

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Carla Alessandra Cabral do Nascimento

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE SUSHI E SASHIMI A BASE DE  
SALMÃO COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2019

Carla Alessandra Cabral do Nascimento

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE SUSHI E SASHIMI A BASE DE  
SALMÃO COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Monografia apresentada ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientadora: Carla de Oliveira Rosas

Co-orientadora: Manoela P. da Penha.

Rio de Janeiro

2019

## Catologação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Nascimento, Carla Alessandra Cabral do

Análise microbiológica de amostras de sushi e sashimi a base de salmão comercializados na cidade do Rio de Janeiro. / Carla Alessandra Cabral do Nascimento. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

39 f.: fig.; tab.

Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Carla de Oliveira Rosas.

Co-orientadora: Manoela Pessanha da Penha.

1. Comida Japonesa. 2. Qualidade Microbiológica. 3. Contaminação.
4. Vigilância Sanitária. I. Título.

Microbiological analysis of salmon sushi and sashimi samples marketed in Rio de Janeiro city.

Carla Alessandra Cabral do Nascimento

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE SUSHI E SASHIMI A BASE DE  
SALMÃO COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Monografia apresentada ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em 26/ 06/ 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

---

Cátia Aparecida Chaia de Miranda (Doutor)

Instituto Oswaldo Cruz.

---

Renata Trotta Barroso Ferreira (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

ORIENTADORES

---

Carla de Oliveira Rosas (Doutora) – Orientadora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

---

Manoela Pessanha da Penha (Doutora) – Co-orientadora

Universidade Estácio de Sá.

Dedico esse trabalho ao meu pai por  
todo amor e incentivo dados a mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado iluminando meu caminho.

À minha família, por me incentivar nos momentos mais difíceis, principalmente meu esposo por entender minhas horas de ausência.

À minha orientadora, Carla Rosas por me ajudar em todo processo do projeto, sempre disponível e disposta a ensinar.

À minha co-orientadora, Manoela Pessanha por aceitar a fazer parte desse desafio.

À residente Mariana, por me acompanhar em todo o processo de análises e por me apresentar quase todas as dependências do INCQS.

À Valéria, Ingrid, Marcelo, Luiza, Cátia, Jandira e Natália pela colaboração em várias etapas do meu projeto.

Enfim, a todos do laboratório que me receberam com muito carinho, sou grata por todo o apoio.

Por mais longa que seja a caminhada o  
mais importante é dar o primeiro passo.

Vinícius de Moraes

## RESUMO

O aumento do consumo de sushi e sashimi entre os brasileiros é cada vez maior. A venda dessas iguarias se expandiu e hoje são comercializados em diferentes estabelecimentos de venda, alguns com condições de higiene limitadas. O risco de contaminação em sushis e sashimis tem sido atribuído principalmente pela manipulação por profissionais não capacitados, fato que pode desencadear contaminações por micro-organismos, dentre eles às bactérias muitas vezes responsáveis por doenças transmitidas por alimentos. O objetivo desse estudo foi analisar e avaliar a qualidade microbiológica de amostras de sushi e sashimi de salmão, comercializadas em diferentes pontos de venda na cidade do Rio de Janeiro. As análises de detecção de *Salmonella* spp.; pesquisa de *Listeria monocytogenes* e quantificação de coliformes termotolerantes foram baseadas nas metodologias do *Bacteriological Analytical Manual* do *Food Drug Administration*. Na quantificação de estafilococos coagulase positiva foi aplicado o método descrito na Norma ISO 6888-3:2003. As colônias identificadas como coliformes termotolerantes foram submetidas à identificação de *Escherichia coli*. Os isolados de estafilococos coagulase positiva foram submetidos a análise do perfil fenotípico, buscando-se a identificação de estirpes de *Staphylococcus aureus*. Das amostras analisadas apenas uma foi classificada como imprópria para o consumo humano, por apresentar contaminação por coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido na legislação vigente. Apesar das análises indicarem resultados satisfatórios para 96,7% das amostras, se faz necessário que estudos como este possam ser periodicamente elaborados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos prontos para consumo ofertados aos consumidores.

Palavras-chaves: Comida japonesa. Qualidade microbiológica. Contaminação. Vigilância sanitária.



## ABSTRACT

The raise in consumption of sushi and sashimi among Brazilians is increasing. The sale of these delicacies has expanded and now are marketed in different sales outlets, some with limited hygiene conditions. The risk of contamination in sushis and sashimis has been attributed mainly by manipulation by untrained professionals, a fact that can trigger contaminations by microorganisms, among them the bacteria often responsible for foodborne diseases. The objective of this study was to analyze and evaluate the microbiological quality of sushi and sashimi salmon samples, marketed at different points of sale in the city of Rio de Janeiro. The *Salmonella* spp. detection analyzes; research on *Listeria monocytogenes* and quantification of thermotolerant coliforms were based on the Bacteriological Analytical Manual of the Food Drug Administration methodologies. For the quantification of coagulase positive staphylococci, was applied the ISO 6888-3: 2003. Of the colonies identified as thermotolerant coliforms were submitted to identification of *Escherichia coli*. The coagulase positive staphylococci isolates were submitted for phenotypic profile analysis to identify *Staphylococcus aureus* strains. Of the analyzed samples, only one was classified as unfit for human consumption, due to the presence of thermotolerant coliform contamination above the established limit by current legislation. Although the analyzes indicated satisfactory results for 96.7% of the samples, it is necessary that studies such as these can be periodically elaborated to evaluate the microbiological quality of ready-to-eat foods offered to consumers.

Keywords: Japanese food. Microbiological quality. Contamination. Health surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES, QUADRO E TABELAS

Figura 1- Análise temporal do número de surtos e casos de DTAs no Brasil entre os anos de 2000 a agosto de 2017. ....	12
Figura 2- Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil entre os anos 2000 e 2017. ....	12
Quadro 1- Amostras, estabelecimentos e bairros de onde foram adquiridos.....	23
Tabela 1- Resultados obtidos das 30 amostras na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp; pesquisa de <i>Listeria.monocytogenes</i> , quantificação de coliformes 45°C e contagem de estafilococos coagulase positiva. ....	29
Tabela 2- Identificação automatizada dos isolados classificados como estafilococos coagulase positiva.....	31

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BLEB	Caldo de Enriquecimento para <i>Listeria</i> tamponado
CDC	Disease Control and Prevention Center
DM	Departamento de Microbiologia
DTA	Doença transmitida por alimentos
EC	<i>Escherichia coli</i>
ECP	Estafilococos Coagulase Positiva
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GP	Gram positiva
HK	Ágar entérico de Hektoen
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	International Organization for Standardization
LABENT	Laboratório de Referência Nacional Enteroinfecções Bacterianas
LABZOO	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
LIA	Ágar Lisina Ferro
MS	Ministério da Saúde
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial da Saúde
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga
SUBVISA	Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de zoonoses
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 Doença Transmitida por Alimento (DTA) .....	11
1.2 Importância da análise microbiológica de alimentos .....	13
1.3 Expansão da culinária japonesa no Brasil.....	13
1.4 Locais de comercialização de comidas japonesas e a vigilância sanitária.....	15
1.5 Legislação brasileira para o controle microbiológico de alimentos comercializado .....	16
1.6 JUSTIFICATIVA .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 Local de realização do estudo .....	22
3.2 Amostras .....	22
3.3 Metodologias de análise.....	23
3.3.1 Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> .....	24
3.3.2 Enumeração de coliformes termotolerantes e identificação de <i>E. coli</i> .....	25
3.3.3 Enumeração de estafilococos coagulase positiva .....	26
3.3.4 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

