

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

LÍCIA CRISTINA MIRANDA MALAVOTA

**AVALIAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS NO PROCESSAMENTO
DE “SASHIMIS” EM RESTAURANTES: ANÁLISES
BACTERIOLÓGICAS E PESQUISA DE SENSIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS**

NITERÓI, RJ

2008

**UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE**

LÍCIA CRISTINA MIRANDA MALAVOTA

**AVALIAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS NO PROCESSAMENTO DE “SASHIMIS”
EM RESTAURANTES: ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E PESQUISA DE
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON MAIA FRANCO**

**Niterói
2008**

LÍCIA CRISTINA MIRANDA MALAVOTA

AVALIAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS NO PROCESSAMENTO DE “SASHIMIS”
EM RESTAURANTES: ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E PESQUISA DE
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Avaliação em 28 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira
UFF

Professor Dr. Robson Maia Franco
UFF

Professor Dr. Sérgio Carmona de São Clemente
UFF

Professor Dr. José Carlos Albuquerque do Prado Carvalho
CUPL

Niterói
2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar condições físicas, mentais e emocionais, me permitindo, em vida, atingir as metas que tracei e busquei, com muito esforço e dedicação, que se iniciaram quando ainda cursava o segundo grau na Escola Técnica Federal de Química, se prolongaram quando entrei na Universidade Federal Fluminense para cursar a Faculdade de Veterinária, como a etapa que ora se concretiza, a busca do Título de Mestre.

À minha mãe Ana Maria por, mais do que incentivado, ter feito parte desta minha última conquista. Certamente, seus apoios psicológico, financeiro e intelectual foram primordiais nestes momentos.

Ao meu irmão Leandro, por ser um grande estudioso e pesquisador, que sem a intenção, me incentivou a seguir seus passos, e que, ao ingressar no Doutorado em História, seu maior sonho, me estimulou a chegar até o fim desta jornada do meu Curso de Mestrado.

Ao meu pai, Carlos Alberto, que, se estivesse entre nós, seria o pai mais feliz do mundo ao ver seus dois filhos com Título de Mestre. Mesmo em outro plano, ofereço esta conquista a você. Seu jeito irreverente, descolado e despreocupado de viver, mas ainda assim com muita responsabilidade e inteligência, foram determinantes para minhas escolhas de vida. Embora a vida fosse muito melhor quando você estava ao meu lado, sei que você continua olhando e torcendo por mim durante a cervejinha diária de fim de tarde, que em algum lugar, você está dando um jeito de desfrutar. Que um dia possamos nos reencontrar para voltarmos a dividir a felicidade!

Ao professor Doutor Luiz Antônio Trindade de Oliveira, por ter sido meu orientador e ter tido toda a paciência de me apoiar em meio às situações adversas

que passei, como: estresse físico e mental, pequenos problemas de saúde, divergências políticas, etc.

Ao professor Dr. Robson Maia Franco, meu co-orientador, pelos conselhos, amizade, apoio, discussões e risadas. Certamente, foi mais fácil concluir esta etapa com sua ajuda.

À Prof^a Dr^a Eliana Fátima de Mesquita pelo grandioso auxílio à língua inglesa e pelo incentivo moral compartilhado no QG.

Às professoras Dr^{as}. Eliane Mársico e Valéria Moura por estarem sempre me aconselhando e incentivando, em muitos momentos de minha vida pessoal, acadêmica e profissional.

Ao professor Ms Raul Ribeiro de Carvalho por ter sido meu tutor durante a graduação, me apoiando, orientando e aconselhando, e por proporcionar diversos momentos de risadas com seus comentários, tiradas e piadas inteligentíssimas durante as aulas do Programa de Pós-Graduação.

Às amigas, em especial Renata O. Mattos e Fernanda Pestana e Neila Cortez, por me proporcionarem momentos alegres, aliviando as tensões do dia-a-dia.

À grande amiga Maria Inês Deseta, que, com doçura, meiguice e paciência dignas de um anjo, me acompanhou nos últimos sete anos, dividindo comigo tanto momentos de enorme tensão, mas também conquistas de prêmios e reconhecimento profissional. Você é especial!

À Ms MV Gisela Hutten, por, mesmo sem saber, servir de inspiração como profissional da área de Saúde Coletiva e Vigilância Sanitária, tamanha minha admiração profissional por você. Sem contar sua alegria e alto astral que também são admiráveis e contagiantes a ponto de deixar fãs e admiradores por onde passa.

Aos amigos Eliana, Carlinhos e Hilana por fazerem parte da minha vida, estando ao meu lado na saúde e na doença, na alegria e na tristeza, até que a morte nos separe.

Ao meu namorado Ednilton, pela companhia, dedicação e apoio na reta final desta trajetória, me auxiliando, apoiando e proporcionando os momentos mais felizes da minha vida.

Finalmente, ao Sol e à Lua, meus gatinhos, por não permitirem que sequer um dia da minha vida passasse sem um sorriso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS p. 08

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 11

LISTA DE ABREVIATURAS, p. 13

RESUMO p. 15

ABSTRACT p. 16

1 INTRODUÇÃO, p. 17

2 OBJETIVOS, p. 20

2.1 OBJETIVO GERAL, p. 20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 20

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA, p. 22

3.1 RELEVÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA NA FABRICAÇÃO DO GELO E DO USO DE GELO PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS, p. 22

3.2 PESCADO, p. 23

3.2.1 FATORES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE PEIXES COM QUALIDADE, p. 25

3.2.2 SALMÃO, p. 26

3.2.3 CONSUMO DE PESCADO CRU – CULINÁRIA ORIENTAL, p. 27

3.2.4 PESCADO COMO VEICULADOR DE MICRORGANISMOS, p.28

3.3 SUPERFÍCIES DE CONTATO DIRETO COM ALIMENTOS, p. 32

3.4 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR, p. 33

3.5 ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE, p.35

3.6 COLIFORMES TERMOTOLERANTES, p. 36

3.7 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA, p. 38

3.8 *Salmonella* spp., p. 39

3.9 *Vibrio parahaemolyticus* spp., p. 41

| | |
|-----------|--|
| 3.10 | BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS ANAERÓBIAS MESÓFILAS, p. 44 |
| 3.11 | BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTRÓFICAS, p. 44 |
| 3.12 | ANTIMICROBIANOS, p. 45 |
| 3.13 | PADRÕES MICROBIOLÓGICOS, p. 47 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS, p. 48 |
| 4.1 | MATERIAIS PERMANENTES, p. 48 |
| 4.2 | MATERIAIS DE CONSUMO, p. 48 |
| 4.3 | METODOLOGIA DA AVALIAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS, p. 49 |
| 4.4 | AMOSTRAGEM, p. 50 |
| 4.5 | METODOLOGIA DAS ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 50 |
| 4.5.1 | CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS, p. 51 |
| 4.5.2 | CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS PSICROTRÓFICAS, p. 51 |
| 4.5.3 | CONTAGEM DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVA, p. 52 |
| 4.5.3.1 | Contagem, p. 52 |
| 4.5.3.2 | Provas confirmatórias, p. 52 |
| 4.5.3.3 | Teste de sensibilidade a antimicrobianos, p. 53 |
| 4.5.4 | NMP DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> , p. 54 |
| 4.5.4.1 | Provas presuntivas, p. 54 |
| 4.5.4.2 | Isolamento em Agar TCBS, p. 54 |
| 4.5.4.3 | Prova de identificação, p. 55 |
| 4.5.5 | ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES – NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP), p. 55 |
| 4.5.6 | IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE <i>SALMONELLA</i> SPP., p. 56 |
| 4.5.6.1 | Confirmação Sorológica, p. 56 |
| 4.5.6.2 | Reações em agar TSI, p. 56 |
| 4.5.6.3 | Pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento seletivo, p. 57 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 57 |
| 5 | RESULTADOS, p. 58 |
| 6 | DISCUSSÃO, p. 61 |
| 7 | CONCLUSÕES, p. 74 |
| 8 | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS, p. 76 |
| 9 | APÊNDICES, p. 87 |
| 10 | ANEXOS, p. 102 |

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Resultados das análises das amostras A, B e C no ESTABELECIMENTO X de: NMP de Coliformes termotolerantes, Bactérias psicrótróficas, bactérias heterótróficas aeróbias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Samonella* spp., p. 87
- TABELA 2** Resultados das análises das amostras A, B e C testadas no ESTABELECIMENTO Y de: NMP de Coliformes termotolerantes, Bactérias psicrótróficas, bactérias heterótróficas aeróbias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Samonella* spp., p. 88
- TABELA 3** Resultados das análises das amostras D, E e F no ESTABELECIMENTO X de: NMP de Coliformes termotolerantes, Bactérias psicrótróficas, bactérias heterótróficas aeróbias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Samonella* spp., p. 89
- TABELA 4** Resultados das análises das amostras D, E e F no ESTABELECIMENTO Y de: NMP de Coliformes termotolerantes, Bactérias psicrótróficas, bactérias heterótróficas aeróbias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Samonella* spp., p. 90

- TABELA 5** Padrões microbiológicos para “sashimi” estabelecidos pela RDC nº12/2001/ANVISA, p. 91
- TABELA 6** Percentual de amostras com concentração bacteriana superior aos limites estabelecidos por: Jay (2005), Brasil (2001) e ICMSF (1986), p. 92
- TABELA 7** Tratamento estatístico comparativo entre resultados obtidos para Estabelecimentos X e Y, p. 93
- TABELA 8** Comportamento das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva frente aos diferentes antimicrobianos testados, p. 94
- TABELA 9** Percentual de classificação do comportamento das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva frente aos antimicrobianos testados, p. 95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 Resultados em LOG_{10} das amostras de alimentos no ESTABELECIMENTO X das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (BHAP), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+) por dia de análise, p. 96
- Fig. 2 Resultados em LOG_{10} das amostras de superfícies de contato direto com o alimento no ESTABELECIMENTO X das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+) por dia de análise, p. 97
- Fig. 3 Resultados em LOG_{10} das amostras de alimentos no ESTABELECIMENTO Y das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (BHAP), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+) por dia de análise, p. 98
- Fig. 4 Resultados em LOG_{10} das amostras de superfícies de contato direto com o alimento no ESTABELECIMENTO Y das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+) por dia de análise, p. 99
- Fig. 5 Comparação entre resultados entre as médias (dos oito dias) de contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva por estabelecimento (X,Y), p. 100

- Fig. 6 Comparação entre resultados entre as médias (dos oito dias) de contagens de Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas por estabelecimento (X,Y), p. 101
- Fig 7 Comparação entre resultados entre as médias (dos oito dias) de contagens de Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas por estabelecimento (X,Y), p. 101
- Fig 8 Estufa bacteriológica para incubações das culturas em teste, p. 102
- Fig 9 Tubos de ensaio com caldo BHI inoculados com colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase positiva selecionadas da Placa de Petri, p. 103
- Fig 10 Placas de Petri com TCBS para isolamento de *Vibrio parahaemolyticus*, p. 104
- Fig 11 Placas de Petri com Rambach para isolamento de *Salmonella* spp. p. 105
- Fig 12 Semeadura em TCBS de cultivo do Caldo GSTB (*Vibrio parahaemolyticus*), p. 106
- Fig 13 Material com suspeita de *Salmonella* spp. incubado em estufa bacteriológica em meios de TSI e LIA, p. 107
- Fig 14 Rótulo da matéria-prima (salmão refrigerado e eviscerado), p. 108
- Fig 15 Recebimento da matéria-prima (acondicionado com gelo) em caixa isotérmica, p. 109
- Fig 16 Matéria-prima limpa (amostras “A”), p. 110
- Fig 17 “SASHIMI” sendo elaborado no setor de produção, p. 111

- Fig 18 “SASHIMI” sendo preparado em cortes finos (característico), p. 112
- Fig 19 “SASHIMI” pronto para o consumo antes de ir ao bufê de exposição (amostras “B”), p. 113
- Fig 20 “sashimi” durante exposição no bufê (amostras “C”), p. 114
- Fig 21 Visualização do esfregaço em lâmina pelo método de coloração de Gram para identificação de cultivos puros, p. 115
- Fig 22 Placas de Petri com meio de Mueller Hinton com material inoculado e polidiscos de antimicrobianos, p. 116
- Fig 23 Cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva inoculadas em placa com polidiscos de antimicrobianos, cujo diâmetro é medido por halômetro, p. 117

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| ANVISA | AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA |
| APC | AGAR PADRÃO PARA CONTAGEM |
| ATM | AZTREONAM |
| BPF | BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO |
| BHAM | BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS |
| BHAP | BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTRÓFICAS |
| BHI | “BRAIN HEART INFUSION” |
| °C | GRAUS CELSIUS |
| CFO | CEFOXITINA |
| CLI | CLINDAMICINA |
| CLO | CLORAFENICOL |
| CLSI | “CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE” |
| CMT | “CALIFORNIA MASTITIS TEST” |
| CRO | CEFTRIAXONA |
| DTA | DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS |
| EC | <i>Escherichia coli</i> |
| ERI | ERITROMICINA |
| FAO | “FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION” |
| FEDH | “FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT” |
| g | GRAMA |
| GEN | GENTAMICINA |
| GSTB | CALDO GLICOSE SAL TEEPOL |
| INT | INTERMEDIÁRIO |
| LIA | <i>LISYN IRON AGAR</i> |

| | |
|---------|---|
| LOG | LOGARITMO |
| MAPA | MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO |
| NACMCF | “National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods” |
| mL | MILILITROS |
| OMS | ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE |
| OXA | OXACILINA |
| PEN | PENICILINA G |
| PPHO | PROCEDIMENTOS PADRONIZADOS DE HIGIENE OPERACIONAL |
| PPM | PARTE POR MILHÃO |
| RES | RESISTENTE |
| RIISPOA | REGULAMENTO DE INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL |
| SE | SENSÍVEL |
| SVS | SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA |
| TCBS | TIOSSULFATO CITRTO BILE SACAROSE AGAR |
| TEC | TEICOPLAMINA |
| TET | TETRACICLINA |
| TMA | TRIMETILAMINA |
| TSI | “TRIPLE SUGAR IRON” |
| UFC | UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA |
| UFC/G | UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA POR GRAMA |
| USA | “UNITED STATE OF AMERICA” |
| VAN | VANCOMICINA |
| WHO | “WORLD HEALTH ORGANIZATION” |

RESUMO

A qualidade dos alimentos é de total relevância para o fabricante, o comerciante do setor, os consumidores e as autoridades de Saúde Coletiva, devido à possibilidade de ocorrência de doenças originadas pela alimentação. Muitos destes casos são referentes à ingestão de pescado e alguns dos agentes responsáveis por este fato, assim como suas características, foram estudadas para obter fundamentação teórica ao desenvolvimento deste trabalho. Foram comparados dois estabelecimentos produtores de “sashimi”, através da avaliação das condições higiênico-sanitárias nas instalações das empresas produtoras e correlacionou estes dados com os resultados das análises bacteriológicas de seis diferentes amostras: matéria-prima; produto final antes da exposição ao consumo; produto final depois da exposição ao consumo em bufê a 10°C por duas horas; faca de corte de contato direto; mão do manipulador e placa de corte de contato direto. Os restaurantes de auto-serviço escolhidos foram denominados X e Y. As amostras foram coletadas, acondicionadas e encaminhadas dentro de um período de até três horas ao Laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Veterinária na Universidade Federal Fluminense, onde foram realizadas: contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, bactérias heterotróficas aeróbias psicrotólicas, *Staphylococcus* coagulase positiva, enumeração de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus* e isolamento e identificação de *Salmonella* spp. Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o teste T-student. Obtiveram-se: ausência de *Vibrio parahaemolyticus* em 100% das amostras testadas; presença de *Salmonella* spp. em 12,5% das amostras; NMP de coliformes termotolerantes variando de <1 a $< 2,0 \times 10^2$; contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, de 0 a 5,04 LOG₁₀ UFC/g amostra; contagens de BHAM e BHAP, de 1,0 a 9,93 e 1,48 a 9,60 LOG₁₀ UFC/g de amostra, respectivamente. Pôde-se concluir que o estabelecimento X apresentava maiores deficiências nas condições higiênico-sanitárias de elaboração do alimento. Ambos os estabelecimentos obtiveram amostras impróprias para o consumo na pesquisa dos demais patógenos. A matéria-prima utilizada era responsável por muitos dos resultados analíticos insatisfatórios, sendo necessário, portanto, monitorar a etapa de aquisição da mercadoria, garantindo a inocuidade do produto destinado ao consumo humano. As cepas de *S.aureus* testadas frente aos antimicrobianos, demonstraram resistência que variou de 46,7% a 100%.

Palavras-chave: pescado; “sashimi”; qualidade; *Salmonella* spp.; coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Vibrio parahaemolyticus*.

ABSTRACT

Food quality is quite relevant to industrial and trade fields, to consumption and to the authorities of Human Health Collective, because it is possible to occur foodborne diseases and many of these cases are caused by fish ingestion. This work objective is to find out the possible ethiological agents and their relevant characteristics in order to obtain theoretical foundation. The study compared two commercial establishments of "sashimi", through the evaluation of the hygienic sanitary conditions of the furnishings and to relate these data to the results of bacteriological analysis of six different samples: raw material, final product before exposition to the consumption, final product after exposition to the consumption in buffet at 10°C for two hours, cutting knife of direct contact, hand handler and metal cutting tool with direct cutting plate arrangement. Two restaurants were called X and Y. Samples were collected, carried and transported to the Microbiological Control Laboratory of Veterinarian School in Federal Fluminense University within a period of three hours. There were realized the following procedures: mesophilic aerobic heterotrophic bacteria, psychrotrophic aerobic heterotrophic bacteria, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, positive coagulase *Staphylococcus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella* spp.. The data were evaluated statistically using the test T-Student. The results obtained were: absence of *Vibrio parahaemolyticus* in 100% of the tested samples; presence of *Salmonella* spp. in 12.5% of the samples; NMP of thermotolerant coliforms varying from <1 to <2.0 x 10²; counting of positive coagulase *Staphylococcus*, from 0 to 5.04 LOG₁₀ UFC/g of the sample; countings of MAHB and PAHB, varying from 1.0 to 9.93 and 1.48 to 9.60 LOG₁₀ UFC/g of the sample, respectively. We could conclude that the establishment X showed major deficiency in the hygienic sanitary conditions of handling and preparing products. Both establishments showed up inappropriate samples for consumption to the presence of other pathogens. We could conclude that the raw salmon used to elaborate the "sashimi" was responsible for the majority of inappropriate bacteriological results, and so it will be necessary to monitorate the purchase of the raw salmon. *S.aureus* strains tested against to the antimicrobial demonstrated resistance varying from 46,7% a 100%.

Keywords: fish; "sashimi"; quality; *Salmonella* spp.; thermotolerant coliforms; *Escherichia coli*; positive coagulase *Staphylococcus*; *Vibrio parahaemolyticus*.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade e segurança dos produtos alimentícios são primordiais para os diversos segmentos do setor de alimentação e para as autoridades de Saúde Coletiva.

É possível estimar que há centenas de milhões de casos por ano de doenças originadas pela alimentação e que os custos destas doenças são da ordem de milhares de milhões de dólares por ano (WHO, 2003). As perdas econômicas resultantes da deterioração são raramente quantificadas, mas sabe-se que uma notável parte do fornecimento mundial de alimentos seja perdida como resultado da atividade microbiana.

A verdadeira incidência das doenças ocasionadas por agentes etiológicos contaminantes de alimentos não é conhecida na sua totalidade e há muitas razões para este fato. Na maior parte dos países não há obrigatoriedade de relatar às autoridades de saúde coletiva as doenças provocadas pela ingestão de alimentos. Nos poucos países que dispõem de um sistema de registro há muita falta de informação, devido ao fato de que tanto a vítima quanto o médico não estão conscientes do papel dos alimentos como origem da enfermidade. Por outro lado, o alimento responsável nem sempre está disponível para análise e o verdadeiro meio utilizado pelo agente da doença não é identificado. Ainda assim, estima-se que ocorra por ano, 2,1 milhões de óbitos por estas causas no mundo (WHO, 2003).

Na última década, a incidência de doenças de origem alimentar aumentou na Europa, a despeito de regulamentações de segurança dos alimentos e introdução ao programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (TASSOU, 2004).

A ausência de organismos infecciosos está entre as qualidades desejáveis dos alimentos. Contudo, alcançar níveis de “tolerância zero” de microrganismos,

mesmo com a aplicação das Boas Práticas Fabricação, talvez não seja possível. Em vista disso, o objetivo é a produção de alimentos com o mínimo de microrganismos, que não comprometam sua inocuidade, visto que os métodos clássicos de controle de qualidade estão fortemente baseados nos padrões microbiológicos das matérias-primas e dos produtos finais.

A necessidade do controle da qualidade dos produtos alimentícios está bem registrada e, uma vez que as doenças de origem alimentar, convencionalmente chamadas de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) têm aumentado a cada ano, há também uma necessidade urgente de melhorar os meios tradicionais e atuais para assegurar a qualidade dos alimentos.

O pescado é um grupo de alimentos envolvidos em muitos dos casos relatados de doenças de origem alimentar.

Os peixes são alimentos altamente perecíveis, e se forem estocados, processados, embalados e/ou distribuídos inadequadamente, deterioram-se rapidamente e tornam-se inseguros para o consumo devido ao crescimento microbiano.

Os vários agentes responsáveis pelas doenças que têm sido associados ao consumo de pescado vêm sendo relatados em diversos trabalhos por pesquisadores, assim como algumas características relevantes para a avaliação dos perigos e riscos relacionados com a sua presença no peixe e nos produtos da pesca. Os processos que conduzem à deterioração e as opções de controle dos agentes das doenças bem como os processos de deterioração foram estudados para apreender fundamentação teórica para o desenvolvimento deste trabalho.

Embora seja verdade que todo o peixe e produtos derivados que não sejam submetidos a qualquer processamento bactericida, possam conter patógenos, o nível de contaminação pode não ser suficiente para causar doenças desde que sejam respeitadas algumas características essenciais em relação ao retardo do crescimento destes microrganismos, como os cuidados com o binômio tempo-temperatura de estocagem; com a higiene na manipulação e exposição do produto; com a qualidade da matéria-prima. Esta preocupação se estende ao objeto de estudo deste trabalho, o "sashimi", visto que se trata de um produto cujo consumo ocorre com a matéria-prima "in natura", cujas únicas modificações sofridas são a retirada da pele (limpeza) e o corte do filé.

