de material de cor clara impermeável, lavável, bem alvejada e em bom estado de conservação.

A disponibilidade de água para higiene do vendedor só foi considerada adequada quando era possível visualizar a presença de pia exclusiva para higiene de mãos dos manipuladores.

O estabelecimento recebeu a pontuação 1 (adequado) quando existia um funcionário exclusivo para cobrar no momento da coleta da amostra.

A manipulação do alimento foi considerada adequada quando não era possível identificar contaminação cruzada, por meio de observação do comportamento do atendente ao manipular o peixe durante a venda.

Exposição adequada de venda: considerou-se adequada quando da presença de balcão refrigerado, totalmente fechado com separação para

produtos resfriados e congelados, sem decoração com outros alimentos, separados por espécies em bandejas de inox ou plástico.

Quanto ao uso adequado do uniforme, considerou-se quando era possível notar que o manipulador usava avental ou vestes padronizadas da empresa, de cor clara, fechadas, bem conservadas e limpas, touca protetora para os cabelos e luvas descartáveis utilizadas de forma correta. Neste caso foram consideradas todas as pessoas que estavam dentro da área de manipulação ou venda.

No item 10 que se refere ao asseio pessoal, observou-se a aparência geral do atendente, como: barba, cabelos, unhas e presença de adornos.

### 3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram adquiridas pelo pesquisador, que se apresentava como um consumidor comum, visando não interferir no procedimento usual daquele comerciante.

Durante a obtenção das amostras era sempre elucidado ao atendente a intenção de consumi-la crua na forma de sashimi e sushi e alguns vendedores de pescado orientavam quais peixes estavam com frescor apropriado para ser consumido cru. A amostra era adquirida como sashimi (pequenas fatias de peixe cru).

As coletas foram realizadas às terças-feiras, sempre pela manhã, imediatamente acondicionadas em isopor com gelo e transportadas para o

Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, onde as análises foram realizadas. O tempo decorrido da coleta até o início de seu processamento nunca ultrapassou duas horas.

### 3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Antes de iniciar a avaliação microbiológica as amostras foram avaliadas com assepsia quanto a sua consistência, odor e cor e os resultados foram registrados.

As amostras foram homogeneizadas assepticamente, com a utilização de um liquidificador. Alíquotas dessas amostras foram distribuídas nos meios de cultura e de pré-enriquecimento, de acordo com a metodologia empregada para cada microrganismo pesquisado.

### 3.4 ORGANISMOS PESQUISADOS

Foram pesquisados: coliformes termotolerantes, *E. coli*, *Salmonella* spp, *S. aureus* coagulase positiva e *Vibrio* spp, de acordo com metodologia preconizada pela American Public Health Association (APHA) e descrita no manual de métodos de análise microbiológicos de alimentos (SILVA e col., 2001).

As colônias típicas dos microrganismos pesquisados foram subcultivadas para microtubos de 1,5 mL (tipo Eppendorf®), contendo ágar Lúria semi-sólido (0,5% ágar) e submetidas a testes complementares para identificação de cada microrganismo.

#### 3.4.1 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

A determinação do número mais provável dos coliformes termotolerantes foi realizada através da técnica dos tubos múltiplos, com diluição até  $10^{-8}$ , com série de três tubos.

Após homogeneização asséptica da amostra, foram adicionados 25 gramas a 225 mL de água peptonada estéril com 0,1% de NaCl (AP 0,1%), de cada diluição; foi transferido um mililitro (1 mL) a três tubos contendo nove mililitros (9 mL) de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST- Merck) estéril, com tubo de Durham invertido, e incubados a 35°C de 24 a 48 horas. Foram considerados positivos para coliformes totais os tubos que apresentaram turvação e formação de gás, visível no tubo de Durham. Os tubos que apresentaram turvação e presença de gás foram transferidos para tubos contendo Caldo *E. coli* (EC - Merck), com tubo de Durham invertido em seu interior, os quais foram incubados a 45°C. Após incubação de 24 a 48 horas foram considerados para contagem do número mais provável (NMP) os tubos que apresentaram turvação e presença de gás. A pesquisa de *E. coli* foi realizada a partir dos tubos positivos no meio EC, por inoculação em Ágar

Eosina Azul de Metileno (EMB - Difco) a 35°C por 24 horas. As colônias com características de *E. coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico), nesse meio, foram confirmadas através de provas bioquímicas específicas. Na identificação bioquímica das colônias foi utilizado meio de Rugai modificado “Instituto Adolfo Lutz” (IAL - Newprov) formulado de acordo com PESSOA e SILVA (1972), sendo a leitura realizada após incubação a 35°C por 24 horas (HANASHIRO, 2002). Este meio destina-se à triagem bioquímica das seguintes provas: desaminação do L-triptofano (LTD), fermentação da sacarose e glicose, produção de gás, hidrólise da uréia, produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), motilidade, descarboxilação da L-lisina e produção de indol.

### 3.4.2 *Salmonella* spp

A pesquisa da presença de *Salmonella* spp foi realizada através do pré-enriquecimento de 25 g da amostra em 225 mL de caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis (RV - Merck) a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi transferido com auxílio de pipeta estéril, 1 mL do caldo para cada tubo contendo 9 mL de Caldo Selenito Cistina (SC - Merck) e o outro contendo 9 mL de Tetracionato (TT- Merck), incubados a 35°C por 24 horas. O isolamento de colônias típicas foi realizado no meio Ágar Sulfito de Bismuto (BS - Merck), após o período de incubação de 24 horas a 35°C. Como parâmetro de apresentação das colônias sugestivas do



gênero pesquisado, tomou-se por base a coloração marrom ou preta com ou sem brilho metálico.

Os isolamentos foram confirmados através de provas bioquímicas específicas em meio Rugai modificado “Instituto Adolfo Lutz” (IAL - Newprov). As culturas características neste teste foram submetidas ao teste sorológico com anti-soro somático polivalente (Probac do Brasil).

As cepas com sorologia positiva para o gênero *Salmonella* foram submetidas à extração do DNA, a qual foi realizada por meio de choque térmico das células pelo método de CHAPMAN (2001), e posteriormente confirmadas quanto ao posicionamento taxonômico, empregando PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com iniciadores específicos descritos por SOUMET e col. (1999) e apresentados no quadro 2.

**Quadro 2.** Iniciadores empregados para identificação de cepas presuntivamente identificadas como *Salmonella* spp, isoladas de amostras de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo, segundo metodologia descrita por SOUMET e col. (1999).

Nome do iniciador	Seqüência 5'- 3'	Fragmento bp**
ST 11	GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA	429
ST 15	GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G	
S 1	GCC GTA CAC GAC CTT ATA GA	250
S 4	ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC	
Fli 15	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	620
Typ 04	ACT GGT AAA GAT GGC T	

\*\* bp = pares de bases

Para amplificação do fragmento de interesse, foi empregada a seqüência para PCR de acordo com SOUMET e col. (1999) com modificações: foi utilizado um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 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.

### 3.4.3 *Staphylococcus aureus*

Para contagem presuntiva de *S. aureus* foi utilizado o método de contagem direta em placas.

A partir das diluições seriadas, preparadas para pesquisa de coliformes, com auxílio de pipeta estéril, foram semeados cem microlitros (100 µL) de cada uma das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  em placas contendo meio Baird Parker (BP – Merck) adicionadas de 5% de solução de gema de ovo com telurito de potássio (Newprov), e espalhadas com drigalski estéril, e posteriormente incubadas por 48 horas a 35°C.

Após este período, colônias típicas pela forma circular, negra a cinza-escuro, lustrosa, convexa, lisa, com borda regular apresentando halo de hidrólise foram contadas e transferidas para tubos tipo eppendorf® com ágar lúria semi-sólido (0,5% ágar) e posteriormente reisoladas em placas com ágar Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED - Merck) e identificadas através de testes de catalase, DNase e coagulase para sua confirmação (SILVA e col., 2001). Os isolados positivos, para os três testes, foram então 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.

#### 3.4.4 *Vibrio* spp

Após a homogeneização das amostras para o pré-enriquecimento, foram feitas 5 diluições em triplicata, para tanto foram transferidas 10 gramas da amostra em 90 mL e 1 grama da amostra em 90 mL de água peptonada alcalina 1% com pH 8,6 em triplicata, obtendo-se assim as diluições  $10^1$  e  $10^0$ , respectivamente. A partir das diluições utilizadas para os coliformes, foi transferido 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo contendo 9 mL de água peptonada alcalina com pH 8,6 e assim sucessivamente com as demais diluições até  $10^{-3}$ , sempre em triplicata. Após este procedimento, foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (MATTÉ e col., 1994a), conforme esquema em anexo (anexo 2).

