

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE GENES  
CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA DO  
*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*  
E *Salmonella*, EM SUSHIS**

**Rafael Akira Sato**

Médico Veterinário

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE GENES  
CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA DO  
*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*  
E *Salmonella*, EM SUSHIS**

**Rafael Akira Sato**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Paes Bürger**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva.

**2017**

S253q Sato, Rafael Akira  
Qualidade microbiológica e pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella*, em sushis / Rafael Akira Sato. – – Jaboticabal, 2017  
iv, 67 p. : 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Karina Paes Bürger  
Banca examinadora: Luiz Augusto do Amaral, Marco Antônio de Andrade Belo, Maria Izabel Merino de Medeiros, Rachel Zoccal Saba

Bibliografia

1. Segurança de alimentos. 2. Toxinas. 3. Microbiologia de alimentos. 4. Comida japonesa. 5. Saúde pública. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.31:597.552.511

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA DO *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* E *Salmonella*, EM SUSHIS

**AUTOR:** RAFAEL AKIRA SATO

**ORIENTADORA:** KARINA PAES BÜRGER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



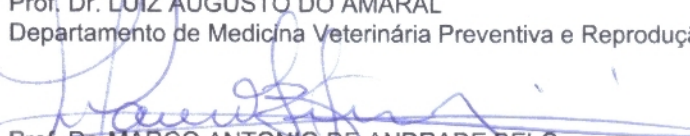
Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



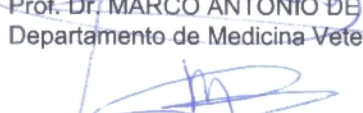
Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS

Polo Regional Centro Oeste / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Bauru, SP



Pesquisadora Dra. RACHEL ZOCCAL SABA

Autônoma / Médica Veterinária / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**RAFAEL AKIRA SATO** – Nasceu no Município de Rio Verde de Mato Grosso - MS, em 28 de junho de 1982, filho de José Takashi Sato e Tereza Shizuko Kubota Sato. É Médico Veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, em 29 de novembro de 2008. Durante a graduação realizou estágios em diversas áreas da Medicina Veterinária. Após o término do Curso de Graduação atuou como Médico Veterinário autônomo na área de Clínica e Anestesiologia. Em junho de 2010 começou a acompanhar algumas atividades de pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, onde auxiliou e adquiriu conhecimento sobre a área. Em março de 2011 ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior. Atuou na área de microbiologia de alimentos recebendo bolsa FAPESP (processo nº 2011/14368-4) e concluiu o mestrado em setembro de 2013. Em março de 2014 ingressou no curso de doutorado dessa mesma instituição, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Paes Bürger, recebendo bolsa CAPES e atuando na mesma linha de pesquisa.

*"Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais.  
Hoje me sinto mais forte mais feliz, quem sabe? Só levo a  
certeza de que muito pouco sei, ou nada sei..."*

*Almir Sater e Renato Teixeira*

*Dedico àqueles que são a base da minha formação de caráter, força e fé.  
Sempre o melhor proporcionaram para mim com muito amor e alegria.  
E nos momentos de aperto,  
Neles busco a energia para superar obstáculos.*

*Aos meus pais, José Takashi e Tereza.*

## AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus e Nossa Senhora pela proteção e sempre iluminarem o meu caminho. Aos meus pais, Tereza e José Takashi, pelo carinho, amor e compreensão. Com eles aprendi as lições que ficam gravadas em nossa alma e moldam nosso caráter.

Agradeço meus irmãos, Vanessa e Leonardo. Irmãos... uma hora amamos... outra hora brigamos...

Agradeço à minha orientadora, prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karina Paes Bürger, pela confiança desde o início desses 4 anos orientação, ajudando na elaboração deste trabalho e contribuindo para minha formação ética e profissional. Obrigado pela amizade, conselhos, risadas e papos descontraídos nos momentos de confraternizações.

Ao prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, que disponibilizou recursos para realização dessa pesquisa. Sem a sua ajuda não conseguiríamos concluir grande parte desse projeto. Pela amizade, orientações nos momentos de dúvidas, bem como ser um dos exemplos de pessoas que conheci e busco me espelhar.

Minha amiga, Laryssa Freitas Ribeiro, companheira de coletas e análises durante as madrugadas de experimentos. Passamos vários momentos juntos de estresse e correria. Mas também, muitas horas de risadas e gordices. Momentos engraçados ou estressantes que valeram a pena.

Às meninas do laboratório de microbiologia molecular do departamento, Andressa e Roberta, pela convivência, risadas e mini confraternizações com comida. Um obrigado especial para Andressa, que me orientou e ensinou a biologia molecular, campo desconhecido no início do Doutorado.

À Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Júnior (Diba), pela amizade, risadas e orientações desde a época do meu Mestrado

Ao prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior, orientador do meu mestrado, que abriu as portas do departamento de Microbiologia de Alimentos e Água, dando início a minha formação como pesquisador. Obrigado pela amizade e ensinamentos.

Obrigado à estagiárias que passaram pelo departamento Júlia Rebecca e Ana Clara pela ajuda e risadas.

À República Filomena e seus atuais moradores: Escoliose, Azeite, Tunico, Fuma na Chuva, Kanaan, Virulento, Flango, Coro e Becapi. Com certeza minha segunda casa desde a graduação. Lugar onde aprendi várias lições de convivências, amizade, apertos e companheirismo.

Aos meus irmãos de sala Roberto Barbuio (So - dá) e Patrícia Martines Évora (Patolina). Quase 10 anos de formados e ainda mantemos contato.

Ao prof. Marco Antônio de Andrade Belo pela amizade, conversas descontraídas e ensinamentos durante sua disciplina ministrada à graduação, ao qual fui estagiário de docência.

À banca examinadora prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Merino de Medeiros e Dr<sup>a</sup>. Rachel Zoccal Saba pela disponibilidade e contribuições dadas à esta tese e aos artigos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal que participaram desta minha trajetória . À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade do curso de pós-graduação. Sempre terei boas lembranças dessa etapa da vida... é claro... sempre carregando a bandeira unespiana no coração.

À Capes pela bolsa concedida.

Por fim, como um bom veterinário, ao Tampinha, velhinho de 14 anos que me acompanha desde o início da graduação.

Muito Obrigado a todos!!!

## SUMÁRIO

Página

|                                                                                                                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                                                                                                                     | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                                                                                                                   | <b>iv</b>  |
| <b>CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>                                                                                                                                                                                           | <b>1</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>1</b>   |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>1</b>   |
| 2.1. Sushi.....                                                                                                                                                                                                                         | 1          |
| 2.2. <i>Bacillus cereus</i> .....                                                                                                                                                                                                       | 4          |
| 2.3. Coliformes e <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                                                                                                         | 6          |
| 2.4. <i>Salmonella</i> spp. ....                                                                                                                                                                                                        | 7          |
| 2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                                                                                                                                                 | 8          |
| 2.5.1 <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à metilina (MRS) .....                                                                                                                                                                     | 10         |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                                                                                                | <b>11</b>  |
| 3.1. Objetivo geral.....                                                                                                                                                                                                                | 11         |
| 3.2. Objetivos específicos .....                                                                                                                                                                                                        | 12         |
| <b>4. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>12</b>  |
| <b>CAPITULO 2 - PRESENÇA DE <i>Bacillus cereus</i> E FREQUÊNCIA DE GENES<br/>CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS EM SUSHIS. ....</b>                                                                                                         | <b>19</b>  |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                                                                                                                     | <b>19</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>20</b>  |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                                                                     | <b>21</b>  |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                  | <b>23</b>  |
| <b>4. CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>27</b>  |
| <b>5. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>27</b>  |
| <b>CAPITULO 3 - QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES,<br/>IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella</i>, E OCORRÊNCIA DE GENES<br/>CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE SUSHI .....</b> | <b>30</b>  |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                                                                                                                     | <b>30</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>31</b>  |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                                                                     | <b>31</b>  |
| 2.1 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais por grama .....                                                                                                                                                     | 32         |
| 2.2 Determinação do NMP de coliformes termotolerantes por grama .....                                                                                                                                                                   | 33         |
| 2.3 PCR.....                                                                                                                                                                                                                            | 33         |

|                                                                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                      | 35        |
| 4. CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                                  | 38        |
| 5. REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                                  | 38        |
| <b>CAPITULO 4 - POPULAÇÕES DE <i>Staphylococcus</i> spp. E <i>S. COAGULASE</i> POSITIVOS, PESQUISA DE <i>S. aureus</i> E PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM SUSHIS.....</b> | <b>41</b> |
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                         | 41        |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                  | 42        |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                                                                                                         | 43        |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                      | 47        |
| 4. CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                                  | 54        |
| 5. REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                                  | 54        |
| <b>CAPITULO 5 - PESQUISA DE GENE CODIFICADOR DE RESISTÊNCIA A METICILINA (MRS) EM <i>Staphylococcus</i> spp. EM SUSHIS .....</b>                                                                     | <b>57</b> |
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                         | 57        |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                  | 58        |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                                                                                                         | 58        |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                      | 61        |
| 4. CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                                  | 63        |
| 5. REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                                  | 63        |
| <b>CAPITULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                                                                                                                       | <b>65</b> |

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA DO *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* E *Salmonella*, EM SUSHIS**

**RESUMO** - A segurança de alimentos de origem animal é uma das preocupações da medicina veterinária preventiva e um interesse de saúde pública, como os sushis preparados com peixe cru e consumidos sem tratamento térmico. Diante dessa preocupação aliada a expansão da culinária japonesa no Brasil, esse estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica e pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella*, em sushis. Para tanto, 60 amostras foram coletadas em restaurantes e avaliados pela quantificação *Staphylococcus* spp., *S. coagulase* positivo e número mais provável de coliformes totais e termotolerantes. Também foram realizadas pesquisas da presença do *B. cereus*, da *E. coli*, do *S. aureus* e da *Salmonella* spp., e estudo da ocorrência de genes codificadores fatores de virulência para *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*. Das amostras analisadas 80,0% (48/60) apresentaram *Staphylococcus* spp., com populações variando de  $1,0 \times 10^2$  a  $5,3 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que 31,7 % (19/60) foram caracterizados como *S. coagulase* positivo e 8,3% (5/60) apresentaram valores de populações acima do limite estabelecido. As populações de coliformes totais e termotolerantes variaram de ausência (< 3,0) a exponenciais de  $10^5$  e  $10^4$  NMP.g<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo que 60,0% (36/60) das amostras apresentaram valores acima de  $10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>, limite máximo previsto pela legislação brasileira para coliformes termotolerantes. Das amostras analisadas 75,0% (45/60) apresentaram *B. cereus* e o gene *bceT* foi mais o frequente sendo amplificado em 35,6% (16/45), seguido pelos genes *nheB* 26,7% (12/45), *nheC* 22,2% (10/45), *hblA* 17,8% (8/45) e *cytK* 15,6% (7/45). Os genes *hblC*, *hblD* e *entFM* apresentaram a menor ocorrência, 11,1% (5/45) em cada. Quanto a presença da *E. coli*, foi confirmada em 21,7% (13/60), e dessas amostras 23,0% (3/13) apresentaram amplificação dos genes de toxinas *aea* e *estB*. A presença *S. aureus* foi identificada em 11,7% (7/60) amostras, sendo que todas apresentaram gene codificador *coa* e foram positivas na prova da coagulase. Dentre as 7 amostras de *S. aureus* os genes *eta* e *hlg* foram os mais frequentes (4/7), seguidos pelos genes *sea*, *sei* e *tst* (2/7), e o gene *seg* (1/7). O gene *mecA* foi identificado em 6 amostras das 48, totalizando 12,5%. O gene para detecção da *Salmonella* sp. não foi amplificado neste trabalho. O *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* e seus genes codificadores de toxinas estão presentes no sushi, oferecendo risco a saúde pública e podendo ocasionar surtos de intoxicações alimentar quando os padrões boas praticas de fabricação de alimentos não forem corretamente aplicadas.

**Palavras-chaves:** comida japonesa, microbiologia de alimentos, saúde pública, segurança de alimentos, toxinas

**MICROBIOLOGICAL QUALITY AND RESEARCH OF GENES ENCODING  
VIRULENCE FACTORS OF *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Salmonella*, IN SUSHIS.**

**ABSTRACT-** The safety of animal origin food is one of the concerns of preventive veterinary medicine and a public health interest, such as the sushis prepared with raw fish and consumed without heat treatment. Given this concern, added to the expansion of Japanese cuisine in Brazil, this study evaluated the microbiological quality and research of genes encoding virulence factors of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Salmonella*, in sushis. For that, 60 samples were collected from restaurants and evaluated by the quantification of *Staphylococcus* spp., coagulase positive *S.* and the most probable number of total and thermotolerant coliforms. Research of *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella* spp. presence, and the study of the occurrence of encoding virulence factors genes for *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*. From the analyzed samples, 80.0% (48/60) presented *Staphylococcus* spp., with populations varying from  $1.0 \times 10^2$  to  $5.3 \times 10^5$  CFU.g<sup>-1</sup>, 31.7% (19/60) were characterized as coagulase positive *S.* and 8.3% (5/60) presented values of populations above the established limit. Total and thermotolerant coliform populations ranged from absent (<3.0) to exponentials of  $10^5$  and  $10^4$  MPN.g<sup>-1</sup>, respectively, and 60.0% (36/60) of the samples presented values above  $10^2$  MPN.g<sup>-1</sup>, the maximum limit established by Brazilian legislation for thermotolerant coliforms. The samples analyzed, 75.0% (45) presented *B. cereus* and the *bceT* gene was more frequent, being amplified in 35.6% (16/45), followed by genes *nheB* 26.7% (12/45), *nheC* 22.2% (10/45), *hblA* 17.8% (8/45) and *cytK* 15.6% (7/45). The *hblC*, *hblD* and *entFM* genes had the lowest occurrence, 11.1% (5/45) in each. *E. coli* presence was confirmed in 21.7% (13/60), and of these samples 23.0% (3/13) presented amplification of the *aea* and *estB* toxin genes. *S. aureus* presence was identified in 11.7% (7/60) samples, all of which presented *coa* coding gene and were positive in the coagulase test. Among the 7 *S. aureus* samples, the *eta* and *hlg* genes were the most frequent (4/7), followed by the *sea*, *sei* and *tst* (2/7) genes, and the *seg* gene (1/7). The *mecA* gene was identified in 6 samples from 48, totaling 12.5%. The *Salmonella* spp. gene was not amplified in this work. *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* and their toxin encoding genes are present in sushi, posing a risk to public health and may lead to outbreaks of food poisoning when good food manufacturing standards are not correctly applied.

**Keywords:** Japanese food, food microbiology, public health, food safety, toxins

## CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

### 1. INTRODUÇÃO

A culinária japonesa conquistou seu espaço no cenário mundial e representa um dos setores mais crescentes na área gastronômica do Brasil. Esse crescimento e popularização criaram um mercado competitivo com outros tipos de restaurantes, obrigando-os à adaptação e inclusão de receitas japonesas em seu “menu”.

Além de agradar o paladar dos consumidores, a comida japonesa recebe o “status” de comida saudável e nutritiva. No entanto, os sushis (prato que pode apresentar pescado cru como ingrediente), por tradição, são preparados pelas mãos nuas dos sushimen, já que a utilização de luvas para seu preparo alteraria o sabor final dos mesmos. Sendo assim, surge a preocupação do ponto de vista da saúde pública relacionada à veiculação de agentes causadores de doenças de origem alimentar.

A má higienização das mãos, utensílios e locais de fabricação desse tipo de alimento, aliadas a falta de preparo técnico dos manipuladores e a presença do pescado *in natura* em sua composição, tornam o sushi um alimento com alto potencial de contaminação microbiológica, podendo ocasionar surtos de doenças transmitidas por alimento.

Nesse contexto, de popularização e expansão da gastronomia japonesa, surge o papel da Medicina Veterinária Preventiva, que deve zelar pela segurança dos alimentos oferecidos à sociedade, buscando fiscalizar e orientar os profissionais desse setor econômico, objetivando um alimento seguro para o consumo.

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1. SUSHI

Historicamente, ligada à necessidade de conservação de peixe cru pelos povos antigos do Sudeste da Ásia, a origem do sushi vem de métodos que consistiam na retirada da cabeça e vísceras do peixe, sendo depois seus filetes

salgados e armazenados em barris de madeira com camadas de arroz cozido entre eles. O arroz cozido fermentava naturalmente, liberando ácido láctico, que diminuía o pH e garantia a conservação do peixe. Ao longo do processo de conservação (entre um a três anos) o arroz se tornava impróprio para o consumo, sendo descartado e somente o peixe aproveitado. Não existem registros precisos de quando começaram essas técnicas, mas sabe-se que no século V a.C. a conservação de peixe cru com arroz já era realizada. Introduzida no Japão no início do século VII d.C., essa técnica sofreu uma pequena modificação, com a utilização de pedras para prensar o peixe cru e o arroz, sendo assim criado o *naresushi* que apresenta odor e sabor fortes como características (YOSHINO, 1997; BARBER; TAKEMURA, 2008).

Por volta do século XVII, em Edo (atual Tóquio), o médico Matsumoto Yoshiichi introduziu o vinagre na preparação do arroz, reduzindo o tempo de preparo do sushi para um dia. Sendo assim, o peixe passou a ser consumido cru e fresco junto ao arroz. O vinagre adicionou um sabor especial ao prato, além do ganho de tempo no preparo (PATROCINIO, 2009).