Tendo em vista a grande ocorrência mundial de doenças transmitidas por patógenos presentes nos alimentos, os riscos potenciais de consumo de pescado na transmissão de doenças, o baixo nível de educação sanitária da população mundial, no sentido da adoção de medidas preventivas para este tipo de enfermidade e de hábitos alimentares, um número cada vez crescente de fatores predisponentes à ocorrência deste tipo de enfermidade, assim como o aumento de pessoas enquadradas como população de risco, pessoas imunodeprimidas, idosos, crianças, grávidas, etc., o desenvolvimento de múltiplas resistências bacterianas diante de antibióticos usados no tratamento de diversos tipos de infecções, faz-se necessário estudar e avaliar condições de obtenção de alimentos, suas microbiotas, patogenicidade e mecanismos de prevenção e defesa, em busca da garantia da inocuidade do produto ao consumidor. Dentre os fatores relevantes ora descritos, a presente pesquisa teve como objeto de estudo o “sashimi”, prato típico japonês à base de peixe cru.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os pontos críticos nas etapas de elaboração do “sashimi” através de análises bacteriológicas de amostras de alimentos e de superfícies de contato direto com estes, coletadas em dois distintos restaurantes de auto-serviço, tecendo comparações entre os resultados obtidos dos dois estabelecimentos e pesquisar a resistência de bactérias encontradas frente aos antimicrobianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar bacteriologicamente as amostras de: matéria-prima (musculatura do peixe inteiro); “sashimi” antes da exposição ao consumo; “sashimi” depois da exposição ao consumo, mantido a 10°C no bufê por duas horas, realizando contagens de BHAP e *Staphylococcus* coagulase positiva, isolamento e identificação de *Salmonella* spp.e enumeração de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e de *Vibrio parahaemolyticus*.

Analisar bacteriologicamente as amostras de superfícies de contato direto com o “sashimi” durante o processamento: placa de corte, lâminas das facas e mãos dos manipuladores, realizando contagens de BHAM e de *Staphylococcus* coagulase positiva, isolamento e identificação de *Salmonella* spp.e enumeração de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

Relacionar os resultados obtidos nas análises com as diferenças higiênico-sanitárias estruturais e operacionais de cada estabelecimento.

Comparar os dois estabelecimentos através da avaliação dos resultados das análises bacteriológicas de amostras de alimentos e de superfícies de contato com os mesmos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RELEVÂNCIA DO USO DE GELO PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Muitos patógenos estão relacionados com a qualidade da água, ou até mesmo do gelo utilizado na conservação, e/ou procedimento pós-captura (HUSS et al., 2000).

A importância da qualidade microbiológica do gelo é enfatizada quando sua finalidade é de conservar alimentos, especialmente os peixes. Germano e Germano (2003) afirmam que o contato dos peixes com gelo produzido com água de má qualidade é um dos meios mais freqüentes de contaminação destes produtos. Vieira et al. (2004), em pesquisa sobre a qualidade microbiológica do gelo usado num 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 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 (GERMANO e GERMANO, 2001; PANETTA, 2003; PIMENTEL et al., 2004; SOULTOS et al., 2006).

3.2 PESCADO

Segundo o RIISPOA (Brasil, 1997), a denominação "PESCADO" compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana. O documento também classifica o grupo em relação à sua natureza como: fresco; resfriado; congelado. Por pescado fresco entende-se: o pescado sem ter sofrido qualquer processo de conservação, a não ser a ação do gelo. Entende-se por resfriado o pescado devidamente acondicionado em gelo e mantido em temperatura entre -0,5 a -2°C. Por pescado congelado, entende-se aquele tratado por processos adequados de congelamento, em temperatura não superior a -25°C.

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

Considerando somente os tipos de carne, no ano 2000 foram produzidas 130,5 milhões de toneladas de produtos pesqueiros no mundo, dos quais 74% foram destinados ao consumo humano direto. Este número supera qualquer tipo de carne proveniente do ambiente terrestre (WIEFELS 2003). O Brasil produzia 150 mil toneladas de pescado em 1950 e no ano de 2003 produziu mais de um milhão de toneladas (FAO 1999; FAO 2005).

Segundo Fritsch (2004), o país, atualmente, é o 25º maior produtor de pescado e sua produção vem crescendo, apresentando um grande potencial para se tornar o maior produtor de pescado cultivado no mundo. Assim como a produção, o consumo anual *per capita* de produtos pesqueiros também está aumentando, de cerca de nove quilos em 1961, para mais de 15 quilos, em 1999. Estima-se que em 2020 o consumo mundial anual de pescado chegue a 30 quilos por pessoa.

O consumo *per capita* relativamente pequeno no Brasil, cerca de 6,5 quilos por pessoa por ano (FAO 2003), pode ser explicado pela composição da população brasileira, de diversas origens e, portanto, tradições; e por um deficiente sistema de distribuição. O custo relativamente elevado dos pescado para os brasileiros também colabora para um menor consumo, mas não é o principal fator, já que as espécies mais consumidas no Brasil são importadas e caras, como bacalhau norueguês,

merluza argentina e salmão chileno (WIEFELS 2003). Ainda segundo este autor, desde 1991 observa-se um relativo estacionamento da quantidade de processamento de produtos pesqueiros e um crescimento no consumo de pescado fresco.

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

Em muitas regiões do mundo, o pescado faz parte da dieta alimentar e, representa, em alguns países, a principal fonte de proteínas de origem animal. Atualmente, um número cada vez maior de pessoas dá a sua preferência ao peixe como uma alternativa saudável à carne. O baixo teor de gordura de muitas espécies de peixes e os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-3, sobre doenças coronarianas em seres humanos, são aspectos extremamente importantes para pessoas que se preocupam com a saúde, em particular, em países onde a mortalidade por doenças cardiovasculares é elevada (FAO, 1997).

Tanto os peixes de água doce como os de água salgada contém altos teores de proteínas e outros constituintes com nitrogênio. O conteúdo de carboidratos destes peixes é zero, enquanto o conteúdo de gordura varia dependendo da espécie. Um aspecto importante da composição do peixe é que nem todos os compostos com nitrogênio do peixe estão na forma de proteínas. Entre os compostos não protéicos com nitrogênio, estão os aminoácidos livres, bases voláteis de nitrogênio como amônia e trimetilamina, creatinina, taurina, carnosina e histamina (JAY, 2005). Estes compostos são oriundos de reações de deterioração dos pescados.

Segundo a FAO (1997), o pescado difere dos outros tipos de produtos alimentícios por diversas razões. A maior parte do pescado é ainda retirado de uma população “selvagem” e os pescadores são como caçadores que não têm influência no manejo de suas presas antes de serem capturadas.

Conforme Kietzmann et al. (1974) descreveram, imediatamente após a captura, devem-se adotar medidas sanitárias, que evitem uma infecção posterior ao pescado, como as referentes ao barco e aparelhos utilizados para a pesca durante todo o transporte desde o local de pesca; medidas de higienização das operações de transferência do peixe para os recipientes; as referentes ao transporte do

pescado desde o porto até a indústria; e as que são de responsabilidade especificamente da indústria.

Segundo Jay (2005), a microbiota do pescado reflete a água onde esses animais vivem, visto que os tecidos internos de um peixe sadio são estéreis. A microbiota dos peixes normalmente é encontrada em três lugares: na superfície externa, nas guelras e nos intestinos. Os peixes de água morna tendem a ter a microbiota mais rica em bactérias mesófilas Gram-positivas do que peixes de água fria, os quais têm mais bactérias Gram-negativas.

Em documentos da FAO (1997) há relatos sobre a qualidade sanitária da água de onde os animais são retirados como sendo o ponto-chave para a obtenção de um produto final com uma boa qualidade microbiológica. Além da água, os microrganismos são adquiridos nas várias etapas do processamento, como o descasque, a descamação, a evisceração, as demais manipulações e outros.

3.2.1 FATORES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE PEIXES COM QUALIDADE

Segundo Silva Junior (2001), o binômio: tempo x temperatura forma, junto com o fator higiene, o sucesso da produção comercial de peixes de consumo humano, visto que deles dependem a segurança e qualidade do produto final.

Conforme descrição no Manual Técnico da FAO (1997), o tempo está intimamente relacionado com a rapidez com que se desencadeiam as reações autolíticas e bacterianas que estão relacionadas com o grau de higiene do barco e dos manipuladores do peixe. Somando-se a estes fatores as baixas temperaturas, e se devidamente aplicados, evitam ou, pelo menos, retardam as reações anteriormente mencionadas.

O uso de baixas temperaturas para conservar alimentos está baseado no fato de que o crescimento microbiano pode ser retardado por temperaturas mais baixas que as de congelamento e geralmente inibido por temperaturas abaixo do congelamento (BRASIL, 1993).

Pacheco et al. (2004) relataram a importância das condições higiênico-sanitárias adequadas durante toda a cadeia produtiva, que vai desde a captura até a distribuição ao consumidor final, no intuito de garantir a qualidade do pescado. As principais fontes de contaminação terrestre para os peixes são provenientes das contaminações cruzadas que ocorrem durante a descarga do produto. Germano e

Germano (2003) salientaram 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 (ANDRADE et al., 2002).

Segundo Feldhusen (2000), 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.

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 psicrófilas, enquanto as bactérias mesófilas são mais comuns em peixes de água tropical. A microbiota 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 microbiota 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 et al., 1997; VIEIRA et al., 2004). Da mesma forma, os métodos de cultivo e criação podem estar associados à qualidade higiênico-sanitária do pescado (ROHAYA et al., 1997).

3.2.2 SALMÃO

De acordo com Stansby (1968), o salmão vem sendo utilizado como alimento do Homem há muito tempo, segundo informações encontradas em paredes de cavernas na França, cuja época se remonta há 12 mil anos.

O salmão é um grande peixe da família Salmonidae, que também inclui as trutas. O salmão, além de peculiar às águas da Europa, também é muito cultivado no Chile. O produto entrou no Chile com fins explicitamente comerciais, há cerca de 20 anos. Os governos chileno e japonês trabalharam para desenvolver a piscicultura no

Rio Claro (afluente do Rio Simpson, em Coyhaique). A idéia original não era criar salmão em cativeiro. Os alevinos foram introduzidos no rio para seguir o ciclo natural. Nesse período seriam capturados em redes de pescadores comerciais. O projeto foi abandonado depois de oito anos porque não atingiu os resultados almejados. Nesse meio-tempo, algumas empresas começaram a criar salmões em grandes "currais" flutuantes. Hoje, o Chile é o segundo maior produtor de salmão do mundo, perdendo apenas para a Noruega.

O salmão é muito procurado pela sua apreciadíssima carne rosada, muito saborosa, e cultivado em pisciculturas. É cultivado nas águas frias do norte da Noruega, próximo ao círculo polar. Sua carne é consistente e tenra.

Como fonte alimentar para os humanos, este peixe destaca-se por ter alto teor de ômega-3. O salmão é muito conhecido como o peixe do "sushi", pela sua grande finalidade de alimentar os seres humanos sendo servido cru, com nabo e molho shoyu. Os japoneses são seus maiores apreciadores, embora a cultura tenha se espalhado muito. Salmão cru pode ter contaminação de anisakidae, um parasita marinho, assim como de sua microbiota ou contaminantes da água de cultivo. Até os refrigeradores serem disponíveis, os japoneses não consumiam salmão cru, o que passou a acontecer, através do "sushi" e do "sashimi" recentemente (JAY, 2005).

3.2.3 CONSUMO DE PESCADO CRU – CULINÁRIA ORIENTAL

O "sashimi" é uma iguaria da culinária do Japão primariamente consistindo de frutos do mar frescos, cortados em fatias finas e servidos com apenas um molho e um simples acompanhamento como shiso e daikon ralado, preparados manualmente. Estes pratos estão tornando-se populares, também, em outros países além do Japão (HAMADA-SATO et al. 2005; YANO et al. 2004).

O "sashimi" é quase sempre o primeiro prato em uma refeição formal japonesa. Muitas pessoas acreditam que este alimento, tradicionalmente considerado o melhor prato da culinária japonesa, deveria ser ingerido antes de outros sabores marcantes que afetam o paladar (WATANABE et al. 2005).

O hábito de ingerir peixes, em especial crus, é de introdução recente no cardápio dos estabelecimentos de alimentos, nas cidades brasileiras, e vem aumentando nos últimos anos (MARTINS; MATTÉ et al.; SANTOS, 2006).

Resende (2004) relata que o consumo de pratos típicos da culinária japonesa cresceu 20%, em Brasília-DF, entre 2001 e 2002. Com o crescente mercado de “sushis”, aumentou também a forma de preparação e os ingredientes utilizados nestes pratos. Preparações que antes incluíam apenas peixes, arroz e alga, estão sendo montadas utilizando frutas e legumes. Os peixes mais utilizados na preparação são o atum, o salmão, namorado, o cara-pau, o camarão e as lulas (MATTE et al. 2006).

Com o objetivo de avaliar a qualidade higiênico-sanitária do pescado servido cru em forma de “sashimis” comercializados em estabelecimentos do tipo “fast food” da cidade de São Paulo, SP, Soares (2004) conduziu um estudo que concluiu o risco que o consumo deste produto pode acarretar aos indivíduos.

Embora, um estudo da Food and Environmental Hygiene Department (FEDH, 2000) demonstrou que “sushi” e “sashimi” são alimentos garantidamente seguros para o consumo humano, Pinheiro (2006), num estudo com os mesmos objetos de estudo em Fortaleza, Ceará, isolou as seguintes bactérias da família Enterobacteriaceae: *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli* tipo II. Também foram isoladas das amostras, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, bactérias características de alimentos em deterioração. Foram detectados *Salmonella* sp. e *Salmonella* Newport nas amostras de dois estabelecimentos, indicando uma baixa qualidade microbiológica desses produtos.

Em dissertação de mestrado na Universidade de Brasília, Iavelberg (2005) concluiu que as amostras de peixe cru “sushi” e “sashimi” colhidas em restaurantes de Brasília, a presença de coliforme termotolerantes no alimento caracteriza a contaminação em algumas das etapas de preparo, o que pode ocorrer desde a aquisição do material, por falha de manipulação nas cozinhas ou pelas condições de transporte e armazenamento do pescado antes de sua chegada aos restaurantes.

3.2.4 PESCADO COMO VEICULADOR DE MICRORGANISMOS

Enquanto os pescados são reconhecidos como ótimas fontes de proteínas e ácidos graxos essenciais, comer peixes crus pode tornar-se grande risco, principalmente, para determinados grupos de riscos como os imunodeprimidos, idosos, crianças, grávidas, etc. (SENAC, 2004).

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

Na Coréia e Japão, peixes e frutos do mar são os principais veículos de transmissão de doenças de origem alimentar. Algumas bactérias patogênicas estão presentes naturalmente na água (espécies patogênicas de *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp.) e no ambiente (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*). Estes patógenos podem, portanto, também ser encontrados em peixes vivos e em seu material consumido cru (BASTI et al. 2006; HUSS et al. 2000).

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

Durante a preparação de vários pratos a partir de pescado, agentes patogênicos presentes no material cru podem ser eliminados ou sobreviverem e estarem presentes no produto final (FORSYTHE, 2002).

Quando o produto é armazenado sob refrigeração, a preocupação concentra-se na sobrevivência e multiplicação de microrganismos psicrotóxicos. O tratamento com calor, como cocção, é eficiente na destruição de alguns patógenos, quando realizado sob temperatura e tempo adequados (HAMADA-SATO et al. 2005; HUSS et al. 2000).

Em pesquisa realizada por Schulz et al (2003), *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, e espécies patogênicas de *Vibrio* spp. não foram detectadas quando analisadas 105 amostras de produtos japoneses.

Menezes (2003) realizou pesquisa com “sashimis” comercializados em restaurantes, em Fortaleza, Ceará, de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. e obteve resultados de grande importância aos Órgãos de Saúde Coletiva, pois

encontrou *S.aureus* acima dos valores permitidos pela Legislação (BRASIL, 2001) e *Salmonella* spp. em 22,5% e 25% das amostras testadas, respectivamente.

Estudo conduzido por Herrera (2006), na Espanha, confirmou que alimentos à base de pescados crus oferecem riscos à saúde de quem os consome, visto que estes produtos carregam bactérias nocivas à saúde.

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

Contaminação adicional, com novos patógenos, também pode ocorrer na etapa de manipulação do alimento. Medidas preventivas incluem boas práticas de fabricação e programas eficazes de higiene e sanitização (HUSS et al. 2000). Segundo Reij e Den Aantrekker (2004), a recontaminação, ou seja, contaminação após preparo, é importante causa de surtos de doenças de origem alimentar e afirmam que equipamentos e instrumental inadequadamente limpos são fontes de numerosos patógenos.

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

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

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

e peixes *in natura* são veículos naturais do *V. cholerae* (BARBONI 2003; BASTI et al. 2006; MATTÉ 2003).

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

Outros agentes bacterianos podem, também, contaminar o pescado e causar risco à saúde. Cepas psicrotróficas de *Bacillus cereus* produzem enterotoxinas nos preparados de peixe, sobretudo em pH superior a 6,0, acarretando surtos de diarreia. Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Aeromonas* spp podem ser encontrados em peixes frescos ou congelados, frutos do mar e produtos industrializados (FRANCO e LANDGRAF 2003; MATTÉ 2004).

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

Albuquerque (2007), demonstrando, atenção ao tema, pesquisou a multi-resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*, isolados de peixes e mãos, fossas nasais e cavidade bucal de manipuladores de alimentos, em feiras livres de Fortaleza, Ceará.

As bactérias patogênicas geralmente não alteram a aparência, odor, nem sabor do alimento; portanto, na maioria das vezes é impossível saber se o alimento oferece risco em termos de contaminantes sem que se realize uma análise microbiológica, o que agrava os riscos de se consumir alimentos não seguros (SENAC, 2004).

3.3 SUPERFÍCIES DE CONTATO DIRETO COM ALIMENTOS

Num estudo desenvolvido por Vargas e Quintaes (2003), analisou-se microbiológica e microscopicamente superfícies de monoblocos plásticos usados no transporte/comercialização de pescados em feiras e Mercados de São Paulo, considerando a importância das condições microbiológicas das superfícies de contato com os peixes. Os pesquisadores constataram, a partir dos resultados obtidos, que há necessidade de regulamentar um material adequado para contato com pescados.

Segundo Hutten (2000), as superfícies de corte que entram em contato com alimentos devem ser de fácil higienização. Devem ser evitados materiais passíveis de craqueamentos, riscos e abrasões que dificultam a limpeza e sanitização, tornando o alimento vulnerável à contaminação. Para haver o controle nesta etapa é necessário se promover a redução da população microbiana por meio da lavagem e sanitização. Em certas circunstâncias onde o contato do alimento é freqüente com a superfície de trabalho, há permanência da umidade e possibilidade de crescimento bacteriano, o que ainda ocorre mesmo durante as operações repetidas de lavagem. Por esta razão, é necessário efetuar lavagem em intervalos capazes de manter a microbiota em níveis aceitáveis e o uso de sanificantes. Esta descontaminação das superfícies de qualquer tipo de placa de corte de uso em cozinhas visa evitar a contaminação cruzada.

Os procedimentos de sanitização de utensílios após a lavagem com detergente e água quente à temperatura acima de 43,3°C podem ser efetuados tanto pelo uso de água de enxágüe com temperatura superior a 76°C ou pelo uso de sanitizantes químicos em água com temperatura entre 24°C e 48,8°C, nas concentrações apropriadas (LOCKEN, 1994).

Segundo Hütten (2000), pode-se considerar que os alimentos que contêm patógenos capazes de provocar doenças são comumente os mais manipulados durante o preparo e mantidos sob condições inadequadas de armazenamento. Por esta razão, pode-se afirmar que os manipuladores se tornam, então, uma grande forma de provocar intoxicações e/ou toxiinfecções alimentares, uma vez que podem portar naturalmente *Staphylococcus aureus* na pele, feridas sépticas, nariz, garganta e cabelo, ou *Salmonella* spp., e este fato, associado aos maus hábitos de manipulação, podem se tornar fortes contribuintes na transmissão de doenças

emergentes entéricas humanas através da ocorrência de contaminação cruzada (HOBBS, 1999; VARNAM, 1991).

Como é impossível esterilizar as mãos, uma lavagem e sanitização adequadas das mesmas, são preceitos básicos para a biossegurança alimentar, visto que a microbiota residente é, em geral, inofensiva e os germes patogênicos que se aderem à superfície e persistem nos poros, cavidades e rachaduras, são facilmente removidos (SENAC, 2004).

O uso de anti-sépticos durante o procedimento de lavagem das mãos dos manipuladores de alimentos, através do uso de sabão bactericida ou após o uso do detergente, reduz consideravelmente a contaminação dos alimentos, sendo dispensado o uso de luvas, na maioria das fases de elaboração dos produtos (SILVA JUNIOR, 2001).

3.4 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR

Nos primórdios da microbiologia, relacionavam-se os alimentos contaminados com o seu estado de putrefação. Atualmente, sabe-se que os alimentos contaminados com microrganismos patogênicos podem ter aspecto, odor e sabor normais (FORSYTHE, 2002).

Conforme descrição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), (BRASIL 2001), Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) é um termo genérico, aplicado a uma síndrome, geralmente, constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia. Estas enfermidades são atribuídas à ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, *prions*, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados.

Além dos sintomas digestivos, podem ocorrer afecções extra-intestinais em diferentes órgãos e sistemas, como: meninges; rins; fígado; sistema nervoso central; terminações nervosas periféricas; e outros, de acordo com o agente etiológico envolvido. O quadro clínico deste tipo de enfermidades depende, portanto, do agente etiológico envolvido e varia desde leve desconforto intestinal até quadros extremamente sérios, como desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda (síndrome hemolítica urêmica) e insuficiência respiratória (SÃO PAULO, 2005).

Em documentos da Secretaria de Vigilância Sanitária – SVS - (Brasil, 2005) estão descritos que mais de 250 diferentes tipos de DTA têm sido descritos e as doenças mais conhecidas são: cólera; febre tifóide; botulismo; salmonelose; estafilococose; e colibacilose. Algumas destas são consideradas emergentes, como: síndrome hemolítica urêmica (SHU); síndrome de Creutzfeld-Jacob; e campilobacteriose.

De acordo com Momesso et al. (2005), está claro que patógenos alimentares ou produtos tóxicos pré-formados precisam ser ingeridos para desencadear alguma doença. À exceção das toxinas botulínicas, das micotoxinas e das toxinas de fitoplâncton, todos os agentes etiológicos contaminantes de alimentos que causam doenças podem ser contraídos por via fecal-oral. Nestes se incluem viroses de origem alimentar, protozoários e bactérias enteropatogênicas. Os microrganismos causadores de DTA podem ser transmitidos a partir de fezes contaminadas e superfícies contaminadas por estas, pelas mãos de manipuladores de alimentos com hábitos de higiene insatisfatórios, pela água ou por vetores ou pragas urbanas.

Vários pesquisadores associam surtos de DTA com procedimentos inadequados em uma ou mais etapas da produção dos alimentos, por descumprimento das normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Por esta razão se explica sua grande importância, pois estas normas asseguram a qualidade e segurança dos alimentos, prevenindo riscos de contaminação nociva à saúde do consumidor (BRASIL, 1993).

Munhoz (2006), objetivando avaliar o padrão higiênico-sanitário de uma Cozinha Piloto e de quatro pontos de distribuição de Botucatu, São Paulo, analisou amostras da merenda escolar e mãos de manipuladores, pesquisando *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e obteve resultados insatisfatórios, que demonstraram potenciais riscos de surtos alimentares.

Conforme Jay (2005) descreve, conhecer os conceitos básicos de higiene na manipulação de alimentos, ajuda a prevenir, controlar ou eliminar as DTA.

Considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando à proteção à saúde da população, de harmonização da ação de inspeção sanitária em serviços de alimentação, e ainda de elaboração de requisitos higiênico-sanitários gerais para serviços de alimentação aplicáveis em todo território nacional, em 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou a Resolução RDC 216 (BRASIL, 2004).

Silva Junior (2001) conceituou as BPF como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, intervindo nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de consumo que direta ou indiretamente relaciona-se com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos da produção”. Ou seja, identifica, avalia e controla os perigos advindos de um processamento, em todas as suas fases.

3.5 ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE

Para o setor de alimentos, é correto afirmar que os conceitos de qualidade e segurança tornaram-se itens obrigatórios, haja vista que falhas desta natureza colocam em risco a saúde do consumidor e a credibilidade do estabelecimento (SENAC, 2004).

Segundo Silva Junior (2001), na tentativa de melhorar a qualidade e segurança dos processos de elaboração de alimentos, e conseqüentemente oferecer ao consumidor final um alimento que não lhe cause problemas nem prejuízos a saúde, surgiram algumas propostas, tais como: implantação de Procedimentos Padronizados de Higiene Operacional (PPHO) e de Boas Práticas de Fabricação (BPF), implantação de sistema de qualidade e implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Um alimento apto para o consumo, isto é, com segurança, é aquele alimento que não causa doença ou dano ao consumidor (USA, 1994).

Um outro entendimento para alimento seguro destaca que a ausência de contaminações químicas, físicas e microbiológicas garante segurança aos alimentos (SENAC, 2004).

Para entender o assunto, faz-se necessário conhecer alguns conceitos, descritos pelo NACMCF (1992):

- Pontos Críticos de Controle são locais ou operações nos quais uma medida de controle deve ser aplicada para eliminar, prevenir ou reduzir um perigo a um nível aceitável.
- Perigos = contaminações ou agentes de natureza física, química ou microbiológica que podem tornar um alimento não seguro para o consumo.

- Pontos de controle = são locais ou operações onde a perda de controle não corresponde a risco à saúde do consumidor.

Neste caminho, o sistema APPCC, de posse do conhecimento do produto e do processo, identifica o quê e onde pode acontecer algo de errado, e BPF, por meio de procedimentos padrão de higiene operacional (PPHO), procuram eliminar ou manter em níveis toleráveis tais perigos (SILVA JUNIOR. 2001).

Para exemplificar essa informação, como parte de um estudo para implantação do Sistema de APPCC num restaurante em São Paulo, foi conduzido por Almeida (1995) um estudo microbiológico das mãos de manipuladores de alimentos através da contagem de BHAM, *S. aureus*, *C. perfringens* e presença de *Salmonella* spp. e foram observadas contagens BHAM em níveis de até 10^7 UFC/mão, contaminações por *S. aureus* e *C. perfringens*, embora *Salmonella* spp. não tenham sido isoladas. Estes dados serviram para determinar as mãos dos manipuladores como um dos PCC do processamento.

Da mesma forma, as demais superfícies de contato direto com o alimento, objeto deste estudo, são igualmente considerados PCC, pois podem interferir por contaminação cruzada, na microbiota do produto final (DIAS, 1998; HUTTEN, 2000; VARGAS E QUINTAES, 2003).

3.6 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

A bactéria conhecida hoje como *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez pelo Dr. Theodor Escherich em 1885, ao tentar isolar o agente etiológico da cólera (ADAM; MOSS, 1997).

A *Escherichia coli* foi reconhecida como patógeno humano após ter causado uma epidemia de diarreia infantil, em uma creche aos meados da década de 40, produzindo um índice de mortalidade da ordem de 50%. Na década de 60 apareceram as primeiras referências de cepas produtoras de enterotoxinas em animais jovens com diarreia, e em 1970 foi descoberto que cepas virulentas produziam enterotoxinas (JAY, 2005). Segundo este autor, a *Escherichia coli* foi reconhecida como patógeno de origem alimentar, quando ocorreram aproximadamente 400 casos de gastroenterite devido à contaminação de queijos por uma linhagem enteroinvasiva, que foram importados e comercializados em 14 estados americanos.

A indústria de alimentos, durante a maior parte do século XX, considerou a contaminação por *E. coli*, simplesmente como um problema relacionado a práticas insatisfatórias de higiene, particularmente, contaminação de origem fecal. No entanto, nas últimas décadas, comprovou-se que muitos tipos dessa bactéria são altamente patogênicos para o homem e podem provocar infecções graves, levando pacientes a óbito. Isto ocorreu devido ao aprofundamento dos estudos e à identificação de diferentes cepas de *E. coli* associadas a quadros clínicos de colite hemorrágica, desinteria, cistite, nefrite, infecções de feridas cirúrgicas, septicemia e, especialmente, da síndrome urêmica-hemolítica (GERMANO; GERMANO, 2003).

Baseado nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, as linhagens de *Escherichia coli* consideradas patogênicas foram agrupadas em classes (GERMANO; GERMANO, 2003; JAY, 2005):

- Enteropatogênica clássica (EPEC): acomete recém-nascidos e lactentes, causando diarreia sanguinolenta ou aquosa;
- Enterotoxigênica (ETEC): provoca a diarreia infantil e a diarreia dos viajantes, sendo esta aquosa e abundante;
- Enteroagregativa (EAggEC): responsável por quadros agudos e persistentes de diarreia aquosa. Do ponto de vista epidemiológico, é pouco estudada.
- Difusamente aderente (DAEC): acomete indivíduos cujo sistema imunológico não está totalmente formado e também crianças mal nutridas. A diarreia desencadeada é aquosa. Esta classe também é pouco estudada do ponto de vista epidemiológico.
- Facultativamente Patogênica (FEEC): aparentemente associada a surtos esporádicos de diarreia.
- Enteroinvasora (EIEC): acomete jovens e adultos. A diarreia produzida pode ser sanguinolenta ou não, com presença de leucócitos e muco;
- Enterohemorrágica (EHEC): acomete com bastante gravidade, preferencialmente crianças e idosos. Dentre as inúmeras cepas virulentas do microrganismo, a que constitui maior preocupação para as autoridades de saúde é a *E. coli* O157:H7, que é responsável pela forma enterohemorrágica da infecção, tendo sido identificada em 1982, associada com surtos de colite hemorrágica.

A *E. coli* é uma enterobactéria Gram-negativa em forma de bastonete, catalase-positiva, oxidase negativa, não esporogênica, móvel por flagelos

peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose em 48 horas, produzindo ácido e gás em caldo específico em temperaturas em torno de 44,5°C. Utiliza para seu crescimento acetato e glicose como fonte de carbono, porém o citrato não pode ser utilizado (ACHA; SZYFRES, 2001). Geneticamente apresenta relação íntima com o gênero *Shigella*, embora sua atividade bioquímica seja mais intensa (GERMANO; GERMANO, 2003).

A *E. coli* é membro da família *Enterobacteriaceae* e contém, aproximadamente, 1000 tipos antigênicos. (GERMANO; GERMANO, 2003). Todas as cepas patogênicas de *E. coli* são destruídas pelos desinfetantes clorados e por radiações gama (JAY, 2005).

3.7. *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, imóveis, de forma esférica, agrupadas em massas irregulares em forma de "cacho". Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer em temperaturas de 7 a 48°C, com um ótimo de 30 a 37°C (HOLT et al, 1994).

De acordo com Germano e Germano (2003), o gênero *Staphylococcus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das intoxicações no mundo. A contaminação por este microrganismo pode ser durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Encontrando condições favoráveis como aquecimento ou refrigeração em temperatura inadequada, esta bactéria cresce e pode produzir toxinas.

As peculiaridades do seu *habitat* tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitido aos alimentos por manipuladores, na maioria dos casos por portadores e também por animais, principalmente, gado leiteiro com mastites, apresentando altos números do microrganismo no leite (FORSYTHE, 2002).

Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem dentro de uma a seis horas após a ingestão do alimento contaminado. Segundo Martins (2006), a ocorrência deste microrganismo é esperada em alimentos que não sofreram tratamento térmico suficiente para sua destruição ou que foram manipulados e/ou refrigerados inadequadamente.

Segundo Andrade e Zelante (1989), alimentos que sofrem manipulação são potencialmente capazes de causar intoxicação estafilocócica e os manipuladores são importantes fontes de contaminação de *S. aureus*.

Alguns autores como Aquino *et al.* (1996) e Dams *et al.* (1996) já estudaram a qualidade microbiológica de pescados comercializados em Manaus e Florianópolis, respectivamente, e encontraram amostras positivas para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

Hilluy *et al.* (1996) também avaliando amostras de pescados, verificaram a ocorrência de *S. aureus* em grande parte dos alimentos testados, relatando erros nas etapas de processamento.

Da mesma forma, Raddi (1988), pesquisou a presença deste patógeno em manipuladores de alimentos, tamanha a importância do tema.

3.8 *Salmonella* spp.

No final do século XIX foram identificadas as primeiras bactérias do gênero *Salmonella*. A descrição morfológica desta bactéria foi feita, em 1884, por Gaffky (BARROW, 1993; CORRÊA; CORRÊA, 1992).

O nome do gênero *Salmonella* foi proposto por Lignières, em 1900, em homenagem ao patologista norte-americano Daniel Elmer Salmon (MERCHANT; PACKER, 1980). A partir de 1925, começaram a serem utilizadas as provas sorológicas na identificação, sendo incluídos no gênero *S. typhimurium* e *S. paratyphi*. Posteriormente, foram descritos vários sorotipos de *Salmonella* spp., atingindo aproximadamente 900 sorotipos, que deram origem ao esquema de Kauffman-White, reconhecido a partir de 1932 (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Recentemente, *S. Typhimurium* DT104 emergiu no Reino Unido. Este patógeno é curioso por apresentar um padrão múltiplo de resistência a antimicrobianos. As taxas de mortalidade entre humanos e animais contaminados por esta bactéria são elevadas (WHO, 2003).

Pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos, formam gás a partir da glicose, excetuando-se os sorovares *S. gallinarum* e *S. pullorum*. Apresentam ainda como características metabólicas bem definidas, a capacidade de descarboxilação da lisina e ornitina, produção de gás sulfídrico e utilização de citrato como fonte única de carbono (RODRIGUES, 2005). Estas

bactérias não formam esporos, são catalase-positivas, oxidase-negativas, redutoras de nitratos a nitritos e, geralmente, móveis com flagelos petríquios, exceção da *S. galinarum* e da *S. pullorum* (GERMANO e GERMANO, 2001).

Os membros do gênero *Salmonella* são caracterizados pela morfologia de bastonete medindo 0,7 – 1,5 X 2 – 5 µm. Metabolicamente são quimiorganotróficos tanto pela via respiratória como pela fermentativa. Os carboidratos usualmente fermentados incluem L-arabinose, maltose, D-manitol, D-mannose, L-rhamnose, D-sorbitol, trehalose, D-xylose. Necessitam, como temperatura ótima para multiplicação, de 37°C (LE MINOR, 1984).

Comparando com outros bastonetes Gram negativos, as salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais. A adaptabilidade fisiológica de *Salmonella* spp. é demonstrada por sua habilidade para proliferar em pH entre 7.0-7.5 (extremos 3.8-9.5), temperaturas de 35- 43°C (extremos de 5 a 46°C) e uma atividade hídrica de 0,99 até 0,94, podendo ser observadas variações entre sorovares ou cepas. A bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70°C, no entanto a termo-resistência pode incrementar-se com menor coeficiente de água. A inativação ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com atividade de água superior a 0,95. Atividades de água inferiores aumentam a termo-resistência (RODRIGUES, 2005).

Segundo Silva Junior (2001), o gênero *Salmonella* tem grande importância para a saúde coletiva, considerando-se seu caráter zoonótico e sua ampla distribuição na natureza. Entre os 2.500 sorotipos de bactérias deste gênero existentes, a maioria, tem sido responsável principalmente por surtos de doenças de origem alimentar em vários países do mundo, incluindo o Brasil.

O sorotipo de maior significância em saúde pública é o da *Salmonella enteritidis* (POPPE, 1994). No Brasil, significativo aumento de *S. enteritidis* foi detectado, tornando-se, o sorotipo de *Salmonella enterica* mais frequentemente isolado de casos de infecções humanas, e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo humano (RODRIGUES, 2005).

Tassou et al. (2004) encontraram *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo enteritidis PT4 em peixes e produtos pesqueiros, e justifica o fato pela capacidade de sobrevivência do patógeno em baixas temperaturas.

Para agravar a situação da salmonelose no cenário mundial, passaram a ser relatados nos Estados Unidos, surtos de infecção alimentar com amostras resistentes a vários antibióticos, como a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfas e tetraciclina (CODY et al., 1999). Em um estudo de um ano de duração, realizado entre 1998 e 1999, pelo “United States Food Safety Inspection Service”, 14% dos frangos de corte positivos para *Salmonella* spp. tinham o sorotipo *Typhimurium*, esta proporção foi de 9.5% em gado de corte, 3.8% em perus e 23% em suíno (SMITH et al., 2002)

Segundo Jay (2005), a síndrome da infecção por *Salmonella* spp. é causada pela ingestão de alimentos que contenham números significativos de espécies do gênero. Os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos, embora períodos mais curtos e longos já tenham sido relatados. Consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia. A taxa de mortalidade é de 4,1%, em média. Os principais alimentos envolvidos em surtos de salmonelose são: carne bovina, carne de peru, carne de frango, sorvete, carne suína, produtos lácteos, ovos, produtos de panificação, entre outros. Em vista da distribuição mundial desta bactéria, o controle de salmoneloses será alcançado tornando animais e pessoas, portadores assintomáticos, livres deste microrganismo, além de se evitar contaminações cruzadas.

Silva (2004) publicou uma pesquisa de surto de toxi-infecção que acometeu 28 pessoas, em cujas fezes, foram identificadas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*. Estudos epidemiológicos indicaram que o veículo da contaminação foi o sanduíche de tomate seco com queijo branco servido pelo bufê.

Embora sua patogenicidade seja conhecida, num estudo conduzido por Hsun et al. (2005), *Salmonella* spp. foi responsável por apenas 4,9% dos surtos de origem alimentar ocorridos em Taiwan de 1995 a 2001.

3.9 *Vibrio parahaemolyticus*

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 (MATTÉ et al. 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 (JAY, 2005).

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 et al. 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 et al. 2004; SÃO PAULO, 2004).

Atualmente existem mais de 90 espécies de *Vibrio* propostas, das quais 63 foram validadas até 2004 (ROUX et al., 2005). Dentre estes, estão incluídos outros agentes que são considerados potencialmente patogênicos e capazes de causar problemas de saúde coletiva, relacionados com infecções em humanos como: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* (MATTÉ, 2003).

Os mecanismos de patogenia dos víbrios não estão completamente esclarecidos. As estirpes patogênicas de *V. parahaemolyticus* são conhecidas por produzirem uma hemolisina termoestável responsável pela reação de Kanagawa.

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 parahaemolyticus* 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 (BUTT et al. 2004); GERMANO e GERMANO, 2003). Outros sintomas incluem dor abdominal, náuseas, vômitos e febre (BUTT et al. 2004).

Os peixes e moluscos (em geral ostras), crus ou mal cozidos, 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 et al., 2004; SÃO PAULO, 2004).

Numerosos casos de gastroenterite registrados no Japão, Estados Unidos e Europa associados à ingestão de frutos do mar, têm como agente causal o *Vibrio parahaemolyticus*. No Japão, inclusive, este agente é a principal causa de enfermidades de origem alimentar (JAY, 2005). Entretanto, poucos são os relatos sobre a ocorrência desta bactéria em alimentos comercializados no Brasil e sua incidência em casos de gastroenterites (SAAVEDRA et al, 2004), embora Magalhães et al (1991) tenham descrito a ocorrência desta bactéria em 7,1% de fezes diarréicas humanas analisadas. Isto é explicado por Jay (2005) devido ao fato de sua detecção em água só ocorrer entre 19-20°C; por não crescer a 4°C e nem acima de 44°C.

Na pesquisa sobre ocorrência de *V. parahaemolyticus* em mexilhões do litoral de Santa Catarina feita por Archer et al (1994), em 52,5% das amostras foi constatada a presença desta bactéria, com níveis de contaminação entre <3 e 93 NMP/g, embora nenhuma dessas culturas tenha apresentado positividade para o teste de Kanagawa, que caracterizaria sua virulência.

Num estudo semelhante com 50 amostras de mexilhões e ostras comercializados na cidade de Niterói, Pereira et al. (2004) isolaram 141 cepas da espécie, mas nenhuma destas culturas foi positiva para o teste de Kanagawa.

De acordo com a grande relevância do assunto e do patógeno em questão, Chen (2004), com o objetivo de avaliar a presença de *Vibrio parahaemolyticus* ematum, coletou amostras vendidas em pontos comerciais de São Paulo, comparando a sazonalidade da contaminação e avaliando a sensibilidade do microrganismo a antibióticos.

Estudos com “sashimi” comercializado em restaurantes no Brasil foram conduzidos para identificar possíveis riscos à saúde dos consumidores de alimentos crus, que são produtos de mais alto risco, e as pesquisadoras obtiveram importantes dados relacionados à Saúde Coletiva (MARTINS; SANTOS, 2006).

Ogawa (2001) conduziu uma pesquisa onde foram obtidos importantes dados epidemiológicos a respeito dos 8.383 casos de intoxicação alimentar causada por este microrganismo ocorridos no Japão no período de 1975 a 1999, o que facilitou a adoção de medidas preventivas por partes de Órgãos de Saúde do país.

3.10 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS

Germano e Germano (2003), descrevem bactérias mesófilas como microrganismos cujo crescimento atinge uma temperatura ótima de 30°C a 45°C, sendo a mínima 5°C e a máxima, 47°C.

Neste grupo de bactérias, estão inseridos os principais patógenos envolvidos em doenças de origem alimentar. Por este motivo, é importante, na maioria das pesquisas, mesmo quando específicas para um patógeno, quantificar as BHAM para se fazer uma avaliação geral dos mesófilos presentes no alimento em questão (HUTTEN, 2000).

As BHAM são consideradas como índice de sanidade, e sua ausência indica que a manipulação e as condições de conservação foram adequadas (JAY, 2005).

Em sua pesquisa com peixes frescos comercializados em Seropédica, Agnese (2001) concluiu que os valores encontrados para a contagem de mesófilos e enumeração de coliformes totais revelam a importância de um maior controle na higiene de elaboração e comercialização.

Lira (2001), quando pesquisou a qualidade dos peixes comercializados em Maceió, AL, os resultados microbiológicos quanto à Contagem de BHAM revelaram que 82% das amostras testadas apresentavam até 6,0 LOG₁₀ UFC/g, enquanto que 17,8% apresentaram contagens de 7,0 LOG₁₀ UFC/g e concluiu que os estavam sendo comercializados em condições sanitárias insatisfatórias.

3.11 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTRÓFICAS

O uso de baixas temperaturas para conservar alimentos está baseado no fato de que o crescimento microbiano pode ser retardado por temperaturas acima da de congelamento e pode ser inibido por temperaturas abaixo do congelamento. A razão para isso é que todas as reações metabólicas dos microrganismos são catalisadas por enzimas, e a taxa de catálise é dependente da temperatura (JAY, 2005).

Atualmente, é amplamente aceito pelos pesquisadores da área de microbiologia que um psicrotrófico é um organismo que pode crescer sob temperaturas entre 0°C e 7°C e produzir colônias visíveis ou turbidez dentro de sete a dez dias (FORSYTHE, 2002).

Dentre os três intervalos de temperatura distintos para estocagem de alimentos sob baixas temperaturas estabelecidos, destacam-se para este estudo, as temperaturas de refrigeração, compreendidas entre 0°C e 7°C, idealmente não superiores a 4,4°C (FORSYTHE, 2002).

Segundo Jay (2005), o crescimento de bactérias já foi demonstrado a -20°C. Os alimentos mais comumente associados a esse fenômeno são bacon, sorvetes, frutas, suco de frutas concentrados, pois contém crioprotetores que diminuem o ponto de congelamento da água.

Abreu (2005), em sua dissertação, concluiu que amostras de peixe-sapo irradiado mantiveram a melhor qualidade bacteriológica e sensorial, quando receberam 5,0 kGy, pois esta concentração de radiação gama, reduziu mais eficientemente a concentração de BHAP no alimento.

Oliveira (2005), obteve em suas análises em camarão, valores de 5,34 a 13,39 LOG₁₀ UFC/g amostras de camarão inteiro e descabeçado, mantidos a 0°C e sugeriu maior controle higiênico-sanitário na aquisição da matéria-prima, para obter melhores resultados.

Jesus (2001), avaliando a estabilidade microbiológica de carnes de peixes amazônicos congeladas, observou que a estocagem do produto por 150 dias sob baixas temperaturas diminui a atividade microbiana reduzindo as concentrações de BHAP.

3.12. ANTIMICROBIANOS

Segundo Jay (2005), os agentes antimicrobianos são substâncias de origem biológicas e/ou sintéticas que produzem toxicidade seletiva sobre microrganismos.

Andrade (2000) pesquisou a sensibilidade “in vitro” a cinco antibióticos e quimioterápicos, 291 cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de 667 amostras de leite procedentes de 375 vacas reagentes ao “California Mastitis Test” (CMT).

Tavares (2000) descreveu que a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no germe durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na seqüência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da

resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, freqüentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons.

Segundo Bauer (1966), essas substâncias existem sob duas formas diferentes: quimioterápicos e antibióticos. A fundamentação de seus efeitos pode ser descrita como :inibição do crescimento de microrganismos ainda que na presença do agente (ação bacteriostática); ação de lise das células microbianas (ação bactericida).

Quanto ao mecanismo de ação, os agentes antimicrobianos são classificados como: drogas que atuam sobre a parede celular; que atuam sobre a membrana celular; que afetam síntese protéica; que afetam o metabolismo dos ácidos nucléicos interferindo na sua síntese; que interferem em alguma fase do metabolismo intermediário das bactérias (BAUER, 1966).

Existem diversas técnicas disponíveis para se medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Na maioria dos casos, o teste de difusão em Agar é o método de eleição para se testar a sensibilidade das bactérias patogênicas de rápido crescimento (CLSI, 1990).

No Brasil, na atualidade, os estafilococos, tanto o *S. aureus* como o *S. epidermidis*, mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar (FARIAS et al. 1997; JAY, 2005; TAVARES, 2000).

Lange (2006), pesquisou a ocorrência de MRSA apresentando o fenótipo βL^r em 60 amostras de *S. aureus* obtidas do laboratório clínico do Instituto de Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG), localizado no Rio de Janeiro, RJ e ainda 15 amostras de MRSA obtidas de pacientes de Porto Alegre, RS e 6 outras de paciente do Rio de Janeiro, devido à grande importância do tema frente aos Órgãos de Saúde Coletiva.

3.13. PADRÕES BACTERIOLÓGICOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, através da RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, preconiza parâmetros bacteriológicos para alimentos, referindo a pratos prontos para o consumo (alimentos prontos para consumo de cozinha, restaurantes e similares), indicando 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 = 10^2 NMP/g; Estafilococos coagulase positiva = 5×10^3 UFC/g; *V. parahaemolyticus* = 10^3 NMP/g; e *Salmonella* spp. = ausência/25 g (BRASIL, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Serão descritos o material e os métodos utilizados no desenvolvimento do experimento.