Após o período de incubação, o isolamento foi feito recolhendo-se, com alça bacteriológica, a película formada na superfície do caldo de enriquecimento, sem agitar o líquido – onde se concentra a massa de células formada pelo tropismo de bactérias do gênero *Vibrio* pela camada aeróbica do caldo de cultura –, que foi transferida para uma placa de petri contendo o meio ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS - Merck), na proporção nove placas por diluição, ou seja, três placas para cada tubo conforme anexo 2, e posteriormente incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. As colônias sacarose-positiva (de coloração amarelada) e sacarose-negativa (verde ou verde-azulada), de 2 a 3 mm de diâmetro, sem pontos pretos, foram as selecionadas para prosseguir a pesquisa (MATTÉ e col., 1994a).

As colônias que apresentaram características presuntivas de *Vibrio* spp, neste meio de cultura, foram triadas em Ágar Ferro de Kligler (KIA - Difco), onde foram consideradas para continuarem na pesquisa as que possuíam as seguintes características: fermentadoras da glicose, que utilizaram ou não a lactose, produziram pouco gás, indol positiva ou negativa, oxidase positiva ou negativa e H<sub>2</sub>S negativa. Colônias consideradas positivas foram confirmadas através de provas bioquímicas específicas para identificação das espécies de *Vibrio*: fermentação da glicose, hidrólise da gelatina, redução de nitrato, hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina e ornitina, crescimento em peptona sem NaCl e com concentrações de 3%, 6%, 8% e 10%, fermentação da lactose, arabinose e manitol, manose e salicina, hidrólise da esculina e produção de acetoina (Voges-Proskauer test), teste vermelho de metila (VM), utilização de etanol e putrescina como fonte de carbono e motilidade. Todas as provas foram realizadas a 35°C por 24 horas (MATTÉ e col., 1994a).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 LOCAIS DE COLETA

Quanto à condição estrutural, uma (12,5%) das peixarias, localizada na região central, foi considerada inadequada, pois possuía divisórias de madeira, uma das paredes estava com os azulejos bem danificados e não possuía forro no teto, apenas o telhado do próprio mercado.

Em relação aos utensílios, quatro (50%) das peixarias foram consideradas inadequadas por apresentarem utensílios de ferro e com cabos de madeira, sendo que três localizavam-se na região central e uma, na região leste.

Observou-se que dois (25%) dos estabelecimentos apresentavam condições adequadas de higiene e limpeza, tanto no item instalações quanto no de utensílios e superfícies. Os que foram considerados inadequados possuíam resíduos de peixes pelo chão, bancadas de manipulação sujas e odor forte de peixe.

Em uma (12,5%) das peixarias foi possível visualizar na entrada uma pia para higiene das mãos dos manipuladores.

Em dois (25%) dos estabelecimentos avaliados havia um funcionário exclusivo para cobrar, no momento da obtenção das amostras.

A manipulação do alimento foi considerada adequada em apenas um (12,5%) dos estabelecimentos, uma vez que não foi possível observar

práticas que levassem à contaminação cruzada. Nos demais, o atendente sempre cometia alguma falha que podia acarretar em contaminação do peixe.

De modo geral, a exposição do produto estava adequada na maioria (seis peixarias, 75%) dos locais de coleta. Os dois (25%) estabelecimentos que foram considerados inadequados apresentavam respectivamente vidro do balcão de exposição quebrado e produtos congelados e resfriados juntos, sem refrigeração.

Em 100% dos locais de coleta, a manipulação do produto foi realizada sem a utilização de luvas protetoras e na maioria dos casos, o mesmo indivíduo manipulava o produto e o dinheiro da venda.

Finalmente, sobre o asseio pessoal, foi considerado adequado em cinco (62,5%) dos estabelecimentos observados.

No total, a pontuação dos locais estudados, considerando a adequação aos itens apresentados no quadro 1, variou entre 2 e 8 pontos, com maior frequência obtida para a pontuação 2. Nenhum dos locais de venda atingiu a pontuação máxima (10). A tabela 1 resume os resultados obtidos com a avaliação informal dos locais de coleta de amostras de peixe.

**Tabela 1.** Resultado da avaliação dos locais de coleta de amostra, segundo o roteiro de avaliação, de acordo com os itens pré-determinados, realizados nos mercados municipais da cidade de São Paulo, 2003.

Local de coleta		Itens observados*										Total por peixaria
Mercado	Peixaria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I	A	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	B	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	C	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
	D	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	4
II	E	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4
III	F	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	8
IV	G	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	6
V	H	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
Total por item		7	4	2	2	1	2	1	6	0	5	30

\*Itens: de acordo com o quadro 1. 1 = adequado; 0 = inadequado.

## 4.2 AMOSTRAS

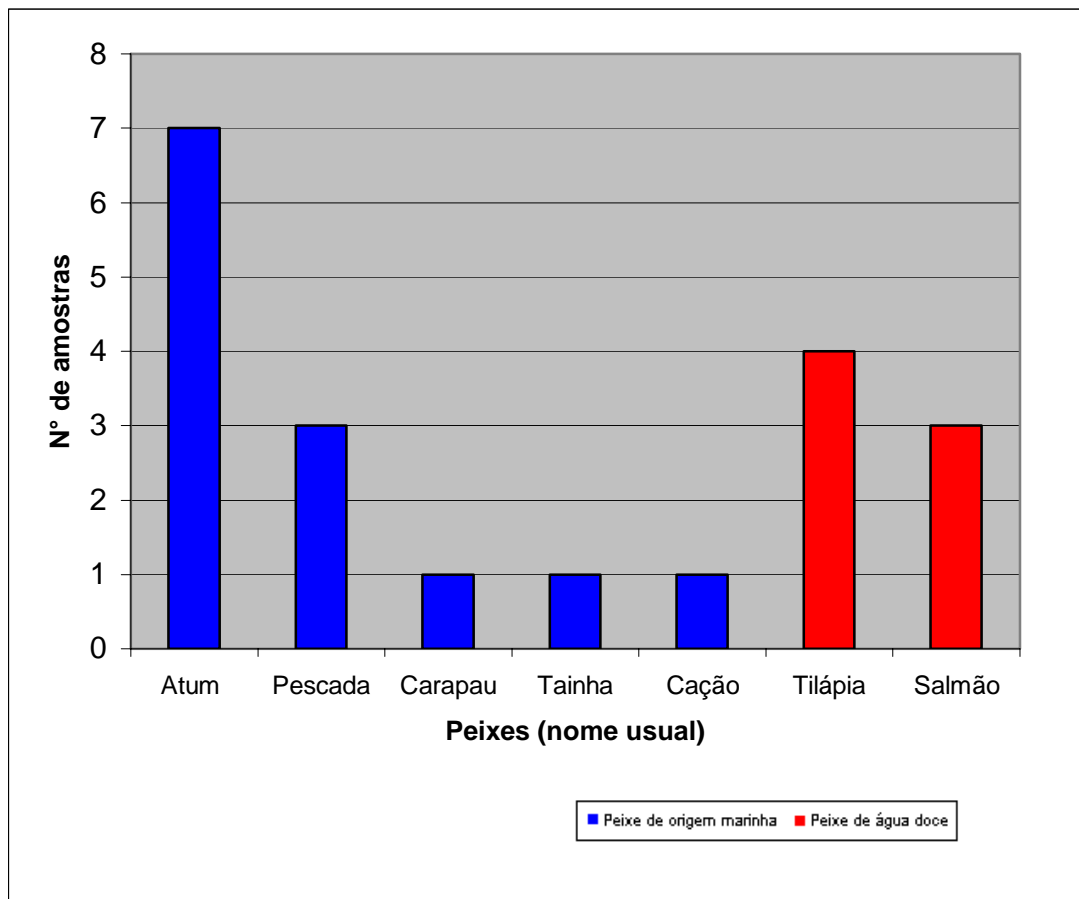
A observação geral do aspecto do produto, antes de iniciar o procedimento da análise laboratorial, revelou 60% (12) das amostras com condições de odor, coloração e consistência características de cada produto, os demais 40% (8) apresentavam alteração em pelo menos um dos itens preconizados para avaliação das amostras (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 1997).

Das vinte amostras de peixe coletadas, foram adquiridas sete diferentes espécies de peixes, sendo sete amostras de atum (*Thunnus* sp), três de salmão (*Salmo* sp), quatro de tilápia (*Oreochromis* sp), três de



pescada (*Cynoscion* sp), uma de carapau (*Caranx* sp), uma de tainha (*Mugil* sp) e uma de cação (*Carcharrhinus* sp).

A figura 1 apresenta a proporção de peixes de diferentes espécies coletados no presente estudo.



**Figura 1.** Quantidade de peixes coletados em mercados municipais da cidade de São Paulo, segundo espécie e origem, origem marinha ou água doce, São Paulo, 2003.

### 4.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

#### 4.3.1 Análise de coliformes termotolerantes a 45°C e *E. coli*

Das 20 amostras coletadas em peixarias de mercados municipais, foram identificados coliformes termotolerantes a 45°C em quatro amostras, entretanto duas (10% do total) apresentaram valores acima do preconizado pela legislação brasileira, a RDC nº 12 de 2001 que determina como valor de referência 10<sup>2</sup> UFC/g para alimentos à base de pescado cru (ANVISA, 2001).

Foi também identificada *E. coli* em outras duas amostras (10% do total), nas quais não foram observados valores acima do preconizado pela legislação para coliformes, sendo as duas amostras do Mercado I e de peixe de origem marinha.