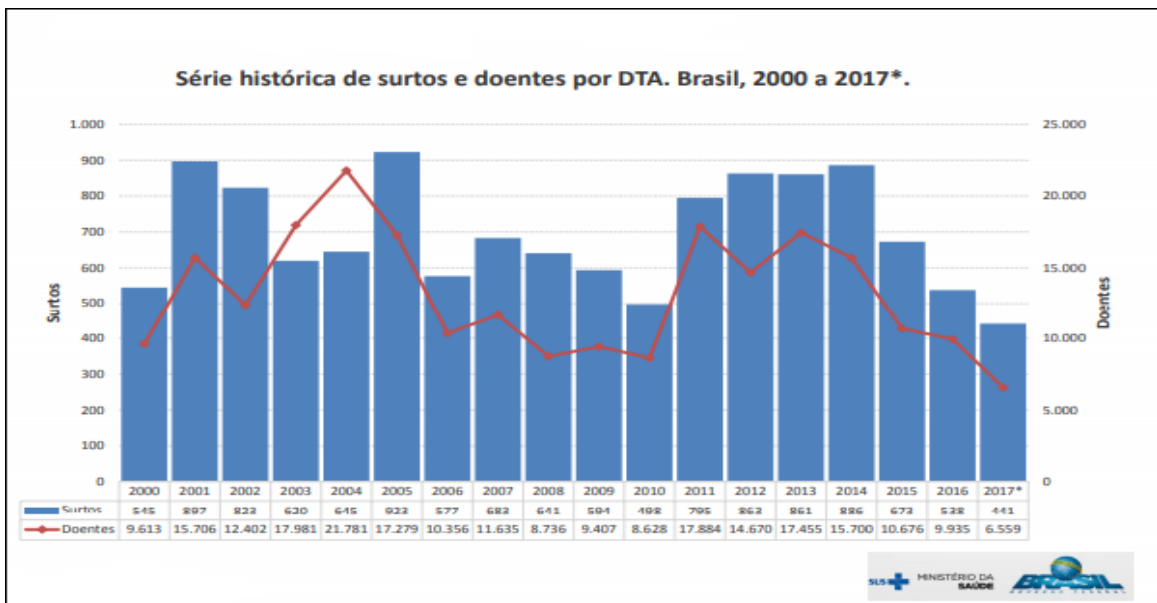
### 1.1 Doença transmitida por alimento (DTA)

As DTAs são causadas por fatores como, condições impróprias de saneamento, qualidade inadequada da água para o consumo humano, práticas inadequadas de higiene pessoal e consumo de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos ou por toxinas microbianas (BRASIL, 2010). Atualmente a ocorrência de DTAs é considerada um problema crescente na área econômica e de saúde pública em muitos países. A previsão é que haja um aumento de DTAs durante o século XXI devido as várias mudanças globais, incluindo crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos, entre outras (SOUZA, 2017).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), apresenta em seu site um levantamento dos surtos de DTAs ocorridos nos Estados Unidos da América (EUA) no ano de 2018. Descreve 25.606 casos de infecções confirmadas em laboratórios, com 5.893 hospitalizações e 120 mortes relacionadas. Dentre os agentes etiológicos de origem bacteriana envolvidos nessas infecções estão: *Campylobacter* (19,5%); *Salmonella* (18,3%); *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) (5,9%); *Shigella* (4,9%); *Vibrio* (1,1%); *Yersinia* (0,9%) e *Listeria* (0,3%) (CDC, 2019).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) divulga periodicamente a relação dos casos de DTAs ocorridos no país. O último levantamento descreve o número de 12.503 casos de surtos no período de 2000 a 2017 (Figura 1) (BRASIL, 2018a). Diante do pequeno número de dados reunidos em 18 anos de levantamento, presume-se que ocorra subnotificação dos casos de DTAs por parte dos profissionais de saúde, reforçado pela falta de orientação da população que somente procura assistência médica nos casos mais graves de infecção.

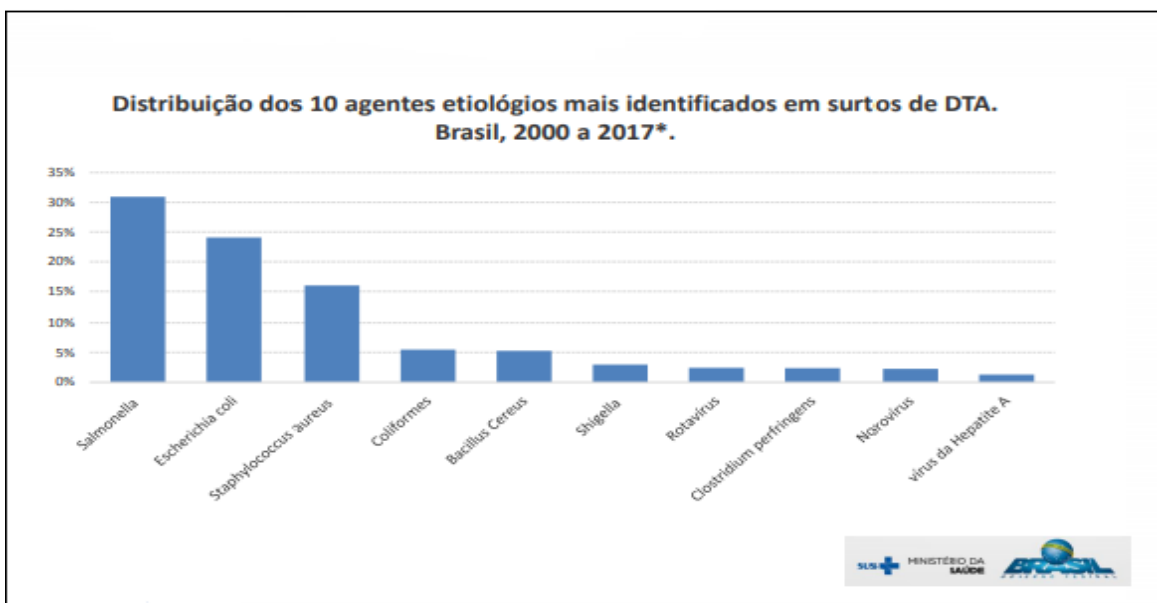
Figura 1- Análise temporal do número de surtos e casos de DTA no Brasil entre os anos de 2000 a 2017.



Fonte: (SINAN/SVS/Ministério da Saúde, 2018).

Dados apresentados pelo Ministério da Saúde mostram que os micro-organismos: *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Staphylococcus aureus* estão entre os principais agentes de surtos de DTAs ocorridos no Brasil (Figura 2) (BRASIL, 2018a).

Figura 2- Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil entre os anos de 2000 e 2017.



Fonte: (SINAN/SVS/Ministério da Saúde, 2018).

## **1.2 Importância da análise microbiológica de alimentos**

A principal missão da vigilância sanitária, conforme descrito na Lei 8.080 de 1990 é identificar, eliminar, diminuir, prevenir ou controlar os riscos inerentes à produção e circulação de produtos e serviços que possam causar danos e agravos à saúde (BRASIL, 1990).

A análise microbiológica de alimentos é uma atividade de extrema importância, que vem a complementar as ações de Vigilância Sanitária no controle de alimentos. Através dela são adquiridas informações sobre as condições higiênico-sanitárias durante a realização dos processos de fabricação, armazenamento, distribuição, além da determinação de tempo de vida útil do produto, bem como, dados importantes sobre a segurança do produto (SILVA, 2017).

Em caso de DTA, a análise microbiológica poderá auxiliar a detectar no alimento qual ou quais micro-organismos foram os causadores do surto. O controle da qualidade de alimentos através de análises microbiológicas vem sendo considerado essencial tanto para o aprimoramento de fornecedores de matérias-primas, produtores de alimentos e distribuidores, com o intuito de oferecer produtos de qualidade aos consumidores finais (SILVA, 2017).

Para que os resultados da análise microbiológica de um alimento reflitam de forma fiel as condições do produto analisado, vários requisitos devem ser atendidos. Além do uso de métodos analíticos adequados é necessário assegurar que as amostras analisadas representem o alimento como um todo, pois micro-organismos contaminantes nos alimentos podem ser inúmeros tanto na variedade, quanto na quantidade e distribuição (BARBOSA et al, 2016).

