

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Avaliação das condições higiênico-sanitárias e multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em sushis preparados em Porto Alegre

DIEGO CHEMELLO MÜLLER

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre

Dezembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Avaliação das condições higiênico-sanitárias e multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em sushis preparados em Porto Alegre

Diego Chemello Müller
Técnico em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Dezembro/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Müller, Diego Chemello

Avaliação das condições higiênico-sanitárias e multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em sushis preparados em Porto Alegre / Diego Chemello Müller. -- 2018.
47 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Sushi. 2. Culinária Japonesa. 3. Patógenos Alimentares. 4. pH. 5. Temperatura. I. Tondo, Eduardo Cesar, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida, a sabedoria e a saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, por sempre terem me amado, educado e incentivado a ser um cidadão correto e que ame o próximo. Por sempre terem me apoiado em minha trajetória acadêmica e me conduzido através de suas experiências de vida.

Aos meus tios, por sempre me amarem e se preocuparem comigo, me auxiliando a traçar um caminho ético e despertando em mim a curiosidade científica necessária para ter gosto pelos estudos.

Aos meus primos, por terem se tornado irmãos para mim e me impulsionado a ser uma pessoa melhor em que possam se espelhar no futuro.

Aos meus avós, por sempre terem me amado e passarem sua experiência de vida para que pudesse me espelhar.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, por ter acreditado em mim desde a primeira vez que nos vimos, ter me ensinado e incentivado por todos esses anos na graduação. Pela paciência que teve nos meus momentos de erro, pelo companheirismo e amizade dentro e fora da academia, sendo sempre um exemplo para mim.

Aos meus colegas de trabalho no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, onde foi minha segunda casa por muitos anos, por terem sempre me ajudado tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Agradeço especialmente à Vera Masuti e à Prof. Dr. Patrícia da Silva Malheiros pelos conselhos e amizade. Também agradeço a todos que me acompanharam em minhas iniciações científicas e congressos com companheirismo e amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo serviço de qualidade prestado e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela infraestrutura necessária para a realização de meus estudos. Ao CNPq e à FAPERGS pelo auxílio financeiro durante anos de iniciação científica.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de contribuir com este trabalho através de seus conhecimentos.

AVALIAÇÃO AS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E MULTIPLICAÇÃO DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* E *Bacillus cereus* EM SUSHIS PREPARADOS EM PORTO ALEGRE

Autor: Diego Chemello Müller; Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

RESUMO:

O consumo de sushi está aumentando tanto no Brasil como em nível mundial. Na cidade de Porto Alegre, o número de estabelecimentos produtores de sushi aumentou 42,6% no período de 2012 a 2018. Paralelamente a esse aumento, diversos surtos alimentares vêm ocorrendo no Brasil e em outros países envolvendo estes alimentos. Normalmente a origem desses surtos é proveniente da falta de Boas Práticas ou contaminação da matéria-prima. O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação da multiplicação bacteriana em sushis, além das condições sanitárias e de processamento em estabelecimentos produtores deste alimento na cidade de Porto Alegre. As Boas Práticas no preparo de sushis foram acompanhadas em 29 restaurantes especializados em sushi, em Porto Alegre. Paralelamente a isso, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foram artificialmente inoculados em sushis e suas multiplicações foram avaliadas sob diferentes pH. Em seguida, a multiplicação desses microrganismos foi modelada nas amostras de sushi com pH 4,2 a 7°C e 25°C. Os resultados demonstraram que a maioria dos restaurantes possuíam instalações, equipamentos, fornecimento de água e controle de pragas adequados. Porém, uma porcentagem expressiva deles demonstrou não-conformidades no controle de temperatura e garantia do fornecedor de peixe cru. O pH do arroz utilizado no preparo do sushi, que variou de 4,0 a 4,3, foi considerado adequado, pois nenhum dos microrganismos avaliados demonstraram multiplicação expressiva na faixa de pH entre 4,0 e 4,5 em meio BHI, durante 24h. Amostras de sushi do tipo hossomaki contaminadas artificialmente não permitiram a multiplicação de *E. coli*, *S. aureus* ou *B. cereus* a 7°C e 25°C, e esse resultado foi atribuído ao pH 4,2. Com base nos resultados obtidos, as medidas de controle identificadas mais importantes no preparo de sushis foram: 1) garantia dos fornecedores de peixe cru; 2) controle de temperatura do peixe cru; e 3) controle do pH do arroz dos sushis. Os resultados desse estudo podem ser utilizados para a preparação de sushis seguros.