#### 4.3.2 Análise de *Salmonella* spp

Na pesquisa de *Salmonella* spp, três amostras apresentaram cepas características na série bioquímica e sorologia positiva; estando em desacordo com o parâmetro preconizado pela RDC nº 12, ausência em 25 g desse microrganismo, porém, após a triagem pelo método de PCR empregando iniciadores específicos para o fragmento 16S rDNA de *Salmonella*, nenhuma amostra foi considerada positiva.

#### 4.3.3 Análise de *Staphylococcus aureus*

Do total de amostras analisadas (20), três (15%) apresentaram *S. aureus*, porém apenas uma amostra apresentou  $1 \times 10^5$  UFC/g, valor acima do preconizado pela RDC nº 12, que indica como valor máximo  $5 \times 10^3$  UFC/g. As outras duas amostras apresentaram os seguintes valores:  $2 \times 10^2$  UFC/g e  $5 \times 10^2$  UFC/g.

#### 4.3.4 Pesquisa de *Vibrio* spp potencialmente patogênico

Foram isoladas espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicos para o homem, em três (15%) amostras, sendo uma delas com duas espécies diferentes, o *V. metschnikovii* e o *V. fluvialis*; e nas outras duas amostras *V. fluvialis*. Vale destacar que a RDC nº 12 de 2001 somente preconiza valores para *V. parahaemolyticus*. Assim no que diz respeito ao *Vibrio* spp todas as amostras estavam de acordo com a legislação vigente no que concerne à pesquisa de *V. parahaemolyticus*.

**Quadro 3.** Resultados das análises microbiológicas, local de coleta, pontuação dos itens predeterminados, tipo de peixe e origem das amostras que apresentaram resultados positivos, coletadas em mercados municipais da cidade de São Paulo, 2003.

Resultados								
Mercado	Peixaria	Coliformes a 45°C	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>S. aureus</i>	<i>Vibrio</i> spp	Total de pontos dos itens pré-determinados	Peixe/ origem
I	Peixaria A	7x10 <sup>1</sup> nmp/g	-	+	-	-	2	Atum marinha
	Peixaria A	1,1x10 <sup>1</sup> nmp/g	-	-	-	<i>V. fluvialis</i> <i>V. metschnikovii</i>	2	Salmão água doce
	Peixaria A	4,3x10 <sup>1</sup> nmp/g	+	-	2x10 <sup>2</sup> ufc/g	<i>V. fluvialis</i>	2	Carapau marinha
	Peixaria B	4,3x10 <sup>1</sup> nmp/g	+	-	-	<i>V. fluvialis</i>	2	Tainha marinha
	Peixaria B	-	-	-	5x10 <sup>2</sup> ufc/g	-	2	Tilápia água doce
	Peixaria C	-	-	-	1x10 <sup>5</sup> ufc/g	-	2	Tilápia água doce
II	Peixaria E	-	-	+	-	-	4	Tilápia água doce
III	Peixaria F	-	-	+	-	-	8	Salmão água doce

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Locais de coleta

A prefeitura do Município de São Paulo responde diretamente por dois dos 14 mercados municipais, sendo os demais de responsabilidade das Subprefeituras. Esses estabelecimentos são responsáveis pelo suprimento de alimentos dentro do sistema de comercialização varejista e atacadista para uma grande parcela da população paulistana (SÃO PAULO, 2001).

Os mercados municipais contavam com balcões fixos, instalações sanitárias, abastecimento de água e coletores de lixo, e eram credenciados para o comércio varejista e atacadista de alimentos.

Durante a aquisição das amostras, foi possível observar que os locais de coleta apresentavam diferenças marcantes em relação à estrutura geral do estabelecimento, equipamentos de refrigeração, exposição do produto, higiene do local e utensílios, apresentação dos funcionários, tipo de embalagem e hábitos de boas práticas.

Os perigos de contaminação ou sobrevivência de microrganismos durante o processamento são bem definidos e podem ser contornados pela aplicação de Boas Práticas de Fabricação. Similarmente, meios de prevenção são necessários para impedir o crescimento de microrganismos patogênicos durante a distribuição e estocagem dos produtos finais (HUSS, 2000). O pescado pode ser contaminado no meio ambiente ou por

conseqüências da manipulação ou processamento (ADAMS e MOTARJEMI, 1999).

Em um dos estabelecimentos de coleta de amostra, havia divisórias de madeira, uma das paredes estava com os azulejos bem danificados, que dificultam a higiene e limpeza, favorecem o acúmulo de sujidades e servem de abrigo para algumas pragas urbanas, além disso, não possuía forro, sendo coberto pelo telhado do próprio mercado. Este estabelecimento localizava-se no Mercado I, e foi o que apresentou maiores problemas quanto aos itens predeterminados (Quadro 1) e resultados microbiológicos. A RDC nº 216, a Portaria 2.535/03, a CVS 6/99 estabelecem que as instalações físicas como piso, parede e teto devem possuir revestimento liso, impermeável, lavável e de cor clara. Devem ser mantidos íntegros, bem conservados, livres de rachaduras, trincas, goteiras, vazamentos, infiltrações, bolores, descascamentos, dentre outros e não devem transmitir contaminantes aos alimentos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 1999; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Nas demais peixarias não foi possível notar problemas estruturais que as desabonassem.

Segundo recomenda a Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA, 1994), a manutenção preventiva e corretiva de edifícios, pátios, equipamentos, utensílios e instalações são fundamentais para favorecer a operação de limpeza.

Os utensílios utilizados nos estabelecimentos que foram considerados inadequados para o item 2 do Quadro 1 eram constituídos de material de

ferro e madeira. A Portaria 2.535/03 da Secretaria Municipal de Saúde não permite o uso de equipamentos e utensílios constituídos de material poroso, madeira, vidro, material esmaltado, susceptível à oxidação, nas etapas de fracionamento, pré-preparo e preparo dos alimentos (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2003).

A higiene e a limpeza dos estabelecimentos e dos utensílios estavam comprometidas na maioria dos locais de coleta de amostra. As bancadas operacionais utilizadas para a manipulação dos peixes eram constituídas de material apropriado, porém a maioria estava suja, tornando-se um foco de contaminação. Nos estabelecimentos que foram considerados como inadequados, os resíduos dos peixes eram depositados em caixas plásticas que ficavam diretamente no piso. Havia excesso de resíduos nessas caixas e no piso, que conseqüentemente resultava em odor forte de peixe, atrativo para moscas e outras pragas e mais um foco de contaminação.

Em uma pesquisa realizada em Fortaleza, Ceará, os autores tiveram por objetivo isolar microrganismos presentes em utensílios e equipamentos em uma indústria de pescado, como resultado foram detectados coliformes e *E. coli* nos equipamentos e utensílios analisados, demonstrando que estes podem ser fonte de contaminação para os alimentos (SANTOS e col., 2002).

A Portaria 2.535/03, a CVS 6/99 e a RDC nº 216 (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 1999; SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) exigem a presença de um lavatório exclusivo para higiene das mãos, em posição estratégica em relação ao fluxo do processo e de fácil acesso ao uso. Todas as peixarias

em que as amostras foram coletas eram pequenas e possibilitavam a visualização de toda a área de manipulação pelo lado externo do estabelecimento. De acordo com a legislação mencionada acima, o lavatório deve ser de fácil acesso aos manipuladores, portanto seria visível pelo lado externo dos locais de coleta, mas este tipo de instalação só foi observado em apenas uma das peixarias pesquisadas.

A CVS 6/99 (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 1999), quando se refere à higiene de mãos, diz que: os funcionários devem lavar as mãos sempre que pegar em dinheiro, porém na maioria dos estabelecimentos este procedimento seria impossível, pela ausência do lavatório. Em apenas dois estabelecimentos havia um funcionário exclusivo para cobrar. Na maioria dos casos, onde não havia este funcionário, o mesmo indivíduo manipulava o produto e o dinheiro da venda.

A educação dos manipuladores de alimentos e sua conscientização sobre o risco da produção de alimentos e de fatores críticos que desencadeiam a produção da enterotoxina é fundamental, Complementarmente, orientações para rigorosa higiene e limpeza das instalações, controle de temperatura, limpeza das mãos e unhas, conscientização sobre o perigo de infecções da pele, nariz e olhos (FRANCO e LANDGRAF, 2003, CVE, 2005b) são etapas indispensáveis para assegurar a inocuidade dos alimentos.

A educação sanitária contribui decisivamente para a prevenção dos diversos patógenos bacterianos veiculados pelos alimentos. A população em geral deve receber informações sobre as doenças e os alimentos envolvidos,



higiene pessoal, preparo e conservação. Os manipuladores devem receber informações sobre higiene dos locais de comercialização, dos equipamentos, dos utensílios e do pessoal, bem como da manutenção de fluxo que impossibilite contaminação cruzada, o cozimento adequado dos alimentos, armazenamento e conservação (CVE, 2005a).

