

## Avaliação microbiológica de *sushi* e *sashimi* preparados em restaurantes especializados

*Microbiological evaluation of sushi and sashimi prepared in specialized restaurants*

Thamiris Pereira de Moraes\*, Fernanda Moreira Darley e Cláudio Dias Timm

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. \*Autor para correspondência: thamiris.p@outlook.com.

Submissão: 20/11/2017 | Aceite: 25/02/2019

### RESUMO

O objetivo foi avaliar o padrão microbiológico de *sushis* e *sashimis* de salmão comercializados em restaurantes especializados situados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Foram analisadas 20 amostras (10 de *sushi* e 10 de *sashimi*) submetidas à pesquisa de *Salmonella*, contagens de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus*. Observou-se que 70% das amostras estavam em desacordo com o padrão estabelecido pela legislação brasileira para estes produtos. Os resultados indicam a necessidade de maiores cuidados em relação à qualidade da matéria-prima e às medidas higiênicas e sanitárias durante o preparo e manipulação do produto, tendo em vista, ainda, o fato de que estes alimentos são consumidos sem cocção, o que aumenta o risco de contaminação.

**PALAVRAS-CHAVE:** contaminação alimentar, culinária japonesa, microrganismos patogênicos, segurança alimentar, higiene.

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiological patterns of salmon sushi and sashimi sold in specialized restaurants located in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty samples were analyzed (10 sushi and 10 sashimi) and submitted to Salmonella testing and counting of fecal coliforms, coagulase-positive Staphylococcus and Vibrio parahaemolyticus. One observed 70% of the samples were at odds with the standards established by the Brazilian law. The results indicate the need for more care about the quality of the raw material and for hygiene and sanitary measures when preparing and handling the product, also considering that these foods are consumed without cooking, which increases the risk of contamination.

**KEYWORDS:** food contamination, Japanese cuisine, pathogenic microorganisms, food security, food hygiene.

Alimentos à base de pescado cru, como o *sushi* e o *sashimi*, originários da cultura japonesa, vêm ganhando destaque no Brasil (SANTOS et al. 2012). Entende-se por *sushi* pedaços de peixe cru envoltos por arroz especial e por *sashimi*, pedaços de peixe cru finamente cortados. No entanto, a qualidade do alimento pode ser prejudicada por hábitos não higiênicos dos manipuladores, bem como a composição do pescado, o transporte e armazenamento que podem deixá-lo vulnerável à ação de microrganismos patogênicos, tornando seu consumo *in natura* um risco para saúde coletiva, já que não ocorre nenhum tipo de tratamento térmico que garanta a sua inocuidade (CORREIA & RONCADA 1997).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC 12/2001 (ANVISA 2001), estabeleceu padrões microbiológicos para alimentos à base de carnes, pescados e similares crus, o que inclui o *sushi* e o *sashimi*. Esses alimentos, para serem seguros ao consumo humano, devem respeitar os limites estabelecidos na legislação para microrganismos termotolerantes ( $\leq 10^2$  UFC/g), *Staphylococcus* coagulase positiva ( $\leq 5 \times 10^3$  UFC/g), *Vibrio parahaemolyticus* ( $\leq 10^3$  UFC/g) e *Salmonella* (ausência).

A ingestão de alimentos crus é considerada uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (DTA), uma vez que a matéria-prima apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos responsáveis por tais enfermidades, associado às condições inadequadas de preparo e armazenamento do produto no que se refere à temperatura, local e tempo de exposição que podem

colaborar para aumentar o risco à saúde do consumidor (VALLANDRO et al. 2011).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes especializados a fim de verificar se estavam em conformidade com os padrões microbiológicos preconizados pela ANVISA.

Foram realizadas 10 coletas em cinco restaurantes especializados em pratos orientais, situados no centro da cidade de Pelotas, RS, obtendo-se duas amostras em cada estabelecimento, uma de *sushi* de salmão e outra de *sashimi* de salmão, em cada coleta, totalizando 20 amostras. Foram coletadas duas amostras de peças de *sushi* e de *sashimi* que se encontravam à disposição dos consumidores nas bancadas dos restaurantes. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis em caixas isotérmicas com gelo para subsequente encaminhamento ao laboratório para posteriores análises.

A contagem de *Vibrio* spp. foi realizada conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA 2003). Foram pesados 25 g de cada amostra e homogeneizadas em 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) para obtenção da diluição  $10^{-1}$ , a partir da qual foram feitas diluições seriadas com base 10. Para contagem de *Vibrio* spp., uma alíquota de 1 mL da diluição  $10^{-1}$  foi distribuída em três placas com Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia), e para as demais diluições, foi realizada análise em duplicata com alíquotas de 0,1 mL originárias da diluição anterior.