No início do século XIX, trabalhando em barraca nas ruas de Tóquio, surge um chefe chamando Hanaya Yohei (1799 – 1858). Ele foi considerado o primeiro sushiman da história e passou a confeccionar um sushi que deixou de ser um método de conservação, tornando-se um alimento de consumo imediato. Assim, surgiu o sushi parecido com o que se consome hoje, um bolinho de arroz de sushi com uma fatia de peixe cru. Como não havia refrigeradores, os peixes eram marinados em molho soja ou vinagre e o tamanho do bolinho era o dobro do atual. A partir da década de 1950, a comercialização do sushi passou a ser em estabelecimentos fixos com cadeiras e mesas para pessoas se sentarem (BARBER; TAKEMURA, 2008).

Atualmente, a comida japonesa é difundida mundialmente sendo adaptada ao paladar dos consumidores conforme a região. Isso contribuiu para elevar o consumo mundial do pescado, aumentando as áreas de produções e movimentações comerciais. A média mundial de produção de pescado foi de 146 mil toneladas, entre 2013 a 2015. No Brasil, o média do consumo por habitante, entre 2013 a 2015, foi de 9,6 kg ao ano, sendo estimado uma expectativa de aumento de 32% até 2025

(FAO, 2016). O Chile é o principal fornecedor de salmão para o Brasil, sendo que em 2016 foram importados cerca de 71,85 mil toneladas englobando peixe vivo, produto seco, congelado, salgado ou defumado. Boa parte do peixe vivo é destinada a culinária japonesa (SALOMÃO, 2017). Na capital paulista, em 2011, existiam cerca de 600 restaurantes especializados em comida japonesa, contra 500 churrascarias (SCAFURO, 2016).

Sendo assim, neste cenário de expansão da culinária japonesa no Brasil, o papel da Saúde Pública em zelar pela segurança dos alimentos oferecidos a sociedade torna-se necessário. O sushi é um alimento que apresenta pescado cru na sua composição e condições inadequadas de preparo podem comprometer a segurança desses alimentos. Herrera et al. (2006) descreveram que alimentos à base de pescado cru oferecem riscos à saúde de quem os consomem, visto que estes produtos carregam bactérias nocivas e a ausência de tratamento térmico nesses alimentos não eliminariam os agentes patogênicos. A RDC - 216 (BRASIL, 2004) associa surtos de doenças de origem alimentar com procedimentos inadequados em uma ou mais etapas da produção dos alimentos, por descumprimento das normas de Boas Práticas de Fabricação.

Uma das vias mais frequentes de transmissão de microrganismos aos alimentos é o manipulador (SOUZA et al., 1998), sendo que inúmeros patógenos podem contribuir para originar um surto de doenças de origem alimentar. No sushi, outro fator relevante, é a contaminação por microrganismos ambientais patogênicos, durante a captura, processamento e armazenagem do pescado cru (MARTINS, 2006).

Dentre os microrganismos de maior importância no controle da qualidade de pescados destacam-se o *Vibrio parahaemolyticus* e o *V. cholerae*, principalmente em regiões costeiras, causando no ser humano gastroenterite aguda (MATTÉ et al., 1994). Entretanto, em estudos recentes na pesquisa do gênero *Vibrio* em alimentos que apresentam o pescado cru, esse microrganismo não vem sendo encontrado, sendo isolado apenas de crustáceos (VALLANDRO et al., 2011; SATO, 2013).

Destacam-se também as bactérias do gênero *Salmonella* e *Escherichia coli*, encontradas em águas poluídas por esgotos e fezes. Como consequência direta da manipulação inadequada o *Staphylococcus aureus* de origem humana, encontrado

nas mucosas e superfícies de pele, também ganha destaque (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Outros agentes bacterianos podem, também, contaminar o pescado e causar risco à saúde. Cepas psicotróficas de *Bacillus cereus* produzem enterotoxinas nos preparados de peixe, sobretudo em pH superior a 6,0, acarretando surtos de diarreia (MARTINS, 2006). As bactérias pertencentes ao grupo do *B. cereus* são isoladas a partir de produtos crus e processados, como arroz, condimentos, vegetais, preparações cárneas e laticínios (KRAMER; GILBERT, 1989). O sushi como é um alimento que apresenta em sua composição o arroz, torna-se potencialmente capaz de veicular esse microrganismo podendo causar surtos de distúrbio alimentar na população.

## **2.2. *Bacillus cereus***

O gênero *Bacillus* apresenta oito espécies, estreitamente relacionadas, formam o grupo do *Bacillus cereus*. As bactérias *B. pseudomycoides* (NAKAMURA, 1998), *B. mycoides* (LECHNER et al., 1998; NAKAMURA, 1998; NAKAMURA; JACKSON, 1995), *B. weihenstephanensis* (LECHNER et al., 1998), *B. cereus* (SMITH et al., 1952; SOMERVILLE; JONES, 1972), *B. thuringiensis* (NAKAMURA, 1994; SMITH et al., 1952; SOMERVILLE; JONES, 1972), *B. anthracis* (LOGAN et al., 1985; SMITH et al., 1952; SOMERVILLE; JONES, 1972), *B. cytotoxicus* (GUINEBRETIERE et al., 2013) e *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013) fazem parte desse ramo homogêneo de microrganismos em forma de bacilo e formadores de esporos (STADHOUDERS, 1992).

O *B. cereus* é microrganismo Gram positivo, tendo como temperatura ótima para seu crescimento de 30 a 37°C. Seu esporo é elipsoidal ou cilíndrico e centro-terminal (VARNAM; EVANS, 1991). São amplamente distribuídos na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. A presença das bactérias ou de seus esporos em alimentos é relativamente frequente e podem ser isolados a partir de produtos crus e processados, como arroz, condimentos, vegetais, preparações cárneas e laticínios (ANDERSSON et al., 1995; KOTIRANTA et al., 2000).

A formação de esporo é importante para microbiologia de alimentos, pois estas estruturas são resistentes ao calor, à radiações ionizantes, compostos químicos, desidratação e congelamento. A reversão da forma de esporo para forma vegetativa pode resultar na multiplicação bacteriana e consequente deterioração do alimento ou produção de toxinas (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Esse microrganismo está associado a duas doenças transmitidas por alimentos, denominadas de “síndrome emética” e “síndrome diarréica” (KRAMER; GILBERT, 1989).

Adams et al. (1994) analisando amostras sushis (tipo rockfish, salmão, cavala e atum) comercializados na região de restaurantes de Seattle, encontraram em 31,58% (6) dos 19 restaurantes analisados a presença do *B. cereus* no arroz cozido para o preparo dos sushis. Fang et al. (2003) analisando 164 amostras de comidas prontas para o consumo conservadas a 18°C em supermercados da região central de Taiwan, encontraram a presença do *B. cereus* em 49,8% das amostras estudadas. Muscolino et al. (2014) avaliaram 38 amostras de sushis comercializados em Messina e Catania, Itália e encontraram esse microrganismo apenas em 3 (7,9%).

Soares et al. (2008) analisaram 90 amostras de ar ambiente e 96 amostras de superfícies de bancadas e de equipamentos, em dois restaurantes institucionais, detectaram a presença de *B. cereus* em 84,4% e 44,8% das amostras de ar ambiente e de superfícies, respectivamente, evidenciando a presença do microrganismo no ambiente culinário.

O *B. cereus* produz várias toxinas incluindo a toxina emética (AGATA et al., 1995) e pelo menos quatro enterotoxinas. Entre a enterotoxinas estão a hemolisina BL ou HBL, as não hemolíticas ou Nhe, citotoxina K ou CytK e enterotoxina FM ou EntFM. (BEECHER; WONG, 1997; LINDBÄCK et al., 2004; LUND et al., 2000; ASANO et al., 1997)

Estudos demonstram a presença *B. cereus* na cadeia produtiva do sushi, entretanto ainda não existem relatos sobre a ocorrência de genes produtores de toxina desse microrganismo nesse tipo de alimento. Hwang e Park (2015) isolaram 347 (50%) cepas de *B. cereus* das 687 amostras de alimentos para bebês e em comidas prontas para consumo. Neste mesmo estudo, os autores encontraram os

genes Hbl, Nhe e CytK em 50% das amostras de comidas prontas para consumo e 14% em alimentos para bebês.

### 2.3. COLIFORMES e *Escherichia coli*

As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. O grupo coliforme é formado por vários gêneros bacterianos, destacando-se *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Erwenia*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Todas as bactérias coliformes são Gram-negativas, não esporuladas e estão associadas com as fezes de animais endotérmicos e com o solo (PELCZAR et al., 1981).

*Escherichia* é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae. Diferente da *Salmonella* e da *Shigella*, muitas *Escherichia* são capazes de fermentar a lactose produzindo ácido e gás. O gênero *Escherichia* contém seis espécies: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. blattae*, sendo a *E. coli* seu principal representante (VARNAM; EVANS, 1991).

*E. coli* está presente no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais, sendo considerada um microrganismo patogênico oportunista, causando infecção ou toxinfecção alimentar em casos particulares. Seu principal papel na microbiologia alimentar é de indicador de contaminação fecal, contribuindo para avaliar a qualidade de alimentos e água (VIEIRA et al., 2004a).

No Brasil, em pescados crus, refrigerados ou congelados, é tolerada a presença de até  $10^2$  NMP.g<sup>-1</sup> para coliformes termotolerantes. Caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, deve constar no laudo analítico (BRASIL, 2001).

Fontes et al. (2007) analisando pescados vendidos numa cidade do interior de Portugal, observaram que 30,0% de suas amostras apresentavam número de coliformes termotolerantes acima do limite aceitável, no entanto *E. coli* não foi isolada. Resende (2004) ao analisar sushis e sashimis no Município de Brasília – DF observou que 25,0% das amostras apresentaram valores acima do permitido em relação à população de coliformes termotolerantes. Já, no Município de São Paulo, 50,0% das 20 amostras de preparações a base de peixe cru (sushi e sashimi)

analisadas por Martins (2006) apresentaram-se fora do padrão da legislação para o mesmo grupo microbiano. A presença da *E. coli* foi observada em 45,0% das amostras.

Farias (2008), analisando 24 amostras de ostras da Baía de Guaratuba - PR verificou que 83,0% das amostras apresentavam coliformes totais e que 16,7% apresentavam a bactéria *E. coli*. Nespolo (2009), analisando 31 amostras de salmão (15 congeladas e 16 refrigeradas) encontrou em 32,2% e 19,3% delas, coliformes totais e coliformes termotolerantes, respectivamente. Não foi encontrada a presença de *E. coli*.

Santos (2012), analisando 35 amostras de sushis comercializados em 7 restaurantes de Aracaju - SE, verificou que 80,0% das amostras apresentavam populações de coliformes termotolerantes acima do limite previsto pela legislação brasileira.

#### **2.4. *Salmonella* spp.**

As salmonelas são microrganismos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Elas se apresentam em forma de bacilo, são oxidase negativos e catalase positivos, não formam esporos, são anaeróbios facultativos, fermentam glicose e reduzem o nitrato. A maioria é móvel, por meio de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullorum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis. A temperatura de multiplicação varia de 5°C a 45°C, sendo a temperatura ótima de 37°C (VARNAM; EVANS, 1991).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*. A espécie *S. enterica* esta dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica* (POPOFF et al., 2004). O ser humano parece ser susceptível a todos eles e as fontes de infecções importantes são os animais sendo seus subprodutos o veículo de transmissão (HIRSH, 2003).

Aproximadamente 2000 sorotipos causam doenças em humanos, afetando todas as faixas etárias, sendo os grupos de maior risco pessoas que apresentam

doenças severas ou crônicas. Estima-se que, nos Estados Unidos, anualmente ocorram cerca de 1,4 milhões de casos, sendo 40.000 confirmados por cultura microbiológica e, aproximadamente, 400 casos fatais (CDC, 2017).

No Brasil, em pescados crus, refrigerados ou congelados não se tolera a presença de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento (BRASIL, 2001). Martins (2006) avaliando 20 amostras de preparações a base de peixe cru comercializadas em São Paulo, não encontrou a bactéria nas amostras. Nespolo (2009) também não encontrou a presença de *Salmonella* spp. em 31 amostras de salmão (15 congeladas e 16 refrigeradas). Santos et al. (2012) analisando 35 amostras de sushis comercializados em 7 restaurantes de Aracaju, não detectou a presença de microrganismos do gênero *Salmonella*. Vallandro et al. (2011) avaliaram 108 amostras de sashimis a base de salmão de restaurantes especializados em comida japonesa em Fortaleza - CE, verificando a ausência de *Salmonella* spp. em todas as amostras.

Vieira et al. (2004b) analisaram 90 caranguejos comercializados em Fortaleza - CE e identificaram sete isolados de *Salmonella* spp., das quais cinco foram identificadas como sorovar S. Senftenberg e duas como S. Pomona. Lourenço et al. (2006) analisaram amostras de carne de caranguejo-içá coletadas em São Caetano de Odivelas e Belém no Estado do Pará e encontraram *Salmonella* spp. em 20,0% delas.

## **2.5. *Staphylococcus aureus***

O gênero *Staphylococcus* é pertencente à família Micrococcaceae e formado por bactérias Gram positivas, imóveis, de forma esférica, que se agrupam formando massas irregulares na forma de “cachos”. São bactérias anaeróbicas facultativas, catalase positivas e oxidase negativas. São microrganismos mesófilos, considerados maus competidores na presença de outros agentes, se multiplicam em temperaturas entre 7°C a 48°C, sendo a temperatura ideal entre 30°C e 37°C. Para produção de enterotoxinas a temperatura varia de 10°C a 46°C. Em condições ideais, os valores de pH variam de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo entre 6,0 a 7,0. O gênero

*Staphylococcus* contém mais de 20 espécies que podem causar diversas doenças nos seres humanos e animais (VARNAM; EVANS, 1991).

Segundo Rodrigues et al. (2004) as intoxicações estafilocócicas têm origem pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, os quais produzem vários componentes extracelulares incluindo hemolisinas, enterotoxinas, coagulases, nucleases e lipases. As enterotoxinas são as responsáveis pelos sintomas das intoxicações estafilocócicas e os demais componentes apresentam papel importante em outras doenças causadas pelo microrganismo. As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo globular de proteínas de cadeia única, que apresentam peso molecular entre 28.000 e 35.000 Daltons, com as seguintes características: termo-estáveis, solúveis em água e não serem inativadas pela irradiação em doses aceitáveis nos alimentos. São produzidas 7 enterotoxinas imunologicamente distintas: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E e a toxina do choque tóxico (TST). Todas elas, exceto a TST, estão associadas a intoxicações alimentares, sendo as enterotoxinas A e D as mais frequentemente envolvidas (VARNAM; EVANS, 1991).

Segundo a legislação vigente alimentos a base de peixe cru, com valores de populações de *Staphylococcus* coagulase positivo acima de  $5,0 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> são inapropriadas para o consumo (BRASIL, 2001). Hiluy et al. (1996) avaliaram amostras de peixe, lagosta e camarão (resfriadas e congeladas) no Estado do Ceará, e verificaram a presença de *Staphylococcus aureus* com populações acima dos valores permitidos pela legislação, resultando em 20,0% de condenações das amostras de peixe e 50,0% das amostras de camarão. Da mesma forma, Martins (2006), avaliando 20 amostras de preparações a base de peixe cru comercializadas em São Paulo - SP verificou que 15,0% apresentavam população de *S. aureus* acima do limite estabelecido na legislação vigente.

Ayulo, Machado e Scussel (1994) avaliaram amostras de carne de peixe, caranguejo, camarão e molusco no litoral de Santa Catarina e isolaram em 20,0% das amostras *Staphylococcus aureus*, sendo 60,0% em mexilhões e 20,0% em carne de caranguejo. Albuquerque et al. (2006), estudando a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positivos em sushis comercializados em alguns

estabelecimentos de Fortaleza - CE, confirmaram que 43,0% das 30 amostras analisadas encontravam-se fora do padrão estabelecido pela legislação vigente.

Kim et al. (2011) analisando a prevalência de *Staphylococcus aureus* em 3293 amostras de comidas refrigeradas prontas para consumo isolaram em 197 amostras o microrganismo, totalizando 5,8% das amostras. Santos et al. (2012) analisando 35 amostras de sushis comercializados em 7 restaurantes de Aracaju - SE, conseguiram identificar *Staphylococcus aureus* em 20 amostras, sendo que 4 amostras apresentavam populações acima da permitida pela legislação.

### **2.5.1 *Staphylococcus* spp. RESISTENTES À METICILINA (MRS)**

A meticilina é beta - lactâmico sintético, criado para combater bactérias com resistência a penicilina na década de 1960. Os beta - lactâmicos se ligam a proteínas chamadas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), que participam da síntese da parede celular bacteriana, impedindo sua formação, ocasionando lise e morte do microrganismo. Entretanto, logo após o advento da meticilina, surgiram relatos de amostras resistentes também a esse antimicrobiano, relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos. Sendo assim, a codificação dessas novas PBPs, tornaram esses patógenos resistentes, relacionada à aquisição do gene *mecA* (GELATTI et al., 2009).

A primeira cepa de *Staphylococcus* spp resistente à meticilina foi detectada na Europa em 1961 e pertencia a espécie *Staphylococcus aureus* (MRSA) (VIVONE; MORREIRA, 2005). A partir da década seguinte, tornou-se uma preocupação para a saúde pública mundial, sendo agentes relacionados a episódios de infecções hospitalares e comunitárias (SOUSA JUNIOR et al., 2009).

Segundo Melo et al. (2004), entre 40 a 60% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados no Brasil são resistentes à meticilina. A resistência nestes microrganismos é resultado do gene cromossômico *mecA*, que produz uma nova proteína ligante a penicilina com baixa afinidade aos beta - lactâmicos (VIVONE; MORREIRA, 2005).