A etapa de preparação é a mais importante na cadeia de produção dos alimentos em geral, por ser a fase que antecede o consumo. Alguns perigos não são eliminados nesta etapa e podem causar DTAs. Dados epidemiológicos sobre essas doenças demonstram que elas geralmente são conseqüências de erros gerados na preparação dos alimentos, entre outros fatores, como cozimento inadequado, contaminação cruzada com alimentos crus e armazenagem inadequada (MOLINS e col., 2001).

A contaminação cruzada dos alimentos nos estabelecimentos pode ocorrer através da superfície de contato, bem como contaminação secundária pelo piso, teto, paredes ou até mesmo equipamentos (HUSS, 1997; SOULTOS e col., 2006).

Os balcões de exposição dos produtos estavam em bom estado de conservação na maioria dos locais de coleta. Das peixarias pesquisadas duas foram consideradas inadequadas, uma delas estava com o vidro do balcão de exposição quebrado e localizava-se próxima da porta do mercado e o sol incidia diretamente sobre o balcão, podendo expor os peixes a elevadas temperaturas; e na outra, os produtos congelados e resfriados estavam juntos, além disso o balcão não possuía refrigeração.

Todas as bactérias patogênicas desenvolvem-se muito bem em peixes crus, por isso conservar o peixe a temperatura menor que 5°C é essencial, sendo apenas uma das medidas de prevenção contra o crescimento bacteriano (HUSS, 1997).

Durante o transporte e distribuição, os microrganismos presentes nos alimentos podem encontrar situações favoráveis de crescimento; o abuso do tempo e temperatura na conservação dos alimentos também pode favorecer a proliferação dos patógenos (PALUMBO, 1986). Este fator é particularmente importante em países que apresentam deficiência na cadeia de frio ou falhas freqüentes no suprimento de energia (MOLINS e col., 2001) e por motivos de economia, muitos comerciantes desligam os equipamentos de refrigeração durante a noite e expõem os produtos a temperaturas de risco.

Em todos os locais de coleta, a manipulação do produto foi realizada sem a utilização de luvas protetoras, a Portaria 2.535/03 e a RDC nº 216, preconizam o uso de luvas descartáveis para a manipulação de alimentos prontos para o consumo. Uma vez que o peixe era adquirido com o propósito de ser consumido cru, ou seja, pronto para o consumo, o manipulador deveria estar munido de luvas descartáveis. A luva descartável é motivo de muita discussão quanto à qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, porém quando utilizada de forma correta garante um alimento mais seguro para o consumo humano (LIU e SU, 2006; CHEN e col., 2000; MONTIVILLE e col., 2001).

A microbiota das mãos e roupas dos manipuladores pode ser oriunda do solo, água, poeira e outros alimentos. Outra fonte importante são as fossas nasais, boca e a pele. Em condições muito precárias de higiene os microrganismos do trato gastrintestinal podem contaminar as mãos dos manipuladores e conseqüentemente os alimentos por eles preparados (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A manipulação assume importância capital para a qualidade higiênico-sanitária do peixe, seja como matéria-prima ou produto industrializado.

Em 62,5% dos estabelecimentos observados, os funcionários apresentavam bom asseio pessoal, estavam com a barba feita, unhas curtas e uniformes limpos.

Foram coletadas dez amostras no Mercado I, que se localiza na região central. Dentre elas, seis apresentaram um ou mais dos microrganismos pesquisados no presente estudo, sendo que três estavam com valores acima do preconizado pela legislação brasileira. Nos Mercados II e III foram coletadas duas e três amostras respectivamente. Uma amostra de cada mercado apresentou cepas características na série bioquímica e sorologia positiva para *Salmonella* spp. Nas outras cinco amostras restantes, que foram coletadas nos Mercados IV e V, não foi possível identificar nenhum dos microrganismos pesquisados no presente estudo.

Contudo, na análise das condições higiênico-sanitárias e estruturais dos locais de comercialização foi possível observar que os estabelecimentos possuíam condições estruturais adequadas. No entanto, o maior problema

observado estava na falta de conhecimento dos manipuladores sobre as Boas Práticas de Manipulação, o que pode acarretar em contaminação dos produtos comercializados nesses locais.

Em uma pesquisa semelhante sobre a avaliação das condições gerais de mercados municipais, feiras-livres e ambulantes da cidade de São Paulo, realizada por PEDRO e col. (2005), os mercados municipais atingiram as melhores pontuações. De acordo com os autores, a estrutura geral dos mercados municipais é mais adequada quando comparada com feiras-livres e ambulantes, entretanto este estudo também ressalta a importância da conscientização e educação quanto às Boas Práticas de Manipulação junto aos profissionais dos três tipos de comércio estudado.

Os perigos relatados pelo presente trabalho demonstram que as preparações dos peixes para consumo cru podem ser controladas pela aplicação das Boas Práticas de Fabricação, para a maioria dos perigos relatados, com exceção das espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas.

As informações obtidas com esta pesquisa fornecem subsídios para a avaliação dos riscos associados com a forma de produção e comercialização dos peixes com o propósito de serem consumidos, principalmente na forma de sashimi e sushi, ou seja, crus ou malcozidos, de modo a estabelecer prioridades para as atividades de prevenção e de controle das doenças transmitidas por alimentos.

## 5.2 Amostras

Os peixes que são comercializados nos mercados municipais da cidade de São Paulo geralmente são provenientes de Santos, Cananéia e de outros pontos do litoral paulista, além de outros estados como Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. Particularmente, o salmão é procedente do Chile, entretanto os peixes geralmente são comercializados no Centro de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP).

Em alguns casos não foi possível comprar determinado peixe, por orientação do próprio vendedor, que estava ciente de que o alimento seria consumido cru. Nesta situação o produto era substituído por outro, que o próprio comerciante indicava.

LIRA e col. (2001), avaliando a qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió, Alagoas, observou 44,45% das amostras com condições organolépticas alteradas, resultado semelhante ao obtido na avaliação de odor, consistência e cor das amostras do presente estudo.

O tempo de vida de prateleira dos sushis (peixe cru) é discutido em uma pesquisa realizada por SATO e col. (2005), na qual os pesquisadores avaliam a qualidade da matéria-prima, histórico de temperatura e sistemas de qualidade que assegurem a qualidade higiênico-sanitária do pescado.

### 5.3 Resultado microbiológico

Em relação às amostras de peixes pesquisadas, cinco (25%) registraram valores fora do padrão microbiológico exigido pela legislação vigente em ao menos um dos parâmetros analisados. Entretanto, em 25% das amostras pesquisadas foi possível observar outros microrganismos que não são preconizados pela legislação e são potencialmente patogênicos ao homem: o *V. fluvialis* e o *V. metschnikovii*.

A RDC nº 12 de 2001 estabelece valores de referência para pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinha, restaurante e similares) na alínea b que preconiza como valores de tolerância máxima para amostras indicativas, à base de carne, pescado e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi etc.) o valor de: Coliformes a 45°C  $10^2$  NMP/g, *S. aureus* coagulase positiva ( $5 \times 10^3$  UFC/g), ausência de *Salmonella* spp em 25 g de amostra e *V. parahaemolyticus* ( $10^3$  NMP/g). No entanto, nessa mesma legislação no item nº 7 alínea a, que se refere a pescado e produtos da pesca, menciona: “pescado não consumido cru”, por isso não determina valores de referência para coliformes, apenas delimita valores de referência para *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* spp em 25 g de amostra. Portanto, considerou-se o item 22 dessa legislação que se refere a sashimi e sushi, uma vez que as amostras foram obtidas com o propósito de serem consumidas cruas e a amostra estava pronta para consumo (ANVISA, 2001).

A peixaria A, localizada no Mercado I, obteve baixa pontuação de acordo com os itens predeterminados (Quadro 1). Neste mesmo estabelecimento, foram coletadas quatro amostras para avaliação microbiológica. Na primeira amostra foi possível detectar  $7 \times 10^2$  NMP/g de coliforme a 45°C, cepas confirmadas bioquimicamente para *Salmonella* spp, na segunda,  $1,1 \times 10^2$  NMP/g de coliformes a 45°C (termotolerantes), desta forma, estas duas amostras estão em desacordo com a RDC nº 12 de 2001. A terceira amostra apresentou  $4,3 \times 10^1$  NMP/g de coliformes a 45°C, presença de *E. coli*,  $2 \times 10^2$  UFC/g de *S. aureus*, e duas espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas para o homem, o *V. metschnikovii* e *V. fluvialis*.

### 5.3.1 Coliforme fecais a 45°C e *Escherichia coli*

Tradicionalmente, as bactérias do grupo coliforme têm sido consideradas como indicadoras de poluição fecal em águas (VIEIRA e col., 2004). A pesquisa de coliformes reflete a condição geral de higiene durante o processo de produção. “A denominação de ‘coliformes a 45°C’ é equivalente à denominação de ‘coliformes de origem fecal’ e de ‘coliformes termotolerantes’. Caso seja determinada a presença de *E. coli*, deve constar no laudo analítico.” (ANVISA, 2001).