## **1.3 Expansão da culinária japonesa no Brasil**

A alimentação é uma das atividades mais relevantes da vida de um ser humano, não só por razões biológicas, mas como também pelas questões econômicas, científicas, políticas, psicológicas, sociais e culturais de um país. A diversificação dessas questões entre os países é fundamental para dinâmica da evolução das sociedades (PROENÇA, 2010). No início do século XX, devido à restrição da emigração de italianos para as lavouras brasileiras e de japoneses nos EUA, o Brasil e o Japão se alinharam diante de seus interesses e assim o governo

brasileiro recebeu imigrantes japoneses para trabalhar nas plantações de café em São Paulo. Os novos habitantes do Brasil tiveram muita dificuldade em se adaptar com o idioma, diferenças climáticas, modo de vida e principalmente com os hábitos alimentares, sendo um verdadeiro choque cultural (MOTTA; SILVESTRE; BROTHERHOOD, 2007).

A alimentação japonesa é composta basicamente de peixe e frutos do mar, arroz, legumes, folhosos, derivados de soja e algas marinhas. A maioria dos pratos tradicionais no Japão inclui o arroz e o peixe como os principais componentes. Em alguns pratos o peixe é apresentado cru e os demais ingredientes e temperos servem apenas para completar ou ressaltar os sabores (DEMETRIO et al, 2009).

Ao passar dos anos, a culinária japonesa ganhou espaço nos cardápios de poucos restaurantes da cidade de São Paulo e seus únicos apreciadores eram japoneses e descendentes. No ano de 1980, essa culinária se tornou popular no Brasil e a partir dos anos 90 houve um grande aumento na procura desses alimentos, passando a ser considerada uma alimentação saudável (ALCÂNTARA, 2009).

Atualmente essa culinária é reconhecida mundialmente e apreciada como uma dieta saudável por vários profissionais da área de saúde. Devido a essas considerações, a culinária oriental no ocidente se tornou “moda”. Com isso, os pratos orientais passaram a ser encontrados comercializados de várias formas, em restaurantes especializados ou não, em *fast food*, feiras-livres, rodízios e até mesmo em serviços de *delivery*. Os pratos à base de pescados crus como o sushi de salmão e o sashimi de salmão são os mais procurados pelos apreciadores dessa culinária (SATO, 2017; YUN, 2017).

O sushi e o sashimi são iguarias bastante conhecidas da cultura japonesa. Antigamente o sushi era apenas o nome de um produto final de conservação realizada pelos japoneses na era Nara (710- 794), que armazenavam os peixes e frutos do mar pelo método natural de fermentação por um período de 2 a 3 meses, utilizando somente sal. Na era muromashi (1338 – 1573) os japoneses começaram a ingerir esses peixes e frutos do mar acrescentando o arroz e a partir da era Edo (1820) surgiu o combinado de peixes ou frutos do mar fresco acompanhado de bolinho de arroz temperado, o atual niguirisushi, porém ainda conhecido popularmente como sushi (FREITAS et al, 2009).

O sushi é uma preparação de bolinho de arroz branco cozido, moldado com



as mãos do manipulador e com uma fatia de peixe cru na parte superior. Já o sashimi consiste em apenas uma fatia de pescado *in natura*, a grande maioria preparado com atum ou salmão. Pelo fato do ingrediente principal dessas iguarias ser o peixe cru, que é considerado um alimento altamente perecível principalmente quando *in natura*; pela forma utilizada para o preparo, que requer muita manipulação e pela ausência de tratamento térmico aplicado ao pescado, que possibilitaria a redução ou eliminação de micro-organismos patogênicos presentes na matéria-prima, esses alimentos são considerados de alto risco (PATRÍCIO, 2009). Além disso, em muitos locais de preparo desses alimentos os aspectos higiênico-sanitários são inadequados, sendo motivo de preocupação para saúde pública. Diante desses aspectos, essas iguarias podem ser consideradas como potenciais fontes de DTAs (MONTANARI et al, 2015).

#### **1.4 Locais de comercialização de comidas japonesas e a vigilância sanitária**

Atualmente, o sushi e o sashimi estão sendo comercializados em diversos locais, sendo eles, estabelecimentos especializados ou não, como: restaurantes, feiras-livres e em serviços de *delivery* seja de estabelecimentos ou de preparação caseira, dificultando assim a fiscalização pelos órgãos responsáveis.

Os estabelecimentos especializados e não especializados têm o compromisso de seguir as orientações descritas na RDC 216 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)/Ministério da Saúde(MS), de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação, visando estabelecer procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação e a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Além disso, devem obedecer também às orientações da RDC 275 ANVISA-MS de 21 de outubro de 2002, que descreve o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) aplicados aos Estabelecimentos Produtores/industrializados de Alimentos e apresenta a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004).

Nas feiras-livres, eventos ou feiras gastronômicas, essas iguarias são comercializadas geralmente em veículos automotores de médio ou grande porte denominados *foodtrucks*. Em cidades brasileiras esse tipo de comercialização está

em estágio incipiente (RIO DE JANEIRO, 2015).

O decreto nº 40. 251 de 16 de junho de 2015, criado pelo município do Rio de Janeiro dispõem sobre os critérios para comercialização de alimentos em veículos automotores (comida sobre rodas) em áreas públicas e dá outras providências. Como regras básicas nos cuidados sanitários, os alimentos perecíveis deverão ser comercializados mediante a disponibilização de equipamentos específicos, em número suficiente, que garantam as condições adequadas de conservação e distribuição dos alimentos, refrigerados, congelados ou aquecidos. A manipulação, o armazenamento, o transporte e a comercialização de alimentos deverão observar a legislação sanitária vigente no âmbito federal, estadual e municipal; nenhum alimento de consumo direto poderá ser exposto à venda sem estar devidamente protegido contra poeira, insetos e animais, bem como do contato direto e indireto do consumidor; em todo o processo de produção, armazenamento, transporte e comercialização de alimentos deverão ser adotados os procedimentos de boas práticas de manipulação de alimentos e de higiene; os equipamentos deverão dispor de fonte própria e autônoma de utilização de água potável para higienização de mãos, utensílios, equipamentos e bancadas; os manipuladores de alimentos devem manter rigorosa higiene pessoal (RIO DE JANEIRO, 2015).

A Sub-secretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e o Controle de Zoonoses (SUBVISA), além do disposto neste Decreto, aplicarão outras normas vigentes que assegurem as condições higiênico-sanitárias e o cumprimento das boas práticas nas atividades relacionadas com alimentos (RIO DE JANEIRO, 2015).

### **1.5 Legislação brasileira para o controle microbiológico de alimentos comercializados**

No Brasil, a resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA-MS estabelece os critérios microbiológicos para produtos comercializados. Em seu Anexo 1, no grupo de alimentos “22” - Pratos prontos para o consumo, item “b” - a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.) indica os seguintes parâmetros de controle microbiológico para produtos a base de pescado: ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas do alimento, os limites máximos de  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> ou NMP.g<sup>-1</sup> para coliformes a 45 °C;  $5 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> para

bactérias do grupo dos estafilococos coagulase positiva e  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> para *Vibrio parahaemolyticus* (BRASIL, 2001).

Em 2018 a ANVISA/MS lançou uma Consulta Pública Nº 542 de 17 de julho de 2018, para uma futura revogação da RDC nº12. Dentre as modificações, encontra-se a inclusão do parâmetro *Listeria monocytogenes* para alimentos prontos para o consumo, com exceção de: a) alimentos com vida útil menor que 5 dias; b) alimentos com pH  $\leq 4,4$ ; c) alimentos com atividade de água  $\leq 0,92$ ; d) alimentos com a combinação de pH  $\leq 5,0$  e atividade de água  $\leq 0,94$ . O documento estabelece, para amostras a serem analisadas, preferencialmente na forma representativa de um lote, a análise de dez unidades (n=10), onde nenhuma das dez unidades do lote (c=0) poderá apresentar concentração (m) igual ou superior a  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*. Na impossibilidade de serem analisadas amostras representativas descreve a análise de amostras indicativas, respeitando os limites de contaminação de  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2018b).