4.1 MATERIAIS PERMANENTES

- auto-clave
- balança analítica de precisão
- banho-maria
- bico de bunsen
- contador de colônias
- destilador
- estufa bacteriológica regulada a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- fogão
- forno Pasteur
- geladeira
- halômetro
- microscópio óptico
- “stomacher”
- termômetro
- pipeta automática 1000 microlitros

4.2 MATERIAIS DE CONSUMO

- Agulha e alça de platina

- Álcool a 70%
- Algodão hidrófilo e hidrófobo
- Discos da Polysensidisc DME
- Embalagens plásticas para “stomacher”
- Placas de Petri descartável
- Ponteiras descartáveis para pipetador automático
- Tubos tipo “Ependorf”
- Vidrarias: becher, balão volumétrico, erlenmeyer, funil, tubos de ensaio, bastão de vidro, bastão do tipo Hockey
- Meios de cultura: Agar Baird-Parker; Agar BHI; Agar LIA; Agar Mueller Hinton; Agar nutriente; Agar nutriente sal 3%; Agar padrão para contagem; Agar Rambach; Agar TSI; agar tiosulfato citrato sais biliares (TCBS); Água de peptona tamponada; Caldo BHI (cérebro-coração); Caldo EC; Caldo glicose sal teepol (GSTB); Caldo Fluorocult LMX; Caldo peptonado sal 3%; Caldo Salmosyst; Emulsão de gema de ovo a 50%; H₂O₂ 3%; Peptona de carne bacteriológica; Plasma de coelho oxalatado; Solução salina 0,85%; Solução salina peptonada 0,1%; Soro anti *Salmonella* polivalente “O”; Tablete de enriquecimento Salmosyst.
- Reagentes: Alfa-naftol; Cristal violeta; Fucsina; Lugol; Reativo de Kovac’s; Telurito de potássio

4.3 METODOLOGIA DA ANÁLISE DOS PONTOS CRÍTICOS

Escolheram-se dois restaurantes de auto-serviço no município do Rio de Janeiro, denominados X e Y, cujas condições de preparação de alimentos fossem distintas quanto ao aspecto de estrutura física (edificação, instalações), e cujas características hipoteticamente pudessem determinar diferenças entre os resultados bacteriológicos das amostras analisadas.

Acompanhou-se todo o processamento do objeto de estudo, o “sashimi”, observando e avaliando criticamente todas as etapas do processo, em ambos os estabelecimentos, para identificar os pontos críticos encontrados na elaboração do produto. Para esta avaliação crítica, foram estudados e usados como ferramentas Legislações Sanitárias e pesquisas científicas de autores já citados anteriormente, principalmente a RDC 216 da ANVISA (BRASIL 2004).

A partir da determinação dos pontos críticos, iniciou-se a avaliação bacteriológica dos alimentos e superfícies de contato direto com o mesmo.

4.4 AMOSTRAGEM

Foram coletadas 48 amostras de cada estabelecimento, perfazendo um total de 96 amostras, sendo oito amostras de cada produto descrito: produto “in natura” (matéria-prima, denominada amostra “A” – FIGURA 16); produto final antes da exposição aos clientes no bufê de auto-serviço, denominada amostra “B” (FIGURA 19); produto final depois de duas horas de exposição no bufê a 8°C-11°C, denominada amostra “C” (FIGURA 20); suabes de mãos dos manipuladores diretos, denominada amostra “D”; suabes das lâminas de corte de contato direto das facas de contato direto na preparação, denominada amostra “E”; suabes das placas de corte em altileno de contato direto na preparação, denominada amostra “F”.

4.5 METODOLOGIA DAS ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

A coleta foi realizada com objetos (pegador ou talher em aço inoxidável) previamente sanitizados com álcool 70%, e as amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo, visando à manutenção de sua temperatura, e encaminhadas dentro de um período de três horas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária - UFF, onde foram realizadas as análises bacteriológicas de: Contagem de BHAM, BHAP e *Staphylococcus* coagulase positiva, isolamento e identificação de *Salmonella* spp., e enumeração de *Vibrio parahaemolyticus*, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, comparando os resultados com os padrões estabelecidos para o produto nas legislações sanitárias vigentes e entre os estabelecimentos comerciais.

Os procedimentos das análises bacteriológicas seguiram as determinações da Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003), excetuando-se a técnica de isolamento e identificação de *Salmonella* spp., que seguiu a descrição feita por Pignato (1996).

A descrição dos procedimentos analíticos desempenhados no laboratório encontra-se a seguir.

4.5.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS

Para pesagem e preparo da amostra, realizou-se pesagem de 25g da amostra, adicionou-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1%; homogeneizou-se por 120 segundos em “stomacher”. Assim, obtinha-se a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuaram-se as demais diluições desejadas em tubos “ependorf” contendo 0,9 mL de solução salina peptonada 0,1%. Semeou-se 0,1 mL de cada diluição selecionada, com pipetador automático, em placas de Petri estéreis. Adicionaram-se cerca de 10 a 15 mL de Agar Padrão para Contagem (APC) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C até o momento da vazagem. Homogeneizou-se adequadamente o agar com o inóculo, deixando-se solidificar em superfície plana. Posteriormente, incubaram-se as placas invertidas em estufa () a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Para a leitura, selecionaram-se as placas que continham entre 25 e 250 colônias. A partir dos resultados obtidos, calculou-se o número de bactérias presentes na amostra em análise, expressando o resultado em LOG_{10} UFC/g.

4.5.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTÓFICAS

Para pesagem e preparo da amostra, realizou-se pesagem de 25 g da amostra, adicionou-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1%; homogeneizou-se por 120 segundos em “stomacher”. Assim, preparava-se a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}), foram preparadas as demais diluições desejadas em tubos “ependorf” contendo 0,9 mL de solução salina peptonada 0,1%, com auxílio de pipetador automático. Semeou-se 0,1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis. Adicionaram-se cerca de 10 a 15 mL de APC fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C até o momento da vazagem. Homogeneizou-se adequadamente o agar com o inóculo, deixando-se solidificar em superfície plana na bancada da cabine de análise. Posteriormente, incubaram-se as placas invertidas a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Para a leitura, selecionaram-se as placas que continham entre 25 e 250 colônias. A partir dos resultados obtidos, calculou-se o número de bactérias presentes na amostra em análise, expressando o resultado em LOG_{10} UFC/g.

4.5.3 CONTAGEM DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

4.5.3.1 Contagem

Para o preparo da subamostra, pesaram-se 25 g da amostra, adicionaram-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1%; homogeneizando-se por 120 segundos em “stomacher”. Assim, foi preparada a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram preparadas as demais diluições desejadas em tubos “ependorf” contendo 0,9 mL solução de salina peptonada 0,1%. Posteriormente, semeou-se 0,1 mL de cada diluição selecionada sobre a superfície seca do agar Baird-Parker, previamente preparado com a adição de telurito de potássio e gema de ovo esterilizada, vazado e solidificado em placa de Petri. Com o auxílio de alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. Incubaram-se as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Para a leitura, selecionaram-se as placas que continham entre 20 e 200 colônias. Contaram-se as colônias típicas: pretas brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio. Não foram encontradas colônias atípicas (acinzentadas ou pretas brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos). Registraram-se as contagens de colônias típicas e selecionaram-se três a cinco colônias de cada placa e semeou-se cada colônia em tubos contendo caldo BHI (FIGURA 9), para posterior realização de provas confirmatórias. Incubaram-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas.

4.5.3.2 Provas confirmatórias

Prova da coagulase: Transferiu-se 0,3 mL de cada tubo de cultivo em caldo BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho. Incubaram-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas. Verificou-se a presença de coágulos, considerando os critérios segundo Varnam (1991), como se segue:

Reação negativa: não formação de coágulo;

Reação 1+ : coágulo pequeno e desorganizado;

Reação 2+ : coágulo pequeno e organizado;

Reação 3+ : coágulo grande e organizado;

Reação 4+: coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprende mesmo quando o tubo é invertido.

Para reações de coagulação do tipo 3+ e 4+, foram consideradas provas positivas para *Staphylococcus* coagulase positiva. Quando a reação de coagulação foi negativa, desconsiderou-se a possibilidade de a espécie presente ser *Staphylococcus* coagulase positiva.

Também foram realizadas avaliações das características morfo-tintoriais através de esfregaço com coloração pelo método de Gram. A presença de cocos Gram positivos confirmaram os resultados obtidos na prova da coagulase (FIGURA 21).

Para confirmação, foi realizada a prova da catalase, conforme o seguinte método: com auxílio de alça de platina, estéril, retirou-se uma alíquota do cultivo em agar BHI e transferiu-se para placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Misturou-se o inóculo ao peróxido e observou-se a reação. Para a não observação da formação de efervescência considerou-se prova negativa para catalase. Para a observação da formação de borbulhas considerou-se prova positiva para catalase.

4.5.3.3 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Após o isolamento e identificação, os cultivos de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, segundo o método recomendado por CLSI (1990). Utilizaram-se os polidiscos da Polisensidisc DME.

Prepararam-se placas de Petri contendo 20 mL de Agar Mueller Hinton, com pH em torno de 7,2-7,4. A suspensão bacteriana utilizada foi ajustada com solução salina esterilizada para uma turbidez padrão de Bauer et al. (1966), correspondente ao número um da escala Mc Farland, que representa um total de 3×10^8 de bactérias/mL de meio de cultura. Esta escala nefelométrica constitui o padrão de turvação mais freqüentemente utilizado nos laboratórios para determinar a intensidade da multiplicação bacteriana em meios de cultivo líquido. Quanto maior o número de bactérias, maior a opacidade do meio.

Com uso de suabe estéril, inoculou-se o cultivo líquido, em toda a superfície do meio, em pelo menos três sentidos, girando a placa após cada espalhamento.

Então, foram colocados cuidadosa e assepticamente os discos de sensibilidade sobre a placa, com auxílio de pinça previamente flambada.

Os discos utilizados foram dos módulos I e IV. O módulo I é constituído pelos antibióticos: Clindamicina; Eritromicina; Oxacilina; Penicilina G; Teicoplanina; Vancomicina. Por sua vez, o módulo IV contém os seguintes antibacterianos: Aztreonam; Cefoxitina; Ceftriaxona; Clorafenicol; Gentamicina; Tetraciclina.

As placas com os polidiscos foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após este período, observaram-se os halos de inibição (FIGURA 22) que foram mensurados com auxílio de um halômetro, conforme ilustrado na Figura 23 (milímetros). A interpretação do teste foi baseada na tabela que determinava as medidas padrões dos halos de inibição de cada antimicrobiano, segundo a classificação: resistente, intermediário, moderadamente sensível e sensível.

4.5.4 NMP DE *Vibrio parahaemolyticus*

Foram pesados 50g da amostra e adicionaram-se 450 mL de Caldo peptonado sal 3%. Homogeneizou-se por 120 segundos em “stomacher”. Assim, se obteve a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuaram-se as demais diluições desejadas em caldo peptonado sal 3%.

4.5.4.1 Provas presuntivas

Volumes de 0,1 mL foram inoculados em três séries de tubos para cada uma das diluições desejadas de três tubos “ependorf” contendo 0,9 mL de GSTB. Incubaram-se os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Para a leitura, verificou-se a presença de turvação do meio, pois indica a suspeita da presença de *Vibrio parahaemolyticus*. Anotou-se o número de tubos de cada série que apresentaram turvação.

4.5.4.2 Isolamento em Agar TCBS

A partir de cada tubo de GSTB que apresentou turvação, sem agitá-lo e com auxílio de uma alça de platina estéril, retirou-se uma alíquota do crescimento da superfície, com auxílio de alça de platina, e estriou-se sobre a superfície seca de

agar TCBS (FIGURA 12). As placas foram incubadas em posição invertida a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Para a leitura, verificou-se o aparecimento de colônias arredondadas, opacas, de cor azul esverdeada, com dois a três mm de diâmetro, típicas de *Vibrio parahaemolyticus*. Quando não houve formação de colônias suspeitas, o resultado foi considerado negativo para o tubo de origem.

4.5.4.3 Prova de identificação

Posteriormente, foram realizadas provas preliminares para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*. De cada placa com colônias supostamente típicas no TCBS, selecionaram-se de 2 a 3 colônias típicas e transferiram-nas simultaneamente para tubos contendo caldo peptonado sal 3% e agar nutriente sal 3% inclinado. Incubaram-se os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A partir do cultivo mantido em agar nutriente sal 3%, procedeu-se a verificação das características morfo-tintoriais a partir de esfregaço em lâmina com seguinte coloração pelo método de Gram. Onde não foram observados bastonetes retos ou curvos Gram negativos, a prova foi considerada negativa para *Vibrio parahaemolyticus*.

4.5.5 ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES – NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Pesaram-se 25g da amostra e adicionaram-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Homogeneizou-se por 120 segundos em “stomacher”. Assim, se efetuou a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuaram-se as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1%.

Para a realização das provas presuntivas, inocularam-se volumes de 0,1 mL de cada uma das diluições desejadas em séries de três tubos “ependorf” contendo 0,9 mL solução salina peptonada 0,1%. Incubaram-se os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. A confirmação de coliformes termotolerantes é indicada pela presença de fluorescência no tubo “ependorf” quando observado sob luz ultravioleta. Para a prova confirmativa de *Escherichia coli*, pingaram-se duas gotas de reativo de Kovacs em cada tubo positivo na fluorescência para observação da formação de anel vermelho, que confirma a presença desta espécie patogênica. O resultado obtido para cada tubo foi anotado, bem como a diluição utilizada. A partir da combinação

de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo nos testes confirmativos de fluorescência (coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, como único representante deste grupo de bactérias), verificou-se o Número Mais Provável, usando-se a tabela de NMP (BRASIL, 2003).

4.5.6 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE *Salmonella* SPP.

4.5.6.1 Pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento seletivo

Para o preparo da subamostra, pesaram-se 25g da amostra, adicionaram-se 225 mL de caldo “Salmosyst” e homogeneizou-se por 120 segundos em “stomacher”. Esta é a diluição 10^{-1} . Incubou-se em estufa a 35°C por seis horas. Retirou-se alíquota de 10 mL da suspensão pré-enriquecida e transferindo-a para tubo de ensaio contendo tablete de suplemento *Salmosyst*; homogeneizou-se e incubou-se em estufa a 35°C por 24 horas. Do tubo, transferiu-se com alça de platina estéril, pequena alíquota para placa de Petri contendo meio Rambach e estriou-se por esgotamento. Sucessivamente, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas (FIGURA 11). Nas placas, onde foram observadas colônias vermelhas ou rosas-escuro, foram retirados inóculos, com auxílio de alça de platina, e posteriormente inoculadas em tubos contendo meios TSI e LIA para provas de triagem.

4.5.6.2 Reações em agar TSI

Inoculou-se no agar TSI, através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel. Incubou-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. No agar TSI, estão presentes: glicose (1,0 g/L), lactose (10,0 g/L) e sacarose (10,0 g/L). Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, é rapidamente fermentada anaerobiamente, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol (todos os membros da família *Enterobacteriaceae* fermentam a glicose com produção de ácido). A fermentação aeróbia da glicose, que ocorre na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a CO_2 e água. A grande maioria das bactérias do gênero *Salmonella* spp. não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando

alterações no meio TSI (que contém esses dois açúcares). A maioria das salmonelas apresenta no TSI (FIGURA 13) as seguintes reações: Ácido na base, com ou sem produção de gás. Alcalino ou inalterado no bisel. Com produção de H₂S.

4.5.6.3 Confirmação Sorológica

Ressuspendeu-se o cultivo obtido em agar nutriente inclinado (de 18 a 24 horas) em aproximadamente dois mL de solução salina 0,85%. Em lâmina de vidro, depositou-se separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "O" (PROBAC DO BRASIL), diretamente do frasco. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão em teste. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura com iluminação sobre fundo escuro em um a dois minutos.

A classificação da reação deu-se do seguinte modo:

- Positiva: presença de aglutinação somente na mistura cultivo + anti-soro;
- Negativa: ausência de aglutinação em ambas as misturas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se obter a distribuição normal, colocaram-se os dados reais da contagem para logaritmo na base 10 para uniformização dos mesmos (aproximando-os da normalidade).

Os testes possuem intervalo de confiança de 95%. Quando N é grande (>30) pode-se eliminar dados discrepantes. Como N=8, a homogeneização dos dados foi a maior possível para se aproximar da normalidade e usar a distribuição normal para realizar o tratamento estatístico.

O tratamento estatístico das análises bacteriológicas foi realizado segundo o Teste T-student. O nível de significância adotado foi de 5% (THRUSFIELD, 1986).

5. RESULTADOS

Foram considerados pontos críticos no processamento do “sashimi”: a matéria-prima, todas as superfícies de contato direto com o produto (mão do manipulador, lâmina das facas de corte e placas de corte) e o binômio tempo-temperatura de manipulação, manutenção e exposição do produto ao consumidor.

Os resultados das análises realizadas nesta pesquisa estão detalhadamente representados nas tabelas localizadas nos apêndices no item nove.

Todos os resultados de contagens estão expressos em LOG₁₀ UFC/g amostra, facilitando a análise estatística através da maior aproximação da normalidade dos valores obtidos, sendo utilizado o Teste T-Student para tratamento estatístico dos resultados. Os resultados de NMP estão expressos conforme tabela de interpretação do Anexo III da Instrução Normativa N° 62 (BRASIL, 2003).

Foi observada ausência de *Vibrio parahaemolyticus* em 100% das amostras analisadas, tanto no estabelecimento X, quanto no Y.

Pôde-se constatar a presença de *Salmonella* spp. em oito das 64 amostras de alimentos analisadas (12,5%). No estabelecimento X, 100% das amostras testadas foram negativas para esta bactéria. Das 32 amostras testadas no estabelecimento Y, 25% das amostras continham *Salmonella* spp. (TABELA 6), sendo seis amostras de alimentos e duas, de mãos dos manipuladores de alimentos.

Em relação à contagem de BHAM para superfícies de contato direto com o alimento, coletadas através de suabes (mãos, facas e placas de corte), foram encontrados os seguintes resultados no estabelecimento X (TABELA 3): três amostras de mãos de manipuladores, três de facas de corte e duas amostras de placas de corte utilizadas no preparo direto do alimento, obtiveram contagens superiores a 6,0 LOG₁₀ UFC/g de amostra. As amostras, cujos resultados ficaram acima desta concentração, totalizaram 33,3% das superfícies de contato analisadas

neste estabelecimento (TABELA 6). As contagens obtidas variaram entre 1,00 e 9,93 LOG₁₀ UFC/g de amostra (TABELA 3).

No estabelecimento Y (TABELA 4), uma amostra de mão de manipulador, três de facas de corte e duas amostras de placas de corte de contato direto com o alimento continham mais de 6,0 LOG₁₀ UFC/g amostra. Estes resultados representam 25% (TABELA 6) das superfícies testadas para este grupo de bactérias no estabelecimento Y. As contagens obtidas variaram entre 1,30 e 9,81 LOG₁₀ UFC/g de amostra (TABELA 4).

Pôde-se constatar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em três das 96 amostras analisadas (3,1%).

No estabelecimento X, 4,2% das amostras testadas, representados por duas amostras de alimentos, continham esta bactéria em concentrações superiores a 3,0 LOG₁₀ UFC/g de amostra (TABELA 6). As contagens obtidas variaram entre 0 e 4,83 LOG₁₀ UFC/g de amostra (TABELA 1).

Das 48 amostras testadas no estabelecimento Y, 2,1% das amostras continham *Staphylococcus* coagulase positiva (TABELA 6), sendo uma amostra de alimento. As contagens obtidas variaram entre 0 e 5,04 LOG₁₀ UFC/g de amostra (TABELA 2).

Em relação à contagem de BHAP para alimentos, foram encontrados os seguintes resultados no estabelecimento X (TABELA 1: 12 amostras, obtiveram contagens superiores a 7,0 LOG₁₀ UFC/g de amostra, sendo: cinco de matéria-prima "A"; quatro, de "sashimi" antes da exposição no bufê "B" e três, do "sashimi" após a exposição no bufê "C". As amostras, cujos resultados ficaram acima dessa concentração, totalizaram 50,0% dos alimentos testados neste estabelecimento (TABELA 6). As contagens obtidas variaram entre 3,85 e 9,60 LOG₁₀ UFC/g de amostra (TABELA 1).

No estabelecimento Y (TABELA 2), cinco amostras de alimentos continham mais de 7,0 LOG₁₀ UFC/g amostra, sendo: uma de matéria-prima; uma de "sashimi", antes da exposição no bufê e três, do "sashimi" depois da exposição no bufê. Estes resultados representam 20,8% das amostras testadas para este grupo de bactérias no estabelecimento Y (TABELA 6). As contagens obtidas variaram entre 1,48 e 8,03 LOG₁₀ UFC/g amostra (TABELA 2).

No total, foram encontradas concentrações superiores a 7,0 LOG₁₀ UFC/g amostra em 35,4% dos alimentos testados para BHAP (TABELA 6).

No teste de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* encontrados nas amostras testadas frente a dois diferentes grupos de antimicrobianos (MÓDULO I E MÓDULO IV), obtiveram-se grandes variações nos resultados absolutos, obtidos ao medir o halo de inibição do crescimento da bactéria (TABELA 8).

Na Tabela 9, pode ser observada a seguinte classificação da sensibilidade das cepas do patógeno frente aos antimicrobianos: para a Clindamicina, 66,7% das cepas testadas demonstrou-se resistente, 26,7%, intermediário e 6,7%, sensível ao antimicrobiano; para a Eritromicina, os resultados foram 60,0%, 26,7% e 3,3%, respectivamente; para a Oxacilina, a sequência de resultados foi, 60,0%, 6,7% e 33,3%; para a Penicilina G, 66,7% das cepas testadas demonstrou-se resistente e 33,3%, sensível; para a Teicoplanina, 80,0% foram resistentes, 13,3%, intermediários e 6,7%, sensíveis; 46,7% das cepas testadas demonstraram-se resistentes e 53,3%, sensíveis ao antimicrobianos.

Para os antimicrobianos do Módulo IV, os resultados foram os seguintes: para Aztreonam, 100% resistente; Cefoxitina, 60% resistente e 40% sensível; Ceftriaxona, 66,7% das cepas testadas demonstraram-se resistentes, 6,7%, intermediários, 20,0% moderadamente sensíveis e 6,7%, sensíveis ao antimicrobiano; para o Clorafenicol, 73,3% das cepas testadas demonstrou-se resistente, 6,7%, intermediário e 20,0%, sensível; Gentamicina, a sequência foi de 80%, 6,7% e 13,3%, respectivamente; e finalmente, para a tetraciclina, 66,7% das cepas foram resistentes e 33,3% sensíveis (TABELA 9).

6. DISCUSSÃO

As variáveis do estudo foram selecionadas ao avaliar previamente o processo de elaboração do “sashimi”, verificando e identificando os pontos críticos do processamento, os quais poderiam determinar a origem da contaminação de quaisquer amostras que viriam a ser analisadas durante a pesquisa. Matéria-prima, produto final e superfícies de contato direto com os alimentos foram analisadas para avaliar as condições higiênico-sanitárias, que determinariam a inocuidade do alimento em questão.