Não existem muitos estudos sobre a prevalência desse gene em sushis, porém a literatura relata a presença desse fator de virulência em alimentos como carne suína, leite bovino, queijos, peixe cru e ovos.

Boer et al. (2009) avaliaram 2217 amostras de carne crua bovina, suína, ovina, de veado, frango e peru e observaram uma prevalência de 11,9% (264/2217) para MRSA. Hammad et al. (2012) avaliando peixe cru em alimentos prontos para consumo comercializados em Hiroshima, Japão, verificaram que 10 das 200 amostras coletadas apresentaram MRS e MRSA, totalizando uma prevalência de 5%. Syed et al. (2017) pesquisaram MRSA em ovos no Paquistão obtiveram uma prevalência de 11 % (33) das 300 amostras analisadas.

Diferentemente, Crago et al. (2012) estudaram todas as comidas suspeitas de intoxicação alimentar envolvidas em surtos enviadas para o Alberta Provincial Laboratory for Public Health, Canadá, entre o período de 1 de Janeiro de 2007 a 31 de Dezembro de 2010 e não encontraram cepas MRSA, fato este que corrobora a variabilidade da presença do genes considerando diferentes regiões e ate tipos de comidas, enfatizando a necessidade de estudos.

### **3. OBJETIVOS**

De acordo com o exposto, o sushi é um alimento com alto potencial de contaminação microbiológica, seja pela qualidade da matéria prima, seja pela má higienização das mãos dos manipuladores, dos equipamentos e do local de preparo, ou ainda pela falta de capacitação do pessoal envolvido na produção desse alimento. Desta forma, objetivou-se:

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a qualidade microbiológica e realizar a pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* em sushis.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar *Staphylococcus* spp. e *S. coagulase* positivo, e quantificação do número mais provável de coliforme totais e termotolerantes.
- Pesquisar a presença do *B. cereus*, da *E. coli*, do *S. aureus* e da *Salmonella* em amostras de sushi
- Pesquisar a frequência de genes responsáveis pela codificação das enterotoxinas de *B. cereus* em amostras de sushi.
- Pesquisar a frequência dos genes responsáveis pela codificação das enterotoxinas de *E. coli* em amostras de sushi.
- Pesquisar a frequência dos genes responsáveis pela codificação das toxinas estafilocócicas de *S. aureus* em amostras de sushi.
- Pesquisar a frequência de genes responsáveis pela resistência a meticilina em *Staphylococcus* spp.

### 4. REFERÊNCIAS

ADAMS, A. M.; LEJA, L. L.; JINNEMAN, K. ; BEEH, J.; YUEN, G. A.; WEKELL, M. M. Anisakid Parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in Sushi and Sashimi from Seattle Area Restaurants. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 4, p. 311-317, 1994.

AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBÉ, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**. 1995. v. 129, p. 17–20, 1995.

ALBUQUERQUE, W. F.; BARRETO, N. S. E.; SILVA, A. I. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e estafilococos coagulase positivo, em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza – CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 146, p. 58-61, 2006.

ANDERSSON, A.; RGÖNER, U.; GRANUM, P. E.. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology** , v.28, n.2, p.145-155, 1995.

ASANO, S. I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUKA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1054–1057, 1997.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.

BARBER, K.; TAKEMURA, H. **Sushi – Taste and Technique**. Dorling Kindersley – Civilização Editores, Lda. Porto, 2008.

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and mode for its characteristic paradoxical zone phenomenon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 233–239, 1997.

BOER, E. D.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; WIT, B.; HUIJSDENS, X. W.; NEELING, A. J.; BOSCH, T. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **Int J Food Microbiol.**; v. 134, p. 52-56, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 16 dez. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O\\_RDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O_RDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b)>. Acesso em: 16 dez. 2017.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Salmonella**, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 16 de jan. 2018.

CRAGO, B.; FERRATO, C.; DREWS, S. J.; SVENSON L. W.; TYRRELL, G.; LOUIE, M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. **Food Microbiol.** 2012; 32(1):202-5.

FANG, T. J.; WEI, Q.-K.; LIAO, C.-W.; HUNG, M.-J.; WANG, T.-H. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**. 2003. 80. 241–250.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State Of World Fisheries And Aquaculture. **Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. 200pp. 2016.

FARIAS, H. **Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea sp.*, cultivadas na baía de guaratuba, PR, Brasil**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, área de Concentração e Produção), Curitiba – Universidade Federal do Paraná.

FONTES, M. C.; ESTEVES, A.; SARAIVA, C.; VIEIRA-PINTO, M.; MARTINS C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1308-1315, 2007.

FRANCIS, K. P.; MAYR, R.; VON STETTEN, F.; STEWART, G. S. A. B.; SCHERER, S. Discrimination of psychotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting major cold shock protein genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3525– 3529, 1998.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo, Atheneu, 1996. 182p.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol.**, v. 84, p. 501-6, 2009.

GUINEBRETIÈRE, M. -H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; SARRAU, B. D.; DEBUYSER, M. -L.; LAMBERRET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LERECLUS, D.; VOS, P. D.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp nov. is a new thermo-tolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with foodpoisoning. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v, 63, p, 31–40, 2013.

HAMMAD, A. M.; WATANABE, W.; FUJII, T.; SHIMAMOTO, T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International Journal of Food Microbiology**. 2012. 156, 286–289.

HARMON, S. M. In *Bacillus cereus*. Bacteriological Analytical Manual. **Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, VA, pp. 16.01-16.08, 1984.

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. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n.45, p. 37, 1996.

HIRSH, D. J. *Salmonella*. In: HIRSH, D. J; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, p. 69-73, 2003.

HWANG, J.; PARK, J. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. **Journal of Dairy Science**. v. 98 n. 3, 2015.

JIMÉNEZA, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTESB, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTO, A.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 383–391, 2013.

KIM, N. H.; YUN, A. R.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n.6, p. 1456–1464 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05168.x, 2011.

KOO, K.; FOEGEDING, P. M. N.; SWAISGOOD, H. E. Development of a streptavidin-conjugated single-chain antibody that binds *Bacillus cereus* spores. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, p. 2497–2502, 1998.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M.. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**. v.2, n.2, p.189-198, 2000.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P., Ed., **Foodborne Bacterial Pathogens**, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 21- 50, 1989.

KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M.P. **Food borne bacteria pathogens**. New York: Marcel Dekker, p.21-69, 1989.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRÜSS, B. M.; KAPLAN, T.; WIESSNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 48, p. 1373–1382, 1998.

LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A.; RODLAND, M. S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology**, v. 150, p. 3959–3967, 2004.

LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API system. **J. Gen. Microbiol.**, v. 130, p. 1871–1882, 1984.

LOURENÇO, L. F. H.; OLIVEIRA, M. L.; PINTO, C. M. C.; PEREIRA, D. X. P. Análises físico-químicas e microbiológicas de carne de caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (linnaeus, 1763), comercializada nos municípios de São Caetano de Odivelas e Belém, PA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 90-95, 2006.

LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, p. 254–261, 2000.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 249– 254, 2003.

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**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestre em Saúde Publica), São Paulo – Universidade de São Paulo.

MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H.; SATO, M. I. Z.; SANCHEZ, P. S.; RIVERA, I. G.; MARTINS M. T. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 201-207, 1994.

MELO, M. C. N; CARVALHO, M. C. S; FERREIRA, R. L; COELHO, L. R.; SOUZA, R.; GOBBI, C. N; ROZENBAUM, R.; SOLARI, C. A.; FERREIRA-CARVALHO, B. T; FIGUEIREDO, A. M. S. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, p. 276-285, 2004.

MELO, M. C. N; CARVALHO, M. C. S; FERREIRA, R. L; COELHO, L. R; SOUZA, R.; GOBBI, C. N; ROZENBAUM, R. SOLARI, C. A; FERREIRA-CARVALHO, B. T; FIGUEIREDO, A. M. S. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, p. 276-285, 2004.

MUSCOLINO, D.; GIARRATANA, F.; BENINATI, C.; TORNAMBENE, A.; PANEBIANCO, A.; ZIINO, G. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, **Italy Italian Journal of Food Safety**, v.3:1701, p, 134-136, 2014.

NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, p. 1031–1035, 1998.

NAKAMURA, L. K. DNA relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, p. 44, v. 125–129, 1994.

NAKAMURA, L. K.; JACKSON, M. A. Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 46–49, 1995.

NESPOLO; N. M. **Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do estado de São Paulo**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração Medicina Veterinária preventiva), Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária Câmpus de Jaboticabal, 2009.

PATROCÍNIO, I. D. R. **A segurança alimentar no consumo de pescado cru com valência para a produção de sushi**. 2009. 129 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar) Lisboa - Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. **Microbiologia**. MacGraw-Hill do Brasil, 2 v., São Paulo, 1981. 495p.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46), to the Kauffmann-Whitte scheme. **Research in Microbiology**, Paris, V. 155, nº 7, p. 568-570, 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**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Química.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAVAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1 p. 297-299, 2004.

SALOMÃO, R. Chile quer elevar venda de salmão ao Brasil para 100 mil t em dois anos. **Globo Rural**. 2017 Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2017/06/chile-quer-elevar-venda-de-salmaa-ao-brasil-para-100-mil-t-em-dois-anos.html>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia plena**, v. 8, n. 3, 2012.

SATO, R. A. **Características microbiológicas de sushis adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa**. 2013 Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração Medicina Veterinária preventiva), Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária Câmpus de Jaboticabal, 2013.

SCAFURO, C. São Paulo tem mais restaurantes japoneses do que churrascarias. **Jornal da Baixada**, 2011. Disponível em: <<http://www.jornaldabaixada.com.br/?p=1203>>. Acesso em: 20 out. 2015.

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

SMITH, N. R.; GORDON, R. E.; CLARCK, F. E. **Aerobic Sporeforming Bacteria** Monograph no 16. Washington, DC: US Department of Agriculture. 1952.

SOARES, C. M.; VALADARES, G. F.; AZEREDO R. M. C.; KUAY, A. Y. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.38, n. 2, 2008.

SOMERVILLE, H. J.; JONES, M. L. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of bacilli. **J. Gen. Microbiol.**, v. 73, p. 257– 265, 1972.

SOUSA JUNIOR, F. C.; NUNES, É. W. F.; NASCIMENTO, E. D.; Oliveira, S. M.; Melo, M. C. N.; Fernandes, M. J. B. C. Prevalência de *Staphylococcus* spp resistentes à meticilina isolados em uma maternidade escola da Cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 42(2), p. 179-182, 2009.

SOUZA, C. M.; BRAGANÇA, M. G.; COLI, M. C. M I. **Manual de boas práticas de fabricação de pão de queijo**. Belo Horizonte: CETEC, 1998. 54p.

STADHOUDERS, J. General introduction. In: *Bacillus cereus* in milk and milk products. **Bull. Int. Dairy Fed.**, n. 287, p.3-5, 1993.

SYED, M. A.; SHAH, S. H. H.; SHERAFZAL, Y.; SHAFI-UR-REHMAN, S.; KHAN, M. A.; BARRETT, J. B.; WOODLEY, T. A.; JAMIL, B.; ABBASI, S. A.; JACKSON, C. R. Detection and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Table Eggs in Haripur, Pakistan **Foodborne Pathogens And Disease**. Mary Ann Liebert, v. XX, n. XX, 2017.

VALLANDRO, M. J.; CAMPOS, T.; PAIM, D.; CARDOSO, M.; KINDLEIN, L. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa**. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. In: **Foodborne Pathogens: an illustrated text**. London: Mosby Year Book, 1991. 547p.

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

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E .F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. - *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 46(4), p. 179-182, 2004b.

VIVONE, A. M.; MOREIRA B.M. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 693-698, 2005.

YOSHINO, M. **Sushi: the delicate flavour of Japan**. Tokyo: Japan Publications Trading, 1997.

## **CAPITULO 2 - Presença *Bacillus cereus* e frequência de genes codificadores de enterotoxinas em sushis**

**RESUMO** - O *Bacillus cereus* é um microrganismo que pode ser encontrado em alimentos como o arroz e ocasionar surtos de intoxicações alimentares. O sushi é um alimento constituído desse cereal, e hoje, com a popularização da comida japonesa surgem questionamentos sobre a qualidade desse alimento e a prevalência desse microrganismo nesse produto. Diante do exposto, esse estudo objetivou avaliar a presença do *Bacillus cereus* e a frequência de genes codificadores de enterotoxinas desse microrganismo em sushis. Para tanto, 60 amostras de sushis foram coletadas em restaurantes especializados e não especializados em comida japonesa, e submetidos a análise de PCR para verificação da presença do microrganismos e de seus fatores de virulência. Das 60 amostras analisadas 75,0% (45/60) apresentaram *B. cereus*, sendo 76,6% (23/30) no grupo de estabelecimentos especializados e 73,3% (22/30) não especializados. O gene *bceT* foi mais frequente sendo amplificado em 35,6% (16) das 45 amostras positivas para *B. cereus*, seguido pelos genes *nheB* 26,7% (12/45), *nheC* 22,2% (10/45), *hblA* 17,8% (8/45) e *cytK* 15,6% (7/45). Cada um dos genes *hblC*, *hblD* e *entFM* foram amplificados em 11,1% (5/45) das amostras, já o gene *nheA* não foi amplificado em nenhuma delas. O sushi é alimento veiculador do *Bacillus cereus* e apresenta genes codificadores de toxinas. Consequentemente erros relacionados a temperatura inadequada de conservação desse alimento podem ocasionar multiplicação desses microrganismo e ocasionar surtos de intoxicação alimentar.

**Palavras-chave:** arroz, comida japonesa, microbiologia de alimentos, saúde pública, toxinas

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, oito espécies do gênero *Bacillus*, estreitamente relacionadas, formam o grupo do *Bacillus cereus*. As bactérias *B. pseudomycoides* (NAKAMURA, 1998), *B. mycoides* (LECHNER et al., 1998; NAKAMURA, 1998; NAKAMURA e JACKSON, 1995), *B. weihenstephanensis* (LECHNER et al., 1998), *B. cereus* (SMITH et al., 1952; SOMERVILLE e JONES, 1972), *B. thuringiensis* (NAKAMURA, 1994; SMITH et al., 1952; SOMERVILLE e JONES, 1972), *B. anthracis* (LOGAN et al., 1985; SMITH et al., 1952; SOMERVILLE e JONES, 1972), *B. cytotoxicus* (GUINEBRETIÈRE et al., 2013) e *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013) fazem parte desse ramo homogêneo de microrganismos em forma de bacilo e formadores de esporos (STADHOUDERS, 1992).

*B. cereus* é uma bactéria Gram positiva, possui a forma de bastão, aeróbica facultativa, móvel e formadora de esporos esféricos em presença de oxigênio, o que lhe confere resistência ao aquecimento e a substâncias químicas (SETLOW, 1995). São amplamente distribuídos na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. A presença das bactérias ou de seus esporos em alimentos é relativamente frequente e podem ser isolados a partir de produtos crus e processados, como arroz, condimentos, vegetais, preparações cárneas e laticínios (ANDERSSON et al., 1995; KOTIRANTA et al., 2000).

Mundialmente essa bactéria vem sendo relacionada a surtos de doenças de origem alimentar podendo multiplicar-se em uma grande variedade de alimentos produzindo toxinas como a hemolisina BL (*Hbl*), enterotoxina não hemolítica (*Nhe*), citoxina K (*CytK*), enterotoxina FM (*entFM*) e enterotoxina T (*bceT*) ocasionando episódios de diarreia e vômito (MTENGA et al., 2012).

As toxinas *Hbl* e *Nhe* são complexos formados por 3 proteínas. As proteínas do *Hbl* são o componente de ligação B e dois componentes líticos  $L_2$  e  $L_1$  codificados, respectivamente, pelos genes *hblA*, *hblC* e *hblD*. As proteínas *Nhe* também apresentam dois componentes líticos codificados pelos genes *nheA* e *nheB*, respectivamente. Em relação a função da proteína codificadora *nheC*, ainda não é conhecida (NGAMWONGSATIT et al., 2008).

O sushi é um alimento com alto potencial para se encontrar esporos de *B. cereus* pois apresenta o arroz cozido como um de seus ingredientes (ADAMS et al., 1994). Sendo assim fatores como temperatura inadequada de conservação podem propiciar a multiplicação do microrganismo, resultando na produção de toxinas e oferecer risco a saúde pública. Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar a presença do *B. cereus* em amostras de sushis comercializados por restaurantes especializado e não especializados em comida japonesa, e verificar a frequência de genes codificadores de enterotoxinas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 60 amostras de sushis *in natura*, constituído obrigatoriamente de arroz temperado e salmão, podendo apresentar outros ingredientes como algas, molhos e legumes. As amostras foram coletadas em 30 restaurantes especializados em comidas japonesas e em 30 estabelecimentos comerciais não especializados nos municípios de Jaboticabal - SP e Ribeirão Preto - SP, sendo os estabelecimentos especializados restaurantes que obrigatoriamente trabalham somente com a culinária japonesa, normalmente oferecendo para o cliente o serviço de rodízio, "a la carte" ou "self service" por quilo. Já os estabelecimentos não especializados são os restaurantes que oferecem a tradicional comida brasileira incorporando em seu cardápio outros tipos de culinária, incluindo a japonesa ("fast foods", "self services", churrascarias, etc.).

As quantidades de sushis adquiridas foram de acordo com o cardápio oferecido pelo estabelecimento, sendo que cada porção comprada apresentada entre 10 a 14 sushis. Quando o estabelecimento oferecia a opção de venda por peso, aproximadamente 300g de sushi foram pesados para compra. Todas as amostras adquiridas foram embaladas na forma comum de venda ao consumidor. Imediatamente após a compra, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp/Jaboticabal - SP.