EVALUATION OF HYGIENE PRACTICES AND *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* AND *Bacillus cereus* GROWTH IN SUSHI PREPARED IN PORTO ALEGRE

Author: Diego Chemello Müller
Advisor: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

ABSTRACT:

The consumption of sushi is increasing in Brazil and worldwide. In Porto Alegre city, between 2012 and 2018, the number of sushi producers increased 42.6%. In parallel with this increase, several outbreaks have been occurring in Brazil and in other countries, involving these foods. Usually the origin of these outbreaks comes from the lack of Good Practices or raw material contaminations. The objective of this study was to evaluate bacterial growth in sushi, as well as sanitary conditions and processing in establishments producing this food in Porto Alegre city. Good Hygiene Practices and sushi preparation were followed in 29 sushi restaurants in Porto Alegre. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* were artificially inoculated in sushis and their multiplication was evaluated under different pH. After that, the growth of the same microorganisms was modelled at 7°C and 25°C in sushi pieces presenting pH 4.2. Results demonstrated that the majority of restaurants had adequate facilities, equipment, water supply, and pest controls, however, an expressive percentage of them demonstrated inadequacies concerning important food safety issues as temperature control and supplier's assurance of the raw fish. The pH of rice used to prepare sushi varied from 4.0 to 4.3 and was considered adequate, because no one of the evaluated microorganisms were able to expressively growth at pH ranging from 4.0 - 4.5 in BHI medium (24h). Artificially contaminated hossomaki sushi pieces did not support growth of *E. coli*, *S. aureus*, or *B. cereus* at 7°C and 25°C, and this result was attributed to the pH 4.2. Based on the results, the most important control measures identified in sushi preparation were: 1) supplier assurance of raw fish, 2) temperature control of raw fish, and 3) pH control of rice in sushi. Thus, the results of this study can be used for a safe preparation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. História e Microbiologia do Sushi.....	4
3.1.1. <i>Bacillus cereus</i>	6
3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.2. Microbiologia Preditiva.....	10
3.2.1. <i>Classificação e Desenvolvimento dos Modelos Preditivos</i>	11
3.2.2. <i>Modelos de Multiplicação</i>	12
3.2.3. <i>Modelos de Inativação</i>	13
4. ARTIGO	18
5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
6. REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de multiplicação e produção de toxina do <i>S. aureus</i>	9
Table 2 - Risk-based instrument and respective results after evaluation of hygienic and sanitary conditions of 29 sushi restaurants of Southern Brazil.	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características das síndromes causadas por *B. cereus*. 7

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação genérica dos modelos mais utilizados para a inativação de patógenos em alimentos.	14
Figura 2 - Representação genérica da curva de sobrevivência de acordo com o modelo Weibull para três valores de β distintos	15
Figura 3 - Representação genérica da curva de sobrevivência de acordo com o modelo shoulder/tail.	17
Figura 4 - Optical density of bacterial suspensions tested in Brain Heart Infusion Broth with different pH (4.0, 4.5, 5.0, and 6.0) during 24 hours at 37°C to <i>E. coli</i> (a), <i>S. aureus</i> (b), and <i>B. cereus</i> (c)	26
Figura 5 - Survival of <i>E. coli</i> on hossomaki sushi stored at 7°C (▲) and 25°C (●), fitting data to the GlnaFiT Excel add-in software and ComBase	27
Figura 6 - Survival of <i>S. aureus</i> on hossomaki sushi stored at 7°C (▲) and 25°C (●), fitting data to the GlnaFiT Excel add-in software and ComBase	28
Figura 7 - Survival of <i>B. cereus</i> on hossomaki sushi stored at 7°C (▲) and 25°C (●), fitting data to the GlnaFiT Excel add-in software	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

ATCC *American Type Culture Collection*

BHI Infusão de Coração e Cérebro

BP Boas Práticas

BPF Boas Práticas de Fabricação

CH colite hemorrágica

DTA Doença transmitida por alimentos

EHEC *Escherichia coli* enterohemorrágica

ETEC *Escherichia coli* enterotoxigênica

FAO *Food and Agriculture Organization of the United States*

ICMSF *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

MYP *Mannitol Egg Yolk Polymyxin*

PCA *Plate Count Agar*

STEC *Shiga-toxin-producing E. coli*

TCC *Total colony-counts*

TSB Caldo de Soja Trypticaseína

UFC Unidades formadoras de colônia

1. INTRODUÇÃO

O consumo de sushi está aumentando tanto no Brasil como em nível mundial. Este crescimento começou como consequência da imersão da cultura japonesa em outros países, como ocorreu nos Estados Unidos na década de 70 (SINDHA, 2018). No Brasil, a culinária japonesa começou há cerca de 100 anos, proveniente das famílias imigrantes japonesas que introduziram sua cultura principalmente nas regiões Sul e Sudeste (SÃO PAULO, 2018).