Para que o estudo obtivesse êxito em sua proposta, foi necessário avaliar e monitorar outros fatores que poderiam influenciar nos resultados das análises, tornando-os, então, invariáveis, como o binômio tempo e temperatura na estocagem, manipulação, manutenção e exposição do alimento.

Analisando os resultados para *Vibrio parahaemolyticus*, em cujo estudo observou-se ausência desta bactéria para todas as amostras testadas, pode-se constatar que os resultados (TABELA 5) estão de acordo com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001).

Embora houvesse diferença nas condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos X e Y durante a manipulação do alimento, estes fatores não determinaram diferenças nos resultados obtidos para *V. parahaemolyticus*, tanto para X quanto para Y (TABELA 7), visto que a mais provável razão da presença deste patógeno nos alimentos, caso estivesse presente, seria uma contaminação oriunda desde a aquisição da matéria-prima, e não uma contaminação consequente à manipulação (FIGURAS 17 e 18) do produto frente às condições a que estavam expostos.

Embora a patogenicidade deste microrganismo é discutida em documentos publicados pela FAO (2003) onde estão descritos que os *Vibrio parahaemolyticus*

designados como patogênicos nem sempre o são, pois na maioria das espécies selvagens faltam os fatores de colonização necessários para a aderência e penetração, toxinas apropriadas ou outros determinantes da virulência necessários para causar a doença, os dados desta pesquisa são relevantes, pois a presença deste patógeno nos alimentos, principalmente naqueles consumidos crus, em concentrações superiores a $5,0 \log_{10}$ (JAY, 2005) levaria a uma intoxicação no consumidor, aumentando os custos públicos com os serviços de saúde.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram observados na pesquisa de *V.parahaemolyticus* em 20 amostras de “sashimis” comercializados em São Paulo, realizada por Santos (2006).

Estes resultados também estão de acordo com os obtidos por Herrera et al. (2006), num estudo sobre microrganismos patogênicos, incluindo *V. parahaemolyticus*, em peixes marinhos frescos comercializados na Espanha, onde 100% das amostras foram negativas para esta bactéria.

Também similares, foram os resultados obtidos por Chen (2004) em pesquisa realizada com atum, em São Paulo, na qual constatou que apenas três das 112 amostras analisadas, continham esse patógeno, e ainda assim, obteve baixos valores de NMP, quando comparados aos limites estabelecidos na legislação (BRASIL, 2001).

No entanto, comparando os dados do presente estudo com os resultados obtidos por Martins (2006), observam-se significativas diferenças, já que o *V. parahaemolyticus* foi isolado em 35% das 20 amostras analisadas em “sushi” e “sashimi”, sendo este um dado muito importante quanto aos aspectos relacionados à Saúde Coletiva.

Pereira (2004) analisando várias espécies patogênicas da família *Vibrionaceae*, em amostras de ostras comercializadas em restaurantes de Niterói, Rio de Janeiro, isolou 264 culturas, sendo 40% destas, *V. parahaemolyticus* e alertou para o grave risco à população que consome este tipo de alimento sem tratamento térmico.

Outro fator de grande importância relacionado ao *Vibrio parahaemolyticus* é sua resistência frente aos antimicrobianos. Embora este fator não tenha sido pesquisado neste estudo, Saavedra (2004), observou nas estirpes de *Vibrio spp.* estudadas, resistência de 80% à carbenicilina, de 40% à amoxicilina e ampicilina e de 100% à estreptomicina, o que são dados de alto valor aos Órgãos de Saúde.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, a constatação da presença de *Salmonella* spp. em 12,5% das amostras de alimentos analisadas, e que por esta razão, estavam impróprias para o consumo segundo os padrões microbiológicos da legislação (BRASIL, 2001), e ainda da contaminação do mesmo patógeno em duas das 16 amostras (12,5%) de mãos dos manipuladores diretos dos alimentos, caracterizam falhas evidentes em uma ou mais etapas de elaboração do alimento, significando dizer que o alimento coletado, assim como o suabe da superfície da mão do manipulador, encontravam-se em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias segundo os padrões legais ou científicos (BRASIL, 2001; JAY, 2005), e portanto, comprometendo a inocuidade do produto analisado.

Esses valores são de grande relevância, devido ao alto grau de patogenicidade da *Salmonella* spp., que levou a legislação a exigir sua ausência em 25 gramas de amostra analisada para que o alimento seja considerado próprio para o consumo (BRASIL, 2001).

É importante ressaltar que de todas as amostras analisadas no estabelecimento X, obteve-se ausência da bactéria em 25g de amostra.

As edificações e instalações do estabelecimento Y contavam com características como climatização do ambiente de manipulação e câmaras frigoríficas específicas para peixes, o que levou a uma falsa hipótese de que seriam obtidos melhores resultados bacteriológicos nas análises, quando fossem confrontados com o estabelecimento X. Isto porque os alimentos produzidos no estabelecimento Y estariam menos expostos a variações de tempo-temperatura durante as etapas compreendidas na elaboração do produto final antes de sua exposição ao consumo: estocagem, pré-preparo, preparo e manutenção; e ainda menos expostos a fatores que determinam contaminações cruzadas, o que aumentaria a contaminação do alimento e/ou superfícies (HUTTEN, 2000). Entretanto, esta pré-suposição não foi confirmada quando as análises foram realizadas, pois melhores resultados foram obtidos no estabelecimento X para pesquisa de *Salmonella* spp., conforme pode-se observar na Tabela 7.

Esses resultados que contrariaram a hipótese supracitada podem ser explicados pela ocorrência de falhas durante o processo de elaboração do produto, o que pode ser independente das características físicas do estabelecimento, tais como: a aquisição de matéria-prima sem devido controle de suas qualidades microbiológica e físico-química e de sua temperatura de transporte; o tempo

excessivo gasto na manipulação do produto durante a elaboração; as condições precárias de higiene durante a manipulação; a existência de portadores assintomáticos de *Salmonella* spp.. Este tipo de falha pode ser minimizado ou eliminado com Educação Sanitária e Treinamentos sobre a segurança dos alimentos, que embora existissem no local, pôde-se constatar que houve falha na execução das orientações.

Outra provável explicação para esse resultado que contraria a pré-suposição de um melhor resultado para o estabelecimento Y, é o fato de que, no presente estudo, os resultados bacteriológicos obtidos neste local foram contagens menores de BHAM e BHAP, e menor NMP de coliformes termotolerantes, quando comparado com os resultados do estabelecimento X, conforme os dados contidos nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Por esta razão, ou seja, a grande quantidade de outras bactérias presentes no meio nas amostras do estabelecimento X, podem provocar competições microbiológicas entre os microrganismos contaminantes presentes e/ou produção de bacteriocinas excretadas por outras espécies de bactérias presentes em maior número nas amostras analisadas do estabelecimento X, tornando o meio desfavorável à sobrevivência da *Salmonella* spp. nestas amostras. A ocorrência de bacteriocinas, inclusive colicinas, foi descrita por Jay (2005) e Forsythe (2002).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a contaminação por *Salmonella* spp., nas amostras do estabelecimento Y, pode ter origem na matéria-prima (A), o que teria como consequência a presença da bactéria também nas amostras de produto final antes e depois da exposição ao consumo (B e C, respectivamente) pois ambas são oriundas de "A". O mesmo raciocínio se aplica para explicar a origem da contaminação das mãos do manipulador (D), pois a superfície em questão entra em contato direto com o alimento já contaminado "A". A contaminação do alimento, como consequência de contaminações cruzadas já foram propostas por Forsythe (2002), Jay (2005) e Silva Junior (2001).

Resultados similares aos do presente estudo foram encontrados por Santos (2006) em pesquisa com 20 amostras de "sashimis" comercializados em São Paulo, onde constatou a presença de *Salmonella* spp. em 15% dos alimentos, que foram também considerados impróprios para o consumo.

Resultados melhores do que os da atual pesquisa foram divulgados num estudo com "sashimis", desenvolvido pela FEDH (2000), no qual microrganismos patogênicos foram encontrados em apenas 0,26% das 906 amostras de "sashimi"

analisadas, sendo que *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus* foram encontrados apenas em duas amostras dos produtos separadamente.

Martins (2006), testando o mesmo produto, observou ausência de *Salmonella* spp. em 100% das amostras testadas. O resultado é igual ao obtido por Adesiyun (1993), que constatou ausência desta bactéria em 61 amostras de peixes analisadas. Schulz et al. (2003) também observaram ausência deste patógeno analisando amostras de “sushi” e de peixes crus, o que representa bons resultados aos consumidores deste tipo de alimento.

Os dados do presente estudo foram melhores do que os obtidos numa pesquisa conduzida por Menezes et al. (2006) em Fortaleza, Ceará, na qual foi constatada uma ocorrência alarmante de 50% de *Salmonella* spp. em “sashimi” e que mereceu especial atenção dos Órgãos de Saúde Pública.

Na pesquisa conduzida por Tassou et al. (2004), os pesquisadores explicam a ocorrência de *Salmonella enterica* pelo fácil desenvolvimento do patógeno em frutos do mar. Este fundamento justificaria a presença da bactéria nestes tipos de alimentos, inclusive naqueles já prontos para o consumo, trazendo um fato de grande importância aos Órgãos de Saúde.

Com relação aos manipuladores de alimentos, em 2004 ocorreu uma toxinfecção alimentar em São Paulo, acometendo 51% dos participantes de um evento. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium foi considerada a causadora do problema. Não foi determinada como ocorreu a contaminação, mas a identificação de um manipulador portador assintomático da bactéria confirma a hipótese da contaminação no preparo (SILVA et al., 2004).

Em pesquisa realizada por Almeida (1995), realizada em mãos de manipuladores, *Salmonella* spp. não foi isolada, apresentando resultado diferente do presente estudo.

Nas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, 4,2% das 48 amostras testadas no estabelecimento X (TABELA 6 e FIGURA 1), foram insatisfatórias, segundo os padrões estabelecidos (BRASIL, 2001). Tratam-se de: matéria-prima (“amostra A”) e do “sashimi” depois da exposição ao consumo no bufê a 10°C por duas horas (“amostra C”). Devido ao fato de estes resultados terem sido obtidos em dias de análises diferentes, não é possível justificar a contaminação de “C” como consequência da contaminação de “A”.

No estabelecimento Y, resultados não satisfatórios, segundo os padrões (BRASIL, 2001), foram encontrados apenas para uma amostra de “sashimi” depois da exposição no bufê a 10°C por duas horas (“C”), representando um total de 2,1% das 48 amostras testadas no local (TABELA 6).

Neste estudo, 3,1% das amostras de alimentos e superfícies testadas (TABELA 6) continham *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites estabelecidos (Brasil, 2001), conforme pode ser observado na Tabela 5.

No caso da amostra “C”, pelo que se pode constatar, a contaminação ocorreu durante a exposição ao consumidor, possivelmente ocasionada por perdigotos, contaminação do ar, e/ou outros tipos de contaminação cruzada, visto que o produto encontrava-se distribuído em bufê de auto-serviço. Este fato mostra a importância de haver proteção superior para qualquer alimento pronto para o consumo exposto à venda direta para o consumidor (BRASIL, 2004).

Por se tratar de bactérias produtoras de enterotoxinas, causadoras de intoxicações nos consumidores, deve haver um rigoroso controle higiênico-sanitário da produção dos alimentos. Isso é possível desde que se observe as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de aquisição, transporte, recebimento e estocagem da matéria-prima, pré-preparo, preparo, manutenção e distribuição do alimento, para que não se atinjam concentrações acima de 6,0 LOG₁₀ UFC/g amostra, que ofereceria o risco da produção das toxinas (JAY, 2005).

Forsythe (2002) relata que alimentos mantidos abaixo de 4,4°C até o momento do consumo, estão livres de enterotoxinas, desde que possuam baixas contagens da bactéria. Por esta razão, o cumprimento das normas de Boas Práticas de Produção dos alimentos, com relação à higiene e ao binômio tempo-temperatura, são fundamentais para se obter um alimento inócuo a ser distribuído ao consumidor.

É exatamente a produção das toxinas por parte destas bactérias que traz importância ao estudo para os Órgãos de Saúde Coletiva (JAY, 2005).

Resultados semelhantes aos da presente pesquisa foram obtidos num estudo conduzido por Santos (2006) com “sashimi”, que encontrou este patógeno acima dos limites estabelecidos (BRASIL, 2001) em 5% das amostras testadas.

Esses dados foram mais satisfatórios que os obtidos por Martins (2006), que encontrou em 15% das amostras testadas, *Staphylococcus* coagulase positiva em concentrações acima de 3,0 LOG₁₀ UFC/g amostra (BRASIL, 2001), demonstrando

que toda essa porcentagem de “sashimi”, o objeto de estudo, se encontrava imprópria para o consumo.

Os resultados das análises do presente estudo, quando comparados com pesquisas em alimentos similares, apresentam diferenças, conforme descritos por Aquino et al. (1996), que analisaram 45 amostras de pescado na cidade de Manaus, Brasil, encontrando 20% das amostras com altas concentrações (BRASIL, 2001) de *Staphylococcus aureus* e aos encontrados por Dams et al. (1996) que constataram a presença deste patógeno acima das concentrações (BRASIL, 2001) em 20% de pescado inteiro congelado na cidade de Florianópolis.

Hiluy et al. (1996), avaliando 22 amostras de peixe, ostras e camarão, verificaram a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em 50% das amostras de camarão e 20% das amostras de peixe, descrevendo também a manipulação inadequada na captura, processamento e manuseio.

Para 100% das superfícies de contato direto com o alimento, que foram testadas, e são consideradas pontos críticos de controle na elaboração do produto por Dias (1998), tanto no estabelecimento X, quanto no Y, obtiveram-se resultados satisfatórios segundo critérios descritos por Jay (2005), não se considerando um dado de grande relevância neste estudo e, portanto, não pode ser considerado um fator determinante na contaminação do alimento em questão. Este é mais um dado que conduz à evidência de a contaminação das amostras de alimentos por esta bactéria ser oriunda da matéria-prima ou da contaminação por consumidores durante a exposição do produto à venda, e não de contaminação cruzada durante o processamento.

Comparando, entretanto, estatisticamente os valores obtidos, embora todos os resultados tenham sido satisfatórios, o estabelecimento X obteve melhores contagens deste patógeno para as amostras “E” e “F” em relação ao estabelecimento Y (TABELA 7 e FIGURA 5).

Num estudo conduzido por Vargas e Quintaes (2003), encontrou-se *Staphylococcus* coagulase positiva em 37,5% dos monoblocos de contato direto com peixes comercializados em São Paulo, Brasil, que diferem dos valores encontrados na presente pesquisa, representando um grave risco à saúde da população, considerando a ocorrência de contaminações cruzadas e, principalmente, o consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos (HUTTEN, 2000).

Com relação às mãos dos manipuladores, através dos dados deste estudo, revelaram-se 4,2% de amostras de mãos contaminadas por esta espécie bacteriana no estabelecimento X e 2,1% no estabelecimento Y (FIGURA 5), porém nenhum destes valores ultrapassou os limites toleráveis (JAY, 2005), variando de 0 a 1,70 LOG₁₀ UFC/mão (TABELAS 3, 4 e 6).

Estes dados corroboram com os obtidos por Munhoz (2006) que obteve contagem variando de 0 a 2,2 LOG₁₀ UFC/mão de *Staphylococcus coagulase* positiva.

Almeida (1995) obteve como contagens de *S. aureus* em mãos de manipuladores de alimentos, variando desde 5,0 X 10 a 7,0 X 10⁵ UFC/mão.

Estes dados são fundamentais à condução de pesquisas sobre portadores assintomáticos, que são riscos potenciais aos alimentos por eles manipulados (HUTTEN, 2000). Raddi (1988) pesquisando o mesmo tema encontrou 44,1% do total de manipuladores de alimentos testados portadores de *Staphylococcus aureus* em fossas nasais e mãos, sendo que 75,0% destes apresentaram cepas com vínculo epidemiológico. A partir destes achados evidencia-se o risco potencial representado pelas mãos nas intoxicações alimentares, responsáveis por diversas sintomatologias, conforme descritos em documentos da SVS (Brasil, 2005).

Trabalhos realizados por Andrade e Zelante (1989) avaliando a ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos, verificaram que 24,8% das linhagens isoladas foram enterotoxigênicas.

A enumeração pelo Número Mais Provável de coliformes termotolerantes foi considerada superior aos padrões higiênico-sanitários estabelecidos na legislação vigente (BRASIL, 2001), em uma amostra de “A” (matéria-prima/peixe cru) e três amostras de “C” (“sashimi” depois da exposição no bufê a 10°C por 2 horas) testadas e coletadas no Estabelecimento X (TABELAS 1 e 3).

No estabelecimento Y, uma amostra de “B” (“sashimi” antes da exposição ao consumo) e uma de “C”, encontraram-se acima dos limites toleráveis, segundo Brasil (2001) e conforme pode ser observado na Tabela 2.

Os demais resultados da pesquisa de coliformes termotolerantes das amostras coletadas em ambos os estabelecimentos, apresentaram-se dentro dos padrões (BRASIL, 2001), embora em todas as análises, se pôde comprovar a presença deste patógeno, ainda que em níveis pouco significativos (TABELAS 1, 2, 3, 4 e 5 e FIGURAS 1, 2, 3 e 4).

Com os resultados obtidos na enumeração por NMP de coliformes termotolerantes demonstra-se que em ambos os estabelecimentos, ocorreram erros graves em uma ou mais etapas da elaboração do produto, não descartando a possibilidade de a origem do problema estar na baixa qualidade bacteriológica da matéria-prima adquirida, trazendo como consequência, a ocorrência deste patógeno acima dos limites toleráveis (BRASIL, 2001) em 6,25% dos alimentos testados no estabelecimento X, e em 4,2% dos alimentos testados no estabelecimento Y (TABELA 6). Isto representa risco ao consumo do produto, já que estas amostras são consideradas impróprias para o consumo humano, mas ainda assim foram usadas no processo de obtenção do produto final. Ainda assim, o estabelecimento Y obteve um resultado mais satisfatório que o estabelecimento X, com relação ao NMP de coliformes termotolerantes (TABELA 7).

Estes dados corroboram com os encontrados por Pinheiro (2006) em pesquisa realizada com “sushi” e “sashimi”, onde 30% das amostras continham concentrações alarmantes deste tipo de microrganismo, sob o ponto de vista de Saúde Coletiva, atingindo uma média de NMP entre $< 3,0$ a $2,4 \times 10^5$.

Este alto percentual de amostras analisadas contaminadas com coliformes termotolerantes em níveis acima do estabelecido em lei (BRASIL, 2001), também foi relatado por Lavelberg (2005) que descreveu que 25% das amostras de “sushi” e “sashimi” colhidas em oito restaurantes japoneses do Distrito Federal, Brasil, continham coliformes termotolerantes acima dos limites toleráveis (BRASIL, 2001).

Comparando os resultados obtidos por Martins (2006) que encontrou este patógeno em 50% das amostras de “sashimi” pesquisadas, e por Santos (2006), cujo resultado obtido foi de 10% das amostras com valores acima dos padrões estabelecidos (BRASIL, 2001), o presente estudo obteve contagens inferiores, mas ainda assim alerta a possíveis riscos à saúde humana, visto que trouxe informações sobre alimentos impróprios para o consumo expostos à venda (FIGURA 20).

Um outro resultado alarmante sobre este grupo de bactérias em “sashimi” foi obtido por Soares (2004), que encontrou o patógeno em 66,4% das amostras testadas.

Considerando os resultados da pesquisa de coliformes termotolerantes deste estudo, cuja principal evidência recai sobre a matéria-prima, visto que os utensílios e mãos de manipuladores não continham a mesma contaminação, a principal forma de prevenção é selecionar matérias-primas de melhor qualidade, podendo-se, inclusive

avaliar tecnicamente as condições higiênico-sanitárias dos produtores de pescado, avaliando também suas embalagens e rotulagem (FIGURA 14), e as condições sanitárias do produto no recebimento da matéria-prima conforme a RDC nº 216 da ANVISA (BRASIL, 2004) recomenda (FIGURA 15).

Também se deve considerar a etapa de preparação (FIGURAS 18 e 19) que é muito 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 enfermidades. Dados epidemiológicos sobre doenças de origem alimentar demonstram que elas geralmente são conseqüências de erros gerados na preparação dos alimentos, entre outros fatores, contaminação cruzada com alimentos crus, armazenagem inadequada e cozimento inadequado (BASTI et al. 2006).

Com relação à contagem de BHAM das superfícies de contato direto com os alimentos do estabelecimento X, obtiveram-se resultados diferentes quando confrontados estatisticamente com os resultados das análises do estabelecimento Y (FIGURA 7), onde igualmente se obteve contagens acima do limite tolerável (JAY, 2005), para as mesmas amostras, placas de corte, lâminas de facas de corte e mãos do manipulador, porém em concentrações menores. Além disso, uma menor quantidade de amostras contaminadas com altas concentrações foi encontrada em "X", quando comparado com "Y" (33,3% e 25%, respectivamente).

Estes dados são evidências da ocorrência de falhas relativas às condições higiênico-sanitárias, as quais as superfícies estavam expostas durante elaboração do alimento, pois atingiu contagens acima de 6,0 LOG₁₀ UFC/g amostra.

A legislação Brasileira (BRASIL, 2001) não prevê limites para a contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas em pescado, entretanto, segundo Jay (2005) e Forsythe (2002), contagens acima de 6,0 LOG₁₀ UFC/g amostra para BHAM, podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças de origem alimentar.

Agnese et al. (2001) relataram que valores de microrganismos mesófilos superiores a 6,0 LOG₁₀ UFC/g de carne de peixe são considerados críticos com relação ao grau de frescor, embora Lira et al. (2001) tenham observado que alguns pescados que apresentaram número superior a 6,0 LOG₁₀ UFC/g não estavam com seus caracteres alterados, enquanto que outros com número inferior, na análise sensorial, eram desclassificados.

Munhoz (2006) obteve como resultados: 4,0 LOG₁₀ UFC/g de BHAM pesquisando mãos de manipuladores, em São Paulo.

Almeida (1995) obteve em seu estudo até 7,0 LOG₁₀ UFC/g de BHAM em mãos de manipuladores de alimentos.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods estabelece como limite microbiológico sanitário para alimentos 7,0 LOG₁₀ UFC/g de amostra de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (ICMSF, 1986).

Nas análises de BHAP nos alimentos pesquisados, obtiveram-se resultados não satisfatórios (ICMSF, 1986) para 66,7% dos alimentos testados no estabelecimento X (TABELAS 1 e 6). Já no estabelecimento Y (TABELAS 2 e 6), 33,3% das amostras foram consideradas impróprias para o consumo, segundo os limites toleráveis (ICMSF, 1986).

Portanto, 50% dos alimentos testados para este grupo de bactérias nesta pesquisa, continham concentrações acima dos limites toleráveis (ICMSF, 1986), indicando falhas no controle higiênico-sanitário na elaboração do produto (FORSYTHE, 2002).