Bactérias representantes do gênero *Salmonella* são bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, apresentam-se em forma de bastonetes curtos Gram negativos, não esporuladas. São móveis, anaeróbios facultativos, oxidase negativa, crescem a 37 °C e metabolizam nutrientes por via respiratória ou fermentativa. Não fermentam a sacarose e a lactose, mas produzem gás a partir da glicose. São encontradas no intestino de vários animais, assim como no solo, águas e esgotos (D'AOUST; MAURER, 2007). As mesmas causam várias doenças relacionadas à ingestão de alimentos crus, mal cozidos (em especial aves e ovos), água contaminada e a falta de higiene na manipulação de alimentos. Podem desencadear quadros de infecção conhecidos como salmoneloses e como febres entéricas (febre tifoide e paratifoide) estas últimas com quadros de infecções invasivas, mais complicados. Os sintomas mais comuns da salmonelose é a diarreia, porém em alguns casos pode ocorrer febre, cólicas abdominais e vômitos, podendo também evoluir para bacteremia ou infecção localizada, que afeta pulmões, sistema nervoso central, rins, ossos e articulações. Os idosos, crianças menores de 5 anos, pacientes imunossuprimidos e desnutridos são mais vulneráveis às infecções (FÀBREGA; VILA, 2013). Devido à alta taxa de morbidade em todos os países do mundo, onde representam uma das causas mais comuns de DTAs, a presença deste micro-organismo não é permitida em alimentos (TASSINARI, 2019).

O grupo dos coliformes termotolerantes (coliformes a 45 °C, ou coliformes fecais) representa um subgrupo dos coliformes totais. É um grupo restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5 – 45,5°C, com produção de gás. A espécie *E. coli* está incluída no grupo de coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o intestino de animais endotérmicos e sua presença em alimentos indica contaminação fecal. Algumas linhagens de *E. coli* são patogênicas podendo causar em humanos infecções intestinais e urinárias, septicemias, meningites entre outros tipos de infecções (SILVA et al, 2010). A espécie compõe o grupo dos 10 micro-organismos mais envolvidos nas DTA's no Brasil, ocorridas no período do ano 2000 a 2017 (BRASIL, 2018a).

O grupo dos estafilococos coagulase positiva (ECP) abrange bactérias em forma de cocos, anaeróbios facultativos, Gram-positivas e que coagulam o plasma de sangue de coelho a 35 °C. O grupo é composto por três diferentes espécies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*. *S. aureus* é uma espécie de grande importância na microbiologia de alimentos por estar associado a intoxicações alimentares representando, em média 98% dos surtos desencadeados por este gênero. O reservatório natural do *S. aureus* é o ser humano, sendo encontrado na pele, mucosas e no trato nasofaríngeo de portadores assintomáticos, podendo causar desde uma simples infecção até infecções graves como pneumonia, sepse, endocardite e síndrome do choque tóxico (EURL, 2014). A enumeração de ECP é reconhecida internacionalmente como um padrão microbiológico da qualidade dos alimentos, servindo como indicativo de ausência do controle higiênico-sanitários na produção e conservação dos alimentos (RESTA et al, 2013). A legislação brasileira, RDC N°12 recomenda nas análises de ECP a avaliação da capacidade de produção de termonuclease e quando necessário a de toxina estafilocócica como forma de se obter dados de interesse à saúde pública (BRASIL, 2001).

*Vibrio parahaemolyticus* pertence à família Vibronaceae. Possui características de bacilo reto ou curvo, Gram-negativo, com flagelo polar ou flagelos laterais, anaeróbio facultativo, halofílico, com crescimento na faixa de temperatura entre 5 a 43 °C. Cepas virulentas podem causar diferentes doenças como feridas, septicemia e gastroenterites (BROBERG; CALDER; ORTH, 2011). A contaminação em alimentos está relacionada ao consumo de peixes, moluscos ou crustáceos contaminados, que desencadeiam no ser humano quadros de gastroenterite branda,

com duração de dois a três dias, apresentando sintomas de diarreia, cãibras abdominais, náusea, vômito, dor de cabeça, febre e calafrios. Muitos relatos descrevem o isolamento desta espécie a partir de amostras de água do mar, peixes e frutos do mar (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No Japão, 20 a 30% dos casos de toxinfecção alimentar são relacionadas a contaminação por *V. parahaemolyticus*. As elevadas taxas de infecção são atribuídas ao alto consumo de peixes e frutos do mar e a prática do consumo de alimentação de origem marinha na forma crua (SU; LIU, 2007).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, não formadora de esporos e móvel por meio de flagelos. Encontra-se distribuída na natureza, sendo isolada de solos, vegetais, águas e alimentos. Das dezoito espécies do gênero, a *L. monocytogenes* é a mais importante (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). *L. monocytogenes* tem os alimentos como sua principal fonte de contaminação. Apresenta capacidade de crescer em temperaturas baixas como 3 °C, podendo assim ocorrer a multiplicação em alimentos refrigerados. Estudos indicam o salmão como fonte de infecção por *L. monocytogenes* (CRUZ et al, 2008; ROTARIU et al, 2014; SCHJØRRING et al, 2017). A população de risco inclui indivíduos imunocomprometidos, gestantes, idosos e recém-nascidos. A infecção pode desencadear quadros de encefalite, septicemia, meningite e no caso das gestantes: aborto, nascimento do feto morto ou prematuro (NOORDHOUT, 2014). No Brasil, surtos de listeriose não constam nos dados do MS das DTAs ocorridas entre 2000 a 2017, presumivelmente pela subnotificação de casos (SILVA, 2017; BRASIL, 2018a). Devido à relevância da *L. monocytogenes* é de grande importância a tipificação dos isolados obtidos para investigação epidemiológica. A espécie apresenta 13 sorotipos, todos potencialmente patogênicos, divididos em 3 linhagens I, II e III e em cinco grupos filogenéticos relacionados: I.1 (1/2a-3a); I.2 (1/2c-3c); II.1 (4b-4d-4e); II.2 (1/2b-3b-7) e III (4a-4c) (DOUMITH et al, 2004).

## 1.6 Justificativa

O sushi e o sashimi são preparações que têm como base o peixe cru, um alimento considerado altamente perecível, necessitando de cuidados higiênico-sanitários nas suas preparações. O grande crescimento da comercialização e da oferta desses alimentos em locais nem sempre apropriados, cujos manipuladores possuem pouco conhecimento sobre os procedimentos exigidos pelos órgãos responsáveis, gera preocupação com a qualidade final desses produtos.

O presente trabalho objetivou verificar a qualidade microbiológica de amostras de sushi e sashimi obtidas de diferentes estabelecimentos de comercialização do município do Rio de Janeiro visando verificar a qualidade microbiológica desses alimentos frente aos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente, com exceção da contagem de *V. parahaemolyticus* e com a inclusão da pesquisa de *L. monocytogenes*. A avaliação microbiológica de sushis e de sashimis comercializados em diferentes estabelecimentos especializados ou não, localizados em pontos distintos da cidade do Rio de Janeiro poderão contribuir como informações do controle microbiológico de alimentos prontos para consumo à base de pescado e conseqüentemente sensibilizar a Vigilância Sanitária para a necessidade do aumento da fiscalização nos estabelecimentos com recursos higiênico-sanitários precários. Os dados obtidos, aliados a resultados de outros autores poderão auxiliar as autoridades competentes na elaboração de programas educativos para os diversos segmentos da sociedade como comerciantes, consumidores e fiscais sanitários, com a finalidade de diminuir o número de DTAs.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica de amostras de sushi e sashimi de salmão, provenientes de distintos estabelecimentos comerciais do município do Rio de Janeiro.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Pesquisar *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas;
- ✓ Quantificar coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva nas amostras avaliadas;
- ✓ Verificar a presença de *Escherichia coli* entre os isolados de coliformes termotolerantes obtidos;
- ✓ Avaliar a presença de *Staphylococcus aureus* entre os estafilococos coagulase positiva isolados;
- ✓ Comparar os resultados obtidos aos parâmetros estabelecidos na legislação vigente.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Local de realização do estudo**

As atividades de controle microbiológico das amostras de sushi e sashimi foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DM) do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os procedimentos de identificação presuntiva dos isolados suspeitos de *S. aureus* foram feitos no Setor de Identificação Bacteriana do DM do INCQS. A tipificação dos isolados de *L. monocytogenes* foi desenvolvida no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LABZOO) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz.