Para a PCR de cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas e colocados em frascos contendo 225 mL de caldo BHI esterilizado. A mistura foi homogeneizada por um minuto e incubada por 24 horas a 37 °C em estufa com agitação continua. Após o período de incubação alíquotas de 1 mL da cultura foi utilizada para realização da extração de DNA por fervura (KESKIMAKI et al., 2001). A reação de amplificação foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase, 4 pmol de cada primer, 3 µL de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo por 30s e 72°C por 30s. O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min para completa extensão dos fragmentos. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE<sup>1</sup> 1X para a detecção da espécie *B. cereus* com o primer específico *gyrB*. As amostras positivas para *B. cereus*, foram testados quanto à presença do gene codificador das enterotoxinas (*hblD*, *hblC*, *hblA*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *entFM* e *bceT*) (Tabela 1).

O gene *nheA* utilizou a cepa padrão ATCC 11778. Para o restante dos genes foi utilizada a cepa padrão ATCC 11770.

---

<sup>1</sup> Ácido bórico 89 mM; Tris 89 mM e EDTA 2,5 mM

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes codificadores de toxinas dos grupos HBL, NHE, Cytotoxin-K, Enterotoxin-T, Enterotoxin FM e gene *gyrB*, tamanho do fragmento obtido, temperatura de pareamento e referências.

| Grupo            | Gene         | Primer | Sequência (5'→3')        | Tamanho (pb) | T (°C) | Referência                         |
|------------------|--------------|--------|--------------------------|--------------|--------|------------------------------------|
| HBL              | <i>hblA</i>  | FhblA  | GCAAAATCTATGAATGCCTA     | 884          | 50     | Ngamwongsatit et al., 2008         |
|                  |              | RhblA  | GCATCTGTTTCGTAATGTTTT    |              |        |                                    |
|                  | <i>hblC</i>  | FhblC  | CCTATCAATACTCTCGCAA      | 695          |        |                                    |
|                  |              | RhblC  | TTTCCTTTGTTATACGCTGC     |              |        |                                    |
|                  | <i>hblD</i>  | FHD    | GAAACAGGGTCTCATATTC      | 487          | 53     | Thaenthanee et al., 2005           |
|                  |              | RHD2   | CTTGAAGTTGTGGAATCGTT     |              |        |                                    |
| NHE              | <i>nheA</i>  | NA-F1  | TAAGGAGGGGCAAACAGAAG     | 759          | 53     | Ngamwongsatit et al., 2008         |
|                  |              | NA-R1  | TGAATGCCGAAGAGCTGCTTC    |              |        |                                    |
|                  | <i>nheB</i>  | NB-F1  | CAAGCTCCAGTTCATGCGG      | 935          |        |                                    |
|                  |              | NB-R1  | GATCCCATTGTGTACCATTTG    |              |        |                                    |
|                  | <i>nheC</i>  | NC-F1  | ACATCCTTTTGCAGCAGAAC     | 618          |        |                                    |
|                  |              | NC-R1  | CCACCAGCAATGACCATATC     |              |        |                                    |
| Cytotoxin-K      | <i>cytK</i>  | Cyt-F  | CGACGTCACAAGTTGTAACA     | 565          | 50     |                                    |
|                  |              | Cyt-R  | CGTGTGTAAATACCCAGTT      |              |        |                                    |
| Enterotoxin-T    | <i>bceT</i>  | BTF    | GACTACATTCACGATTACGCAGAA | 303          | 56     | Lee et al. 2008; Mtenga et al 2012 |
|                  |              | BTR    | CTATGCTGACGAGCTACATCCATA |              |        |                                    |
| Enterotoxin      | <i>entFM</i> | ENTFMF | GTTTCGTTCAAGGTGCTGGTAC   | 486          | 54     | Ngamwongsatit et al., 2008         |
|                  |              | ENTFMR | AGCTGGGCCTGTACGTACTT     |              |        |                                    |
| <i>B. cereus</i> | <i>gyrB</i>  | BCFW1  | GTTTCTGGTGGTTTACATGG     | 352          | 56     | Manzano et al., 2003a              |
|                  |              | BCRW1  | CAACGTATGATTTAATTCCACC   |              |        |                                    |

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados das amostras onde ocorreram amplificação dos oligonucleotídeo iniciador *gyrB* utilizado para identificação da espécie *B. cereus*.

**Tabela 2.** Amplificação do *gyrB*, distribuídas pelo tipo de estabelecimento onde foram coletas as amostras de sushi.

| Gene <i>gyrB</i>  | Número de amostras (%) |                   | Total (%)  |
|-------------------|------------------------|-------------------|------------|
|                   | Especializado          | Não Especializado |            |
| Amplificação      | 23 (76,6)              | 22 (73,3)         | 45 (75,0)  |
| Sem amplificação  | 7 (23,3)               | 8 (26,6)          | 15 (25,0)  |
| Total de amostras | 30 (100,0)             | 30 (100,0)        | 60 (100,0) |

Das 60 amostras analisadas 75,0% (45) apresentaram amplificação dos genes de *B. cereus*, sendo 76,6% (23/30) no grupo de estabelecimentos especializados e 73,3% (22/30) no grupo de estabelecimentos não especializados. Manzano et al. (2003b) utilizaram a sequência do primer *gyrB* elaborando um protocolo mais rápido capaz de diferenciar o *B. cereus* do *B. thuringiensis* e *B.*

*mycoides*, demonstrando a sensibilidade e especificidade para identificar a presença do *Bacillus cereus* em vários tipos de alimentos.

Adams et al. (1994) analisando amostras sushis (tipo rockfish, salmão, cavala e atum) comercializados na região de restaurantes de Seattle, encontraram em seis (31,58%) dos 19 restaurantes analisados a presença do *B. cereus* no arroz cozido para o preparo dos sushis. Fang et al. (2003) analisando 164 amostras de comidas prontas para o consumo conservadas a 18°C em supermercados da região central de Taiwan, encontraram a presença do *B. cereus* em 49,8% das amostras estudadas. Muscolino et al. (2014) avaliaram 38 amostras de sushis comercializados em Messina e Catania, Itália e encontraram esse microrganismo apenas em três amostras totalizando 7,9%. Apesar das porcentagens menores encontradas por esse autores, esses trabalhos reforçam que o *B. cereus* está presente no sushi. Diferentemente deste trabalho, esses estudos utilizaram somente técnicas de isolamento microbiológicos, o que explicaria a menor ocorrência da presença do microrganismo.

Nas 45 amostras positivas para *B. cereus* foram realizados PCR pesquisando genes codificadores de enterotoxinas, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Genes codificadores de toxinas amplificados, distribuídos pelo tipo de estabelecimento onde foram coletadas as amostras de sushi.**

| Gene<br>Amplificação | Número de amostras |                   | Total (%) |
|----------------------|--------------------|-------------------|-----------|
|                      | Especializado      | Não Especializado |           |
| <i>hblA</i>          | 3                  | 5                 | 8 (17,8)  |
| <i>hblC</i>          | 1                  | 4                 | 5 (11,1)  |
| <i>hblD</i>          | 1                  | 4                 | 5 (11,1)  |
| <i>nheB</i>          | 5                  | 7                 | 12 (26,7) |
| <i>nheC</i>          | 4                  | 6                 | 10 (22,2) |
| <i>cytK</i>          | 3                  | 4                 | 7 (15,6)  |
| <i>bceT</i>          | 8                  | 8                 | 16 (35,6) |
| <i>entFM</i>         | 1                  | 4                 | 5 (11,1)  |

O gene *bceT* foi mais frequente sendo amplificado em 35,6% (16) das 45 amostras analisadas, seguido pelos genes *nheB* 26,7% (12), *nheC* 22,2% (10), *hblA* 17,8% (8) e *cytK* 15,6% (7). Os genes *hblC*, *hblD* e *entFM* apresentaram a menor

ocorrência sendo todos de 11,1% (5) do total das 45 amostras positivas para *B. cereus*. Não houve amplificação do gene *nheA*.

Agrupando os complexos de genes *hblA*, *hblC* e *hblD* como *hbl* e, *nheB* e *nheC* como *nhe*, verifica-se uma porcentagem de 40,0% e 48,9% respectivamente para prevalência desses codificadores de enterotoxina. Hwang e Park (2015) realizaram o mesmo agrupamento e verificaram uma porcentagem maior em amostras de comidas prontas para consumo e alimentos infantis, sendo que dos 347 isolados de *B. cereus* 290 (84,0%) apresentaram o gene *hbl* e 346 (99,7%) o gene *nhe*.

As enterotoxinas são proteínas que causam citotoxicidade e acúmulo de líquido nas vilosidades do íleo em animais experimentais, podendo ocasionar dermonecrose e morte em ratos. (GRANUM, 1997; NOTERMANS e BATT, 1998; HANSEN e HENDRIKSEN, 2001).

Em relação aos genes codificadores das enterotoxinas *cytK*, *bceT* e *entFM* Hwang e Park (2015) no mesmo estudo, encontraram prevalências maiores, sendo de 48% (167) para *cytK*, 80% (277) para *bceT* e 93% (323) para *entFM*, do total de 347 *B. cereus* isolados. A proteína *cytK* é conhecida por induzir uma diarreia similar as toxinas codificadas pelo grupo *hbl* e *nhe* (LUND e GRANUM, 1997). As proteínas *bceT* e *entFM* podem apresentar a mesma atividade biológica dos complexos *hbl* e *nhe*, mas suas contribuições para intoxicações alimentares ainda são desconhecidas (HWANG e PARK 2015).

Na Tabela 4 é possível observar que na amostra 26 do grupo de estabelecimentos especializados, e na amostra 24 do grupo não especializado, apresentaram amplificação para 8 genes sendo eles *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *bceT* e *entFM*. Das 45 amostras que foram confirmadas as presenças do *B. cereus*, 22 apresentaram pelo menos um gene codificador de toxina totalizando 48,9% das amostras.

**Tabela 4. Distribuição dos genes codificadores de toxinas por amostra e tipo de estabelecimento onde foram adquiridos os sushis**

| Nº da Amostras | Especializados                                                |
|----------------|---------------------------------------------------------------|
| 3              | <i>nheB + nheC</i>                                            |
| 6              | <i>bceT</i>                                                   |
| 7              | <i>hblA + bceT</i>                                            |
| 9              | <i>hblA + becT</i>                                            |
| 19             | <i>nheB + nheC + cytK + bceT</i>                              |
| 25             | <i>nheB + nheC + cytK + bceT</i>                              |
| 26             | <i>hblA + hblC + hblD + nheB + nheC + cytK + bceT + entFM</i> |
| 27             | <i>nheB + nheC + cytK + bceT</i>                              |
| 28             | <i>bceT</i>                                                   |
| Nº da Amostras | Não especializados                                            |
| 1              | <i>nheC</i>                                                   |
| 3              | <i>nheB</i>                                                   |
| 4              | <i>nheB</i>                                                   |
| 5              | <i>nheB + nheC + bceT</i>                                     |
| 8              | <i>bceT</i>                                                   |
| 10             | <i>hblA + bceT</i>                                            |
| 11             | <i>hblA + bceT</i>                                            |
| 21             | <i>hblC</i>                                                   |
| 24             | <i>hblA + hblC + hblD + nheB + nheC + cytK + bceT + entFM</i> |
| 25             | <i>hblA + hblD + nheB + nheC + cytK + bceT + entFM</i>        |
| 26             | <i>nheB + nheC + cytK + bceT + entFM</i>                      |
| 27             | <i>hblC + hblD + nheB + nheC + bceT + entFM</i>               |
| 30             | <i>hblA + hblC + hblD + cytK</i>                              |

Agrupando os complexos *hbl* e *nhe*, verifica-se que 6,6% (3) das 45 amostras com 5 genes codificadores de enterotoxinas, seguidos 4,4% (1), 6,6% (3), 13,3 (6) e 17,7% (8) para 4, 3, 2 e 1 genes respectivamente.

Diferentemente, Hwang e Park (2015), demonstraram em seu trabalho que todos os isolados avaliados apresentaram pelo menos um gene produtor de enterotoxina. A porcentagem de isolados do *B. cereus*, com cinco genes codificadores simultaneamente, que esses autores encontraram foi de 43,0% (149) e 46% (160) desses isolados apresentaram 3 genes, sendo eles *hbl*, *nhe* e *cytK*.

É importante ressaltar que diferentemente do trabalho de Hwang e Park (2015), esse estudo não utilizou isolados *B. cereus* para pesquisa dos genes produtores de enterotoxina, sendo que a metodologia foi a extração geral do DNA enriquecido da amostra. Ou seja, todo microrganismo encontrando na amostra inicial multiplicou e contribuiu para os resultados encontrados. Consequentemente não é

possível afirmar por exemplo que os genes encontrados em associação sejam de apenas um isolado *B. cereus* na amostra. Esse fator talvez explicaria as diferenças encontradas entre as prevalências

Com a popularização da comida japonesa, o sushi passou a ser uma refeição frequente na alimentação brasileira. Entretanto, não existe uma legislação específica para regulamentar a qualidade microbiológica desses produtos oferecidos ao consumidor, tão pouco, estudos sobre a prevalência de microrganismos causadores de intoxicação alimentar em sushis.

#### 4. CONCLUSÕES

O sushi é um alimento com alta potencial de veicular o *B. cereus*, sendo provavelmente o arroz a maior fonte de contaminação. As amplificações de genes codificadores de toxinas em sushis contendo *B. cereus*, representam risco de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos por esse agente, sendo que falhas relacionadas a manutenção inadequada da temperatura de conservação desse produto após o seu preparo, podem gerar condições favoráveis para produção das toxinas e ocasionar surtos de doença alimentares.

É importante ressaltar a necessidade de estabelecer normas e parâmetros para melhorar a qualidade desse tipo de produto, bem como treinar e ensinar boas práticas de manipulação de alimentos aos chefes, cozinheiros e sushimen, visando fornecer um sushi mais seguro ao consumidor.

#### 5. REFERÊNCIAS

ADAMS, A. M.; LEJA, L. L.; JINNEMAN, K. ; BEEH, J.; YUEN, G. A.; WEKELL, M. M. Anisakid Parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in Sushi and Sashimi from Seattle Area Restaurants. **Journal of Food Protection**, vol. 57, n. 4, p. 311-317, 1994.

ANDERSSON, A.; RGÖNER, U.; GRANUM, P. E.. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, 1995.

FANG, T. J.; WEI, Q.-K.; LIAO, C.-W.; HUNG, M.-J.; WANG, T.-H. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 241–250, 2003.

GUINEBRETIÈRE, M. -H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; SARRAU, B. D.; DEBUYSER, M. -L.; LAMBERRET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LERECLUS, D.; VOS, P. D.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp nov. is a new thermo-tolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with foodpoisoning. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 63, p. 31–40, 2013.

GRANUM, P. E. 1997. Fundamentals and Frontiers: in *Bacillus cereus*. **Food microbiology**. ASM Press, Washington, D.C, p. 327–336, 1997.

HANSEN, B. M.; DAMGAARD, P. H.; EILENBERG, J.; PEDERSEN J. C. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 71, p. 106-114, 1998.

HWANG, J.; PARK, J. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1-9, 2015.

JIMÉNEZA, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTESB, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTO, A.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 383– 391, 2013.

KESKIMAKI, M., EKLUND, M., PERSONEN, H., HEISKANEN, T., SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect.Dis.**, v. 40, p. 151-156, 2001.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M.. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 189-198, 2000.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRÜSS, B. M.; KAPLAN, T.; WIESSNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, p. 1373–1382, 1998.

LEE D.S.; KIM K. S.; HONG K. W. A multiplex PCR assay for the detection and differentiation of enterotoxin-producing and emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 17, p. 761-765, 2008.

LUND, T., GRANUM, P. E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v. 143, p. 3329–3336, 1997.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 249–254, 2003a.

MANZANO, M.; GIUSTO, C.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A molecular method to detect *Bacillus cereus* from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1361–1366, 2003b.

MTENGA, A. B.; KASSIM, N.; LEE, W.; SHIM, W.; YOON, Y.; CHUNG, D. Resistance of *Bacillus cereus* and Its Enterotoxin Genes in Ready-to-eat Foods to  $\gamma$ -Irradiation. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 21(2), p. 443-452, 2012. DOI 10.1007/s10068-012-0056-7

MUSCOLINO, D.; GIARRATANA, F.; BENINATI, C.; TORNAMBENE, A.; PANEBIANCO, A.; ZILINO, G. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, **Italy Italian Journal of Food Safety**, v 3:1701, p. 134-135, 2014.

NAKAMURA, L. K. DNA relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44, 125–129, 1994.

NAKAMURA, L. K.; JACKSON, M. A. Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 46–49, 1995.

NGAMWONGSATIT, P.; BUASRI, W.; PIANARIYANON, P.; PULSRIKARN, C.; OHBA, M.; ASSAVANIG, A.; PANBANGRED, W. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 352–356, 2008.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for foodborne *Bacillus cereus* and its toxins. **J. Appl. Microbiol. Suppl.**, v. 84, p. 51S-61S, 1998.

SETLOW P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 29-54, 1995.

SMITH, N. R.; GORDON, R. E.; CLARCK, F. E. **Aerobic Sporeforming Bacteria** Monograph no 16. Washington, DC: US Department of Agriculture. 1952.

SOMERVILLE, H. J.; JONES, M. L. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of bacilli. **J. Gen. Microbiol.**, v. 73, p. 257-265, 1972.

THAENTHANEE, S.; WONG, A. C. L.; PANBANGRED, W. Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 203–212, 2005.