Comparando tanto os resultados que se encontravam dentro dos limites, quanto os que se enquadravam acima dos limites (ICMSF, 1986), o estabelecimento X obteve contagens superiores, relacionando os resultados com a ocorrência de falhas no processamento do alimento enquanto o resultado da análise para o estabelecimento Y foi mais satisfatório (FIGURA 6).

Resultados similares foram obtidos por Abreu (2005), em amostras de peixe-sapo "in natura" resfriado, onde encontrou 6,88 LOG₁₀ UFC/g amostra de BHAP, e ainda por Jesus (2001), que obteve contagens médias de 6,81 LOG₁₀ UFC/g. Porém, em pesquisa deste grupo de bactérias em camarão branco do pacífico, Oliveira (2005) obteve contagens variando de 5,34 a 13,39 LOG₁₀ UFC/g.

Considerando o estudo completo envolvendo todos os grupos de bactérias estudados, de todos os valores obtidos e comparados entre os estabelecimentos X e Y, somente houve diferença significativa, considerando um intervalo de confiança de 95%, para a amostra "A" (peixe cru/matéria-prima) na pesquisa de BHAP (FIGURA 6); na amostra "D" (mão de manipulador do alimento) na análise de BHAM (FIGURA 7); e nas amostras "E" e "F" (faca e placa de corte/superfícies de contato, respectivamente) para análise de *Staphylococcus* coagulase positiva (FIGURA 5).

Nas duas primeiras análises comparativas, o estabelecimento X obteve os piores resultados.

Os resultados de ambos os estabelecimentos evidenciam riscos no consumo deste alimento, considerando a associação destes fatores: ocorrência de doenças de origem alimentar, possibilidade de colonização do trato intestinal, germes com múltipla resistência a antimicrobianos, consumidores classificados como grupos de risco.

Dos 12 antimicrobianos testados, o *Staphylococcus coagulase positiva* demonstrou maior percentual de sensibilidade à Vancomicina, com 53,3% de sensibilidade, e o maior percentual de resistência frente à Aztreonam, cujo grau de resistência foi de 100% (FIGURAS 8 e 9).

Considerando o aspecto da multi-resistência dos *Staphylococcus aureus* frente aos antimicrobianos, associado ao risco ao consumidor, principalmente aos grupos de risco já mencionados neste estudo, Farias et al. (1997), obteve o seguinte resultado: os antimicrobianos que apresentaram maior atividade “in vitro” contra amostras de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistentes (ORSA) (100% sensibilidade). Oitenta e sete por cento das amostras de *Staphylococcus aureus* oxacilina sensíveis (OSSA) foram sensíveis à ciprofloxacina, enquanto que, para os ORSA, a sensibilidade foi de apenas 38%.

Das 291 cepas de *S. aureus* isoladas, 90,72% analisadas por Andrade (2000) foram sensíveis à gentamicina, 89,35% à enrofloxacina, 88,66% à cefaperazona, 87,63% à kanamicina e 23,71% à penicilina. A gentamicina foi o antibiótico de maior ação sobre o *S. aureus*.

Estudo realizado por Albuquerque (2007), obteve como resultado 100% das cepas isoladas resistentes à ampicilina e 44% apresentaram multi-resistência, e esse fato é de extrema importância, visto que a bactéria não responde a diversos tratamentos para infecções. Logo, é mais que necessário, utilizar-se de procedimentos preventivos da contaminação por estes microrganismos antibiótico-resistentes. Essas medidas compreendem as BPF na elaboração dos alimentos. Os fatores que levam a essa resistência podem estar contidos nos plasmídeos e transposons.

Ainda sobre a resistência deste patógeno frente a antimicrobianos, Lange (2006) analisou 23 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) e concluiu que: todas as amostras foram sensíveis para vancomicina,

linezolide, gentamicina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, teicoplanina, mupirocina e rifampicina. E ainda que todas as amostras testadas apresentaram fenótipo de resistência somente aos antibióticos β -lactâmicos ou, adicionalmente, até no máximo 3 antimicrobianos, acompanhada de susceptibilidade à gentamicina.

Todos os aspectos relacionados à Saúde Coletiva já discutidos nesta pesquisa comprovam a total importância desses achados.

7. CONCLUSÕES

1 – Após avaliação do processo e identificação dos pontos críticos no processamento do “sashimi”: a matéria-prima, todas as superfícies de contato direto com o produto (mão do manipulador, lâmina das facas de corte e placas de corte) e o binômio tempo-temperatura de manipulação, manutenção e exposição do produto ao consumidor, conclui-se que há necessidade de monitoramento de todos os fatores mencionados para garantir a inocuidade do alimento.

2 – De acordo com os resultados das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, BHAM e BHAP, assim como da enumeração de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, no estabelecimento Y obtiveram-se os melhores resultados quando comparados com o estabelecimento X, segundo o padrão estabelecido na RDC 12/2001 da ANVISA.

3 – A edificação e instalações do estabelecimento Y, tais como: climatização do ambiente, câmaras frigoríficas específicas para peixes e fluxos de produção sem cruzamentos entre área suja e área limpa nas áreas de manipulação do alimento, que permitem que os alimentos produzidos no local estejam menos expostos a variações de tempo-temperatura durante as etapas compreendidas na elaboração do produto final antes de sua exposição ao consumo, contribuíram para este resultado.

4 – Segundo os padrões estabelecidos na RDC 12/2001 da ANVISA para um ou mais grupos de microrganismos testados, 8,3 % das amostras de matéria-prima testadas e 29% das amostras de produto final, foram classificadas como impróprias para o consumo.

5 – Segundo padrões estabelecidos por pesquisadores já mencionados, foram insatisfatórios os resultados das análises de superfícies de contato direto com o alimento, ou seja, os pontos críticos do processamento avaliados no estudo, 33,3%, no estabelecimento X e 25%, no Y.

6 – A presença de *Salmonella* spp. em amostras do estabelecimento Y, sugere que houve competição e/ou interferência de outros fatores de crescimento para este gênero, dificultando seu desenvolvimento nas amostras do estabelecimento X.

7 – A presença *Salmonella* spp. e de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, BHAM e BHAP em valores superiores aos estabelecidos pelas fontes mencionadas, constitui-se num problema de saúde coletiva, uma vez que o produto encontrava-se livremente exposto à venda direta ao consumidor.

8 – Os resultados evidenciam riscos no consumo deste alimento, considerando a associação destes fatores: ocorrência de doenças de origem alimentar, possibilidade de colonização do trato intestinal, germes com múltipla resistência a antimicrobianos, consumidores classificados como grupos de risco.

9 – Segundo as conclusões do presente estudo, sugere-se que sejam intensificadas as pesquisas acerca do tema, principalmente relativas ao objeto de estudo, o “sashimi”, e das ações de vigilância sanitária realizada pelo Município do Rio de Janeiro, a fim de evitar riscos no consumo do produto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.G.. *Caracterização sensorial e análise bacteriológica do peixe-sapo (Lophius gastrophysus) refrigerado e irradiado*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói. 90p. 2005.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis e enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animais. Bacterioses y micosis.3.ed. *Publicacion Cientifica y Tecnica*. Organization Panamericana de la Salu (OPS). Washington, 2001.

ADAM, M.R.; MOSS, M.O. *Microbiologia de los alimentos*. 1 ed. Zaragoza (Espanha): Editora Acribia. Traduzido por Manuel Ramis Verges.1997. 463p.

ADESIYUN, A.A. Prevalence of *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. And toxigenic *Escherichia coli* on meat and seafood in Trinidad. *Food Microbiology*, n.10, p. 395-403. 1993.

AGNESE, A. P.; DE OLIVEIRA, V. M.; SILVA, P. P. O.; OLIVEIRA, G. A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 67-70, 2001.

ALBUQUERQUE, W.F., MACRAE, A., SOUSA, O.V. e col. Multi-resistência a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de uma feira de pescado e de seus manipuladores. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2007, v. 38, n. 1 [citado 2007-07-02], p. 131-134. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000100027&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 1517-8382

ALMEIDA, R.C.C.; KUAYE, A.Y.; SERRANO, A.M e col. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Rev. Saúde Pública*. [online]. ago. 1995, v.29, n.4 [citado 12 Maio 2006], p.290-294. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101995000400006&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0034-8910.

ANDRADE, F.S.V., CARNEIRO, M.J.M., MARTINS,M.L.L., CORDEIRO,C.A.M.. Avaliação sensorial e microbiológica do peruá (*Balistes capriscus*) capturado na região norte fluminense e comercializado no mercado de Campos dos Goytacazes – RJ. *Rev.Higiene Alimentar*, n.16, v.99, p.70-74, 2002.

ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T.. Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira* v.1, n.1, p. 53-57, jan./jun. 2000.

ANDRADE, G.P.; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. *Revista de Saúde Pública*, v. 23, n. 4, p. 277-84, 1989.

AQUINO, J.S.; VASCONCELOS, J.C.; INHANUMS, A.J.; SILVA, M.S.B. Estudo microbiológico de pescado congelado comercializado em Manaus (AM). *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 14, n. 1, p. 78-82, 1996.

ARCHER, R.M.B.; MORETTO, E.. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de banco natural do litoral do município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.10, n.3, 1994. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1994000300017&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 05 Ago 2007.

BARBONI, S.A.V.. 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. Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP, São Paulo; 2003.

BARROW, P. A. A *Salmonella* in control-past, present and future. *Avian Pathology*, v. 22, p. 651-69, 1993.

BASTI, A.A, MISAGHI, A., SALEHI, T.Z., KAMBAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food Control* 2006; 17: 183-188.

BAUER, A.W.; KIRBY, E.M.; TURCK, M.. Antibiotic Susceptibility Testing by standardized single disk method. Recopilado em *The American Journal of Clinical pathology*, n.45. 1966.

BRASIL. Ministério da Saúde - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Vigilância epidemiológica das Doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. *Boletim eletrônico epidemiológico*, Brasília, 28/12/2005. Ano 5, n.6, 2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf.. Acessado em: 22/10/2006.

_____. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2004.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, SDA nº 62 de 23/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2003.

_____. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC n. 12 de 02/01/2001, Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial* n. 07-E de 10/01/2001.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25/06/1962, 1.236 de 02/09/1994, 1.812 de 08/02/1996 e 2.244 de 04/06/1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1997.

_____, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. PORTARIA Nº 1.428 de 26 de novembro de 1993. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 dez.1993.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDRES,C.V.. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, N. 4, p.201 – 212, 2004.

CHEN,J.; SILVA,E.O.T.R.; PANETTA,J.C.; PINTO,J.P.A.N.. Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp.) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP. *Latin American Knowledge Harvester*, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações, USP, 01out 2004. disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-17062005-22613/oai:teses.usp.br:tde-17062005-122613>

Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI), *Performance Standards for Antimicrobial Dise Susceptibility Test*, v. 10, n. 7. 1990.

CODY, S. H.; ABBOTT, S. L.; MARFIN, A. A.; SCHULZ, B.; WAGNER, P.; ROBBINS, K.; MOHLE-BOETANI, J. C.; VUGIA, J. D. E col. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype *Typhimurium* DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. *Journal of the American Medical Association*, v.281, p.1805-1810, 1999. Disponível em: <<http://jama.ama-assn.org/cgi/search?fulltext=Two+outbreaks+of+multidrugresistant+Salmonella+serotype&submit>>. Acesso em: 23 jul. 2006.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, W.C. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 843 p. p.167-74.

CUNHA NETO, A., SILVA, C.G.M. e STAMFORD,T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. set./dez. 2002, vol.22, no.3 [citado 12 Maio 2006], p.263-271. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612002000300012&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0101-2061.

DAMS, R.I.; BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion striatus*) inteira e em filés nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 14, n. 2, p. 151-162, 1996.

DIAS, F.J.E.. *Avaliação microbiológica e análise de perigos e pontos críticos de controle do sushi e sashimi consumidos nos restaurantes do município do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1998.

DIAZ, J.H. Is fish consumption safe? *Journal of the Louisiana State Medical Society*, n.156,v. 1, p.42-9, 2004.

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

_____. Historical consumption and future demand for fish and fishery products: exploratory calculations for the years 2015/30. [on line] In: *FAO Fisheries Circular no 946*. Rome; 1999. Available from <URL:http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/005/x3216e/x3216e00.htm> [2006 jan 12]

_____. *Documento Técnico sobre as pescas*. Garantia da qualidade dos produtos da pesca, 1997.

FARIAS, W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I.L.; PIGNATARI, A.C.. Padrão de Sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. *Rev Ass Med Brasil*, v. 43,n.3, p. 199-204. 1997.

FEDH, Food and Environmental Hygiene Department. *Sushi and sashimi generally safe*. Edição de 28 de abril de 2000. Disponível em: <http://www.info.gov.hk/gia/general/200004/28/0428192.htm>. Acessado em 30 de setembro de 2006.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microb. Infect.* v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.

FIGUEIREDO, A.A.R. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) carreando a ilha SCCmec IV: um patógeno emergente em infecções no Brasil. Tese (Doutorado em Ciências/Microbiologia, Universidade federal do Rio de Janeiro. 150p. 2006.

FORSYTHE, S.T. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO,B.G.M., LANDGRF,M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2003.

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

FURLANETTO,S.M.P., LACERDA,A.A. e CERQUEIRA-CAMPOS,M.L. Pesquisa de alguns microrganismos em saladas com maionese adquiridas em restaurantes,

lancheonetes e "rotisseries". *Rev. Saúde Pública*. [online]. dez. 1982, vol.16, no.6 [citado 12 Maio 2006], p.307-316. Disponível na www: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101982000600001&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0034-8910. Acessado em: 22/10/2006.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*, 2. ed. São Paulo: Varela, 2003. 630p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 655p. p. 244–248.

GIBOTTI, A., SARIDAKIS, H.O.; PELAYO, J.S.; TAGLIARI, K.C., FALCÃO, D.P.. 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*. n.89, p.70-75, 2000.

HAHN, A. CHILE: Y0 N0 CREO en TRUCHAS, PERO QUE LAS HAY, LAS HAY! Acessado em 24/07/2007. Disponível em: <http://www.finefishing.com/whereto/southamerica/creotuc.htm>

HAMADA-SATO, N., USUI, K., KOBAYASHI, T., IMADA, C., WATANABE, E.. Quality assurance of raw fish base on HACCP concept. *Food Control*, n.16, p.301-307, 2005.

HERRERA, F.C.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCIA LOPES, M.L.. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal-of-Applied-Microbiology*. V. 100, n. 3, p. 527-536. 2006

HILUY, D.J.; PINHEIRO, H.C.G.; MOURÃO, A.F.; MACEDO, E.P.; CARVALHO, M.L.M.; PINTO, A. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no Estado do Ceará. *Rev. Higiene Alimentar*, v. 10, n. 45, p. 37, 1996.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D.. *Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos*, 6. ed. São Paulo: varela ed, 1999. 375p. Traduzido por: Marcelo Arruda Nascimento.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Staphylococcus* spp. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. WILLIAMS & S.T. WILKINS, 9 ed., Baltimore. M.D: 1994. 787p. p.544-551.

HSUN-P.S.; SHIOU-I.C.; JIN-L.T.; CHIH-L.L. and TZU-M.P.. Bacterial food-borne illness outbreaks in northern Taiwan, 1995–2001. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v.11, n.3, p.146-151, 2005. Capturado em: <http://www.springerlink.com/content/k009384n88726qh3>

HUDSON, A. J.; MOTT, S. J.; PENNEY, N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 3, p. 204-208, 1994.

HUSS,H.H., REILLY,A., EMBAREK,P.K.B.. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 2000; 11:149-156.

HÜTTEN,G.C. *HACCP na produção e distribuição de salpicão de frango em um restaurante "self-service": metodologia e ocorrência de coliformes fecais, E. coli e S. aureus.* Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000. 132p.

IABELBERG, C.. "Sushi" e "sashimi" de restaurantes de Brasília contém bactérias nocivas. *Instituto de Pesca – Governo de São Paulo. Fonte: Folha de S.Paulo, Abr/2005.* Disponível em: http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id_not=254. Acessado em 05/01/08.

ICMSF. 1986. *Recommended microbiological limits for seafoods.* 1986. Acessado em: 4 jan. 2007. Disponível em: <http://www.seafood.ucdavis.edu/orgnize/icmsf.htm>.

JACKSON,T.,C. ACUFF,G.R., DICKSON,S.J.. Meat, Poultry, and seafood. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* Washington: editora ASM Press,p.83 -100, ;1997.

JAY,J.M. *Microbiologia de alimentos.* 6 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005. 711p.

JESUS, R.S.; LESSI, E.; TENUTA-FILHO,A.. Estabilidade química e microbiológica de "minced fish" de peixes amazônicos durante o congelamento. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.21, n.2, p. 144-148, maio-ago. 2001.

KIETZMANN,U.; PRIEBE, K.; RAKOW, D.; REICHSTEIN, K. *Inspeccion Veterinaria de pescados.* Zaragoza, Espanha. Editorial Acribia, 1974. 326 p.

LANGE, A.A.R.. *Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) carreando a ilha SCCmec IV: um patógeno emergente em infecções no Brasil.* Tese de Doutorado em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

LE MINOR, L. Genus III – *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore: Willians and Wilkins, 1984. v. 1, p. 427-458. 964 p.

LIRA, G. M., PEREIRA, W. D., ATHAYDE A. H. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió - Al. *Revista Higiene Alimentar*, v. 15, n. 84, p. 67-74, 2001.

LOCKEN,J.K.. *The HACCP Food Safety Manual.* 1 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994, 317p.

MACHOSHVILI, I.A.; PENNA, T.C.V.; COLOMBO, A.J. Resistência térmicas de cepas de *Staphylococcus aureus* em solução tampão fosfato (pH 7,0) e em leite reconstituído. *Revista de Microbiologia*, v. 22, n. 4, p. 323-329, 1991.

MAGALHÃES, Vera et al. Gastroenteritis humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 33, n.1, 1991. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651991000100012&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 05 Ago 2007.

MARTINS, F.O.. *Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (“sushi” e “sashimi”) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo*. Dissertação Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2006.

MATTÉ, M.H., BALDASSI, L., BARBOSA, M.L., MALUCELLI, M.I.C., NITRINI, S.M.O.O., MATTÉ, G.R.. Virulence factors in *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control* 2006; Available online.

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

MATTÉ, G.R.. *Estudo de Vibrio spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares*. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP. São Paulo; 2003.

MENEZES, F.G.R.; SILVA, C.M.; CARVALHO, F.C.T.; SOUSA, D.B.R e VIEIRA, R.H.S.F. *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em “sushis” e “sashimis” comercializados na cidade de Fortaleza, Ceará, 2006.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R. A. *Bacteriologia e Virologia Veterinárias*. 3.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 768p. p.299-322.

MI, Y.P.; MOON, H.K.; SEUNG, T.C.; YOUNG, M.K.; KYUNG, S.K.; DONG, S.C.. A survey of microbial levels for food in large markets of Busan. *Food Science and Biotechnology*, v. 12, n.3, p. 274-277. 2003.

MOMESSO, A.P., MATTÉ, M.H., GERMANO, P.M.L.. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de restaurantes tipo self-service, por quilo, do município de São Paulo, durante o período de distribuição de refeições. *Revista Higiene Alimentar*, v.19, n.136, out. 2005.

MUNHOZ, P.M.. *Qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e avaliação dos conhecimentos sobre boas práticas por parte dos manipuladores de alimentos da Rede Municipal de ensino – Botucatu, SP*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2006.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) 1992. http://www.fsis.usda.gov/About_Fsis/NACMCF/index.asp

OGAWA, H.; TAKEDA, Y.; INOUE, K.; TOKUBO, Y.. *Bulletin of the Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment*. Japão, v.1, n.8, 2001.

OLIVEIRA,V.M.. *Estudo da qualidade do camarão branco do pacífico (Litopenaeus vannamei) inteiro e descabeçado estocado em gelo*. Tese de Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2005. 91p.

PACHECO,T.A., LEITE,R.G.M., ALMEIDA,A.C., SILVA,N.M.O., FIORINI,J.E.. Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescado de água doce. *Rev. Higiene Alimentar*, n.18, v. 116/117, p.68-72, 2004.

PEREIRA,C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P.. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciênc. Technol. Aliment.*, v.24, n.4, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400019&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 05 Ago 2006

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Revista de Microbiologia*, v. 25, n. 3, p. 161-165, 1994.

PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELE,M.C.; IANNOTTA,V.; CARACAPPA,S.; GIAMMANCO,G. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonella* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*,v.61, n. 5, p. 1995-1999. May, 1995, Palermo, Italy. 1996.

PIMENTEL,L.P.S., PANETTA,J.C.. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados da grande São Paulo. Parte 1, resultados microbiológicos. *Higiene Alimentar*. n,17, v.106,p. 56-57, 2003.

PINHEIRO, H.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T.; REIS, E.M.F.; SOUSA, V.; VIEIRA, G.H.F.; RODRIGUES, D.P.. *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes em “sushi” e “sashimi” comercializados na cidade de Fortaleza-Ceará. *Bol. Téc. Cient. CEPENE*, v. 14, n. 1, p. 23-31, 2006.

POPPE,C. *Salmonella enteritidis* in Canada. *Int. J. Food Microbiol.* n.21, p.1-5. 1994.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F. e MENDONCA,C.P.. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Rev. Saúde Pública*. [online]. fev. 1988, vol.22, no.1, p.36-40. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101988000100005&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0034-8910.

REIJ, M. W. , DEN AANTREKKER,E. D. ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.91, n.1, p.1-11, 2004

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

RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: *CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. Anais...*Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas, 2005, 2v. V.2, p. 223-237.

ROHAYA,M.A., CHUINK,B.H., 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*. n.28, v.77, 1997;

ROUX,F.L., GOUBET,A., THOMPSON,F.L., FAURY,N., GAY,M., SWINGS,J. e col. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters *Crassostrea gugas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n.55, p.2251-2255. 2005.

SAAVEDRA, M.J., BRITO, R.D., SOUSA, M. E col. Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*): susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2004, v.56, n.2 [citado 2007-07-02], pp. 277-279. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352004000200022&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0102-0935.

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

SANTOS,R.M.. *Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em Mercados Municipais da cidade de São Paulo, SP*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2006.

SCHLUNDT,J.. *New directions in foodborne disease prevention. International Journal of Food Microbiology* 2002; n.78, p. 3-17.

SCHULZ, S.G.; MUELLER, M.; JARK, U.; ETZEL, V.; HORN, D.; FELDHUSEN, F. Food hygienic examination of sushi products and the basic raw material. *Archiv-fuer-Lebensmittelhygiene*. V.54, n.2, p. 37-41. 2003.

SENAC/DN. *Elementos de Apoio para as Boas Práticas e Sistema APPCC no Setor Distribuição* (Qualidade e Segurança dos Alimentos): SENAC. Rio de Janeiro, 2004, 275p.

SILVA JUNIOR,E.A. *Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos*. 4 ed. São Paulo: Varela, 2001, 475p.

SILVA, M.C.D.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, A.W.O. Condições higiênico-sanitárias da carne de sol comercializada no município do Recife - Pernambuco. II.