### **3.2 Amostras**

Foram analisadas 30 amostras, 15 de sushis e 15 de sashimis, adquiridos em quinze estabelecimentos comerciais, de bairros distintos do município do Rio de Janeiro, entre os meses de setembro e dezembro do ano de 2018. As informações dos tipos de amostras e os locais de aquisição encontram-se descritas no quadro 1.

As amostras foram coletadas em sacos plásticos estéreis e transportadas dos locais de comercialização até o laboratório de análise em bolsas isotérmicas contendo gelo reciclável. Ao serem recebidas no INCQS, foram cadastradas como amostras especiais e mantidas em temperatura de refrigeração por um período máximo de quatro horas, até a realização das análises.



Quadro 1- Amostras, estabelecimentos e bairros de onde foram adquiridas.

<b>Amostra</b>	<b>Tipo</b>	<b>Local de Coleta</b>
A1	Sushi	<i>Food truck 1- Feira da Glória</i>
A2	Sashimi	<i>Food truck 1- Feira da Glória</i>
A3	Sashimi	<i>Food truck 2 - Penha</i>
A4	Sushi	<i>Food truck 2 - Penha</i>
A5	Sashimi	<i>Food truck 3- Andaraí</i>
A6	Sushi	<i>Food truck 3 - Andaraí</i>
A7	Sashimi	Restaurante 1 - Taquara
A8	Sushi	Restaurante 1 - Taquara
A9	Sashimi	Restaurante 2 - Taquara
A10	Sushi	Restaurante 2 - Taquara
A11	Sashimi	Restaurante 3 - Taquara
A12	Sushi	Restaurante 3 - Taquara
A13	Sushi	<i>Delivery 1 - Gardênia Azul</i>
A14	Sashimi	<i>Delivery 1- Gardênia Azul</i>
A15	Sashimi	<i>Food truck 4 - Anil</i>
A16	Sushi	<i>Food truck 4 - Anil</i>
A17	Sushi	Restaurante 4 - Ilha do Governador
A18	Sushi	Restaurante 4 - Ilha do Governador
A19	Sashimi	Restaurante 5 - Freguesia
A20	Sushi	Restaurante 5 - Freguesia
A21	Sushi	Restaurante 6 - Gávea
A22	Sashimi	Restaurante 6 - Gávea
A23	Sashimi	<i>Food truck 5 - Lagoa</i>
A24	Sushi	<i>Food truck 5 - Lagoa</i>
A25	Sashimi	Barracas de feiras de alimentação 1 - Recreio
A26	Sashimi	Barracas de feiras de alimentação 1 - Recreio
A27	Sashimi	Barracas de feiras de alimentação 2 - Recreio
A28	Sushi	Barracas de feiras de alimentação 2 - Recreio
A29	Sashimi	Restaurante 7 - Barra daTijuca
A30	Sushi	Restaurante 7 - Barra daTijuca

Fonte: (Da autora, 2019).

### 3.3 Metodologias de análise

Nas análises microbiológicas de “Pesquisa de *Salmonella* spp.”; “Enumeração de Bactérias Coliformes Termotolerantes” e de “Pesquisa de *L. monocytogenes*” foram utilizadas as metodologias descritas no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM/FDA, 1998) nos capítulos: 4- *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*; 5- *Salmonella* e 10- *Listeria monocytogenes*. Para a contagem de estafilococos coagulase positiva foi empregada a metodologia da Norma ISO 6888-

3:2003 – *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)* (ISO, 2003).

Para o controle positivo e negativo dos ensaios foram utilizadas cepas de referência cedidas pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência – Setor de bactérias e Arqueas, anteriormente criopreservadas no Setor de Alimentos do DM.

### 3.3.1 Pesquisa de *Salmonella* spp

No ensaio de pesquisa de *Salmonella* spp. 25 g da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de caldo lactosado. O homogenato foi deixado à temperatura ambiente durante 60 minutos e posteriormente foi ajustado o pH do homogenato para 6,8 utilizando hidróxido de sódio 1N e ácido clorídrico 1N estéreis. Após a incubação a 35 °C por 24 horas, na etapa de enriquecimento seletivo, 1 mL da cultura foi transferida para um tubo contendo caldo tetracionato e 0,1 mL para caldo Rappaport-Vassiliadis. O meio tetracionato foi incubado a 35 °C e o meio Rappaport a 42 °C. Após 24 horas uma alçada do crescimento de cada um dos meios de enriquecimento seletivo foi semeada, pela técnica de esgotamento, em placas de Petri contendo os meios seletivos diferenciais: ágar entérico de Hektoen (HK) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Colônias com características de coloração vermelhas, com ou sem centro negro, ou colônias negras e brilhosas crescidas no meio XLD, assim como colônias verdes com ou sem centro negro brilhoso no meio HK foram consideradas como suspeitas de salmonela. As colônias foram submetidas à triagem bioquímica, a partir da utilização dos meios: ágar tríplice açúcar ferro (TSI); ágar lisina ferro (LIA) e ágar ureia, com incubação a 35 °C por 24 horas. Os crescimentos que apresentaram no meio TSI superfície de coloração vermelha (alcalina) e base amarela (ácida), com ou sem produção de sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) evidenciado pelo escurecimento do meio; ágar LIA com coloração inalterada, com ou sem produção de H<sub>2</sub>S e ausência de modificação na coloração do ágar ureia (urease negativa) foram considerados com perfil característico de *Salmonella* e submetidos à sorologia a partir da utilização de soro polivalente para *Salmonella* spp. cedido pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LABENT) do IOC/FIOCRUZ. Os resultados foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* spp em 25 g

do alimento.

### 3.3.2 Enumeração de Coliformes Termotolerantes e Identificação de *E. coli*

O ensaio de enumeração de bactérias coliformes termotolerantes foi realizado pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Primeiramente 25 g da amostra foram homogeneizadas com 225 mL do diluente Tampão Fosfato de Butterfield. O homogenato obtido foi considerado como diluição  $10^{-1}$ . Da primeira diluição foram preparadas duas outras diluições seriadas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), a partir da transferência de 10 mL de cada diluição anterior para frasco contendo 90 mL de Tampão Fosfato de Butterfield. De cada uma das três diluições preparadas foram distribuídas alíquotas de 1 mL para três tubos contendo caldo lauril sulfato triptose contendo tubos de Duham invertidos, formando-se assim três séries de três tubos. Os tubos foram incubados a 35 °C por 48 horas. Os tubos que apresentaram presença de gás no interior dos tubos de Duham foram considerados positivos. De cada cultura positiva foi transferido o volume de 10 µL referente a uma alça bacteriológica para um tubo contendo caldo *Escherichia coli* (EC) com tubo de Duham para a confirmação dos coliformes termotolerantes. Os tubos foram incubados a 44,5 °C. Após 48 horas os tubos com produção de gás foram considerados como positivos. O resultado do ensaio foi obtido através da leitura da tabela do NMP, para 3 séries de 3 tubos contendo 0,1; 0,01 e 0,001 g de inoculo, com intervalo de confiança de 95%.

Após a etapa de contagem o ensaio foi complementado com testes de identificação de *E. coli*. As culturas de caldo EC consideradas positivas para coliformes termotolerantes foram semeadas por esgotamento em placas contendo ágar eosina azul de metileno e incubadas a 35 °C por 24 horas. Colônias escuras, característica da fermentação da lactose, apresentando brilho metálico verde foram selecionadas e submetidas à verificação das características morfotintórias pela técnica de coloração de Gram. Os isolados classificados como bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos foram encaminhados para identificação bioquímica utilizando as provas do IMViC: produção do indol; vermelho de metila; Voges-Proskauer e utilização do citrato. Os isolados que apresentaram perfil de resultado ++- nas respectivas provas descritas acima foram classificadas como *E. coli* biótipo 1 e com perfil -+- como *E. coli* biótipo 2.