### **CAPITULO 3 - Quantificação de coliformes totais e termotolerantes, identificação de *Escherichia coli* e *Salmonella*, e ocorrência de genes codificadores de fatores de virulência em amostras de sushis**

**RESUMO** - O sushi conquistou o seu espaço no setor gastronômico brasileiro e consequentemente mais restaurantes passaram a oferecer a culinária japonesa ao consumidor. A manipulação desse produto pelo sushiman, somada a presença de vários ingredientes que o compõe, levantam questões de saúde pública sobre a segurança desse alimento e riscos oferecidos aos consumidores brasileiros. Diante do exposto, esse estudo avaliou a qualidade microbiológica de sushis pela quantificação de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e também de oito genes codificadores de toxina. Para tanto, 60 amostras de sushis foram coletadas em restaurantes especializados e não especializados em comida japonesa, e avaliadas as amostras pela metodologia do número mais provável para coliformes totais e termotolerantes, identificação da *E. coli* e fatores de virulência pela análise de PCR. As populações de coliformes totais e termotolerantes variaram de ausência ( $< 3,0$ ) a exponenciais de  $10^5$  e  $10^4$  NMP.g<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo que 60,0% (36/60) das amostras apresentaram valores acima de  $10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>, limite máximo previsto pela legislação brasileira para coliformes termotolerantes. Das 60 amostras analisadas 21,7% (13) apresentam *E. coli* e apenas 3 dessas amostras apresentaram amplificação dos genes de toxinas *eae* e *estB*. A presença da *Salmonella* spp. foi negativa em todas as amostras. O sushi é um alimento com alto risco de contaminação e pode veicular *E. coli*, bem como genes de fatores de virulência, podendo ocasionar surtos de intoxicação alimentar.

**Palavras-chave:** comida japonesa, microbiologia de alimentos, saúde pública, segurança de alimentos, toxinas.

## 1. INTRODUÇÃO

Coliformes é um termo geral para bactérias Gram negativas, anaeróbias, facultativas em forma de bastonetes e foi considerado historicamente como um grupo de microrganismos indicadores de contaminação fecal, e assim, avaliar a presença potencial de patógenos entéricos em água ou alimentos. Entretanto hoje, já se sabe que a maioria dos coliformes são encontrados no meio ambiente, sendo necessário a diferenciação entre coliformes totais e termotolerantes (FORSYTHE, 2013).

Entre os coliformes termotolerantes, a *E. coli* é a principal espécie do grupo, pois ela se multiplica no meio ambiente. Consequentemente é considerada o melhor indicador de poluição fecal e possível ameaça de contaminação por patógenos entéricos.

As cepas de *E. coli* associadas à infecção intestinal e surtos alimentares são classificadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas (tEPEC e aEPEC), shigatoxigênica (STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004).

O sushi é um alimento constituído de vários ingredientes e confeccionados pelas mãos sem luvas do sushiman. Consequentemente a falta de higiene do manipulador associada a má qualidade da matéria prima e limpeza do local de trabalho, pode criar ambiente propício para multiplicação de bactérias entéricas e ocasionar surtos de doença alimentar. Sendo assim, esse estudo teve objetivo de quantificar coliformes totais e termotolerantes, identificar *E. coli* e *Salmonella spp.*, e avaliar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas desse microrganismo em amostras de sushis comercializados em restaurantes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

O estudo foi realizado com 60 amostras de sushis *in natura*, constituído obrigatoriamente de arroz temperado e salmão, podendo apresentar outros

ingredientes como algas, molhos e legumes. As amostras foram coletadas em 30 restaurantes especializados em comidas japonesas e em 30 estabelecimentos comerciais não especializados nos municípios de Jaboticabal - SP e Ribeirão Preto - SP, sendo os estabelecimentos especializados restaurantes que obrigatoriamente trabalham somente com a culinária japonesa, normalmente oferecendo para o cliente o serviço de rodízio, "a la carte" ou "self service" por quilo. Já os estabelecimentos não especializados são os restaurantes que oferecem a tradicional comida brasileira incorporando em seu cardápio outros tipos de culinária, incluindo a japonesa ("fast foods", "self services", churrascarias, etc.).

As quantidades de sushis adquiridas foram de acordo com o cardápio oferecido pelo estabelecimento, sendo que cada porção comprada apresentada entre 10 a 14 sushis. Quando o estabelecimento oferecia a opção de venda por peso, aproximadamente 300g de sushi foram pesados para compra. Todas as amostras adquiridas foram embaladas na forma comum de venda ao consumidor. Imediatamente após a compra, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp/Jaboticabal - SP.

Para a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes de cada amostra foram pesadas, assepticamente, 25 gramas, as quais foram colocadas em frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, esterilizada. A mistura foi homogeneizada em aparelho Stomacher por um minuto, obtendo a diluição inicial de  $10^{-1}$ . Após esse processo foram realizadas diluições decimais até  $10^{-7}$  utilizando-se o mesmo diluente (APHA, 2001).

## **2.1 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TOTAIS POR GRAMA**

**Teste presuntivo:** três séries de tubos de caldo lauril sulfato triptose, com tubo de Durham invertido, foram inoculados com 1 mL a partir das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Após serem incubados a 35°C por 24 a 48 horas, as culturas que produziram gás foram consideradas positivas (APHA, 2001).

**Teste confirmativo:** de cada tubo com resultado positivo no teste presuntivo foi transferida uma alçada da cultura (alça de níquel-cromo de 3 mm de diâmetro) para tubos correspondentes contendo caldo lactose-verde brilhante-bile a 2,0% e tubo de Durhan invertido. Após o processo foi realizada a incubação a 35°C por 24 a 48 horas e considerados positivas as culturas que produziram gás neste período. De acordo com o número de tubos com culturas positivas e, empregando a Tabela de Hoskins, foi determinado o NMP de coliformes totais por grama de sushi (APHA, 2001).

## 2.2 DETERMINAÇÃO DO NMP DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES POR GRAMA

**Coliformes termotolerantes:** a partir de cada tubo de caldo lauril sulfato triptose com resultado positivo no teste presuntivo para coliformes totais, foram inoculados com alça, tubos correspondentes contendo caldo EC e tubo de Durhan invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas e considerados positivas as culturas com multiplicação bacteriana e produção de gás. De acordo com o número de tubos com culturas positivas e, empregando a Tabela de Hoskins, foi determinado o NMP de coliformes termotolerantes por grama de sushi (APHA, 2001).

## 2.3 PCR

Para a PCR de cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas e colocados em frascos contendo 225 mL de caldo BHI esterilizado. A mistura foi homogeneizada por um minuto, e incubada por 24 horas a 37 °C em estufa com agitação contínua. Após o período de incubação alíquotas de 1 mL da cultura foi utilizada para realização da extração de DNA por fervura (KESKIMAKI et al., 2001). A reação de amplificação foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase, 4 pmol de cada primer, 3  $\mu\text{L}$  de DNA genômico e água pura estéril para 20  $\mu\text{L}$ . As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 94°C por 3 min, seguido

de 30 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo por 30s e 72°C por 30s. O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min para completa extensão dos fragmentos. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE<sup>2</sup> 1X, para detecção da espécie *Escherichia coli* com os primers específicos 16 E1/16 E2/16 E3. As amostras positivas para *E. coli* foram testados quanto à presença dos genes codificador de fatores de virulência (*Stx1*, *Stx2*, *eae*, *eltB*, *estA*, *estB*, *aatA* e *aggR*) (Tabela 1). Para pesquisa de *Salmonella* sp. foi utilizado os primers *INVAF* e *INVAR* (5'-CGGTGGTTTTAAGCGTACTCTT- 3' e 5'- CGAATATGCTCCACAAGGTTA - 3', respectivamente).

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção da *E. coli* (16S rRNA) e amplificação dos genes dos grupos STEC, EPEC, ETEC e EAEC, tamanho do fragmento obtido, temperatura de pareamento, amostras controles e referências.

| Grupo         | Gene                 | Nome do gene | Sequência                            | Tamanho (pb) | Temperatura de pareamento (°C) | Controle positivo | Referência             |
|---------------|----------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------------|------------------------|
| 16S rRNA gene | 16 E1                |              | for 5' GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC     | 583          | 55                             | EcL 6611          | Tsen et al., 1998.     |
|               | 16 E2                |              | rev 5' TTCCCGAAGGCACATTCT            |              |                                |                   |                        |
|               | 16 E3                |              | rev 5' TTCCCGAAGGCACCAATC            |              |                                |                   |                        |
| STEC          | <i>Stx1</i>          | <i>stxA</i>  | for 5' TTAGACTTCTCGACTGCAAAAG        | 530          | 60                             | EcL 6611          | Woodward et al., 1992. |
|               |                      |              | rev 5' TGTGTACGAAATCCCCTCTG          |              |                                |                   |                        |
|               | <i>Stx2all</i> *     | <i>Stx2A</i> | for 5' TTATATCTGCGCCGGGTCTG          | 326          |                                |                   |                        |
|               |                      |              | rev 5' AGACGAAGATGGTCAAAACG          |              |                                |                   |                        |
| EPEC          | <i>EAE (intimin)</i> | <i>eae</i>   | for 5' CATTATGGAACGGCAGAGGT          | 790          | 60                             |                   | Beaudry et al., 1996.  |
|               |                      |              | rev 5' ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA         |              |                                |                   |                        |
| ETEC          | <i>STa</i>           | <i>estA</i>  | for 5' TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG      | 163          | 60                             | EcL7805           | Ngeleka et al., 2003.  |
|               |                      |              | rev 5' GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT      |              |                                |                   |                        |
|               | <i>STb</i>           | <i>estB</i>  | for 5' GCAATAAGGTTGAGGTGAT           | 368          |                                |                   | Lortie et al., 1991.   |
|               |                      |              | rev 5' GCCTGCAGTGAGAAATGGAC          |              |                                |                   |                        |
|               | <i>LT</i>            | <i>eltB</i>  | for 5' TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA       | 275          |                                |                   | Furrer et al., 1990.   |
|               |                      |              | rev 5' GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC       |              |                                |                   |                        |
| EAEC          |                      | <i>aatA</i>  | for 5' CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT    | 629          | 60                             | 17.2              | Schmidt et al., 1995   |
|               |                      |              | rev 5' CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T |              |                                |                   |                        |
|               |                      | <i>aggR</i>  | for 5' CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA    | 457          |                                |                   |                        |
|               |                      |              | rev 5' AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG   |              |                                |                   |                        |

\*Stx2all Shiga-like toxin typell subunit A and B

<sup>2</sup> Ácido bórico 89 mM; Tris 89 mM e EDTA 2,5 mM

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 refere-se à distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial do NMP de coliformes totais (NMP.g<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.** Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial NMP de coliformes totais (NMP.g<sup>-1</sup>). (Jaboticabal e Ribeirão Preto – SP, 2016 e 2017)

| Exponencial de coliformes totais (NMP.g <sup>-1</sup> ) | Número de amostras (%) |                    | Total (%)         |
|---------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
|                                                         | Especializados         | Não especializados |                   |
| Ausência (< 3,0)                                        | 1 (3,3)                | 2 (6,7)            | 3 (5,0)           |
| 10                                                      | 1 (3,3)                | 2 (6,7)            | 3 (5,0)           |
| 10 <sup>2</sup>                                         | 6 (20,0)               | 7 (23,3)           | 13 (21,7)         |
| 10 <sup>3</sup>                                         | 15 (50,0)              | 12 (40,0)          | 27 (45,0)         |
| 10 <sup>4</sup>                                         | 6 (20,0)               | 5 (16,7)           | 11 (18,3)         |
| 10 <sup>5</sup>                                         | 1 (3,3)                | 2 (6,7)            | 3 (5,0)           |
| <b>Total de amostras</b>                                | <b>30 (100,0)</b>      | <b>30 (100,0)</b>  | <b>60 (100,0)</b> |

As populações de coliformes totais variaram de ausência (< 3,0) a exponencial de 10<sup>5</sup> NMP.g<sup>-1</sup>, sendo a maior porcentagem na casa de 10<sup>3</sup>, totalizando 45,0% (27) do total das 60 amostras analisadas. A ausência de coliformes totais foi verificada em 3 amostras totalizando 5,0%.

A Tabela 3 refere-se à distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial do NMP de coliformes termotolerantes (NMP.g<sup>-1</sup>).

**Tabela 3.** Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial do NMP de coliformes termotolerantes (NMP.g<sup>-1</sup>). (Jaboticabal e Ribeirão e Preto – SP, 2016 e 2017)

| Exponencial de coliformes termotolerantes (NMP.g <sup>-1</sup> ) | Número de amostras (%) |                    | Total (%)         |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
|                                                                  | Especializados         | Não especializados |                   |
| Ausência (< 3,0)                                                 | 5 (16,7)               | 7 (23,3)           | 12 (20,0)         |
| 10                                                               | 6 (20,0)               | 6 (20,0)           | 12 (20,0)         |
| 10 <sup>2</sup>                                                  | 14 (46,7)              | 11 (36,7)          | 25 (41,7)*        |
| 10 <sup>3</sup>                                                  | 3 (10,0)               | 5 (16,7)           | 8 (13,3)*         |
| 10 <sup>4</sup>                                                  | 2 (6,7)                | 1 (3,3)            | 3 (5,0)*          |
| <b>Total de amostras</b>                                         | <b>30 (100,0)</b>      | <b>30 (100,0)</b>  | <b>60 (100,0)</b> |

\* Amostras fora do padrão para Coliformes termotolerantes. Valor acima de 10<sup>2</sup> (NMP.g<sup>-1</sup>) segundo RDC - nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

As populações de coliformes termotolerantes variaram de ausência ( $< 3,0$ ) a exponencial de  $10^4$  NMP.g<sup>-1</sup>, sendo a maior porcentagem na casa de  $10^2$ , totalizando 41,7% (25) das 60 amostras analisadas. A ausência dos microrganismos indicadores foi verificada em 12 amostras totalizando 20,0%.

Também é possível verificar que 60,0% (36) das amostras em que esses microrganismos foram quantificados apresentaram-se com valores acima de  $10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>, limite máximo previsto pela legislação vigente para alimentos similares (BRASIL, 2001). De acordo com a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, essas amostras seriam consideradas inaceitáveis para o consumo. Santos et al. (2012) avaliaram a qualidade microbiológica de sushis comercializados em restaurantes de Aracaju - SE e verificaram que 80% (28) das 35 amostras analisadas estavam com valores do NMP de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação. Esses resultados somados a dados de pesquisas anteriores (RESENDE, 2004; MARTINS, 2006) refletem a real sanidade da cadeia produtiva de comida japonesa, demonstrando que falhas estão ocorrendo no processo de produção desse alimento.

A Tabela 4 apresenta os resultados das amostras nas quais ocorreram amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores 16 E1/16 E2/16 E3 utilizados para identificação da espécie *E. coli*.

**Tabela 4. Amplificação dos genes 16 E1/16 E2/16 E3 para identificação da *E. coli*, distribuídas pelo tipo de estabelecimento onde foram coletas as amostras de sushi.**

| Gene 16 E1/16 E2/16 E3 | Número de amostras (%) |                   | Total (%)  |
|------------------------|------------------------|-------------------|------------|
|                        | Especializado          | Não Especializado |            |
| Amplificação           | 5 (16,7)               | 8 (26,7)          | 13 (21,7)  |
| Sem amplificação       | 25 (83,3)              | 22 (73,3)         | 47 (78,3)  |
| Total de amostras      | 30 (100,0)             | 30 (100,0)        | 60 (100,0) |

Das 60 amostras analisadas 21,7% (13) apresentam *E. coli*, sendo 5 amostras no grupo de estabelecimentos especializados e 8 amostras no grupo de não especializado. Não existe na legislação brasileira um limite para a população de *E. coli*. De acordo com a legislação a presença desse microrganismo deverá ser relatada em laudo analítico quando constatada em um alimento.

Atanassova et al. (2008) encontraram resultados semelhantes avaliando a qualidade microbiológica de sushis comercializados em "sushi bar" e varejos no norte da Alemanha, verificando que 19,2% (24) das 125 amostras apresentavam *E. coli*. A presença desse microrganismo no sushi podem levar a surtos de intoxicação alimentar como relatados por Jain et al. (2004), onde 34 clientes de dois restaurantes de Nevada tiveram sintomas de diarreia com duração de 2 a 9 dias.

Na Tabela 5 é possível observar que das 13 amostras onde foram confirmadas a presença do *E. coli*, apenas 3 amostras apresentaram amplificação para genes codificadores de toxinas sendo esses genes *eae* e *estB*.

**Tabela 5. Distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência por amostra e tipo de estabelecimento onde foram adquiridos os sushis**

| Amostras | Especializados     |
|----------|--------------------|
| 1        | <i>eae</i>         |
|          | Não especializados |
| 4        | <i>eae</i>         |
| 7        | <i>estB</i>        |

As amostras 1 do grupo especializado e 4 do grupo não especializado apresentaram amplificação para o gene *eae* totalizando 15,4% (2/13) das amostras onde foram confirmadas a presença de *E. coli*. A *eae* codifica uma proteína externa a membrana chamada intimina, que media a ligação da EPEC às células epiteliais. A intimina também estimula resposta imune dos linfócitos Th1 e a hiperplasia das criptas intestinais (HIGGINS et al., 1999). As bactérias pertencentes ao grupo das EPEC estão relacionado a casos de diarreia infantil em países em desenvolvimento e pode ser definida pela produção de lesões do tipo "attaching and effacing" (A/E) e pela ausência de toxina Shiga (Stx) (TRABULSI et al., 2002; KAPER et al., 2004).

Apenas a amostra 7 do grupo não especializado apresentou amplificação para gene *estB* totalizando 7,7% (1/13) das amostras onde foram confirmadas a presença *E. coli*. A *estB* codifica uma proteína enterotóxica termoestável (ST) produzidos pelas ETEC e esta associada com a quadros de diarréias em animais e crianças (KAPER et al., 2004; GYLES e FAIRBROTHER, 2009).