As placas foram incubadas a 37 °C pelo período de 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Os 25 g da amostra em APA foram incubados a 37 °C por 24 horas, para pré-enriquecimento e posterior pesquisa de *Vibrio* spp. em TCBS, também a 37 °C por 24 horas. Quando houve crescimento de colônias características de *V. parahaemolyticus* nas placas de TCBS, cinco isolados de cada placa foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação de *V. parahaemolyticus*, conforme BILUNG et al. (2005), com modificações, utilizando os *primers* GTCTTCTGACGCAATCGTTG e ATACGAGTGGTTGCTGTCATG (KIM et al. 1999) para pesquisa dos genes *toxR*. Cada reação teve um volume final de 20 µL, na qual foram utilizados 10 µL de Master Mix, 1 µL (10 pmol) de cada *primer*, 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96 °C por 5 min, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63 °C por 1,5 min, extensão a 72 °C por 1,5 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,8%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

Para pesquisa de *Salmonella*, foram pesados 25 g de cada amostra e acondicionadas em sacos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Em seguida, foi feita a homogeneização das amostras e incubação à 37 °C para pré-enriquecimento. Essa primeira etapa e as demais foram realizadas de acordo com o descrito pela U.S. Administração de Alimentos e Drogas (U.S. Food and Drug Administration) (ANDREWS et al. 2014).

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada conforme MAPA (2003). As amostras foram coletadas, separadas em alíquotas de 25 g e homogeneizadas em sacos estéreis contendo 225 mL de solução salina 0,85%. A partir desta solução com diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas as demais diluições decimais. De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 1 mL e inoculadas em três tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Os tubos foram incubados por 48 horas a 37 °C e aqueles que apresentaram formação de gás foram considerados positivos no teste presuntivo. De cada tubo positivo, foi retirada uma alíquota e transferida para um tubo contendo caldo EC (Acumedia, Michigan, EUA), que foram novamente incubados por 48 horas em temperatura de 45 °C para teste confirmatório. O número de tubos positivos (com presença de gás) em cada diluição foi observado e o resultado final foi obtido com uso de uma tabela do número mais provável (NMP).

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada conforme MAPA (2003). Foram pesados 25 g de cada amostra e homogeneizadas em 225 mL de solução salina para a obtenção da diluição  $10^{-1}$ . Para cultura na diluição  $10^{-1}$ , foi semeada uma alíquota de 1 mL distribuída em três placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia). Para as demais diluições, foram realizadas análises em duplicata utilizando alíquotas de 0,1 mL originárias da diluição anterior. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. Ao fim desse período, foi realizada a contagem de colônias e foram selecionadas três colônias típicas e três colônias atípicas de cada placa, que foram semeadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) para realização posterior da prova de coagulase, utilizando alíquotas de 300 µL de cada cultura adicionadas a 300 µL de plasma de coelho que foram

incubadas por 6 horas em estufa a 37 °C. Passado esse período e observada a formação de coagulação que caracteriza resultado positivo, foi realizado o cálculo de colônias coagulase positiva por placa para obtenção da contagem final.

A ANVISA estabelece padrões microbiológicos para alimentos à base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, *carpaccio*, *sushi*, *sashimi*, etc.), a tolerância máxima para amostra indicativa, utilizada neste trabalho, para Coliformes a 45 °C/g é  $\leq 10^2$  UFC/g, para *Staphylococcus* coagulase positiva é de  $\leq 5 \times 10^3$  UFC/g e para *Vibrio parahaemolyticus* é de  $\leq 10^3$ . Dentre as 20 amostras, 14 (70%) estavam em desacordo com os valores estipulados pela ANVISA (Tabela 1), sendo consideradas impróprias para consumo humano. No primeiro estabelecimento, uma amostra de *sashimi* apresentou resultados fora dos padrões microbiológicos em três dos parâmetros pesquisados. Esse fato se repetiu em outro estabelecimento com uma amostra de *sushi*, a qual apresentou valores superiores aos considerados satisfatórios pela ANVISA para duas das análises realizadas.

Tabela 1. Amostras de *sushi* e *sashimi* em desacordo com a RDC 12 da ANVISA.

Table 1. *Sushi and sashimi samples at odds with RDC 12 of ANVISA.*

Alimento	<i>Vibrio</i> (%)	<i>Salmonella</i> (%)	Coliformes a 45 °C (%)	Estafilococos coagulase positiva (%)	Total de amostras
<i>Sushi</i>	0	0	5 (50)	1 (10)	10
<i>Sashimi</i>	0	1 (10)	5 (50)	2 (20)	10
Total	0	1 (5)	10 (50)	3 (15)	20

No presente estudo, não foi evidenciada a presença de *V. parahaemolyticus*, os resultados das contagens em todas as amostras, de *sushi* e de *sashimi*, foram  $< 1,0 \times 10^3$  UFC/g. Estes resultados são similares aos encontrados nos estudos desenvolvidos por MADRIGAL et al. (2013), VALLANDRO et al. (2011) e ALBUQUERQUE et al. (2006). MOURA FILHO et al. (2007), que também não isolaram *Vibrio* de *sashimi* de atum e atribuíram esse resultado às boas práticas de manipulação aplicadas nos estabelecimentos. Entretanto, no nosso estudo, considerando os resultados das demais análises, o não isolamento de *Vibrio* pode se dar devido à ausência do microrganismo na matéria-prima.