### 3.3.3 Enumeração de Estafilococos Coagulase Positiva

Vinte e cinco gramas da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de Tampão Fosfato de Butterfield. Foi preparada uma diluição decimal  $10^{-2}$ . Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas para duas placas contendo ágar Baird Parker. Com auxílio de alça de Drigalsky os inoculos foram distribuídos pela a superfície do meio. As placas foram incubadas a 35 °C, após 48 h de incubação foram selecionados os pares de placas da mesma diluição, contendo de 20 a 200 colônias. Foram contadas e selecionadas para identificação bioquímica, colônias circulares, lisas, de coloração cinza escuro a negro, rodeadas por um halo claro transparente, provenientes da ação da enzima lecitinase. As colônias suspeitas foram submetidas à verificação das características morfotintórias pelo método de Gram e as provas bioquímicas da catalase e da coagulase.

Os isolados que apresentaram características morfotintórias de cocos agrupados em forma de cachos Gram-positivos, catalase positivo e com formação de coágulo de intensidade 1+, 2+, 3+ e 4+ em até seis horas de incubação a 35 °C foram classificados como estafilococos coagulase positiva. O cálculo da expressão dos resultados foi realizado utilizando-se a fórmula da equação abaixo e expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (INCQS, 2019).

$$C \text{ (UFC / mL ou g)} = \frac{\sum_i (Z_i * \frac{k_i}{n_i})}{V} * F \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$Z_i$  = contagem das colônias separadas por característica (da diluição selecionada)

$V$  = volume total utilizado nas placas (da diluição selecionada) em mL

$k_i$  = total de colônias confirmadas, separadas por característica, por provas bioquímicas (da diluição selecionada)

$n_i$  = total de colônias testadas, separadas por característica (da diluição selecionada)

$F$  = fator da diluição selecionada

Os isolados classificados como estafilococos coagulase positiva foram submetidos à identificação em equipamento VITEK 2.0 Compact (bioMérieux, France), utilizando o

cartão “Gram Positivos (GP)”.

### 3.3.4 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para a pesquisa de *L. monocytogenes*, 25 g da amostra foram homogeneizados com 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* tamponado (BLEB). Após 4 horas de incubação a 30 °C foram adicionados ao homogenato os seguintes agentes seletivos: um volume de 1,8 mL de uma solução de ácido nalidíxico a 0,5%; 0,455 mL de uma solução de acriflavina a 0,5% e o volume de 1,15 mL de uma solução de cicloheximida a 1%. Após um total de 48 horas de incubação a 30 °C uma alçada da cultura foi semeada por esgotamento em uma placa contendo ágar cromogênio para *Listeria*. A placa foi incubada a 35 °C por 48 horas. A partir do crescimento na placa foram selecionadas de 3 a 5 colônias de coloração verde com halo branco ao redor. As colônias foram submetidas aos ensaios presuntivos de identificação de *L. monocytogenes*: o teste das características morfotintoriais e o teste da catalase. As colônias que se apresentaram como bacilos curtos, Gram-positivos e catalase positivas foram encaminhadas para os testes confirmatórios: utilização dos carboidratos (glicose, esculina, maltose, ramnose, xilose e manitol), a prova da motilidade a 25 °C e a prova da atividade hemolítica. Os isolados com resultado positivo na utilização da glicose, esculina, maltose e ramnose; mobilidade a 25 °C em forma de guarda-chuva e atividade hemolítica com formação de  $\beta$  hemólise fraca foram considerados como *L. monocytogenes*. Os resultados foram expressos como presença ou ausência de *L. monocytogenes* em 25 g do alimento.

Os crescimentos identificados como *L. monocytogenes* foram encaminhados ao LABZOO do IOC-FIOCRUZ para a realização de sorotipagem.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado das análises das 30 amostras de sushi e sashimi de salmão coletadas em 15 diferentes estabelecimentos de comercialização, são apresentados na tabela 1.

Os resultados referentes à pesquisa de *Salmonella* spp. evidenciaram ausência da bactéria nas 30 amostras de comida japonesa analisadas. Com relação à contagem de estafilococos coagulase positiva, todas as amostras apresentaram resultados abaixo dos níveis aceitáveis pela legislação vigente ( $5 \times 10^3$  UFC/g). Na enumeração de coliformes a 45 °C, somente uma amostra de sashimi comercializada em um *food truck* apresentou resultado acima do limite da legislação ( $10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>), sendo considerada imprópria para o consumo humano. A presença de *L. monocytogenes* foi detectada em apenas uma amostra de sushi adquirida em um *food truck*.

Tabela 1- Resultados obtidos das 30 amostras na pesquisa de *salmonella* spp; pesquisa de *L. monocytogenes*, quantificação de coliformes a 45°C e contagem de estafilococos coagulase positiva.

Amostra	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em 25g	Enumeração de Coliformes a 45 °C (NMP/g)	Contagem de ECP (UFC/g)	Pesquisa de <i>L.monocytogenes</i> em 25 g
A1 - Sushi - <i>Food truck</i>	Ausência	15 (LIC 3,7 ; LSC 42)	< 100	Ausência
A2 - Sashimi - <i>Food truck</i>	Ausência	15 (LIC 3,7 ; LSC 42)	< 100	Ausência
A3 - Sashimi - <i>Food truck</i>	Ausência	21 (LIC 4,5 ; LSC 42)	< 100	Ausência
A4 - Sushi - <i>Food truck</i>	Ausência	21 (LIC 4,5 ; LSC 42)	10 <sup>2</sup>	<b>Presença</b>
A5 - Sashimi - <i>Food truck</i>	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	5 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
A6 - Sushi - <i>Food truck</i>	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	< 100	Ausência
A7 - Sashimi - Restaurante	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	< 100	Ausência
A8 - Sushi - Restaurante	Ausência	<3 (LIC --- ; LSC 1,9)	< 100	Ausência
A9 - Sashimi -Restaurante	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	< 100	Ausência
A10 - Sushi - Restaurante	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	< 100	Ausência
A11- Sashimi - Restaurante	Ausência	23 (LIC 4,6 ; LSC 94)	< 100	Ausência
A12 - Sushi - Restaurante	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	< 100	Ausência
A13 - Sushi - <i>Delivery</i>	Ausência	93 (LIC 18 ; LSC 420)	5 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
A14 - Sashimi - <i>Delivery</i>	Ausência	93 (LIC 18 ; LSC 420)	< 100	Ausência
A15 - Sashimi - <i>Food Truck</i>	Ausência	<b>1100 (LIC 180 ; LSC 4.100)</b>	< 100	Ausência

Tabela 2- Resultados obtidos das 30 amostras na pesquisa de *salmonella* spp; pesquisa de *L. monocytogenes*, quantificação de coliformes a 45°C e contagem de estafilococos coagulase positiva.