A principal causa de doenças diarreicas é a ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas por microrganismos patogênicos. Um dos agentes etiológicos das infecções entéricas é a bactéria *E. coli* que, presente em águas ou alimentos, indica uma contaminação de origem fecal e um possível

risco à saúde. A principal representante do grupo dos coliformes é a *E. coli*, sendo considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal recente e da eventual presença de organismos patogênicos (VIEIRA e col., 2004).

Tendo em vista os resultados obtidos, causados por falhas durante o processamento, não se pode ignorar a possibilidade da presença de outros microrganismos patogênicos ou deteriorantes não-pesquisados. No presente estudo também foram isolados *E. coli* em amostras de peixes, de origem marinha, que estavam dentro do limite preconizado pela RDC nº 12 para coliformes fecais (ANVISA, 2001). Por não fazer parte da microbiota do pescado marinho, a presença de *E. coli* está associada à contaminação fecal da água do local de captura e/ou do transporte e manuseio (incluindo recipientes de transporte, gelo, utensílios etc.) que ocasionalmente tenham entrado em contato com o pescado fresco (GASPAR e col., 1997).

AGNESE e col. (2001), avaliando as condições higiênico-sanitárias de 26 amostras de pescado fresco comercializado num município do Rio de Janeiro, observaram que 100% das amostras estavam de acordo com o preconizado pela legislação vigente para coliformes fecais e isolaram *E. coli* em 34,6% das amostras. Demonstrando também que amostras com valores dentro do preconizado pela legislação podem conter *E. coli*, os autores ainda revelam a importância de um maior controle na higiene de elaboração e comercialização do pescado.

HOFFMANN e col. (1999), investigando amostras de pescado de São José do Rio Preto, São Paulo, verificaram a presença de nove amostras



(81,8%) em desacordo com a legislação vigente para contagem de coliformes e também foram confirmadas duas (18,2%) amostras com *E. coli*.

Em outra pesquisa realizada em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, os autores avaliaram 43 amostras de peixes do lago Guaíba e chegaram à conclusão que nem todas as amostras analisadas estavam adequadas para o consumo humano devido à presença de *E. coli* em 33,74%; e que 8,14% estavam com níveis de coliformes fecais acima do permitido pela legislação brasileira (MÖLLERKE e col., 2002). Em outra pesquisa realizada no mesmo ano no Rio de Janeiro, os autores obtiveram 100% das amostras contaminadas por coliformes totais e por organismos mesófilos e 75% com *E. coli* (ANDRADE e col., 2002).

SILVA e col. (2002) avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de pescado comercializado em Maceió, Alagoas, sendo evidenciadas a presença de *E. coli* em 15% e 55% com coliformes fecais acima dos padrões legais.

Estes trabalhos demonstram a problemática da qualidade higiênico-sanitária do pescado comercializado em diferentes locais do Brasil e os riscos que correm os indivíduos que consomem estes alimentos crus, na forma de sushi ou sashimi.

### 5.3.2 *Salmonella*

A *Salmonella* é patogênica ao homem e aos animais. Habita o trato intestinal de animais e é eliminada através das fezes. Desta forma, pode contaminar a água, superfícies, manipuladores, alimentos e conseqüentemente os consumidores desses alimentos (GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004).

Na RDC nº 12 do Ministério da Saúde, consta ausência de *Salmonella* em 25 g da amostra. A presença desta bactéria nos alimentos indica a inadequação do produto para consumo, constituindo um sério problema para a saúde pública (ANVISA, 2001).

No presente estudo, a pesquisa de *Salmonella* spp foi realizada através do pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em ágar seletivo, seleção de colônias suspeitas, com as quais realizaram-se provas bioquímicas e sorológicas. Em 15% das amostras analisadas foi possível identificar cepas presuntivas de serem *Salmonella* spp, de acordo com a técnica previamente descrita. Entretanto, após triagem pelo método de PCR, empregando iniciadores específicos para o fragmento 16S rDNA de *Salmonella*, nenhuma amostra foi considerada positiva (SOUMET e col., 1990).

LIPP e ROSE (1997) relatam que a incidência de *Salmonella* spp em peixes é baixa nos Estados Unidos, quando comparada com outros alimentos. No entanto, eles alertam para o risco que este patógeno representa para os indivíduos imunocomprometidos, idosos e diabéticos. Os

autores salientam ainda a importância de empregar as técnicas de PCR nas rotinas laboratoriais dos serviços de proteção e vigilância a saúde pública, para a confirmação de *Salmonella* spp, metodologia similar à empregada neste trabalho.

Em um outro estudo, realizado por FELDHUSEN (2000), o autor também refere a baixa incidência de salmonelose em humanos causadas por consumo de peixes e crustáceos na Europa e América do Norte, quando comparados a outros alimentos.

PEIXOTO e col. (2002) também obtiveram, como resultado, ausência de *Salmonella* spp em 25 g das amostras analisadas em um estudo realizado com pescada (*Macrodromus aegyptius*). CASTRO e col., 2003, analisaram 100 amostras de peixe curimã (*Mugil liza*), oriundo da Favela do Caranguejo, Recife, Pernambuco, e também não obtiveram resultado positivo para a pesquisa de *Salmonella*. FILHO e col., 2003b, analisaram pirarucu (*Arapaima gigas*) e também confirmaram a baixa incidência de *Salmonella* spp em peixes, ao obter todos os resultados negativos para este microrganismo.

MARTINS e col. (2002) pesquisaram *Salmonella* spp entre outros microrganismos em pescado comercializado em “Pesque-Pague” em Toledo, Paraná, utilizando petri-filme. Obtiveram como resultado nenhuma amostra positiva para *Salmonella* spp. Os resultados obtidos pelos autores corroboram com os obtidos no presente estudo, apesar da diferença de metodologia.

Dentre as 30 amostras analisadas por FILHO e col. (2002) de pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum*), cinco foram consideradas como presença de *Salmonella* spp em 25 g. Entretanto, estes autores utilizaram-se de técnicas padrões de análises laboratoriais para este estudo.

Em uma pesquisa realizada por KUMAR e col. (2003), os autores compararam os métodos convencionais para detecção de *Salmonella* spp. Em seguida, os resultados foram confirmados pelo método de PCR, demonstrando que os primeiros podem gerar falsos resultados positivos, e ressaltando a importância de se obter um resultado confiável através do PCR – salientando portanto a importância dos resultados obtidos no presente estudo quanto à utilização de métodos moleculares para confirmação de cepas presuntivas de *Salmonella*.

A utilização de técnicas de biologia molecular para caracterização de diferentes grupos de bactérias vem sendo amplamente utilizada com a finalidade de detecção de organismos responsáveis por surtos e mesmo em estudo de diversidade microbiana.

A técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) pode ser utilizada tanto para a pesquisa direta da presença e identificação de microrganismos como para determinar perfis genéticos que podem informar a semelhança entre organismos isolados de uma ou diferentes amostras, bem como isolados de pacientes e alimentos, e assim traçar rotas epidemiológicas do organismo em estudo.

### 5.3.3 *Staphylococcus aureus*

Uma das causas mais freqüentes dos surtos de intoxicações está relacionada com a presença de toxinas produzidas por cepas de *S. aureus*. Os manipuladores são os carreadores das cepas toxigênicas para o alimento, o qual abriga essa bactéria em suas fossas nasais, garganta, cabelo e pele (GERMANO e GERMANO, 2003; VIEIRA e col., 2004). Embora *S. aureus* não seja um microrganismo de ambiente marinho, ele pode ser isolado em peixes, em consequência da contaminação cruzada entre utensílios e alimentos crus e cozidos, ou ainda pelo abuso do tempo nas temperaturas a que estes alimentos são submetidos.

O crescimento desta bactéria nos alimentos representa um risco potencial à saúde devido a enterotoxina produzida e introduzida, via alimento, responsável pelo quadro de intoxicação alimentar (ICMSF, 1978). O interesse por este patógeno se constitui em um problema de saúde pública.

Como consequência direta da manipulação inadequada na preparação de sushis e sashimis, o *Staphylococcus* spp encontra nos peixes ambiente favorável para a multiplicação (GERMANO e GERMANO, 2003).

BARRETO e VIEIRA (2003) realizaram uma pesquisa sobre possíveis portadores de *S. aureus* em duas indústrias de pesca em Fortaleza, Ceará. A pesquisa teve por objetivo isolar e identificar cepas de *S. aureus* a partir de amostras das mãos, cavidade nasal, cavidade orofaríngea e saliva de 60 manipuladores de alimentos. Os autores isolaram *S. aureus* em 60% dos

indivíduos pesquisados, sendo a área de maior ocorrência na cavidade orofaríngea, seguida da saliva, cavidade nasal e mãos, evidenciando assim a importância dessas áreas como fonte de contaminação.

CASTRO e col., 2003, pesquisando *Staphylococcus* coagulase positiva em peixes oriundos da Favela do Carangueijo, Recife, Pernambuco, obtiveram como resultado máximo  $6,7 \times 10^2$  UFC/g, estando todas as amostras dentro dos limites preconizados pela legislação. Essas amostras, entretanto, foram retiradas dos viveiros e posteriormente analisadas, com pouca manipulação dos peixes, o que justifica os baixos valores obtidos.