Não existem muitas publicações sobre a prevalência de genes codificadores de enterotoxinas e fatores de virulência da *E. coli* em isolados de sushis. Wang et al.

(2017) avaliaram a prevalência de *E. coli* diarrreio gênica em diferentes comidas no varejo (carne bovina, suína, frango, peixe, vegetais e frutas, e comidas prontas) em Osaka, Japão, e verificaram que 6,0% (20) das 333 amostras apresentaram-se positivas para *E. coli* patogênica, sendo que das 82 cepas isoladas no trabalho, 16 apresentaram fatores de virulência para EPEC e 2 isolados para ETEC.

Em relação a pesquisa de *Salmonella* spp., todas as amostras apresentaram-se negativas, estando todas de acordo com a RDC nº 12 que determina a ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de alimento crus, refrigerados ou congelados. (BRASIL, 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

O sushi apresenta risco potencial à saúde pública, já que a *E. coli* e seus genes codificadores de fatores de virulência foram encontrados nesse trabalho. A maioria das amostras apresentaram valores de NMP acima do permitido pela legislação para coliformes termotolerantes, demonstrando que esse alimento não é seguro segundo os padrões estabelecidos, não sendo recomendado ao consumo. Isso é reflexo de falhas nas boas práticas de fabricação de alimento, erros de armazenamento e obtenção da matéria prima, demonstrando a necessidade desse setor reformular sua estrutura de produção, orientar seus funcionários, objetivando um alimento seguro.

#### 5. REFERÊNCIAS

APHA. American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, 2001. 676 p.

ATANASSOVA, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Microbiological Quality of Sushi from Sushi Bars and Retailers. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 860–864, 2008.

BEAUDRY M, ZHU C, FAIRBROTHER JM, HAREL J. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **J Clin Microbiol.**, v. 34, p.144–148, 1996.

BRASIL. **Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 20 de out. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FURRER B , CANDRIAN U , LUTHY J . Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Lett Appl Microbiol.**, v. 10, p. 31–34, 1990.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.;PRESCOTT, J. F.;SONGER, G. ;THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ed. New York: Wiley-Blackwell, p. 267-308, 2010..

HIGGINS, L. M.; FRANKEL, G.; CONNERTON, I.; GONÇALVES, N. S.; DOUGAN, G.; MACDONALD, T. T. Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. **Science.**, v. 285, n. 5427, p. 588-591, 1999.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic *Escherichia coli*.**Nat Rev Microbiol.**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KESKIMAKI, M., EKLUND. M., PERSONEN, H., HEISKANEN, T., SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect.Dis.**, v. 40, p. 151-156, 2001.

LORTIE LA, DUBREUIL JD, HAREL J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **J Clin Microbiol.**, v. 29, p. 656–659, 1991.

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**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestre em Saúde Pública), São Paulo – Universidade de São Paulo.

NGELEKA M, PRITCHARD J, APPLEYARD G, MIDDLETON D, FAIRBROTHER JM. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **J Vet Diagn Invest.**, v. 5, p. 242–252, 2003.

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**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Química.

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3, 2012.

SCHMIDT, H., KNOP, C., FRANKE, S., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J., KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol.** v. 33(3), p. 701-705, 1995.

TSEN, H. Y.; LIN1, C. K.; CHI, W.R. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water **Journal of Applied Microbiology.**, v. 85, p 554–560, 1998.

TRABULSI, L.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 508 - 513, 2002.

WANG , L.; NAKAMURA, H.; KAGE-NAKADAI, E.; HARA-KUDO, Y.; NISHIKAWA, Y. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods **International Journal of Food Microbiology.**, v. 249, p. 44–52, 2017.

WOODWARD MJ, CARROLL PJ, WRAY C. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Vet Microbiol.**, v. 31, p. 251–261, 1992.

#### **CAPITULO 4 - Populações de *Staphylococcus* spp. e *S. coagulase* positivos, pesquisa de *S. aureus* e pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência em sushis**

**RESUMO** - As doenças de origem alimentar são uma preocupação frequente para a saúde pública. Diante dessa realidade, esse trabalho avaliou a contaminação de sushis por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e a presença de genes codificadores de toxinas nesses microrganismos. As amostras foram adquiridas em 30 restaurantes especializados em comida japonesa e 30 restaurantes não especializados da região de Ribeirão Preto - SP. Foram realizadas as contagens de *Staphylococcus* sp., e *Staphylococcus* coagulase positivos, pesquisa de *S. aureus* e pesquisa de genes codificadores de toxinas. Das amostras analisadas, 80,0% (48/60) apresentaram *Staphylococcus* spp., com populações variando de  $1,0 \times 10^2$  a  $5,3 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que em 31,7 % (19/60) foram caracterizados como *Staphylococcus* coagulase positivo e em 8,3% (5/60) apresentaram valores de populações acima do limite estabelecido. A presença *S. aureus* foi identificada em 11,7% (7/60) das amostras e estas apresentaram o gene codificador *coa* sendo todas positivas na prova da coagulase. Dentre as 7 amostras de *S. aureus* os genes *eta* e *hlg* foram os mais frequentes (4/7), seguidos pelos genes *sea*, *sei* e *tst* (2/7), e o gene *seg* (1/7). O sushi é um alimento veiculador de *S. aureus* com a presença de genes codificadores de fatores de virulência ressaltando a importância de estabelecer normas e parâmetros para melhorar a qualidade desse tipo de produto, bem como capacitar os chefes, cozinheiros e sushimen, ensinando-lhes boas práticas de manipulação de alimentos, visando fornecer um sushi mais seguro ao consumidor.

**Palavras-chaves:** comida japonesa, doenças transmitidas por alimento, manipuladores de alimentos, segurança alimentar, saúde pública, toxinas

## 1. INTRODUÇÃO

A culinária japonesa conquistou seu espaço no cenário mundial e no Brasil representa, um dos setores mais crescente na área gastronômica do país. Esse crescimento e popularização criou um mercado competitivo com outros tipos de restaurantes, obrigando-os à adaptação e inclusão de receitas japonesas em seu cardápio.

O sushi, prato que apresenta pescado cru como ingrediente, por tradição é preparados pelas mãos nuas dos “sushimen”, já que a utilização de luvas para sua confecção alteraria o seu sabor final da comida. Sendo assim, surge a preocupação do ponto de vista da saúde pública relacionada à veiculação de doenças de origem alimentar.

A intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é uma doença extremamente comum que resulta do consumo de alimentos que contêm enterotoxinas estafilocócicas (SEs), que são produzidas por estirpes enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. Cinco SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são as causas mais comuns de intoxicação alimentar estafilocócica (Balaban; Rasooly 2000, Loir et al., 2003). Os sintomas típicos da IAE incluem náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia dentro de 2 a 4 h após a ingestão (Argudin et al., 2010; Hennekinne et al., 2012). Até o momento a literatura descreve 23 SEs e SE-like toxins (SEIs).

Nesse contexto, de popularização e expansão da gastronomia japonesa, surge o papel da Medicina Veterinária Preventiva, em zelar pela qualidade dos alimentos oferecidos à sociedade, buscando orientar e fiscalizar os profissionais desse setor econômico, objetivando um alimento seguro para o consumo. Sendo assim, objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica do sushi pela quantificação de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, bem como pesquisar a presença de *Staphylococcus aureus* e genes codificadores de toxinas em *S. aureus*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 60 amostras de sushis *in natura*, constituído obrigatoriamente de arroz temperado e salmão, podendo apresentar outros ingredientes como algas, molhos e legumes. As amostras foram coletadas em 30 restaurantes especializados em comidas japonesas e em 30 estabelecimentos comerciais não especializados nos municípios de Jaboticabal - SP e Ribeirão Preto - SP, sendo os estabelecimentos especializados restaurantes que obrigatoriamente trabalham somente com a culinária japonesa, normalmente oferecendo para o cliente o serviço de rodízio, "a la carte" ou "self service" por quilo. Já os estabelecimentos não especializados são os restaurantes que oferecem a tradicional comida brasileira incorporando em seu cardápio outros tipos de culinária, incluindo a japonesa ("fast foods", "self services", churrascarias, etc.).

As quantidades de sushis adquiridas foram de acordo com o cardápio oferecido pelo estabelecimento, sendo que cada porção comprada apresentada entre 10 a 14 sushis. Quando o estabelecimento oferecia a opção de venda por peso, aproximadamente 300g de sushi foram pesados para compra. Todas as amostras adquiridas foram embaladas na forma comum de venda ao consumidor. Imediatamente após a compra, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp/Jaboticabal - SP.

As amostras foram submetidas às contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo. Também foi realizada a pesquisa *Staphylococcus aureus* e de genes codificadores de toxinas. Para a caracterização microbiológica foram utilizadas as metodologias descritas no American Public Health Association (APHA, 2001) e a técnica de PCR comum para pesquisa de *Staphylococcus aureus* e genes de codificadores de toxina.

Para a contagem de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, de cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas e colocados em frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, esterilizada. A mistura foi homogeneizada em aparelho Stomacher por um minuto, obtendo a diluição inicial de

$10^{-1}$ . Após esse processo foram realizadas diluições decimais até  $10^{-4}$  utilizando-se o mesmo diluente. Das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram retirados 0,1 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-Parker. A seguir, com um auxílio de um bastão em forma de “L” esterilizado, foi realizada a distribuição do inóculo por toda a superfície do meio e as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Após a incubação, foram contadas as colônias em placas que apresentavam 1 a 200 colônias, com as seguintes características: colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro. Também foram consideradas as que se apresentavam somente negras e brilhantes. Os resultados encontrados foram multiplicados por 10 e pelo fator de diluição para obter os valores de UFC.g<sup>-1</sup>. A seguir 5 colônias sugestivas foram semeadas em tubos com 4 mL de caldo BHI esterilizado e incubados a 37 °C por 24 horas. Após incubação, esfregaços foram preparados e corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentarem na forma de cocos Gram positivos, formando massas irregulares em forma de cachos de uva, foram submetidas às provas da catalase (MAC FADDIN, 1976). Cepas com resultados positivos foram submetidas à prova da coagulase livre. A confirmação do gênero e pesquisa *S. aureus* foram feitas pela técnica de PCR.

Para a PCR de cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas e colocados em frascos contendo 225 mL de caldo BHI esterilizado. A mistura foi homogeneizada por um minuto, e incubada por 24 horas a 37°C em estufa com agitação contínua. Após o período de incubação alíquotas de 1 mL da cultura foi utilizada para a extração de DNA por fervura (KESKIMAKI et al., 2001). A reação de amplificação foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase, 4 pmol de cada primer, 3 µL de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo por 30s e 72°C por 30s. O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min para completa extensão dos fragmentos. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE<sup>3</sup> 1X para confirmação do gênero e detecção da espécie *S. aureus*. As amostras positivas para *S. aureus*, foram testadas quanto

---

<sup>3</sup> Ácido bórico 89 mM; Tris 89 mM e EDTA 2,5 mM

à presença do gene *coa*, para coagulase-positivo, e quanto à presença de genes codificadores de toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *tst*, *eta*, *pvl* e *hlg*) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para a identificação do gênero *Staphylococcus* spp., espécie *S. aureus*, gene codificador da coagulase *coa* e para os genes codificadores de toxina de *S. aureus* *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* *tst*, *eta*, *etb*, *pvl* e *hlg*, tamanho do produto de amplificação, temperatura de pareamento, controle positivo e sua respectiva referência.

|                                                              | Oligonucleotídeos iniciadores | Sequência                                                         | Tamanho (pb) | Temperatura de pareamento (°C) | Controle positivo | Referência                      |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| <i>Staphylococcus</i> spp                                    | 16sRNA                        | GTA GGT GGC AAG CGTTAT CC<br>CGC ACA TCA GCG TCA G                | 228          |                                | ATCC25923         | Pereira et al., 2009            |
| <i>S. aureus</i>                                             | Sa442                         | AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG<br>CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA | 102          | 55                             | ATCC6538          | Moret-Bizot et al., 2004        |
| Gene que codifica coagulase de <i>S. aureus</i>              | <i>coa</i>                    | AGAAGGTCCTGAAGGTAGC<br>GAATCTTGGTCTCGCTTC                         | 250          |                                | ATCC6538          | Blickwede et al., 2005          |
|                                                              | <i>sea</i>                    | TTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATC<br>TGGTGTAACACCCGACATTGA                | 252          | 60                             | ATCC23235         |                                 |
|                                                              | <i>seb</i>                    | GACATGATGCCTGCACCAGGAGA<br>AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG            | 355          | 60                             | ATCC14458         |                                 |
|                                                              | <i>sec</i>                    | CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA<br>CGCCTGGTGCAGGCATCATATC                 | 602          | 60                             | ATCC19095         |                                 |
|                                                              | <i>sed</i>                    | GAAAGTGAGCAAGTTGGATAGATTGCGGCTAG<br>CCGCGCTGTATTTTCTCCGAGAG       | 830          | 60                             | ATCC23235         |                                 |
|                                                              | <i>see</i>                    | TGCCCTAACGTTGACAACAAGTCCA<br>TCCGTGTAAATAATGCCTTGCCCTGAA          | 532          | 60                             | ATCC27664         |                                 |
| Genes que codificam proteínas de toxinas de <i>S. aureus</i> | <i>seg</i>                    | TGCTCAACCCGATCCTAAATTAGACGA<br>CCTCTTCTTCAACAGGTGGAGACG           | 117          | 60                             | ATCC25923         | Paniagua-Contreras et al., 2012 |
|                                                              | <i>seh</i>                    | CATTACATCATATGCGAAAGCAGAAG<br>GCACCAATCACCCCTTCTGTGC              | 358          | 60                             | ATCC19095         |                                 |
|                                                              | <i>sei</i>                    | TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA<br>TCCATATTCTTTGCCTTTACCACTG               | 220          | 60                             | ATCC19095         |                                 |
|                                                              | <i>tst</i>                    | AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA<br>CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG          | 306          | 60                             | ATCC25923         |                                 |
|                                                              | <i>eta</i>                    | CGCTGCGGACATTCTACATGG<br>TACATGCCCGCCACTTGCTTGT                   | 676          | 60                             | TC-142            |                                 |
|                                                              | <i>pvl</i>                    | TGCCAGACAATGAATTACCCCATTT<br>TCTGCCATATGGTCCCAACCA                | 894          | 60                             | ATCC25923         |                                 |
|                                                              | <i>hlg</i>                    | TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA<br>CGCCTGCCAGTAGAAGCCATT                   | 306          | 60                             | ATCC19095         |                                 |
|                                                              |                               |                                                                   |              |                                |                   |                                 |
|                                                              |                               |                                                                   |              |                                |                   |                                 |
|                                                              |                               |                                                                   |              |                                |                   |                                 |

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 60 amostras analisadas, conforme pode ser observado na Tab. 2, 80,0% (48/60) apresentaram *Staphylococcus* spp., com populações que variaram de  $1,0 \times 10^2$  a  $5,3 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. Aplicado o teste t de student aos valores dessas populações, as diferenças entre as médias não foram significativas do ponto de vista estatístico ( $p > 0,05$ ). Isso significa que não houve diferença entre as populações de *Staphylococcus* sp. encontradas nos produtos adquiridos nos restaurantes especializados e não especializados.

**Tabela 2.** População de *Staphylococcus* sp. em cada uma das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal e Ribeirão Preto – SP, 2015 e 2016)

| Número da amostra                  | Tipos de Estabelecimentos                     |                                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                                    | Especializados<br>(Pop. UFC.g <sup>-1</sup> ) | Não especializados<br>(Pop. UFC.g <sup>-1</sup> ) |
| 1                                  | $1,7 \times 10^3$                             | $1,9 \times 10^3$                                 |
| 2                                  | $9,0 \times 10^2$                             | $1,0 \times 10^2$                                 |
| 3                                  | $6,2 \times 10^4$                             | $2,1 \times 10^4$                                 |
| 4                                  | $8,0 \times 10$                               | $3,6 \times 10^4$                                 |
| 5                                  | < 100                                         | < 100                                             |
| 6                                  | $1,3 \times 10^3$                             | $5,3 \times 10^5$                                 |
| 7                                  | $8,9 \times 10^3$                             | $2,0 \times 10^3$                                 |
| 8                                  | $4,5 \times 10^4$                             | $1,3 \times 10^3$                                 |
| 9                                  | $1,1 \times 10^3$                             | $4,0 \times 10^2$                                 |
| 10                                 | < 100                                         | $3,1 \times 10^3$                                 |
| 11                                 | $1,54 \times 10^5$                            | $4,8 \times 10^2$                                 |
| 12                                 | $3,7 \times 10^4$                             | $4,60 \times 10^3$                                |
| 13                                 | <100                                          | < 100                                             |
| 14                                 | < 100                                         | $7,0 \times 10^2$                                 |
| 15                                 | < 100                                         | $7,0 \times 10^2$                                 |
| 16                                 | < 100                                         | $2,6 \times 10^3$                                 |
| 17                                 | < 100                                         | $1,13 \times 10^3$                                |
| 18                                 | $1,0 \times 10^2$                             | $5,3 \times 10^3$                                 |
| 19                                 | $3,2 \times 10^3$                             | $1,3 \times 10^3$                                 |
| 20                                 | $1,5 \times 10^3$                             | < 100                                             |
| 21                                 | < 100                                         | $1,11 \times 10^4$                                |
| 22                                 | $1,3 \times 10^3$                             | $9,3 \times 10^3$                                 |
| 23                                 | $3,3 \times 10^3$                             | $1,9 \times 10^3$                                 |
| 24                                 | $1,66 \times 10^4$                            | $5,0 \times 10^2$                                 |
| 25                                 | $1,6 \times 10^3$                             | $5,7 \times 10^3$                                 |
| 26                                 | $6,0 \times 10^2$                             | $2,4 \times 10^3$                                 |
| 27                                 | $5,8 \times 10^3$                             | $6,0 \times 10^3$                                 |
| 28                                 | $2,10 \times 10^3$                            | $7,1 \times 10^3$                                 |
| 29                                 | < 100                                         | $1,1 \times 10^3$                                 |
| 30                                 | $1,4 \times 10^3$                             | $5,0 \times 10^2$                                 |
| Médias aritméticas e desvio padrão | $1,2 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^4$         | $2,2 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^4$             |

Santos et al. (2012), analisando 32 amostras de sushis comercializados em restaurantes de Aracaju - SE, identificaram *Staphylococcus* sp. em 20 amostras, totalizando 62,5%.