<b>Amostra</b>	<b>Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em 25g</b>	<b>Enumeração de Coliformes a 45 °C (NMP/g)</b>	<b>Contagem de ECP (UFC/g)</b>	<b>Pesquisa de <i>L.monocytogenes</i> em 25 g</b>
A16 - Sushi - <i>Food Truck</i>	Ausência	93 (LIC 18 ; LSC 420)	< 100	Ausência
A17 - Sushi - Restaurante	Ausência	93 (LIC 18 ; LSC 420)	10 <sup>2</sup>	Ausência
A18 - Sushi - Restaurante	Ausência	15 (LIC 3,7 ; LSC 42)	< 100	Ausência
A19 - Sashimi - Restaurante	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	10 <sup>2</sup>	Ausência
A20 - Sushi - Restaurante	Ausência	<3 (LIC --- ; LSC 1,9)	1,5 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
A21 - Sushi - Restaurante	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	< 100	Ausência
A22 - Sashimi - Restaurante	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	4 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
A23 - Sashimi - <i>Food Truck</i>	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	< 100	Ausência
A24 - Sashimi - <i>Food Truck</i>	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	< 100	Ausência
A25 - Sashimi - <i>Food Truck</i>	Ausência	9,2 (LIC 1,4 ; LSC 38)	< 100	Ausência
A26 - Sashimi - <i>Food Truck</i>	Ausência	<3 (LIC --- ; LSC 1,9)	< 100	Ausência
A27 - Sashimi - <i>Food Truck</i>	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	< 100	Ausência
A28 - Sushi - <i>Food Truck</i>	Ausência	<3 (LIC --- ; LSC 1,9)	< 100	Ausência
A29 - Sashimi - Restaurante	Ausência	3,6 (LIC 0,17 ; LSC 18)	< 100	Ausência
A30 - Sushi - Restaurante	Ausência	75 (LIC 17 ; LSC 200)	< 100	Ausência

ECP- estafilococos coagulase positiva; NMP- número mais provável; UFC- unidade formadora de colônia; LIC- limite mínimo de confiabilidade; LSC- limite superior de confiabilidade.

Fonte: (Da autora, 2019).



Em seis amostras analisadas foi constatada a presença de *E. coli*, a partir dos resultados do teste bioquímico de identificação IMViC. Destas seis amostras cinco foram provenientes de *food truck* e uma de restaurante. Apenas um isolado apresentou perfil de *E. coli* biotipo 1 e as demais do biotipo 2.

Apesar de todas as amostras estarem dentro do padrão estabelecido para a contagem de estafilococos coagulase positiva, seis (20%) amostras apresentaram contaminação por *S. aureus*. Duas amostras comercializadas em *food truck*, uma em *delivery* e três de restaurantes (Tabela 2).

Tabela 3- Identificação automatizada dos isolados classificados como estafilococos coagulase positiva.

Amostra	Intensidade da Coagulase	Identificação no VITEK	Probabilidade da Confiabilidade da Identificação
A4 – Sushi ( <i>Food truck</i> )	1+	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%
A5 – Sashimi ( <i>Food truck</i> )	2+	<i>Staphylococcus aureus</i>	95%
A13 – Sushi ( <i>Delivery</i> )	3+	<i>Staphylococcus aureus</i>	96%
A17 – Sushi (Restaurante)	1+	<i>Staphylococcus aureus</i>	96%
	1+	<i>Staphylococcus aureus</i>	96%
A19 – Sashimi (Restaurante)	3+	<i>Staphylococcus aureus</i>	91%
	3+	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%
A20 – Sushi (Restaurante)	3+	<i>Staphylococcus aureus</i>	96%
	3+	<i>Staphylococcus aureus</i>	93%
	3+	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%
A22 - Sashimi (Restaurante)	1+	<i>Kocuria kristinae</i>	90%
	1+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99%

Fonte: (Da autora, 2019).

Com relação à prova da coagulase, a metodologia empregada recomenda considerar como resultado positivo as reações onde o volume do coágulo ocupa mais da metade do volume do líquido. No presente estudo foram considerados os resultados de todas as intensidades de coagulase. Assim, foi verificado que duas amostras de intensidade 1+ foram classificadas como *S. aureus* e uma (amostra A22) como micro- organismos não pertencentes ao grupo dos estafilococos coagulase positivas. Caso os resultados com intensidade 1+ não tivessem sido

considerados, isolados de *S. aureus* não teriam sido identificados.

Uma amostra apresentou contaminação por *L. monocytogenes*. Os dois isolados encaminhados para a sorotipificação no IOC/FIOCRUZ foram classificados como *L. monocytogenes* sorogrupo (1/2c, 3c), pela técnica da Reação da Cadeia de Polimerase Multiplex, segundo Doumith et al (2004).

Os resultados de ausência de *Salmonella* spp. obtidos para as 30 amostras analisadas foram também descritos por Lima et al (2009), que ao analisarem 40 amostras de sushi e sashimi, sendo 20 amostras em restaurantes não especializados e 20 amostras em restaurantes especializados, obtiveram resultados satisfatórios para todas as amostras. Sato (2017), também descreveu resultados de ausência de *Salmonella* spp. em 25 g ao analisar 60 amostras de sushis, coletadas em 30 restaurantes especializados em comidas japonesas e em 30 restaurantes não especializados em Jaboticabal/SP e Ribeirão Preto/SP. Diferentemente, os resultados do estudo realizado por Malavota et al. (2009), para pesquisa de *Salmonella* spp. em 25g do produto, no qual foram coletadas 64 amostras de sashimis de dois restaurantes do município do Rio de Janeiro. Das amostras analisadas, oito amostras provenientes de um mesmo restaurante apresentaram contaminação por *Salmonella* spp.

Na quantificação de coliformes termotolerantes, apenas 1 amostra (3,3%) das 30 analisadas apresentou resultado de  $1,1 \times 10^3$  NMP/g ficando acima do limite tolerável pela legislação vigente ( $10^2$  NMP.g-1), sendo assim considerada insatisfatória para o consumo. Um estudo de Braghini et al. (2015), de análises realizadas em 15 amostras de sashimis de salmão adquiridos em cinco restaurantes da cidade de Maringá/PR, apresentou níveis de contaminação abaixo do limite estabelecido pela legislação. Sato (2017), em 60 amostras analisadas de sushi de salmão, 11 amostras indicaram valores acima do limite estipulado pela legislação, 25 amostras ficaram no limite permitido. Treze (43,3%) amostras indicaram a presença de *E. coli*.

Na quantificação do ECP do presente trabalho, todas as amostras foram consideradas satisfatórias, diante dos níveis aceitáveis de contaminação pela legislação vigente ( $5 \times 10^3$  UFC/g). Em um estudo por Lima et al (2009) que ao quantificarem ECP em 40 amostras de comida japonesa verificaram que todas estavam de acordo com os limites indicados na legislação. Em outro estudo elaborado por Souza et al (2015), onde foram coletadas 15 amostras de sushis em cinco diferentes

restaurantes especializados em comida japonesa localizados na cidade de João Pessoa/PB, três amostras apresentaram contaminação por ECP superior ao limite permitido pela legislação. Análises realizadas por Vallandro (2010) em 108 amostras de sashimis adquiridas em restaurantes especializados em culinária japonesa em Porto Alegre indicaram condições satisfatórias em todas as amostras quando avaliadas por contaminação por ECP.

Na pesquisa de *L. monocytogenes* realizada neste estudo uma amostra apresentou contaminação por esse micro-organismo. A legislação vigente RDC 12 de 02 de janeiro de 2001, somente exige a pesquisa de *L. monocytogenes* em queijos de média a alta umidade. Entretanto, na Consulta Pública Nº 542 de 17 de julho de 2018, já está previsto a quantificação de *L. monocytogenes* para alimentos prontos para consumo, onde sushi e sashimi se encaixam como exceção “alimentos com vida útil menor que 5 dias”, não sendo indicado a quantificação desta espécie. No entanto, cabe destacar que essas iguarias, por sua composição, pela forma de preparo dada por manipulação e pelo armazenamento por refrigeração, ambiente propício para a multiplicação desta espécie podem ser potenciais fontes de *L. monocytogenes*.

Poucos são os trabalhos científicos brasileiros disponíveis na literatura reportando o ensaio de pesquisa de *L. monocytogenes* em iguarias japonesas, por não se tratar de um critério microbiológico descrito na legislação em vigor. Diferentemente dos dados obtidos neste estudo para a pesquisa de *L. monocytogenes*, Montanari, et al (2015), reportaram resultados de análises de 15 amostras de sashimis preparados com salmão comercializados em três estabelecimentos especializados em comida japonesa do município de Ji-Paraná/RO, onde constataram a presença de *L. monocytogenes* em uma amostra de um dos estabelecimentos e em três amostras de um outro.