Staphylococcus aureus enterotoxigênicos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 35, n. 2, p. 375-388, 1992.

SOARES, C.M., GERMANO, P.M.L., Análise da qualidade microbiológica de “sashimis”, comercializados em “shopping centers” da cidade de São Paulo, Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, v.18, n.116/117, jan/fev. 2004.

SOULTOS,N., ABRAHIM,A.; PAPAGEORGIOU,K., STESIS,V. Incidence of *Listeria* spp in fish and environment of fish markets in Northern Greece. *Food Control*. 2006.

SOUZA, L.H.L.. *O Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle como ferramenta de segurança alimentar*. aplicação ao serviço de abastecimento de uma organização militar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Curso de Pós-Graduação em Gestão e Estratégia de Negócios. Seropédica, 2006. 43p.

SMITH, K.; RACHID, M.A.; WILLINGHAM, E.; STURTZ, R.;ALMEIDA, C.Q. *Salmonella* DT104. *College of Veterinary Medicine*, 2002. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/VPP/NSEP/Brazil2002/salmonella/port/transmission.htm>>._Acessado: 23 jul. 2006.

STANSBY, M.E.. *Tecnología de la Industria Pesquera*. Zaragoza, Espanha. Editorial Acribia, 1968. 44 p.

TASSOU, C.C.; LAMBROPOULOU, K.; NYCHAS, G.J.E.. Effect of Prestorage Treatments and Storage Conditions on the Survival of *Salmonella enteritidis* PT4 and *Listeria monocytogenes* on Fresh Marine and Freshwater Aquaculture fish. *Journal of Food Protection*, v. 67, n. 1, p. 193-198. 2004

TAVARES, V.. Bactérias gram-positivas problemáticas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.33 n.3 Uberaba May/June 2000.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 2 ed. Londres, Inglaterra. Ed. Blackwell, 1986. 483p.

USA, *Codex Alimentarius and Recommended International Code of Practice for Fish and Fishery Products*, 1994.

http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10273/CXP_052e.pdf,

UYTTENDEAELE, M., TAVERNIERS,I., DEBEVERE,J. Effects of stress induced by suboptimal growth factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food. Microbiol.* v.66, n. 1-2, p31-37, 2001.

WATANABE,E.; KAMADA,Y; HAMADA-SATO,N.. Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on KI value. *Biosens Bioelectron*, v. 21, n. 3, p.534-538, England, 2005 Sep 15.

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

WIEFELS,R,. El consumo de pescado y las estrategias de comercialización. *Infopesca Internacional*, n. 16, p.11-19, 2003.

VARGAS,D.S.T. e QUINTAES,K.D. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. set./dez. 2003, v.23, n.3, p.517-522. Disponível na www: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000300036&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0101-2061. Acessado em: 13/07/2006

VARNAM,A.H.; EVANS, M.G. *Foodborn Pathogens*. London, Wolfe Publishing, 1991, 557p.

VIEIRA,R.H.S.F., RODRIGUES,D.P., BARRETO,N.S.E, SOUZA,O.V., TÔRRES,R.C.O., RIBEIRO,R.V. e col. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado; teoria e prática*. São Paulo: Varela; 2004.

YANO,Y., YOKOYAMA,M., SATOMI,M., OIKAWA,H., CHEN,S.S.. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. *Journal of Food Protection* n.67, v.8, p.1617-1623, 2004.

9. APÊNDICE

TABELA 1: Resultados das análises das amostras de alimentos no ESTABELECIMENTO X para: Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotólicas (BHAP), *Staphylococcus coagulase* positiva (Staphy. C+); *Samonella* spp.e NMP de Coliformes termotolerantes (Colif. Termot.)

| DIAS | AMOSTRAS | NMP/g | BHAP (LOG ₁₀ UFC/g) | Staphy. C+ (LOG ₁₀ UFC/g) | SALM (P/A) |
|------|----------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------|
| 1 | A | 43 | 4,15 | 0 | Aus |
| | B | 23 | 4,41 | 0 | Aus |
| | C | 4,6x10 ² | 6,20 | 1,00 | Aus |
| 2 | A | 2,4x10 ² | 7,34 | 0 | Aus |
| | B | 43 | 6,60 | 0 | Aus |
| | C | 43 | 6,61 | 0 | Aus |
| 3 | A | 3,6 | 7,21 | 0 | Aus |
| | B | 23 | 7,02 | 3,15 | Aus |
| | C | 43 | 6,98 | 0 | Aus |
| 4 | A | 38 | 9,29 | 0 | Aus |
| | B | 23 | 9,46 | 0 | Aus |
| | C | 23 | 9,60 | 0 | Aus |
| 5 | A | 23 | 8,34 | 4,83 | Aus |
| | B | 9,2 | 8,48 | 0 | Aus |
| | C | 35 | 8,83 | 0 | Aus |
| 6 | A | 23 | 8,26 | 0 | Aus |
| | B | 23 | 8,26 | 2,78 | Aus |
| | C | 2,4x10 ² | 8,49 | 3,78 | Aus |
| 7 | A | 9,2 | 4,85 | 0 | Aus |
| | B | 23 | 4,18 | 1,90 | Aus |
| | C | 23 | 5,25 | 1,90 | Aus |
| 8 | A | 23 | 4,11 | 1,85 | Aus |
| | B | 23 | 3,85 | 2,51 | Aus |
| | C | 1,1x10 ³ | 4,15 | 2,53 | Aus |

LEGENDA:

A = PEIXE CRU (MATÉRIA-PRIMA)

B = "SASHIMI" ANTES DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO

C = "SASHIMI" DEPOIS DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO MANTIDO A 10°C POR 2 HORAS

P/A = presença/ausência

Aus = Ausência em 25g de amostra

■ = VALORES ACIMA DO LIMITE TOLERÁVEL (BRASIL, 2001; JAY, 2005)

TABELA 2: Resultados das análises das amostras de alimentos no ESTABELECIMENTO Y para: Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotólicas (BHAP), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+); *Samonella* spp. e NMP de Coliformes termotolerantes (Colif. Termot.).

| DIAS | AMOSTRAS | NMP | BHAP (LOG ₁₀ UFC/g) | Stapy. C+ (LOG ₁₀ UFC/g) | SALM (P/A) |
|------|----------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------------|------------|
| 1 | A | 75 | 3,58 | 0 | Aus |
| | B | 23 | 5,43 | 0 | Pres |
| | C | 43 | 6,46 | 1,00 | Aus |
| 2 | A | 23 | 1,48 | 1,48 | Aus |
| | B | 2,4x10 ² | 2,72 | 0 | Aus |
| | C | 23 | 3,33 | 0 | Aus |
| 3 | A | 23 | 4,44 | 0 | Pres |
| | B | 23 | 5,26 | 0 | Pres |
| | C | 3,6 | 6,00 | 0 | Aus |
| 4 | A | 23 | 7,29 | 0 | Pres |
| | B | 93 | 7,44 | 2,92 | Pres |
| | C | 23 | 7,66 | 5,04 | Pres |
| 5 | A | 93 | 5,76 | 1,85 | Aus |
| | B | 43 | 5,81 | 1,60 | Aus |
| | C | 23 | 8,03 | 2,94 | Aus |
| 6 | A | 93 | 5,34 | 1,70 | Aus |
| | B | 43 | 6,45 | 1,00 | Aus |
| | C | 2,4x10 ² | 7,49 | 1,30 | Aus |
| 7 | A | <3,0 | 5,35 | 0 | Aus |
| | B | 9,2 | 5,12 | 0 | Aus |
| | C | 9,2 | 5,25 | 0 | Aus |
| 8 | A | 3,6 | 4,90 | 0 | Aus |
| | B | 7,4 | 5,74 | 0 | Aus |
| | C | 3,6 | 5,86 | 0 | Aus |

LEGENDA:

A = PEIXE CRU (MATÉRIA-PRIMA)

B = "SASHIMI" ANTES DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO

C = "SASHIMI" DEPOIS DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO MANTIDO A 10°C POR 2 HORAS

P/A = presença/ausência

Aus = Ausência em 25g de amostra



= VALORES ACIMA DO LIMITE TOLERÁVEL (BRASIL, 2001; JAY, 2005)

TABELA 3: Resultados das análises das amostras de superfícies de contato direto com o alimento no ESTABELECIMENTO X para: bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+); *Samonella* spp. e NMP de Coliformes termotolerantes (Colif. Termot.).

| DIAS | AMOSTRAS | NMP | BHAM (LOG ₁₀ UFC/g) | Staphy. C+ (LOG ₁₀ UFC/g) | SALM (P/A) |
|------|----------|------|--------------------------------|--------------------------------------|------------|
| 1 | D | 23 | 6,61 | 0 | Aus |
| | E | 29 | 6,54 | 0 | - |
| | F | 3,0 | 3,64 | 0 | - |
| 2 | D | <3,0 | 4,02 | 1,70 | Aus |
| | E | <3,0 | 1,60 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 2,89 | 0 | - |
| 3 | D | <3,0 | 5,36 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 5,04 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 4,07 | 0 | - |
| 4 | D | 7,4 | 4,00 | 0 | Aus |
| | E | 23 | 4,04 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 1,90 | 0 | - |
| 5 | D | <3,0 | 9,59 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 9,93 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 8,37 | 0 | - |
| 6 | D | <3,0 | 7,60 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 7,58 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 7,54 | 0 | - |
| 7 | D | <3,0 | 1,30 | 1,30 | Aus |
| | E | <3,0 | 1,00 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 2,30 | 0 | - |
| 8 | D | 23 | 4,23 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 4,18 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 4,34 | 0 | - |

LEGENDA:

D = MÃO DE MANIPULADOR

E = FACA DE CORTE (AÇO INOXIDÁVEL)

F = PLACA DE CORTE (ALTILENO)

P/A = presença/ausência

Aus = Ausência em 25g de amostra



= VALORES ACIMA DO LIMITE TOLERÁVEL (JAY, 2005)

TABELA 4: Resultados das análises para amostras de superfícies de contato direto com o alimento no ESTABELECIMENTO Y para: bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+); *Samonella* spp. e NMP de Coliformes termotolerantes (colif. Termot.)

| DIAS | AMOSTRAS | NMP | BHAM (LOG ₁₀ UFC/g) | Staphy. C. + (LOG ₁₀ UFC/g) | SALM (P/A) |
|------|----------|------|--------------------------------|--|------------|
| 1 | D | <3,0 | 2,29 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 3,20 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 6,28 | 0 | - |
| 2 | D | <3,0 | 1,78 | 0 | Pres |
| | E | 3,0 | 5,16 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 1,48 | 0 | - |
| 3 | D | <3,0 | 2,13 | 0 | Pres |
| | E | <3,0 | 7,95 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 2,70 | 0 | - |
| 4 | D | <3,0 | 3,10 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 3,93 | 0 | - |
| | F | 3,6 | 3,28 | 0 | - |
| 5 | D | <3,0 | 7,06 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 9,81 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 6,25 | 0 | - |
| 6 | D | <3,0 | 4,96 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 6,45 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 3,60 | 0 | - |
| 7 | D | <3,0 | 1,30 | 1,60 | Aus |
| | E | <3,0 | 1,78 | 1,48 | - |
| | F | <3,0 | 1,30 | 1,00 | - |
| 8 | D | <3,0 | 1,78 | 0 | Aus |
| | E | <3,0 | 2,97 | 0 | - |
| | F | <3,0 | 2,27 | 0 | - |

LEGENDA:

D = MÃO DE MANIPULADOR

E = FACA DE CORTE (AÇO INOXIDÁVEL)

F = PLACA DE CORTE (ALTILENO)

P/A = presença/ausência

Aus = ausência em 25g de amostra

Pres = presença em 25g de amostra

■ = VALORES ACIMA DO LIMITE TOLERÁVEL (JAY, 2005)

TABELA 5: Padrões bacteriológicos para “sashimi” estabelecidos pela RDC nº12/2001/ANVISA

| Categoria do alimento (enquadramento) | Microrganismos pesquisados | UFC/g amostra |
|---|-----------------------------------|----------------------|
| Alimento pronto para o consumo à base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.) | Coliformes a 45°C/g | 10 ² |
| | Estaf.coag.positiva/g | 5x10 ³ |
| | <i>V.parahaemolyticus</i> | 10 ³ |
| | <i>Salmonella</i> spp./25g | Aus |

Fonte: RESOLUÇÃO - RDC Nº 12, DE 2 DE JANEIRO DE 2001- ANVISA

TABELA 6: Percentual de amostras com concentração bacteriana superior aos limites toleráveis (Brasil, 2001; Jay, 2005).

| Microrganismos analisados | Percentual de amostras fora dos padrões no estabelecimento X | Percentual de amostras fora dos padrões no estabelecimento Y | Percentual total de amostras fora dos padrões |
|---|---|---|--|
| NMP <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 0 | 0 | 0 |
| NMP coliformes termotolerantes | 8,3 | 4,2 | 6,3 |
| NMP <i>Escherichia coli</i> | 8,3 | 4,2 | 6,3 |
| Contagem de BHAM | 33 | 25 | 29 |
| Contagem de BHAP | 50 | 21 | 35 |
| Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva | 4,2 | 2,1 | 3,1 |
| Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp. | 0 | 25 | 12,5 |

TABELA 7: Tratamento estatístico comparativo entre resultados obtidos das análises bacteriológicas para Estabelecimentos X e Y.

| ESTABELECIMENTO | Média dos resultados em LOG ₁₀ BHAP | | Média dos resultados em LOG ₁₀ BHAM | | Média dos resultados em LOG ₁₀ <i>Staphylococcus</i> Coag. + | |
|-----------------|--|------|--|------|---|------|
| | | | | | | |
| X | A | 6,7 | - | - | A | 0,83 |
| | B | 6,53 | - | - | B | 1,29 |
| | C | 7,01 | - | - | C | 0,92 |
| | - | - | D | 5,34 | D | 0,38 |
| | - | - | E | 4,90 | E | 0 |
| | - | - | F | 4,38 | F | 0 |
| Y | A | 4,77 | - | - | A | 0,63 |
| | B | 5,50 | - | - | B | 0,69 |
| | C | 6,26 | - | - | C | 1,16 |
| | - | - | D | 3,05 | D | 0,20 |
| | - | - | E | 5,16 | E | 0,18 |
| | - | - | F | 3,39 | F | 0,13 |

TABELA 8: Classificação (INT, MO SE, RES, SE) das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* frente aos antimicrobianos testados.

| MÓDULO I (ANTIMICROBIANOS) | | | | | | |
|------------------------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|
| AMOSTRAS | CLI | ERI | OXA | PEN | TEC | VAN |
| 1 | INT | INT | SE | SE | RES | SE |
| 2 | RES | RES | SE | SE | RES | SE |
| 3 | RES | INT | RES | RES | RES | RES |
| 4 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 5 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 6 | INT | SE | RES | RES | RES | SE |
| 7 | RES | INT | RES | RES | INT | SE |
| 8 | INT | RES | SE | SE | RES | RES |
| 9 | RES | SE | SE | SE | RES | SE |
| 10 | RES | INT | RES | RES | RES | SE |
| 11 | INT | RES | INT | RES | SE | SE |
| 12 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 13 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 14 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 15 | SE | RES | SE | SE | INT | SE |
| MÓDULO IV (ANTIMICROBIANOS) | | | | | | |
| AMOSTRAS | ATM | CFO | CRO | CLO | GEN | TET |
| 1 | RES | RES | RES | RES | RES | SE |
| 2 | RES | SE | RES | SE | SE | RES |
| 3 | RES | SE | RES | RES | RES | RES |
| 4 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 5 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 6 | RES | RES | RES | SE | RES | RES |
| 7 | RES | SE | MO SE | INT | RES | RES |
| 8 | RES | SE | SE | RES | INT | SE |
| 9 | RES | SE | MO SE | RES | RES | SE |
| 10 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 11 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 12 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 13 | RES | RES | RES | RES | RES | RES |
| 14 | RES | SE | INT | SE | SE | SE |
| 15 | RES | RES | MO SE | RES | RES | SE |

LEGENDA:

ATM = aztreonam
 CFO = ceftioxina
 CLI = clindamicina
 CLO = clorafenicol
 CRO = ceftriaxona
 ERI = eritromicina
 GEN = gentamicina
 INT = intermediário
 MO SE = moderadamente sensível
 OXA = oxacilina
 PEN = penicilina G
 RES = resistente
 SE = sensível
 TEC = teicoplanina
 TET = tetraciclina
 VAN = vancomicina

TABELA 9: : Percentual de classificação do comportamento das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* frente aos antimicrobianos testados

| ANTIBIÓTICO | RESISTENTE | INTERMEDIÁRIO | MODERAD. SENSÍVEL | SENSÍVEL |
|-------------|------------|---------------|----------------------|----------|
| CLI | 66,7 | 26,7 | 0 | 6,7 |
| ERI | 60,0 | 26,7 | 0 | 13,3 |
| OXA | 60,0 | 6,7 | 0 | 33,3 |
| PEN | 66,7 | 0 | 0 | 33,3 |
| TEC | 80,0 | 13,3 | 0 | 6,7 |
| VAN | 46,7 | 0 | 0 | 53,3 |
| ATM | 100 | 0 | 0 | 0 |
| CFO | 60,0 | 0 | 0 | 40,0 |
| CRO | 66,7 | 6,7 | 20,0 | 6,7 |
| CLO | 73,3 | 6,7 | 0 | 20,0 |
| GEN | 80,0 | 6,7 | 0 | 13,3 |
| TET | 66,7 | 0 | 0 | 33,3 |

LEGENDA:

ATM = aztreonam
 CFO = cefoxitina
 CLI = clindamicina
 CLO = clorafenicol
 CRO = ceftriaxona
 ERI = eritromicina
 GEN = gentamicina
 INT = intermediário
 MO SE = moderadamente sensível
 OXA = oxacilina
 PEN = penicilina G
 RES = resistente
 SE = sensível
 TEC = teicoplanina
 TET = tetraciclina
 VAN = vancomicina

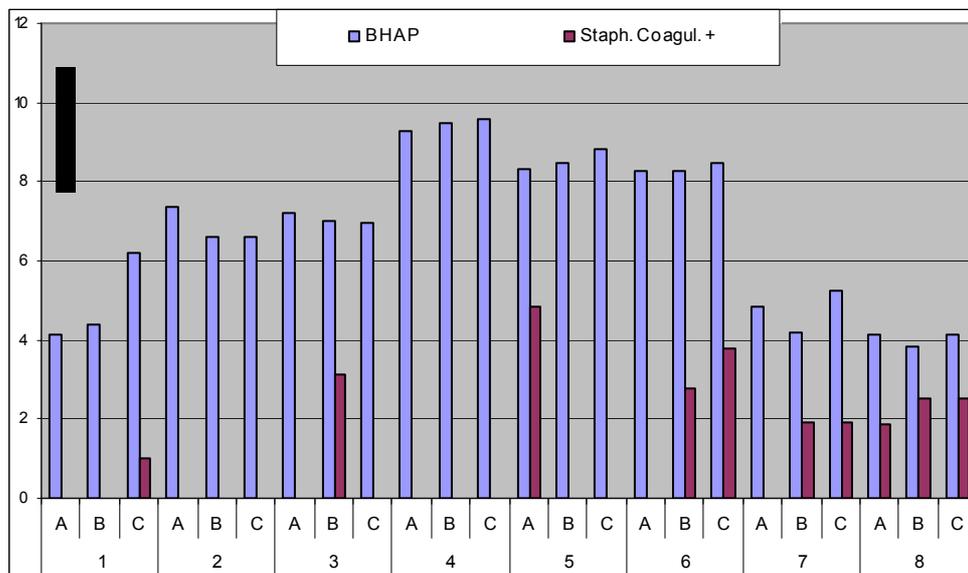


FIGURA 1: Resultados em LOG₁₀ das amostras de alimentos no ESTABELECIMENTO X das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (BHAP), *Staphylococcus coagulase positiva* (Staphy. C+) por dia de análise

LEGENDA:

A = PEIXE CRU (MATÉRIA-PRIMA)

B = SASHIMI ANTES DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO

C = SASHIMI DEPOIS DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO MANTIDO A 10°C POR 2 HORAS

BHAP = Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas

Staph. Coag + = *Staphylococcus coagulase positiva*

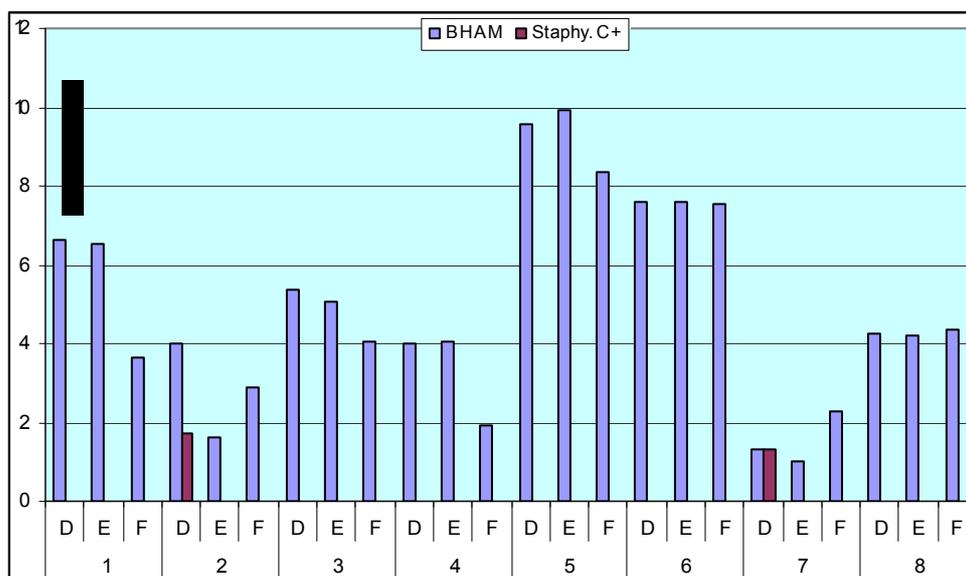


FIGURA 2: Resultados em LOG₁₀ das amostras de superfícies de contato direto com o alimento no ESTABELECIMENTO X das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAP), *Staphylococcus coagulase positiva* (Staphy. C+) por dia de análise

LEGENDA:

D = MÃO DE MANIPULADOR

E = FACA DE CORTE (AÇO INOXIDÁVEL)

F = PLACA DE CORTE (ALTILENO)