Em relação à pesquisa de *Salmonella*, houve presença em uma amostra de *sashimi* coletada em um dos estabelecimentos (5%), o que é inaceitável de acordo com ANVISA, que preconiza ausência do microrganismo em 25 g de amostra analisada. Em trabalho realizado por BRAGHINI et al. (2015), esse microrganismo foi isolado de 15 amostras recolhidas em cinco restaurantes, dos quais três apresentaram 20% de amostras com presença de *Salmonella*, por outro lado, MADRIGAL et al. (2013) e RESENDE et al. (2009) não isolaram *Salmonella* em *sushis* e *sashimis*, concluindo que o alimento pesquisado estava em condições satisfatórias para o consumo humano, de acordo com os padrões estabelecidos pela ANVISA. A falta de higienização dos equipamentos, utensílios e local de armazenagem, aumentam o risco de contaminação por *Salmonella* (VALLANDRO et al. 2011), o que pode explicar as diferenças de isolamento ocorridas no presente trabalho e nos demais estudos citados.

Em relação à pesquisa de coliformes termotolerantes, 50% (10/20) das amostras apresentaram valores acima do limite permitido pela ANVISA (2001). O mesmo perfil foi observado por BRAGHINI et al. (2015) e VALLANDRO et al. (2011), os quais também encontraram valores superiores ao preconizado pela ANVISA. A presença desse grupo de microrganismos em contagens elevadas indica falha nos cuidados higiênicos em alguma etapa do processamento do alimento. Adicionalmente, por serem os coliformes termotolerantes oriundos do trato intestinal do homem e de outros animais, a possibilidade de que bactérias patogênicas entéricas também tenham contaminado o produto é alta, podendo oferecer riscos à saúde dos consumidores (SALOTTI et al. 2006).

A análise de *Staphylococcus* coagulase positiva resultou em contagens superiores ao limite estabelecido pela ANVISA em três amostras (15%), sendo duas provenientes do mesmo estabelecimento, os resultados das contagens são demonstrados na Tabela 2. Segundo VALLANDRO et al. (2011), a contaminação do alimento por esse tipo de patógeno se dá no momento do processamento, por meio da contaminação das mãos, cavidade oral e nasal do processador.

Os resultados indicam a necessidade de maiores cuidados em relação à qualidade da matéria-prima e, especialmente, às medidas higiênicas e sanitárias adotadas durante o armazenamento, preparo e manipulação do produto. Além disso, por se tratar de um alimento consumido *in natura*, há um risco aumentado de contaminação devido à manipulação humana.

Tabela 2. Resultado das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva de *sushi* e *sashimi*.  
 Table 2. Result of countings of coagulase-positive *Staphylococcus* of *sushi* and *sashimi*.

Amostra	Sashimi	Sushi
1	$1,7 \times 10^7$ UFC/g	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g
2	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g
3	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g
4	$2,0 \times 10^3$ UFC/g	$1,9 \times 10^4$ UFC/g
5	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g
6	$1,2 \times 10^3$ UFC/g	$1,2 \times 10^5$ UFC/g
7	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$6,8 \times 10^2$ UFC/g
8	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g
9	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$1,3 \times 10^3$ UFC/g
10	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g	$<5,0 \times 10^3$ UFC/g

*Sushis* e *sashimis* preparados em estabelecimentos especializados em culinária japonesa podem apresentar riscos à saúde do consumidor, uma vez que podem apresentar contaminação por *Salmonella* ou níveis inaceitáveis de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva. Portanto, sugere-se maior rigor das autoridades em relação à fiscalização desse tipo de alimento.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE WF et al. 2006. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e Estafilococos coagulase positivo, em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza, CE. Higiene Alimentar 20: 58-61.
- ANDREWS WH et al. 2014. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. Cap. 5. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>. Acesso em: 06 set. 2016.
- BILUNG ML et al. 2005. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara geanosa*). American Journal of Immunology 1: 31-36.
- BRAGHINI F et al. 2015. Análise microbiológica de sashimis a base de salmão, comercializados na cidade de Maringá, PR. Enciclopédia Biosfera 11: 3165-3175.
- MAPA. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União I: 14-51.
- ANVISA. 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União 1: 45-53.
- CORREIA M & RONCADA MJ. 1997. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras da cidade de São Paulo. Revista de Saúde Pública 31: 296-301.
- KIM YB et al. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. Journal of Clinical Microbiology 37: 1173-1177.
- MADRIGAL AP et al. 2013. Estudio bacteriológico de sushi preparado y comercializado en San José, Costa Rica. Revista Costarricense de Salud Pública 22: 51-55.
- MOURA FILHO LGM et al. 2007. Enumeração e pesquisa de *Vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em *sashimi* de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. Acta Scientiarum 29: 85-90.
- RESENDE A et al. 2009. Análise microbiológica de sushis e sashimis comercializados em restaurantes de Brasília no período de 2001 a 2004. Higiene Alimentar 23: 164-170.
- SALOTTI BM et al. 2006. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico 73: 171-175.
- SANTOS AA et al. 2012. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju. Scientia Plena 8: 1-5.
- VALLANDRO MJ et al. 2011. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. Revista do Instituto Adolfo Lutz 70: 144-150.