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ Não foi detectada a presença de *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas;
- ✓ Em uma amostra foi evidenciada a presença de *L. monocytogenes*;
- ✓ Uma amostra apresentou resultado acima do limite descrito na legislação vigente para coliformes termotolerantes;
- ✓ Em seis amostras com contaminação por coliformes termotolerantes foi identificada a presença de *E. coli*;
- ✓ Das amostras com contaminação por estafilococos coagulase positiva, todas continham concentrações de células abaixo dos limites estabelecidos na legislação. Seis dessas amostras apresentaram presença de *S. aureus*;
- ✓ Os resultados obtidos neste estudo apontam que 96,7% das amostras analisadas apresentaram qualidade microbiológica satisfatória, podendo-se assim sugerir uma boa aceitação e implantação das orientações técnicas de boas práticas pelos estabelecimentos que comercializam esses produtos.

## REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, B.M. **Qualidade higiênico-sanitário de sushi e sashimi servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza**: modismo alimentar e risco à saúde. Fortaleza, 2009. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br>. Acesso em 20 jan. 2019.

BARBOSA, L.J. *et al.* Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n.5, p.372-378, maio 2016.

BRAGHINI, F. *et al.* Análise microbiológica de sashimis a base de salmão, comercializados na cidade de Maringá – PR quanto a presença de coliformes totais e termotolerantes. *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 9., 2015, Paraná. **Anais Eletrônico...** Paraná: UniCesumar, 2015. p.4-8. Disponível em: [http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2015/anais/fernanda\\_braghini\\_1.pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2015/anais/fernanda_braghini_1.pdf). Acesso em: 10 mar. 2019.

BRASIL. Constituição (1990). **Lei nº8.080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm). Acesso em: 7 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, n.7, Seção 1, p.45-53 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002**. Aprova o regulamento de Procedimentos Operacionais Padronizados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de alimentos. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_275\\_2002\\_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254). Acesso em: 20 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº216 de 15 de setembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, anexo I, p. 2-14. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583%20RDC%20BN%20216%20BDE%20B15%20BDE%20BSETEMBRO%20BDE%20B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>.

BRASIL. Ministério da saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília, DF, 1ª edição. 160p. 2010. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 17 jan.2019.

BRASIL. Ministério da saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2018a. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em 17 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública Nº 542, de 17 de julho de 2018b**. Submete à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo, conforme deliberado em reunião realizada em 3 de julho de 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4660474/CONSULTA+P%C3%A9BLICA+N%C2%BA+542+GGALI.pdf/f5a0de8f-8a83-44ee-a95d-290fa426c851>. Acesso em: 20 de jan. 2019.

BROBERG, C.A.; CALDER, T.J.; ORTH, K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. **Microbes Infect.**, v. 13, n. 12-13, p. 992–1001, nov. 2011.

CRUZ, C.D. *et al.* Epidemiologia de *Listeria monocytogenes* em uma linha de processamento de salmão gravlax. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, n.2, p.375-383, 2008.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species in: food microbiology. *In*: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**, 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007, 1038p

DEMETRIO, A.A. *et al.* Culinária japonesa: alimentação saudável. **Gastronomia e Segurança Alimentar da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, p.2, 2009.

DOUMITH, M. *et al.* Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.8, p.3819–3822, 2004.

EURL. European Union Reference Laboratory Coagulase Positive Staphylococci. **About Coagulase Positive Staphylococci**. 2014. Disponível em: <https://sites.anses.fr/en/minisite/staphylococci/about-coagulase-positive-staphylococci>. Acesso em: 20 fev. 2019.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.2, p.308-341, 2013.

FDA. **Bacteriological analytical manual (BAM)**. [Silver Spring]: FDA, 1998. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. Acesso em: 10 mar. 2019.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 182 p.

FREITAS, I.M.S. *et al.* **Boas práticas de manipulação na culinária japonesa: relatório**. Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.851–875, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.002**: pesquisa e contagem de estafilococos coagulase positiva a partir de alimentos e identificação de *S. aureus*. Rev.02. Rio de Janeiro, 2019. 32p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6888-3**: microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Geneva: ISO, 2003.

LIMA, R.M.T. *et al.* **Avaliação microbiológica de sushis e sashimis comercializados na cidade de Recife – PE**. Artigo. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

MALAVOTA, L.C.M. *et al.* Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* a *Salmonella* spp. em “sashimis” comercializados em restaurantes no município do Rio de Janeiro. **Revista brasileira de ciência veterinária**, v.16, n.2, maio/ago. 2009.

MONTANARI, A.S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurantes japoneses no município de Ji-Paraná – RO. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.2, n.1, p.13, 2015.

MOTTA, A.C.S.; SILVESTRE, D.M.; BROTHERHOOD, R.M. Gastronomia e culinária japonesa: Das tradições às proposições atuais (indusivas). Centro Universitário de Maringá. **Revista Cesumar - Ciências humanas e sociais**, v.11, n.1, p41-57, 2007.

NOORDHOUT, C.M. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v.14, p.1073–82, 2014.

PATRÍCIO, I.D.R. **A segurança alimentar no consumo de pescado cru com valência para produção de sushi**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova Lisboa, Portugal, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10362/2508>. Acesso em 6 abr. 2019.

PROENÇA, R.P.C. Alimentação e globalização. Algumas reflexões. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). **Revista Ciência e Cultura**, v.62, n.4, São Paulo, out. 2010.

RESTA, M.S.A.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido pela legislação brasileira para massas alimentícias. **Brazilian journal of food technology**, Campinas, v.16, n.4, p.319-325, dez. 2013

RIO DE JANEIRO. **Decreto nº 40.251 de 16 de junho de 2015**. Dispõe sobre os critérios para comercialização de alimentos em veículos automotores (comidas sobre

rodas) em áreas públicas e dá outras providências. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/a/rj/r/rio-de-janeiro/decreto/2015/3970/39709/decreto-n-39709-2015-dispoe-sobre-os-criterios-para-comercializacao-de-alimentos-em-veiculos-automotores-comida-sobre-rodas-em-areas-publicas-e-da-outras-providencias>. Acesso em: 22 jan. 2019.

ROTARIU O. *et al.* Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v.35, p.284–292, 2014.

SATO, R.A. **Qualidade microbiológica e pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência do *Staphylococcus aureus***. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jacotícabal, Sp. p. 80, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/152873>. Acesso em: 6 abr. 2019.

SCHJØRRING, S. *et al.* Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. **Euro Surveill**. v. 22, n. 50, 2017.

SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise Microbiológicas de Alimentos e água. 4ª ed. São Paulo; livraria Varela, 2010. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22JUNQUEIRA,%20V.%20C.%20A.%22>. Acesso em: 28 jan. 2019.

SILVA, V. B. **Análise microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no macro - região de Sorocaba**. Monografia (Trabalho de conclusão do programa de saúde pública em vigilância sanitária). Secretaria de estado da saúde coordenadoria de controle de doenças - Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, SP, Brasil 2017.

SOUZA, A.M. **Doenças transmitidas por alimentos**: fatores associados às contaminações e principais bactérias causadoras de surtos alimentares. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade União Metropolitana de Educação e Cultura, Bahia, 2017.

SOUZA, T.J.F.F. *et al.* Micro-organismos de interesse sanitário em sushi. Universidade Federal da Paraíba – PB. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, n. 74, p.274, ago. 2015.

SU, Y.C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiology**. v. 24, n. 6, p. 549-558, 2007.

TACK, D.M. *et al.* Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 16, p. 369-373, apr. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/pdfs/mm6816a2-H.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2019.

TASSINARI, A.M. Septic arthritis caused by *Salmonella enterica* serotype Rubislaw: A case report. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 52, 2019.



VALLANDRO, M.J. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre- RS.** Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Bacteriologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. p. 69, 2010.

YUN, A.E.H.K. **Pesquisa de indicadores higiênico-sanitários bacterianos em comidas típicas japonesas.** Monografia. (Trabalho de conclusão de curso). Centro Universitário Tabosa de Almeida, Pernambuco, 2017. Disponível em: <http://repositorio.asc.es.edu.br/bitstream/123456789/1043/1/ARTIGO%20FINAL%20USHI.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2019.