HOFFMANN e col. (1999) também verificaram a presença de *S. aureus* em amostras de pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, onde duas (18,2%) das amostras estavam com valores dentro do padrão estabelecido (máximo  $5,0 \times 10^3$  UFC/g) na legislação federal, assemelhando-se aos resultados obtidos neste estudo.

Em outra pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, em 120 amostras de peixes, sendo 60 de supermercados e 60 de feiras-livres, os autores obtiveram resultados insatisfatórios em 31 das amostras colhidas em supermercados sob refrigeração e em 37 das amostras colhidas em feiras-livres em temperatura ambiente. Destas, 21 amostras oriundas de supermercados e 33 provenientes de feiras apresentaram valores superiores ao que preconiza a legislação brasileira (FILHO e col., 2003a), demonstrando a importância de manter os peixes sob refrigeração e a rápida proliferação deste microrganismo em temperatura elevada.

No que concerne ao *S. aureus*, foram obtidos em três amostras. Destas, duas apresentavam valores abaixo e uma acima ( $1 \times 10^5$  UFC/g) do preconizado pela legislação brasileira (ANVISA, 2001), valor este passível de produzir as toxinas SEA, B, C e D (ICMSF, 1998).

#### 5.3.4 *Vibrio*

Muitos alimentos têm sido relacionados como causas das DTAs e infecções, no entanto as pesquisas normalmente restringem-se a constatar a presença daquelas bactérias patogênicas clássicas, como por exemplo: bactérias do gênero *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, entre outros. Entretanto, várias espécies de *Vibrio* também são potencialmente patogênicas para o homem e são pouco abordadas em pesquisas higiênico-sanitárias de alimentos.

O *Vibrio* é um microrganismo natural de ambientes aquáticos, especialmente ambientes marinhos, transmitido através de peixes crus ou malcozidos, tem sido isolado em diversos alimentos à base de peixe e está associado com doenças em humanos (MATTÉ e col., 1994a;b; ADAMS e MOSS, 1997).

*V. fluvialis* é um patógeno entérico que produz hemolisina extracelular (KOTHARY e col., 2003). No Brasil, o primeiro caso de *V. fluvialis* foi descrito por MAGALHÃES e col. (1996). Atualmente, diversos autores relatam casos de diarreia severa causada pelo *V. fluvialis* em pacientes debilitados, com idade avançada ou crianças, com evolução do quadro para

bacteremia, peritonite, celulite hemorrágica, cerebrites. Nesses casos há sempre um antecedente de consumo de alimentos a base de peixes crus ou malcozidos ou até mesmo o contato direto com água salobra (MAGALHÃES e col., 1990; RODRIGUES e col., 2001; LESMANA e col., 2002; CHAKRABORTY e col.; HUANG e HSU; RATNARAJA e col., 2005; LAI e col., 2006).

A gastroenterite causada pelo *V. fluvialis* pode ser semelhante a do *V. cholerae*, com severa diarreia e vômitos, desidratação, dor abdominal e febre, que são os sintomas mais comuns. Entretanto, a diferença marcante dos sintomas causados pelos dois microrganismos é que na diarreia provocada pelo *V. fluvialis* há a presença de sangue (OLIVER e KAPER, 1997).

O *V. fluvialis* tem sido isolado em moluscos pesquisados em regiões costeiras do Brasil. MATTÉ e col. (1994b) pesquisaram espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicos associados com moluscos da região da costa do atlântico do Brasil, e o *V. fluvialis* foi o terceiro microrganismo mais isolado. Em outra pesquisa, BARBONI (2003) coletou bivalves nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia, entre os anos de 2000 e 2002, e também isolou o *V. fluvialis*. No presente estudo também foi possível isolar este microrganismo em três (15%) das amostras pesquisadas.

*V. metschnikovii* é um habitante natural de ambientes aquáticos, tem sido isolado de amostras de pescado, e está associado com doenças em



humanos. A evidência de gastroenterite causada pelo *V. metschnikovii* no Brasil foi descrita pela primeira vez por MAGALHÃES e col. (1996), quando esta bactéria foi isolada de seis pacientes com diarreia em Recife.

Em pesquisa realizada por MATTÉ e col. (2006) em peixes coletados na cidade de Santos, São Paulo, foram obtidas em 36% das amostras *V. metschnikovii*, que produziram, dentre outros fatores de virulência,  $\beta$ -hemólise em 100% das cepas.

Diversas pesquisas demonstram a resistência destes microrganismos aos antibióticos (ZANETTI e col., 2001; RADU e col., 2002). O *V. fluvialis*, em particular, apresenta resistência ao cloranfenicol, estreptomicina entre outros (AHMED e col., 2005), o que dificulta o tratamento dos indivíduos acometidos.

A RDC nº 12 preconiza valores de referência para *V. parahaemolyticus* de no máximo  $10^3$  NMP/g, sendo este microrganismo responsável por surtos de toxinfecção alimentar, intimamente relacionada ao consumo de pescado. No entanto, outras espécies de *Vibrio* são consideradas potencialmente patogênicas e capazes de causar problemas de saúde pública relacionados com infecções em humanos como: *V. cholerae* sorogrupos não-O1 e não-O139, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. furnissii* (MATTÉ, 2003). Vários casos de gastroenterites causadas por espécies de *Vibrio* spp não são diagnosticados porque os laboratórios clínicos usualmente não adotam como rotina a pesquisa dessas espécies de *Vibrio* (ALTEKRUSE e col., 2000).

Apesar dos víbrios serem habitantes naturais de ambientes aquáticos, eles não deveriam estar na musculatura do peixe. Poderia estar na superfície corpórea, guelras ou até mesmo no trato digestivo dos peixes, mas o fato de ser isolado na musculatura indica falha no processamento, ou seja, houve contaminação cruzada. Nesta pesquisa foi possível isolar em apenas uma das amostras duas espécies patogênicas para o homem, o *V. fluvialis* e o *V. metschnikovii*, e em outras duas amostras isolou-se o *V. fluvialis*, demonstrando que estes microrganismos podem estar presentes em peixes que são comumente ingeridos crus e podem causar sérios problemas a saúde pública.

## 6 CONCLUSÕES

Na investigação dos manipuladores durante o ato de venda e das condições higiênico-sanitárias e estruturais dos locais de comercialização, pode-se concluir que a comercialização, como parte integrante da cadeia produtiva de peixe, é deficiente quanto aos conhecimentos de higiene pessoal, uso de luvas descartáveis e à contaminação cruzada, ou seja, os principais componentes das Boas Práticas de Fabricação.

De acordo com o preconizado pela RDC nº 12 de 2001, foram observadas cinco amostras (25%) não-adequadas para consumo (ANVISA, 2001).

Foram isoladas duas espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas para o homem em 15% das amostras, porém em uma das amostras foi possível identificar as duas espécies.

A ocorrência de espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas, em especial o *V. fluvialis* e *metschnikovii*, representam perigo para a saúde pública.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos são os estudos que abordam o tema das peixarias como fornecedoras de peixes prontos para consumo cru e qualidade higiênico-sanitária de sushis e sashimis, sobretudo comercializados em estabelecimentos que não são especializados.

A utilização de métodos moleculares para a confirmação de cepas presuntivas de *Salmonella* demonstra ser uma alternativa importante na pesquisa deste microrganismo, uma vez que ele representa um problema para a saúde pública e os métodos tradicionais podem gerar resultados falso-positivos.

Além do *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* a busca pelas demais espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas ao homem não é preconizada pela legislação brasileira, não fazendo parte, portanto, da rotina de análises laboratoriais da vigilância sanitária de alimentos. Esse fato não isenta a possibilidade de ocorrência de outras espécies potencialmente patogênicas de *Vibrio*, como observado neste estudo.

O consumidor tem o poder de exigir produtos mais seguros e de melhor qualidade, porém nem sempre tem como saber se o pescado que está adquirindo possui estas características, pois há falta de informação e orientação, o que deixa a população vulnerável às orientações do comerciante, que muitas vezes também não tem conhecimento técnico sobre o produto que está vendendo.

Portanto, os consumidores e comerciantes devem ser orientados de forma mais abrangente possível sobre hábitos de higiene pessoal, aspectos da contaminação cruzada, técnicas de armazenagem, modo de expor corretamente os produtos e a maneira segura de consumir pescado.

Todo este nível de informação é indispensável para minimizar os riscos de uma doença de origem alimentar, provocada pelo consumo de peixes em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, uma vez que o consumo de alimentos crus ou malcozidos representa um sério risco à saúde de quem os consome.

As pessoas só podem ser responsabilizadas pela segurança alimentar se elas receberem orientação profissional sobre os riscos que certos alimentos e práticas causam à saúde e também devem ser orientadas sobre suas escolhas alimentares (WHO, 2000).