Na Tabela 3, estão os resultados da presença de *Staphylococcus* coagulase positivos em 19 amostras das 60 analisadas, totalizando 31,7% das amostras. Na legislação brasileira o *Staphylococcus* coagulase positivo é um parâmetro qualificador da qualidade microbiológica de alimentos fornecendo um limite divisor entre o alimento aceitável e o não recomendado para consumo. Entretanto, não existe uma norma específica para o sushi, sendo utilizada nesse trabalho um padrão limitante para um alimento similar cru.

Os estafilococos estão presentes nas vias nasais, gargantas, cabelo e na pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis. Isso contribui para que os manipuladores de alimentos tornem-se a principal fonte de contaminação desse microrganismo (FORSYTHE, 2013). O sushi é um alimento preparado manualmente sem a utilização de luvas. Consequentemente é um alimento com alto potencial para se encontrar esse microrganismo, sendo que a má higienização das mãos e utensílios durante o preparo aumentam o risco de ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

**Tabela 3.** Populações de *Staphylococcus* coagulase positivos nas amostras de sushi *in natura*, distribuídos segundo o tipo de estabelecimentos em que foram adquiridos e as amostras em que foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus*. (Jaboticabal, Ribeirão Preto)

| Número da amostra                                               | Estabelecimentos especializados (Pop. UFC.g <sup>-1</sup> ) | <i>Staphylococcus aureus</i> confirmado |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 3                                                               | *1,24 x 10 <sup>4</sup>                                     |                                         |
| 8                                                               | *1,80 x 10 <sup>4</sup>                                     |                                         |
| 9                                                               | 4,40 x 10 <sup>2</sup>                                      | X                                       |
| 11                                                              | *6,16 x 10 <sup>4</sup>                                     |                                         |
| 19                                                              | 1,28 x 10 <sup>3</sup>                                      |                                         |
| 25                                                              | 6,40 x 10 <sup>2</sup>                                      |                                         |
| 27                                                              | 1,20 x 10 <sup>3</sup>                                      |                                         |
| 28                                                              | 1,26 x 10 <sup>3</sup>                                      | X                                       |
| Estabelecimentos não especializados (Pop. UFC.g <sup>-1</sup> ) |                                                             |                                         |
| 1                                                               | 1,14 x 10 <sup>3</sup>                                      |                                         |
| 6                                                               | *4,24 x 10 <sup>5</sup>                                     |                                         |
| 7                                                               | 1,60 x 10 <sup>3</sup>                                      |                                         |
| 9                                                               | 3,2 x 10 <sup>2</sup>                                       | X                                       |
| 10                                                              | 1,86 x 10 <sup>3</sup>                                      | X                                       |
| 11                                                              | 2,88 x 10 <sup>2</sup>                                      | X                                       |
| 12                                                              | 1,84 x 10 <sup>3</sup>                                      | X                                       |
| 17                                                              | *9,04 x 10 <sup>3</sup>                                     |                                         |
| 18                                                              | 3,18 x 10 <sup>3</sup>                                      |                                         |
| 21                                                              | 4,44 x 10 <sup>3</sup>                                      |                                         |
| 29                                                              | 1,10 x 10 <sup>3</sup>                                      | X                                       |

\* Amostras fora do padrão para *Staphylococcus* coagulase positivo. Valor acima de 5,0 x 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> segundo RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Dessas 19 amostras, apenas 5 apresentaram valores de populações acima de 5,0 x 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, limite máximo estabelecido pela legislação vigente, para alimentos similares (BRASIL, 2001). Consequentemente, 8,3% do total das amostras analisadas estavam impróprias para o consumo. Já, Albuquerque et al. (2006), estudando a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positivos em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza - CE, confirmaram que 43,0% (13 amostras) das 30 amostras analisadas encontravam-se fora do padrão estabelecido, concluindo que esses resultados eram decorrentes da higiene inadequada dos manipuladores ou contaminação cruzada. Apesar dos sushis de apenas cinco estabelecimentos estarem fora do padrão, as populações de *Staphylococcus* coagulase positivos encontradas nos 19 locais é preocupante, tendo

em vista que o microrganismo já está presente no ambiente de produção e qualquer falhas pode favorecer a multiplicação dessas bactérias podendo ultrapassar o limite estabelecido e até ocasionar IAE.

A presença de *S. aureus*, Tabela 3, foi confirmada pela técnica de PCR em 11,7% (7/60) do total de amostras analisadas, sendo elas duas do grupo de estabelecimentos especializados e cinco no grupo de estabelecimentos não especializados. Uma porcentagem menor foi encontrada por Kim et al. (2011) ao analisarem a prevalência de *S. aureus* em 1882 amostras de "alimentos refrigerados prontos para consumo" (todas variedades de sushi), que isolaram o microrganismo em 110 delas, totalizando 5,8% das amostras. A identificação do *S. aureus* é importante para a etapa de pesquisa de genes codificadores de toxina, pois a maioria dos primers utilizados nesse trabalho são específicos para a espécie.

Na Tabela 4 é possível verificar que o gene *coa* está presente nas 7 amostras nas quais foi detectado o *S. aureus*, sendo que essas amostras também foram positivas na prova da coagulase. A estafiloagulase é uma proteína extracelular produzida pelo *S. aureus* que causa a coagulação do plasma de várias espécies como coelho, bovinos, humanos, etc. A produção de estafiloagulase tem sido considerada como uma característica importante para a identificação de *S. aureus*, que é a espécie mais virulenta e clinicamente relevante (SAKAI et al., 2008). Antes da biologia molecular ser empregada na pesquisa, o fator de coagulase representava um ponto chave para identificação de possíveis estafilococcus patogênicos, o que fez com que as legislações determinassem um limite somente para o *S. coagulase* positivos.

**Tabela 4** Genes codificadores de fatores de virulência encontrados nas amostras nas quais foram confirmadas a presença do *Staphylococcus aureus*.

| Genes codificadores da coagulase e de toxinas | Amostras positivas para <i>S. aureus</i> por tipos de estabelecimentos |                    | Nº de amostras positivas para os genes (%) |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|
|                                               | Especializados                                                         | Não especializados |                                            |
| <i>coa</i>                                    | 9, 28                                                                  | 9, 10, 11, 12, 29  | 7 (100%)                                   |
| <i>sea</i>                                    | 9                                                                      | 29                 | 2 (28,6%)                                  |
| <i>seg</i>                                    | 9                                                                      |                    | 1 (14,3%)                                  |
| <i>sei</i>                                    |                                                                        | 9, 11              | 2 (28,6%)                                  |
| <i>eta</i>                                    | 9                                                                      | 9, 11, 12          | 4 (57,1%)                                  |
| <i>tst</i>                                    | 9                                                                      | 29                 | 2 (28,6%)                                  |
| <i>hlg</i>                                    | 9                                                                      | 9, 10, 11          | 4 (57,1%)                                  |

Dos 12 primers para genes codificadores de toxinas para *S. aureus* testados, apenas 6 foram replicados, sendo eles: duas amostras *sea*, uma *seg*, duas *sei*, quatro *eta*, duas *tst* e quatro *hlg* (Tabela 4). Das sete amostras com *S. aureus* detectado, 85,7% (6/7) apresentaram pelo menos um gene codificação de toxina. Kim et al. (2011) encontraram genes codificadores de toxinas em 98 amostras (49,75%) dos 197 isolados de *S. aureus* em alimentos refrigerados prontos para consumo. Esses resultados mostram que as populações *S. aureus* isoladas de sushi oferecem risco à saúde pública alimentar e sob condições ideais de temperaturas, esses microrganismos podem multiplicar e produzir toxinas ocasionando surtos.

Os genes *eta* e *hlg* foram os mais frequentes sendo encontrados em 4 (57,1%) amostras cada, seguidos dos genes *sea*, *sei* e *tst* identificados em 2 (28,6%) amostras cada. O gene *seg* apresentou-se em apenas 1 (14,3%) amostra.

A *eta* e *etb* são classificadas como toxinas exfoliativa e foram associadas a um série de doenças estafilocócicas impetigosas referidas como síndrome da pele escaldada estafilocócica (LEE et al., 1987). Kim et al. (2011) analisando 197 isolados de *S. aureus* em "alimentos refrigerados prontos para consumo" acharam apenas 6 isolados (3,0%) com o gene codificador *eta*. Já o gene da enterotoxina *hlg* é codificador da gama-hemolisina, a qual possui ação pró-inflamatória, sendo capaz de lisar leucócitos e eritrócitos (CUNHA; CALSOLARI, 2008). Guanghui et al. (2015) pesquisaram genes codificadores de toxinas em 7 isolados de *S. aureus* de surtos alimentares em Xi'an, província de Shaanxi, China, durante 2006-2013 e encontraram uma frequência de 85,7% (6 isolados) para gene *hlg*.

Em relação aos genes codificadores de enterotoxinas SEs, as frequências foram de 28,6% (2/7) para *sea* e *sei*, e 14,3% (1/7) para *seg* (Tabela 4). Kim et al. (2011) analisando 197 isolados de *S. aureus* em "comidas refrigeradas prontas para consumo" encontraram uma frequência de 23,9% (47 isolados) com os genes *seg* e *sei* e 18,3% (36 isolados) para o gene *sea*. Do ponto de vista em saúde pública, sob o aspecto de segurança alimentar, essas são as toxinas mais importantes, já estão relacionada diretamente a IAE. Segundo a literatura a *sea* é a toxina mais comum associada a intoxicações alimentares por *S. aureus* atingindo a frequência de 77% dos surtos (FORSYTHE, 2013). Porém na atualidade, pesquisas demonstram que IAE tem sido ocasionadas por *S. aureus* que não produzem as toxinas clássicas, sendo os genes *seh*, *ses*, *set*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e *selu* frequentemente detectados em estudos (UMEDA et al., 2017).

Em relação ao gene (codificador) *tst*, em 28,6% (2/7) das amostras foram detectadas. Kim et al. (2011) analisando 197 isolados de *S. aureus* em alimentos refrigerados prontos para consumo encontraram uma frequência de 12,2 % (24 isolados) com os genes *tst-1*. Clinicamente, a síndrome do choque tóxico está intimamente associada com cepas de *S. aureus* que carregam o gene *tst* que codifica a toxina de síndrome de choque 1 (TSST-1) (SEE; CHOW, 1989).

Dos genes produtores de toxinas encontrados nesse trabalho apenas *sea*, *seg*, *sei* são relacionados com a produção de enterotoxinas e IAE. Os genes *eta*, *tst* e *hlg* envolvidos com outros tipos de doenças estafilocócica mostram, que apesar do *S. aureus* ser encontrado em um alimento, a frequência de genes produtores de toxinas é bem variável e que nas populações desses microrganismos em alimentos não prevalecem somente genes envolvidos em surtos alimentares.

Na Tabela 5 é possível observar que a amostragem da coleta 9 do grupo de estabelecimentos especializados apresentou replicação de 6 genes produtores de toxina sendo eles *sea*, *seg*, *sei*, *eta*, *tst* e *hlg*.

**Tabela 5.** Amostras e genes codificadores de toxinas encontrados, distribuídos pelo tipo de estabelecimentos onde foram coletadas

| (Coletas) Amostras | Especializados                           |
|--------------------|------------------------------------------|
| 9                  | <i>sea + seg + sei + eta + tst + hlg</i> |
|                    | Não especializados                       |
| 9                  | <i>sei + eta + hlg</i>                   |
| 10                 | <i>hlg</i>                               |
| 11                 | <i>sei + eta + hlg</i>                   |
| 12                 | <i>eta</i>                               |
| 29                 | <i>tst</i>                               |

No grupo de estabelecimentos não especializados o maior número de genes encontrados foram três, sendo as amostras 9 e 11 positivas para os genes *sei*, *eta* e *hlg*. Já as amostras 10, 12, e 29 do grupo não especializados apresentaram apenas um gene codificador de fator de virulência, sendo eles respectivamente *hlg*, *eta* e *tst*. Kim et al. (2011) analisando 197 isolados de *S. aureus* em alimentos refrigerados prontos para consumo verificaram inócuos com até 4 associações de genes sendo eles *seg*, *sei*, *etb* e *tst-1* em amostras de sushis e *sea*, *seg*, *sei* e *tst-1* em amostras de "Kimbab" (um tipo de sushi coreano). É importante ressaltar que diferentemente do trabalho de Kim et al. (2011), esse estudo não utilizou isolados *S. aureus* para pesquisa dos genes relacionados à produção de toxina, sendo que a metodologia foi a extração geral do DNA da amostra enriquecida. Sendo assim, os microrganismos presentes na amostra inicial multiplicaram e contribuíram para os resultados finais encontrados. Consequentemente não é possível afirmar por exemplo que os genes encontrados em associação sejam de apenas um isolado *S. aureus* na amostra.

Com a popularização da comida japonesa, o sushi passou a ser uma refeição frequente na alimentação brasileira. Entretanto, não existe uma legislação específica para regulamentar a qualidade microbiológica desses produtos oferecidos ao consumidor, sendo muitos estudos comparados com produtos "similares" na legislação.

#### 4. CONCLUSÕES

O sushi é um veiculador de *S. aureus* e genes codificadores de fatores de virulência estão presentes nesse alimento. Sendo assim, é importante ressaltar a necessidade de estabelecer normas e parâmetros para melhorar a qualidade desse tipo de produto, bem como capacitar os chefes, cozinheiros e sushimen, ensinando-lhes boas práticas de manipulação de alimentos, visando fornecer um sushi mais seguro ao consumidor.

As falhas na preservação dos ingredientes ou má higienização das mãos durante o preparo do produto, associados a condições de temperaturas que favoreçam a multiplicação bacteriana podem resultar em surtos de intoxicações alimentares.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, W. F.; BARRETO, N. S. E.; SILVA, A. I. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e estafilococos coagulase positivo, em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza – CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 146, p. 58-61, 2006.

APHA. American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, 2001. 676 p.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; FODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751–1773, 2010.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **Int J Food Microbiol.**, v. 61, p. 1–10, 2000.

BLICKWEDE, M., WOLZ, C., VALENTIN-WEIGAND, P., SCHWARZ, S., Influence of clindamycin on the stability of *coa* and *fnbB* transcripts and adherence properties of *Staphylococcus aureus* Newman. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 73–78, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 10 jun. 2017.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology Insights**, v. 1, p. 13-24, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GUANGHUI, L.; SHOUZHI, W.; WEN, L.; YULAN, S.; YANG, L.; XIN, W. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 Isolates from Food-sPoisoning Outbreaks (2006–2013) in Xi'an, China. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 12, n. 3, 2015. Inc. DOI: 10.1089/fpd.2014.1850

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol.**, v. 36 , p. 815–836, 2012.

KESKIMAKI, M., EKLUND, M., PERSONEN, H., HEISKANEN, T., SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect.Dis.**, v. 40, p. 151-156. 2001.

KIM, N. H.; YUN, A. R.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 111, n. 6, p. 1456–1464, 2011.

LEE, C. Y., J. J. SCHMIDT, A. D. JOHNSON-WINEGAR, L. SPERO, AND J. J. LANDOLO. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol**, v. 169, p. 3904-3909, 1987.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.**, v. 2, p. 63–76, 2003.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams e Wikins, 1976. 312 p.

MOROT-BIZOT, S. C., TALON, R., LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1087–1094, 2004.

PANIAGUA-CONTRERAS, G., SÁINZ-ESPUÑES, T., MONROY-PÉREZ, E., RODRÍGUEZ-MOCTEZUMA, J. R., ARENAS-ARANDA, D., NEGRETE-ABASCAL, E., VACA, S. Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Hemodialysis Catheters of Mexican Patients. **Advances in Microbiology**, v. 2, p. 476-487. 2012.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278-282, 2009.

SAKAI, F.; TAKEMOTO, A.; WATANABE, S.; AOYAMA, K.; OHKUBO, T.; YANAHIRA, S.; IGARASHI, H.; KOZAKI, S.; HIRAMATSU, K.; ITO T. Multiplex PCRs for assignment of Staphylocoagulase types and subtypes of type VI Staphylocoagulase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 312–317, 2008. doi:10.1016/j.mimet.2008.07.003

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3, 2012.

SEE, R. H.; CHOW A. W. Microbiology of toxic shock syndrome: overview. **Rev. Infect. Dis.**, v. 11, p. S55-S60, 1989.

UMEDA, K.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, K.; NISHINA, N.; YASUFUKU, Yuki; HIRAI, K.; HIRAYAMA, T.; GOTO, K.; HASE, A.; OGASAWARA, J. Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *selu* genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, p. 30–35, 2017.