BHAP = Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

Staph. Coag + = *Staphylococcus coagulase positiva*

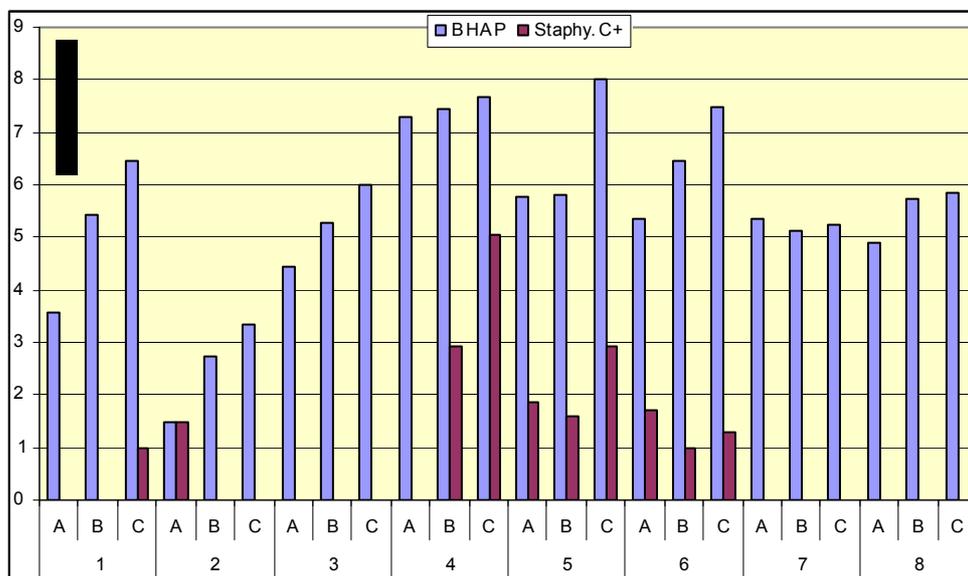


FIGURA 3: Resultados em LOG₁₀ das amostras de alimentos no ESTABELECIMENTO Y das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (BHAP), *Staphylococcus* coagulase positiva (Staphy. C+) por dia de análise

LEGENDA:

A = PEIXE CRU (MATÉRIA-PRIMA)

B = SASHIMI ANTES DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO

C = SASHIMI DEPOIS DA EXPOSIÇÃO AO CONSUMO MANTIDO A 10°C POR 2 HORAS

BHAP = Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas

Staph. Coag + = *Staphylococcus* coagulase positiva

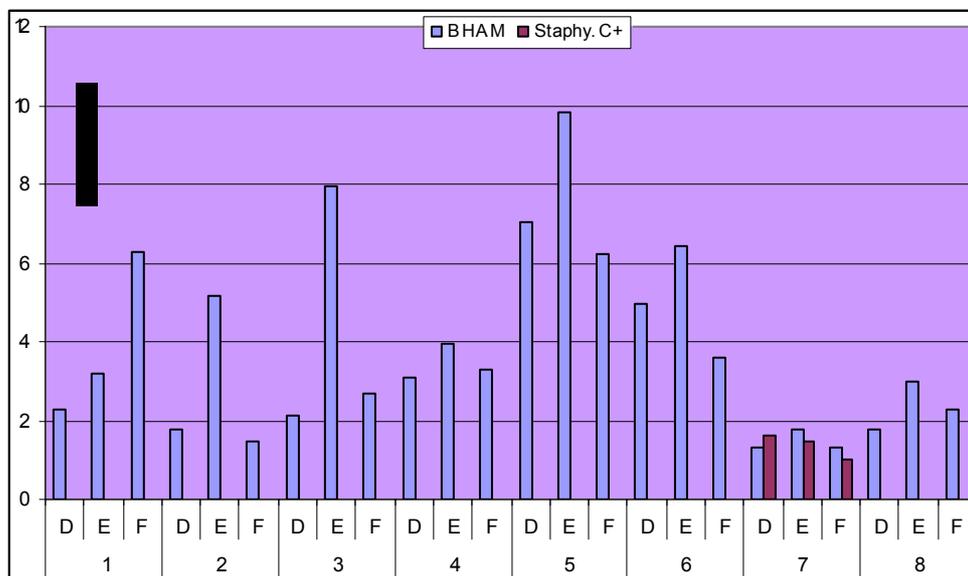


FIGURA 4: Resultados em LOG₁₀ das amostras de superfícies de contato direto com o alimento no ESTABELECIMENTO Y das análises de Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAP), *Staphylococcus coagulase positiva* (Staphy. C+) por dia de análise

LEGENDA:

D = MÃO DE MANIPULADOR

E = FACA DE CORTE (AÇO INOXIDÁVEL)

F = PLACA DE CORTE (ALTILENO)

BHAM = Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

Staph. Coag + = *Staphylococcus coagulase positiva*

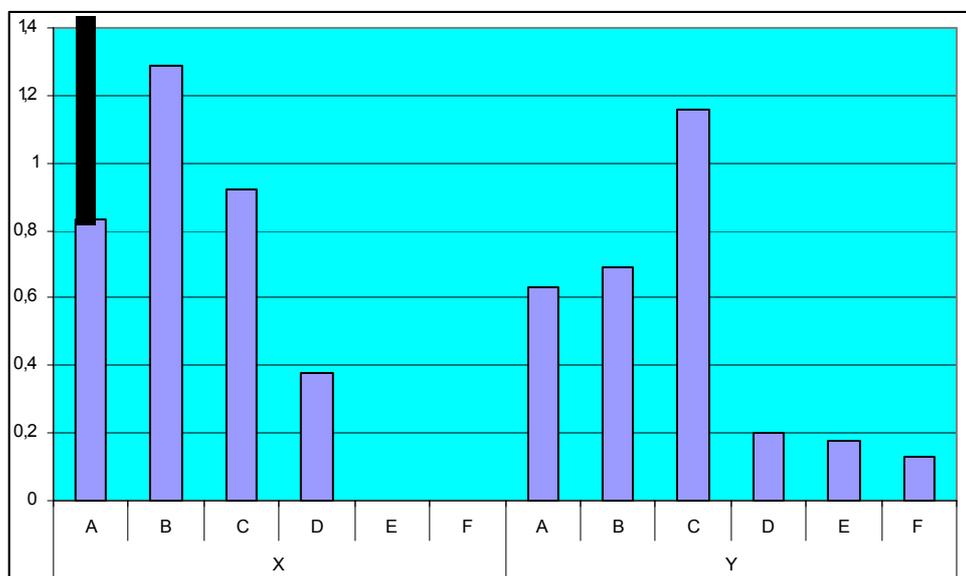


FIGURA 5: Comparação entre resultados entre as médias (dos oito dias) de contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva por estabelecimento (X,Y).

LEGENDA:

D = MÃO DE MANIPULADOR

E = FACA DE CORTE (AÇO INOXIDÁVEL)

F = PLACA DE CORTE (ALILENO)

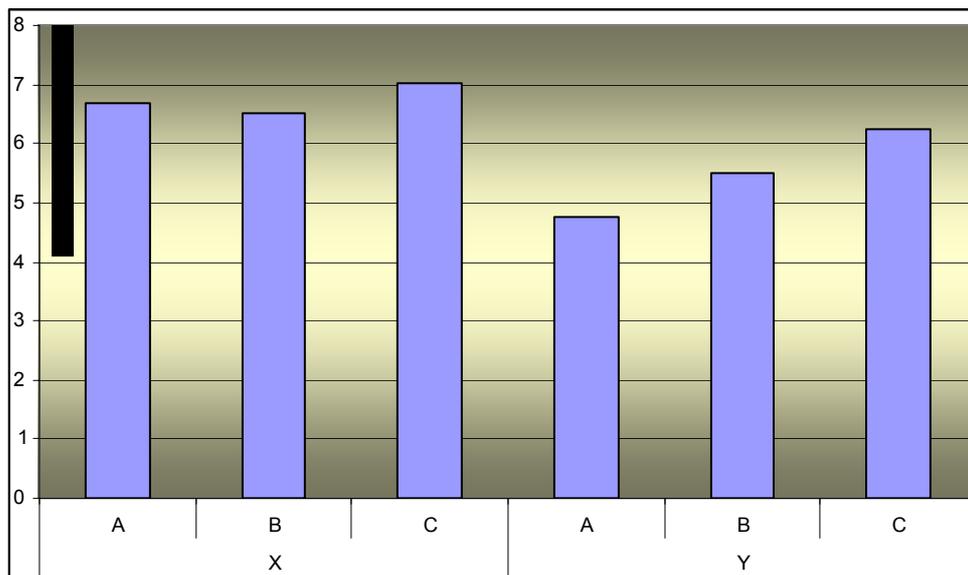


FIGURA 6: Comparação entre resultados entre as médias (dos oito dias) de contagens de Bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas por estabelecimento (X,Y).

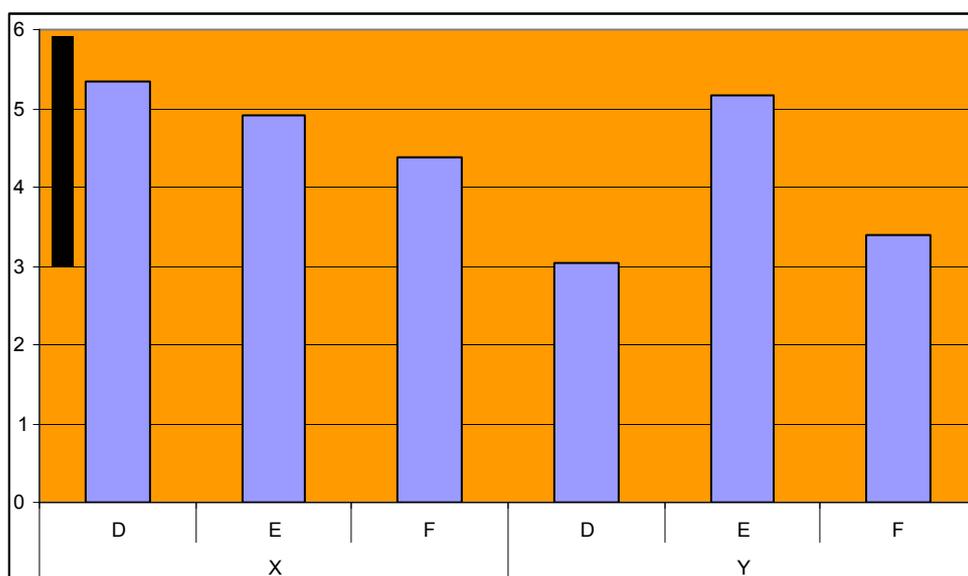


FIGURA 7: Comparação entre resultados entre as médias (dos oito dias) de contagens de Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas por estabelecimento (X,Y).

10. ANEXOS



FIGURA 8: Estufa bacteriológica para incubações das culturas em teste

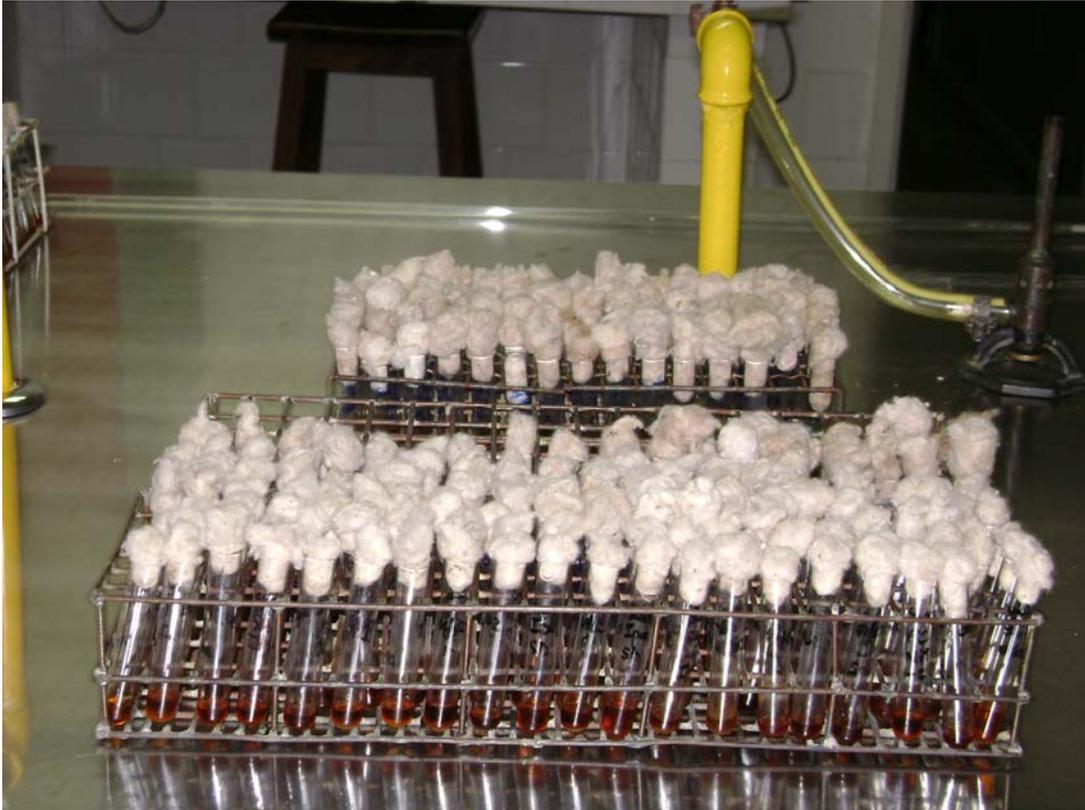


FIGURA 9: Tubos de ensaio com caldo BHI inoculados com colônias típicas de *Staphylococcus coagulase positiva* selecionadas da Placa de Petri.



FIGURA 10: Placas de Petri com TCBS para isolamento de *Vibrio parahaemolyticus*



FIGURA 11: Placas de Petri com Rambach para isolamento de *Salmonella* spp.



FIGURA 12: Semeadura em TCBS de cultivo do Caldo GSTB (*Vibrio parahaemolyticus*)



FIGURA 13: Material com suspeita de *Salmonella* spp. incubado em estufa bacteriológica em meios de TSI e LIA.

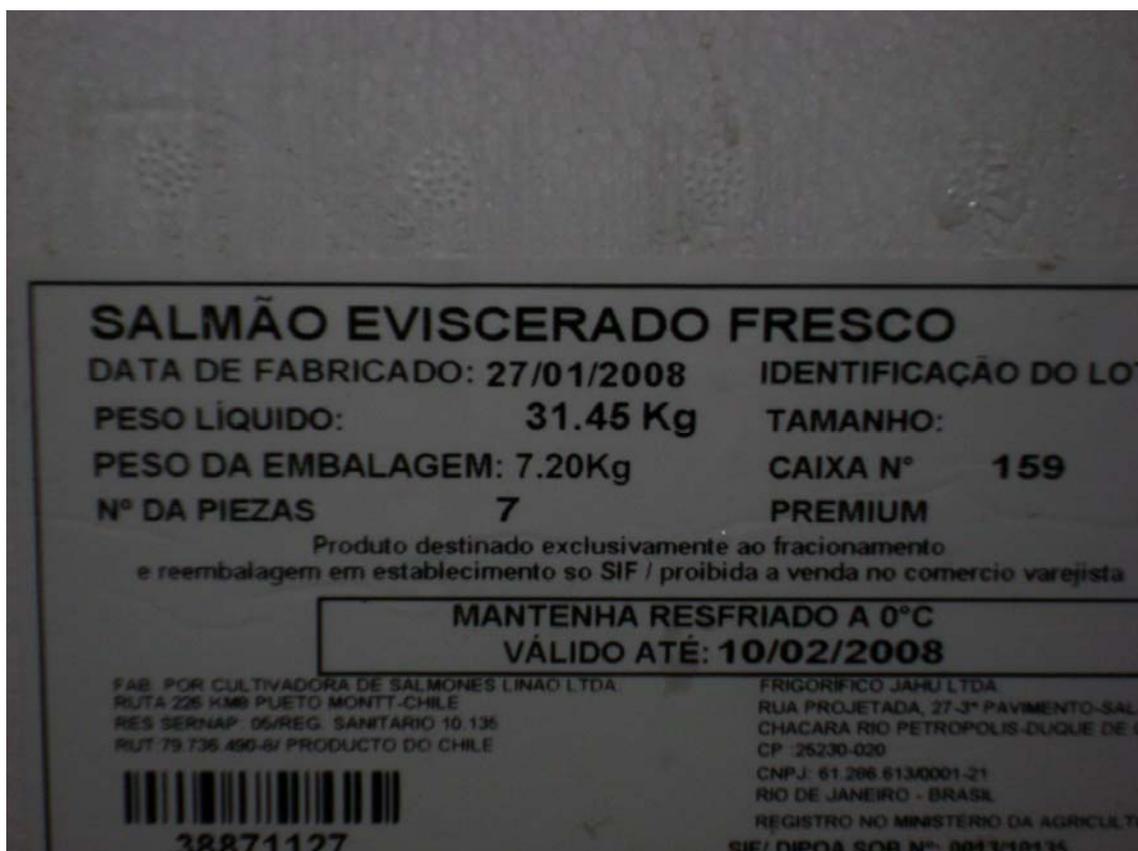


FIGURA 14: Rótulo da matéria-prima (salmão refrigerado e eviscerado).



FIGURA 15: Recebimento da matéria-prima (acondicionado com gelo) em caixa isotérmica



FIGURA 16: Matéria-prima limpa (amostras "A")



FIGURA 17: "sashimi" sendo elaborado no setor de produção



FIGURA 18: “sashimi” sendo preparado em cortes finos (característico)



FIGURA 19: "sashimi" preparado antes de ir ao bufê de exposição (amostras "B")



FIGURA 20: "sashimi" durante exposição no bufê (amostras "C")

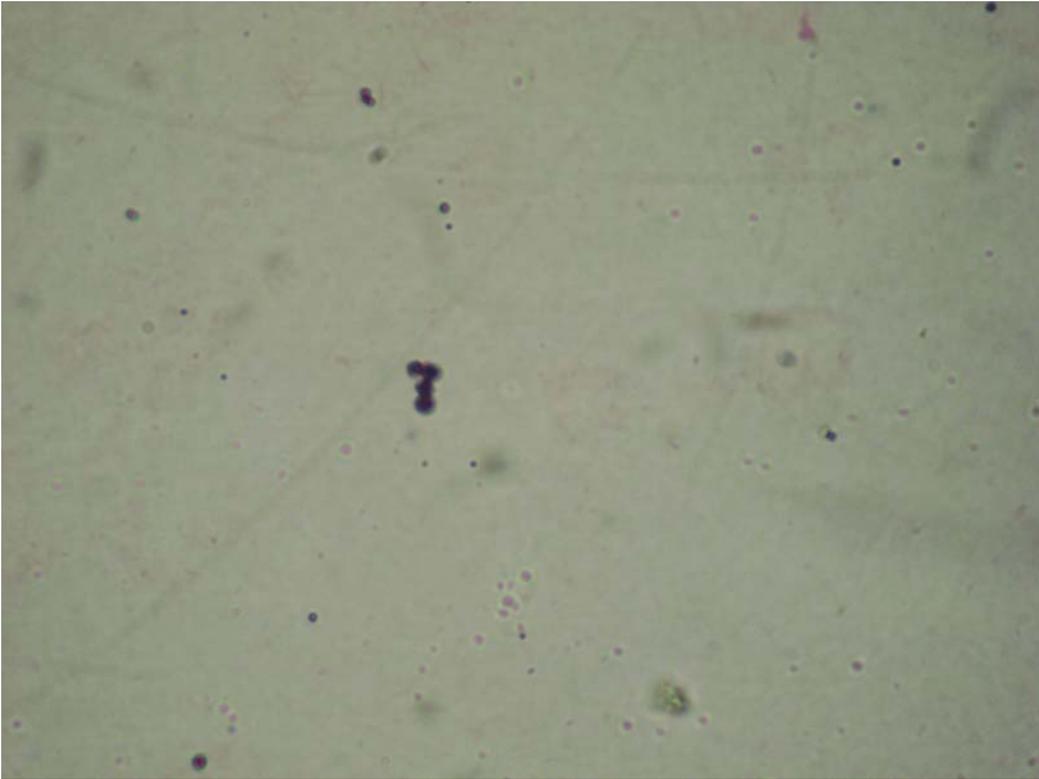


FIGURA 21: Visualização do esfregaço em lâmina pelo método de coloração de Gram para identificação de cultivos puros antes de provas bioquímicas



FIGURA 22: Placas de Petri com meio de Mueller Hinton, material inoculado (*Staphylococcus coagulase positiva*) e polidiscos de antimicrobianos

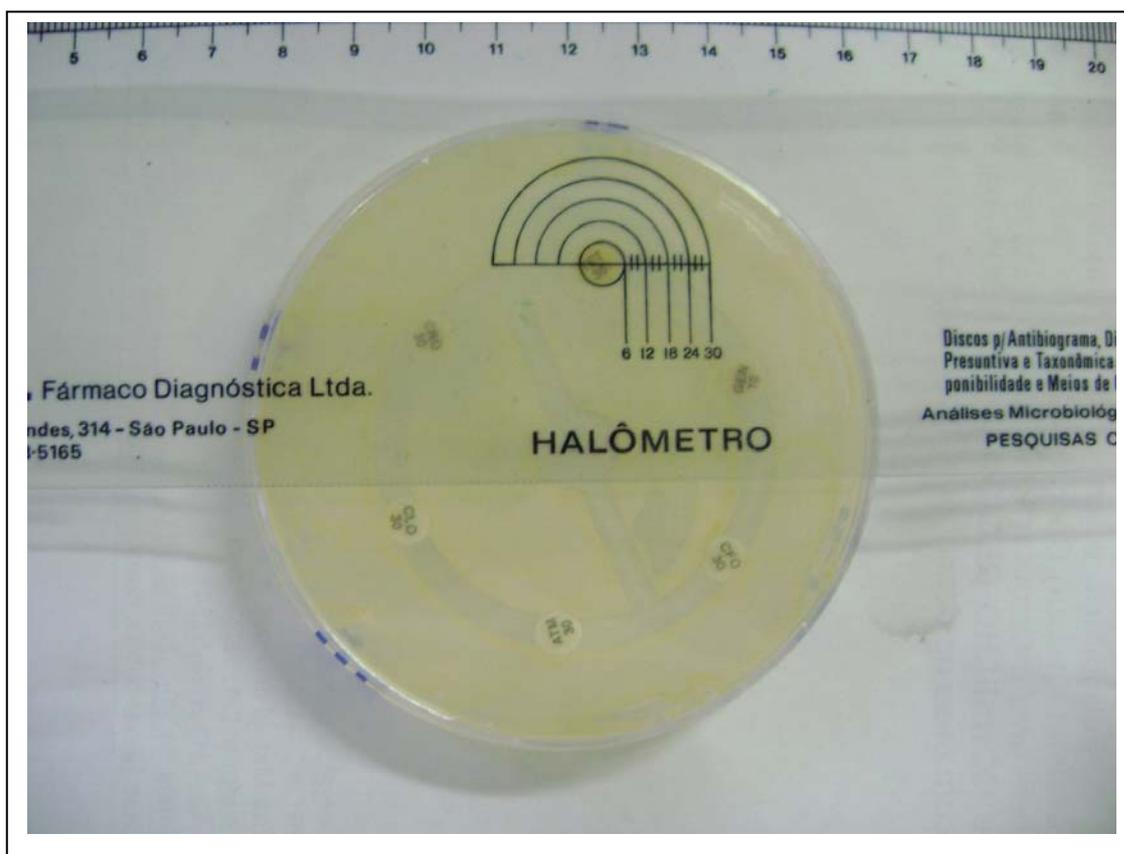


FIGURA 23: Placas de Petri com meio de Mueller Hinton, material inoculado (*Staphylococcus coagulase positiva*), polidiscos de antimicrobianos, sendo medido com halômetro