O consumidor, dada a reconhecida falta de conhecimento, para escolher fornecedores e avaliar a qualidade sensorial dos produtos colocados à sua disposição no comércio varejista, é obrigado a confiar nos órgãos públicos de saúde, informações dos serviços de inspeção federal ou estadual e das vigilâncias sanitárias. No entanto, a legislação vigente pouco aborda sobre a comercialização de pescado para consumo cru ou malcozido, havendo necessidade de passar por uma acurada revisão e atualização.

Com base nestes fatos, faz-se necessária à conscientização da população como um todo, partindo dos pescadores, passando pelos comerciantes e atingindo os consumidores finais sobre os riscos da ingestão

deste tipo de preparação, alertando-os sobre as espécies de peixes que podem ser destinadas a este fim.

Diante dos resultados apresentados, pode-se observar que o consumo de produtos adequadamente cozidos ou refrigerados, educação dos manipuladores de alimentos sobre os fatores de risco de proliferação e contaminação cruzada, conscientização da população sobre os riscos de ingestão de peixes crus e outras medidas sobre o preparo de alimentos, podem reduzir alguns problemas de saúde pública ligados ao consumo destes alimentos.

## 8 REFERÊNCIAS

Adams MR, Moss MO. Food microbiology. Cambridge: the royal society of Chemistry; 1997.

Adams M, Motarjemi Y. Fish, Shellfish and fishery products. Basic Food Safety for Health Workers. Geneva: WHO; 1999.

Agnese AP, Oliveira VM, Silva PPO, Oliveira GA. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica – RJ. Higiene Alimentar. 2001;15(88):67-70.

Ahmed AM, Shinoda S, Shimamoto T. A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. FEMS Microbiology Letters. 2005;242:241-247.

Ayulo AMR, Machado RA, Scussel VM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. International Journal of Food Microbiology. 1994;24:171-178.

Alterkruse SF, Bishop RD, Balndy LM, Thompson SG, Wilson SA, Ray BJ, Griffin PM. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. Epidemiology and Infection. 2000;124:489-495.

Alves CL, Carvalho FLN, Guerra CG, Araújo WMC. Comercialização de pescado no Distrito Federal: avaliação das condições. Higiene Alimentar. 2002;16: 41-49.

Andrade FSV, Carneiro MJM, Martins MLL, Cordeiro CAM. Avaliação sensorial e microbiológica do peruá (*Balistes capriscus*) capturado na região norte fluminense e comercializado no mercado de Campos dos Goytacazes – RJ. Higiene Alimentar. 2002;16(99):70-74.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 10 jan 2001;Seção 1:45-53.

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. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.

Barreto NSE, Vieira RHSF. Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. Higiene Alimentar. 2003;17(104/105): 49-57.

Barros GC. Perda de qualidade do pescado, deterioração e putrefação. Revista CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). 2003;30:59 – 64.

Brien SJO, Gillespie IA, Sivanesan MA, Elson R, Hughes C, Adak GK. Review article: Publication bias in foodborne outbreaks of infectious intestinal disease and its implications for evidence – based food policy. England and wales 1992 - 2003. Epidemiology Infeccion. 2006;01 - 08.

Butt AA; Aldridge KE; Sanders CV. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. The Lancet Infectious Diseases. 2004;4:201 - 212.



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

Castro MRS, Freire IMG, Escobar CAM, Antunes GM, Faro ZP. Influência da contaminação ambiental nas condições higiênico-sanitárias do peixe Curimã (*Mugil lisa*), oriundo da favela do Caranguejo, Recife, PE. *Higiene Alimentar*. 2003;17(109):54-61.

CDC -Centers for Disease Control and Prevention Surveillance. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Disease Information. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholerae\\_t.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholerae_t.htm)>. Acessado em: 13 jan 2005.

Chakraborty R, Chakraborty S, De K, Sinha S, Mukhopadhyay AK, Khanam J, Ramamurthy T, Takeda Y, Bhattacharya SK, Nair B. Cytotoxic and cell vacuolating activity of *Vibrio fluvialis* isolated from paediatric patients with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*. 2005;54:707- 716.

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.

Chen Y, Jackson KM, Chea FP, Schaffner DW. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*. 2000;64(1):72-80.

CVE - Centro de vigilância Epidemiológica. Informe-net DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) Manual das doenças transmitidas por alimentos. *Salmonella enteritidis* / Salmoneloses. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF\\_59Sen.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_59Sen.htm)>. Acessado em: 13 jan 2005a.

CVE - Centro de vigilância Epidemiológica. Informe-net DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) Manual das doenças transmitidas por alimentos. *Staphylococcus aureus* / Intoxicação Alimentar. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF\\_59Sen.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_59Sen.htm)>. Acessado em: 13 jan 2005b.

CVE - Centro de vigilância Epidemiológica. Informe-net DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) Manual das doenças transmitidas por alimentos. *Vibrio parahaemolyticus*. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Vibrio\\_parah.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Vibrio_parah.htm)>. Acessado em: 13 jan 2005c.

Doyle MP, Beuchat RL, Montville JT. Meat, poultry, and seafood. In: Jackson TC, Acuff GR, Dickson SJ. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington: editora ASM Press; 1997. p.84-85.

DSMZ – Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH – DSMZ. Genus *Staphylococcus* – Bacterial nomenclature up-to-date. Disponível em: <<http://www.gbf/dsmz/bactnom/bactname.htm>>. Acessado em: 19.07.2002.

Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*. 2000;2:1651-60.

Ferretti R, Duarte RA, Terra NL, Moriguchi Y. Aterosclerose e ácidos graxos Omega-3. *Acta Méd*. 1994;15:557-574.

Figueiredo VCF. Métodos moleculares aplicados na pesquisa de *Escherichia coli* O157 em amostras fecais de bovinos. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

Filho ESA, Sigarini CO, Ribeiro JN, Delmondes EC, Stelatto E, Araújo Jr. A. Características microbiológicas de “Pintado” (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuiabá-MT. Higiene Alimentar. 2002;16(99):84-88.

Filho ESA, Sigarini CO, Lindner AL, Ales, KG, Eustáquio E, Stelatto E, Ribeiro JN, César APR. Avaliação microbiana de “Pintado” (*Pseudoplatystoma fasciatum*), proveniente da região do pantanal matogrossense e comercializado na cidade de Cuiabá, MT, Brasil. Higiene Alimentar. 2003a;17(114/115):81-84.

Filho VEM, Nascimento AR, Filho JEM, Santos AA, Marinho SC, Martins AGLA, Júnior AVG. Avaliação da qualidade microbiológica e bromatológica do Pirarucu (*Arapaima gigas*) salgado-seco, comercializado nas feiras-livres da cidade de Manaus –AM. Higiene Alimentar. 2003b; 17(111):66-72.

Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu; 2003.

Gaspar Jr JC, Vieira RHSF, Tapia MSR. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza – Ceará. Higiene Alimentar. 1997;11(51):20-23.

Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: editora Varela; 2003.

Germano PML, Oliveira JCF, Germano MIS. O pescado como causa de intoxicações bacterianas. *Higiene Alimentar* 1993;17(28):40-45.

Gibotti A, Saridakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. And *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambém Stream (State of Paraná, Brazil). *Journal of Applied Microbiology*. 2000;89:70-75.

Gram L, Huss HH. Microbiological Spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 1996;33:121-137.

Hanashiro A. Avaliação da Qualidade Higiênico-Sanitária e Nutritiva de Bentôns Comercializados no Bairro da Liberdade, São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2002.

Hoffmann FL, Garcia CH, Vinturim TM, Fázio MLS. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária de pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto (SP). *Higiene Alimentar*. 1999;13(64):45 - 48.

Holt JG. *Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.

Huang KC, Hsu RWW. *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitis and cerebritis. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40:75-77.

Huss HH. Control of indigenous pathogenic bacteria in sea food. *Food Control*. 1997;8:91-98.

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

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Ecología Microbiana de los Alimentos 2 Productos Alimenticios. Zaragoza: Acribia; 1985.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos Características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia; 1998.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration. 2<sup>a</sup> ed. Toronto: University of Toronto; 1978.

Jackson TC, Acuff GR, Dickson SJ. Meat, Poultry, and seafood. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington: editora ASM Press; 1997:83 -100.

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

Karunasagar I, Sugumar G, Karunasagar I, Reilly PJA. Rapid polymerase chain reaction method for detection of Kanagawa positive *vibrio parahaemolyticus* in seafoods. International Journal of Food Microbiology. 1996;317 – 323.

Koneman EW, Allen SD, Jandaw M, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

Kothary MH, Lowman H, McCardell BA, Tall BD. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-Like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. Infection and Immunity. 2003;71:3213-3220.

Kumar HS, Sunil R, Venugopal MN, Karunasagar I. Detction of *Salmonella* spp. In tropical seafood by polymerase chain reaction. International Journal of Food Microbiology. 2003;88:91 -95.

Lai CH, Hwang CK, Chin C, Lin HH, Wong WW, Liu CY. Severe watery diarrhoea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*. Journal of Infection. 2006;52:95-98.

Lederle J. Enciclopédia moderna de higiene alimentar. São Paulo: Manole Dois; 1991.