## **CAPITULO 5 - Pesquisa de gene codificador de resistência a meticilina (MRS) em *Staphylococcus* spp. em sushis**

**RESUMO** - O *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) representam risco à saúde pública, pois o uso indiscriminado da meticilina proporcionou o surgimento de estirpes resistentes penicilina beta-lactamase precursora do grupo da meticilina e oxacilina. Diante do exposto, esse estudo objetivou avaliar a prevalência do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. em amostra de sushi. Para tanto, 60 amostras foram coletadas em restaurantes especializado e não especializados em comida japonesa e submetidas a quantificação de *Staphylococcus* spp. e pesquisa gene de resistência a meticilina em *Staphylococcus* spp. pela técnica de PCR . Das 60 amostras analisada 48 apresentaram *Staphylococcus* spp., totalizando 80%. A presença do gene *mecA* foi confirmada em 6 amostras das 48, totalizando 12,5%. O *Staphylococcus* spp, bem como o gene *mecA* que codifica a de resistência a meticilina estão presentes na cadeia produtiva do sushi.

**Palavras chaves** - antibiótico, beta-lactâmicos, comida japonesa, saúde pública, segurança alimentar

## 1. INTRODUÇÃO

A primeira cepa de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina foi detectada na Europa em 1961 e pertencia a espécie *Staphylococcus aureus* (MRSA) (VIVONE e MORREIRA, 2005). A partir da década seguinte, tornou-se uma preocupação na saúde pública mundial, sendo agentes relacionados a episódios de infecções hospitalares e comunitárias (SOUSA JUNIOR et al., 2009)

O *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) representam risco à saúde pública, pois o uso indiscriminado da meticilina proporcionou o surgimento de estirpes resistentes penicilina beta-lactamase precursora do grupo da meticilina e oxacilina. A resistência nestes microrganismos é resultado do gene cromossômico *mecA*, que produz uma nova proteína ligante a penicilina com baixa afinidade aos beta - lactâmicos (VIVONE e MORREIRA, 2005).

Atualmente não existem estudos sobre a prevalência de MRS em comida japonesa, sendo apenas encontrados trabalhos com carne suína, bem como no leite e queijo (NORMANNO et al., 2007; PEREIRA et al., 2009.; PU et al., 2009). Syed et al. (2017) pesquisando MRSA em ovos no Paquistão observaram uma prevalência de 11 % (33) das 300 amostras analisadas.

Sendo assim, este estudo buscou pesquisar a prevalências do gene *mecA* em sushis comercializados na região de Ribeirão Preto e Jaboticabal - SP.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

O estudo foi realizado com 60 amostras de sushis *in natura*, constituído obrigatoriamente de arroz temperado e salmão, podendo apresentar outros ingredientes como algas, molhos e legumes. As amostras foram coletadas em 30 restaurantes especializados em comidas japonesas e em 30 estabelecimentos comerciais não especializados nos municípios de Jaboticabal - SP e Ribeirão Preto - SP, sendo os estabelecimentos especializados restaurantes que obrigatoriamente trabalham somente com a culinária japonesa, normalmente oferecendo para o cliente o serviço de rodízio, "a la carte" ou "self service" por quilo. Já os

estabelecimentos não especializados são os restaurantes que oferecem a tradicional comida brasileira incorporando em seu cardápio outros tipos de culinária, incluindo a japonesa ("fast foods", "self services", churrascarias, etc.).

As quantidades de sushis adquiridas foram de acordo com o cardápio oferecido pelo estabelecimento, sendo que cada porção comprada apresentada entre 10 a 14 sushis. Quando o estabelecimento oferecia a opção de venda por peso, aproximadamente 300g de sushi foram pesados para compra. Todas as amostras adquiridas foram embaladas na forma comum de venda ao consumidor. Imediatamente após a compra, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina.

Para a contagem de *Staphylococcus* spp., de cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas e colocados em frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, esterilizada. A mistura foi homogeneizada em aparelho Stomacher por um minuto, obtendo a diluição inicial de  $10^{-1}$ . Após esse processo foram realizadas diluições decimais até  $10^{-4}$  utilizando-se o mesmo diluente. Das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram retirados 0,1 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-Parker. A seguir, com um auxílio de um bastão em forma de "L" esterilizado, foi realizada a distribuição do inóculo por toda a superfície do meio e as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Após a incubação, foram contadas as colônias em placas que apresentavam 1 a 200 colônias, com as seguintes características: colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro. Também foram consideradas as que se apresentavam somente negras e brilhantes. Os resultados encontrados foram multiplicados por 10 e pelo fator de diluição para obter os valores de UFC.g<sup>-1</sup>.

Para a PCR de cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas e colocados em frascos contendo 225 mL de caldo BHI esterilizado. A mistura foi homogeneizada por um minuto, e incubada por 24 horas a 37 °C em estufa com agitação contínua. Após o período de incubação alíquotas de 1 mL da cultura foi utilizada para realização da extração de DNA por fervura (KESKIMAKI et al., 2001). A cada reação de amplificação foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase, 4 pmol de

cada primer, 3 µL de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo por 30s e 72°C por 30s. O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min para completa extensão dos fragmentos. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE<sup>4</sup> 1X, para confirmação do gênero *Staphylococcus* spp. As amostras as quais foram identificados o *Staphylococcus* spp. foram testadas quanto à presença do gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *MEC-F* (5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C - 3') e *MEC-R* (5' - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C - 3'), desenvolvidos por Gortel et al. (1999), que amplifica uma banda de 533 pb sob temperatura de pareamento de 55°C.

---

<sup>4</sup> Ácido bórico 89 mM; Tris 89 mM e EDTA 2,5 mM

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 60 amostras analisadas, conforme pode ser observado na Tabela 1, 80,0% (48/60) apresentaram *Staphylococcus* sp., com populações que variaram de  $1,0 \times 10$  a  $5,3 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** População de *Staphylococcus* sp. em cada uma das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal e Ribeirão Preto – SP, 2015 e 2016)

| Número da amostra                  | Tipos de Estabelecimentos                     |                                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                                    | Especializados<br>(Pop. UFC.g <sup>-1</sup> ) | Não especializados<br>(Pop. UFC.g <sup>-1</sup> ) |
| 1                                  | $1,7 \times 10^3$                             | $1,9 \times 10^3$                                 |
| 2                                  | $9,0 \times 10^2$                             | $1,0 \times 10^2$                                 |
| 3                                  | $6,2 \times 10^4$                             | $2,1 \times 10^4$                                 |
| 4                                  | $8,0 \times 10$                               | $3,6 \times 10^4$                                 |
| 5                                  | < 100                                         | < 100                                             |
| 6                                  | $1,3 \times 10^3$                             | $5,3 \times 10^5$                                 |
| 7                                  | $8,9 \times 10^3$                             | $2,0 \times 10^3$                                 |
| 8                                  | $4,5 \times 10^4$                             | $1,3 \times 10^3$                                 |
| 9                                  | $1,1 \times 10^3$                             | $4,0 \times 10^2$                                 |
| 10                                 | < 100                                         | $3,1 \times 10^3$                                 |
| 11                                 | $1,54 \times 10^5$                            | $4,8 \times 10^2$                                 |
| 12                                 | $3,7 \times 10^4$                             | $4,60 \times 10^3$                                |
| 13                                 | <100                                          | < 100                                             |
| 14                                 | < 100                                         | $7,0 \times 10^2$                                 |
| 15                                 | < 100                                         | $7,0 \times 10^2$                                 |
| 16                                 | < 100                                         | $2,6 \times 10^3$                                 |
| 17                                 | < 100                                         | $1,13 \times 10^3$                                |
| 18                                 | $1,0 \times 10^2$                             | $5,3 \times 10^3$                                 |
| 19                                 | $3,2 \times 10^3$                             | $1,3 \times 10^3$                                 |
| 20                                 | $1,5 \times 10^3$                             | < 100                                             |
| 21                                 | < 100                                         | $1,11 \times 10^4$                                |
| 22                                 | $1,3 \times 10^3$                             | $9,3 \times 10^3$                                 |
| 23                                 | $3,3 \times 10^3$                             | $1,9 \times 10^3$                                 |
| 24                                 | $1,66 \times 10^4$                            | $5,0 \times 10^2$                                 |
| 25                                 | $1,6 \times 10^3$                             | $5,7 \times 10^3$                                 |
| 26                                 | $6,0 \times 10^2$                             | $2,4 \times 10^3$                                 |
| 27                                 | $5,8 \times 10^3$                             | $6,0 \times 10^3$                                 |
| 28                                 | $2,10 \times 10^3$                            | $7,1 \times 10^3$                                 |
| 29                                 | < 100                                         | $1,1 \times 10^3$                                 |
| 30                                 | $1,4 \times 10^3$                             | $5,0 \times 10^2$                                 |
| Médias aritméticas e desvio padrão | $1,2 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^4$         | $2,2 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^4$             |

Das 48 amostras onde foram identificados a presença do *Staphylococcus* sp 21 pertencem ao grupo de estabelecimento especializado e 27 ao grupo dos não especializado. Santos et al. (2012), analisando 32 amostras de sushis

comercializados em restaurantes de Aracaju - SE, identificaram *Staphylococcus* sp. em apenas 20 amostras, totalizando 57,1% delas. Os estafilococos estão presentes nas vias nasais, gargantas, cabelo e na pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis. Isso contribui para que os manipuladores de alimentos torne-se a principal fonte de contaminação desse microrganismo (FORSYTHE, 2013). O sushi é um alimento preparado manualmente sem a utilização de luvas. Consequentemente é um alimento com alto potencial para encontrarmos esse microrganismo, sendo que a má higienização das mãos e utensílios durante o preparo aumentam o risco de ocorrência de surtos alimentares.

A Tabela 2 apresenta os resultados das amostras onde ocorreram amplificação dos do oligonucleotídeo iniciador *mecA* utilizado para identificação da do gene de resistência a meticilina nas amostras onde foram confirmadas o gênero *Staphylococcus* sp.

**Tabela 2. Amplificação do *mecA*, distribuídas pelo tipo de estabelecimento onde foram coletas as amostras de sushi.**

| Gene <i>mecA</i>  | Número de amostras (%) |                   | Total (%)  |
|-------------------|------------------------|-------------------|------------|
|                   | Especializado          | Não Especializado |            |
| Amplificação      | 3                      | 3                 | 6 (12,5)   |
| Sem amplificação  | 18                     | 24                | 42 (87,5)  |
| Total de amostras | 21                     | 27                | 48 (100,0) |

Das 48 amostras onde foram identificada o *Staphylococcus* sp., a presença do gene *mecA* foi confirmada em 6 amostras, totalizando uma prevalência 12,5%. Como já citado, não existem pesquisas sobre a ocorrência desse gene no sushi inviabilizando uma análise comparativa de resultados. Por outro, a literatura descreve a presença do MRSA em alimentos como carne suína, leite, queijos, peixe cru e ovos.

Hammad et al. (2012) avaliando peixe cru para alimentos prontos para comer comercializados em Hiroshima, Japão, verificaram que das 200 amostras coletadas 10 apresentaram MRS e MRSA, totalizando uma prevalência de 5%. Syed et al. (2017) pesquisando MRSA em ovos no Paquistão observaram uma prevalência de 11 % (33) das 300 amostras analisadas. O peixe cru e o ovo são ingredientes bases para a produção do sushi. Portanto, esses trabalhos demonstram a possibilidade de

ocorrer contaminação cruzada entre alimentos, bem como justificam a presença de MRS no sushi.

#### 4. CONCLUSÕES

Altas populações de *Staphylococcus* spp. estão presentes no sushi, mostrando que esse setor produtivo precisa ser reestruturado, objetivando fornecer um alimento seguro aos consumidores. Já, a presença do gene codificador da resistência a meticilina, *mecA*, nos sushis, reflete as consequências do uso inadequados de antimicrobianos atingiram indiretamente o setor de produção desse alimento. Assim, surge o papel do Médico Veterinário em orientar o setor agropecuário, bem como atuar na segurança e higiene alimentícia, buscando um alimento seguro e zelando pela saúde pública.

#### 5. REFERÊNCIAS

BRASIL. **Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 20 de out. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GORTEL, K., CAMPBELL, K. L., KAKOMA, I., WHITTEM, T., SCHAEFFER, D. J.; WEISIGER, R. M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 12, p. 1526-1530, 1999.

HAMMAD, A. M.; WATANABE, W.; FUJII, T.; SHIMAMOTO, T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 286–289, 2012.

KESKIMAKI, M., EKLUND, M., PERSONEN, H., HEISKANEN, T., SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.40, p. 151-156, 2001.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA, S.G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology** v.117,p. 219-222, 2007.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278-282, 2009.

PU, S., HAN, F., GE, B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 265-267, 2009.

SOUSA JUNIOR, F. C.; NUNES, É. W. F.; NASCIMENTO, E. D.; Oliveira, S. M.; Melo, M. C. N.; Fernandes, M. J. B. C. Prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina isolados em uma maternidade escola da Cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42(2), p. 179-182, 2009..

SYED, M. A.; SHAH, S. H. H.; SHERAFZAL, Y.; SHAFI-UR-REHMAN, S.; KHAN, M. A.; BARRETT, J. B.; WOODLEY, T. A.; JAMIL, B.; ABBASI, S. A.; JACKSON, C. R. Detection and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Table Eggs in Haripur, Pakistan **Foodborne Pathogens And Disease**, v. XX, n. XX. 2017. Inc. DOI: 10.1089/fpd.2017.2336

Vivone A. M, Moreira BM. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution **A Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 693-698, 2005.

## CAPITULO 6 - Considerações finais

Esta pesquisa confirmou a presença de *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus* em sushis comercializados em restaurantes especializados e não especializados nos Municípios de Ribeirão Preto e Jaboticabal. De acordo com os resultados desse trabalho, 60% das amostras analisadas apresentaram-se em condições inaceitáveis para consumo. A baixa segurança desse alimento, somadas a falsa propaganda de que o sushi é um alimento saudável, geram risco a população, podendo ocasionar surtos de intoxicação ou toxinfecção alimentar, e ocorrência de morte em grupos de riscos, como idosos, pacientes em tratamentos de câncer, imunossuprimidos e soros positivos para o vírus HIV.

Esta contaminação microbiológica pode ser consequência da baixa qualidade da matéria prima ou da falta de capacitação dos colaboradores envolvidos, pela má higienização das mão dos manipuladores, dos equipamentos, do local de preparo, ou ainda conservação inadequada da matéria prima e produto final. Sendo assim, todos esses fatores somados a expansão da culinária japonesa e falta de fiscalização, é possível afirmar que a probabilidade do consumidor brasileiro estar comprando um produto de baixa segurança microbiológica é alta.

A contaminação pelo *B. cereus* é justificada pela presença do arroz no sushi, somada a sua capacidade de formar esporo e resistir ao tratamento térmico. Dificilmente esse microrganismo pode ser eliminado dessa cadeia produtiva. Portanto, o fator mais relevante na prevenção de surtos de intoxicações alimentares pelo *B. cereus* é a manutenção adequada da temperatura de conservação dos ingredientes, bem como a temperatura de conservação do sushi pronto para venda.

Já a presença da *E. coli* e *S. aureus* são consequências da higiene precária no processo de produção do alimento e do manipulador. Como o sushi é um produto constituído de vários ingredientes, qualquer falha na obtenção, transporte e armazenamento das matérias primas refletem na qualidade final do produto. Outro ponto importante, é a higiene pessoal dos sushismen, já que trabalham diretamente com o alimento sem a utilização de luvas.

Sobre a ocorrência de genes codificadores de toxina, essa pesquisa demonstra que existem genes codificadores de fatores de virulência nas populações de microrganismos presentes no sushi, e que falhas podem ocasionar a multiplicação de cepas patogênicas, ocasionando surtos de intoxicação alimentar. Outro ponto importante é a presença do gene codificador da resistência a meticilina, que preocupa a saúde pública mundial, levando a reflexão e busca de soluções para o uso errado e descontrolado de antibióticos nas cadeias de produções animal.

No começo desse estudo, as amostras foram coletadas em grupo de estabelecimentos especializado e não especializado, especulando-se se haveria alguma diferença na qualidade dos dois grupos, supondo que o grupo de restaurantes especializados apresentariam uma melhor segurança, já que os sushimen são conhecidos popularmente por serem profissionais treinados na arte da culinária japonesa. Entretanto de acordo com os resultados, não ficou evidente essa diferença. Durante as coletas, notou-se que os restaurantes estavam na maioria das vezes lotados, buscando atender o consumidor de forma rápida. Essa necessidade de produzir o alimento rápido, associadas aos fatores críticos citados anteriormente provavelmente contribuam para a queda da qualidade e segurança do sushi.

Diante dessa problemática, o ideal seria que todos os restaurantes implantassem padrões para descontaminação e higienização dos locais de preparo do sushi, bem como instruir os seus funcionários a realizarem as boas práticas de manipulação e conservação de alimentos. Os sushis são alimentos muito manipulados e na maioria das vezes apresentam ingredientes crus. A capacitação dos manipuladores é um dos pontos chaves para melhorar a segurança desses alimentos, visando instruir esses trabalhadores aos conceitos de segurança alimentar, noções de microbiologia e multiplicação microbiana, possíveis contaminantes dos sushis, zoonoses e potenciais patógenos que podem ocasionar surtos. Assim criar estabelecimentos certificados, que seguem um manual de práticas e formar funcionários conscientes da produção segura de alimentos e com responsabilidade social.

Entretanto, essa realidade ainda encontra obstáculos, como elevação dos custos com o preparo desses colaboradores, convencer os proprietários desse

seguimento sobre a importância de investir em segurança alimentar e elaborar programas de treinamentos específicos para produzir o sushi.

Portanto, diante dessa dinâmica cadeia produtiva, é evidente a necessidade do Médico Veterinário, buscando identificar e corrigir os erros críticos nesse processo, bem como instruir e elaborar formas de melhorar a segurança do sushi oferecido ao consumidor brasileiro.