Lesmana M, Subekti DS, Tjaniadi P, Simanjuntak CH, Punjabi NH, Campbell JR, Oyofa BA. Spectrum of *vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. Diagnostic Microbiology an Infectious Disease. 2002;43:91-97.

Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. Revista SCI. Tech. Off. int. Epiz. 1997;16:620 – 640.

Lira GM, Pereira WD, Athayde AH, Pinto KP. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió, AL. Higiene Alimentar. 2001; 15(84):67-76.

Liu C, Su YC. Efficiency of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing gloves. Intenational Journal Food Microbiology. 2006;110:149-154.

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.

Magalhães V, Lima RA, Magalhães E, Magalhães M. Human gastroenteritis associated with *Vibrio fluvialis* in Recife. Arq. Gastroenterol. 1990;27:141-143.

Martins CVB, Minozzo MG, Vaz SK. Aspectos Sanitários de pescados comercializados em “Pesque-Pagues” de Toledo (PR). Higiene Alimentar. 2002;16:51 – 61.

Matté GR. Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares. [tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.

Matté GR, Matté MH, Rivera IG, Martins MT. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical Region. Journal of Food Protection. 1994a;57(10):870-873.

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. 1994b;77:281-287.

Matté MH, Baldassi L, Barbosa ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matté GR. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brasil. Food Control. 2006; Article in press. 20 apr. 2006

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.185, de 13 de maio de 1997. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial da União. 19 mai 1997; Seção 1:10282.

Ministério da Saúde. Resolução RDC 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União. 15 set 2004;Seção 1.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº SVS/MS nº 326 de 30 de julho de 1997. Dispõe de regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da União. 01 ago 1997;Seção 1.

Molins RA, Motarjemi Y, Käferstein FK. Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods. *Food Control*. 2001;12:347-356.

Möllerke RO, Wiest JM, Carvalho HHC. Colimetrias como indicadores de qualidade de pescado artesanal do lago Guaíba, em Porto Alegre, RS. *Higiene Alimentar*. 2002;16(99):102-106.

Montville R, Chen Y, Schaffner DW. Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *Journal of Food Protection*. 2001;64(6):845-849.

Morita M. Avaliação da qualidade sanitária e ocorrência de *aeromonas* spp em lagoas de pesque-pagues da Região Metropolitana de São Paulo. [dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

Muratori MCS, Costa APR, Viana CM, Rodrigues PC, Junior RLP. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. *Higiene Alimentar*. 2004;18(116/117):50-54.

Ogawa M, Maia EL. Manual da Pesca ciência e tecnologia do pescado. Volume I. São Paulo: Varela; 1999.

Oliver JD, Kaper JB. *Vibrio* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington: editora ASM Press;1997. p. 228 - 232.



OPAS/INPPAZ. HACCP: Instrumentos essenciais para a inocuidade alimentar Buenos Aires, OPAS/INPPAZ, 2001.

Pacheco TA, Leite RGM, Almeida AC, Silva NMO, Fiorini JE. Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescado de água doce. Higiene Alimentar. 2004;18(116/117):68-72.

Palumbo AS. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? Journal of Food Protection. 1986;49:1003 – 1009.

Panisello PJ, Rooney R, Quantick PC, Stanwell-Smith R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. International Journal of Food Microbiology. 2000;59:221-234.

Pardi MC, Santos IF, Souza ER, Pardi HS. Ciência, higiene e tecnologia da carne. 2ª ed. Goiânia: editora UFG; 2001.

Pedro SCM, Matté GR, Germano PML, Matté MH. Aspectos sanitários de comercialização do queijo minas meia cura no Município de São Paulo. Revisa. 2005;1(4): 246-253.

Peixoto MRS, Souza CL, Mota ES. Utilização de pescada (*Macrodrom aencylodon*) de baixo valor comercial para obtenção de surimi empregado na elaboração de salsicha com sabor de camarão. Higiene Alimentar. 2002;16(99):95-101.

Pessoa GVA, Silva EAM. Medium of Rugai and lysine-motility combined in one single tube for the presumptive identification of Enterobacteriaceae. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 1972;32:97–100.

Pimentel LPS, Panetta JC. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados da grande São Paulo. Parte 1, resultados microbiológicos. Higiene Alimentar. 2003;17(106): 56-57.

Radu S, Vincent M, Apun K, Rahim RA, Benjamin PG, Yuherman, Rusul G. Molecular characterization of *vibrio cholerae* O1 out break strains in Miri, Sarawak (Malaysia). Acta Tropica. 2002;83:169-176.

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

Rodrigues SMA, Gonçalves EGR, Mell DM, Oliveira EG, Hofer E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2001;34 (5):407-411.

Rohaya MA, Chuink BH, Aniran K. Microbiological status of live eel and processed fish products for export to Japan. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1997;28:77.

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 gugas*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005;55:2251-2255.

Santos MG, Vieira RHSF, Iaria ST, Souza OV. Coliformes isolados de utensílios e equipamentos, na linha de processamento de camarão, de uma indústria de pescado de Fortaleza, Ceará. Higiene Alimentar. 2002;16:67-75.

São Paulo (Estado). Decreto n.12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 21 out 1978;13.

São Paulo (Estado). Secretaria de Saúde do Município de São Paulo. Decreto nº 41.425, de 27 de novembro de 2001. Dispõe sobre o funcionamento dos Mercados, das Centrais de Abastecimento e dos Frigoríficos Municipais. Disponível em:  
[http://www3.prefeitura.sp.ov.Br/cadlem/secretarias/negocio\\_juridicos](http://www3.prefeitura.sp.ov.Br/cadlem/secretarias/negocio_juridicos).  
Acessado em 03 jun 2005.

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

SBCTA - Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Manual de Higiene e Sanificação para a Indústria de Alimentos. São Paulo, 1994.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Portaria CVS 6/99 de 10 de março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para controle higiênico sanitário em estabelecimentos de alimentos e institui a obrigatoriedade da responsabilidade técnica. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 13 mar 1999.

Secretária Municipal de Saúde. Portaria nº 2.535, de 24 de outubro de 2003. Regulamento técnico para o controle higiênico-sanitário em empresas de alimentos. Diário Oficial do Município. 24 out 2003.

SEMAB. Secretária Municipal de Abastecimento de São Paulo. Disponível em: <<http://www2.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/abastecimento/organizacao/estrutura/0005>>. Acessado em: 10 jul 2006.

SENAI – Serviço Aprendizagem Industrial Departamento Nacional. Guia para elaboração do plano APPCC; pescado e derivados. 2 ed. Brasília, SENAI/DN, 2000. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC Indústria. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE.

Silva Jr. EA. Manual de controle higiênico Sanitário em alimentos. 4ª ed. São Paulo: editora Varela; 2002.

Silva MCD, Normande ACL, Ferreira MV, Ramalho LS. Avaliação da qualidade microbiológica de pescado comercializado em Maceió, AL. Higiene Alimentar. 2002;16(96):60-68.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª ed. São Paulo: editora Varela; 2001.

Soultos N, Abraham A, Papageorgiou K, Stesis V. Incidence of *Listeria* spp in fish and environment of fish markets in Northern Greece. Food Control. 2006;

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* spp, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. Applied Microbiology. 1999;28:113-117.

Vieira RHSF, Rorigues DP, Barreto NSE, Souza OV, Tôrres RCO, Ribeiro RV et al. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado; teoria e prática. São Paulo: Varela; 2004.

Vieira RHSF, Souza OV, Patel, TR. Bacteriological quality of ice used in Mucuripe Market – Fortaleza, Brasil. Food Control Surrvey. 1997;V8:83-85.

World Health Organization (WHO). Application of risk analysis to food standard issues. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation. 1995.

World Health Organization (WHO). Communicable disease Surveillance and Response (CSR). Cholera: Basic facts for travellers. Disponível em: <[URL:http://www.who.int/emc/disease/cholera/factstravellers.html](http://www.who.int/emc/disease/cholera/factstravellers.html)>. Acessado em: 10.01.2005.

World Health Organization (WHO). Foodborn disease: a focus for health education. Geneva; 2000.

World Health Organization (WHO). Food Safety and Foodborne Illness. Disponível em: < [URL:http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html)>. Acessado em: 08 de outubro de 2003.

Zanetti S, Spanu T, Deriu A, Romano L, Sechi LA, Fadda G. In vitro suscpibility of *Vibrio* spp. Isolated from the environment. International Journal of Antimicrobial Agents. 2001;17:407-409.

**Anexo 1:** Check-list utilizado durante a avaliação informal dos estabelecimentos de coleta de amostras.

<b>Check List de coleta</b>	
<b>Dados da coleta</b>	
Data	
Mercado Municipal	
Peixaria	
Produto coletado	
Tipo de embalagem	
<b>Condição estrutural e higiene</b>	
Balcão e exposição do produto	
Mesa de procedimento	
Presença de pia para higiene das mãos	
Piso	
Parede	
Teto	
Utensílios	
<b>Higiene e organização do ambiente</b>	



Anexo 2: Esquema de análise para detecção de *Vibrio* spp em alimentos.