Com o aumento do consumo de sushi, diversos surtos vêm sendo observados no Brasil e em muitos países envolvendo este alimento. Normalmente a origem desses surtos é provenientes da falta de Boas Práticas ou contaminação da matéria-prima. Como o preparo do sushi é feito de forma manual, utilizando muitas vezes ingredientes crus, o risco de contaminação microbiana é grande. Uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil envolvendo sushis é o longo tempo de exposição do alimento em temperaturas inadequadas. Essa constatação difere do Japão, uma vez que seu preparo tradicional é realizado com volumes menores de matéria-prima e os sushis são consumidos imediatamente após a preparação, reduzindo a possibilidade de multiplicação bacteriana (PROENÇA, 2010).

Dentre as medidas de Boas Práticas adotadas na preparação de sushis destacam-se a verificação do material e condições sanitárias das superfícies que entram em contato com o alimento, higienização de utensílios, evitar o cruzamento das matérias-primas e dos produtos finais, separação das matérias-primas em locais distintos (pescado, arroz e legumes), controle dos prazos de validade, lavagem de mãos e condições adequadas de tempo e temperatura na produção e na exposição do produto final. Muitas dessas medidas são simples de serem implementadas e ajudam a prevenir doenças transmitidas por alimentos (DTA) (UGGIONI; PROENÇA; ZENI, 2010).

Dados recentes mostram que as principais bactérias patogênicas envolvidas em surtos relacionados com sushis no mundo são *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Bacillus cereus*. No Brasil, surtos envolvendo diversos tipos de

alimentos são causados principalmente por *Salmonella* spp. (14,4%), *S. aureus* (7,7%), *E. coli* (6,5%) e *B. cereus* (3,1%). Já em Porto Alegre, pesquisas demonstraram que, de forma geral, os surtos alimentares são causados principalmente por *B. cereus* (prevalência de 32,2%), um patógeno frequentemente associado à ingestão de arroz cozido, o principal ingrediente dos sushis (LENTZ et al., 2018; ESTADOS UNIDOS, 2016; HARADA et al., 2013; JAIN et al., 2008).

Para compreender como ocorre a multiplicação de patógenos no sushi, possivelmente contaminados por *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*, ferramentas de investigação mais avançadas podem ser utilizadas para a obtenção de resultados mais rápidos, práticos e acurados. Dentre essas ferramentas está a microbiologia preditiva, capaz de prever o comportamento de microrganismos quando submetidos a diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos. Esta predição é baseada em modelos matemáticos aplicados à microbiologia e vem sendo utilizada mundialmente (ELIAS, 2018).

A aplicabilidade desse estudo está na possibilidade da identificação de novas estratégias passíveis de serem aplicadas para diminuir a contaminação e multiplicação microbiana e, conseqüentemente, diminuir o risco de DTA, devido à ingestão de sushis. Além disso, os resultados desse estudo podem ser utilizados como embasamento científico para a implementação de novos controles, possibilitando aumento da vida de prateleira e segurança desses alimentos, assim como a diminuição do desperdício.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as condições higiênico-sanitárias e multiplicação bacteriana em sushis provenientes de estabelecimentos produtores na cidade de Porto Alegre.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar as condições higiênico-sanitárias de estabelecimentos produtores de sushi;

2.2.2 Avaliar a multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em diferentes pH;

2.2.3 Avaliar a multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em sushis contaminados artificialmente, expostos a 7°C e 25°C;

2.2.4 Propor medidas de controle para a prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no processamento de sushis.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. História e Microbiologia do Sushi

O sushi faz parte da culinária japonesa e teve sua origem no sudeste asiático no período Yayoi (300 a.C. a 300 d.C.), onde se conservava o peixe através de fermentação utilizando sal e arroz. Após a retirada das vísceras dos peixes, o sal era adicionado aos filés, os quais eram envoltos por arroz cozido. O produto era armazenado por alguns meses até ocorrer a fermentação do amido do arroz, liberando ácido acético e ácido lático. Neste caso, o arroz fermentado era descartado, não sendo consumido junto com o peixe (WEI, 2015). Com o passar dos anos e o avanço da gastronomia, os japoneses começaram a consumir o arroz com peixe antes de se realizar a fermentação. Por serem grandes consumidores de arroz, peixes e frutos do mar, no período Edo (entre 1603 e 1868), os japoneses criaram o sushi como é conhecido hoje, através da adição do vinagre como o tempero do arroz (MILLER, 2015).

No Brasil, a culinária japonesa tornou-se conhecida a partir da chegada das famílias imigrantes, há mais de 100 anos. As famílias orientais começaram a trabalhar na produção de café e no decorrer dos anos foram trazendo os costumes e tradições do Japão, dentre eles a sua culinária rica em alimentos frescos como peixes, vegetais e frutos do mar, além de temperos e especiarias (SÃO PAULO, 2018).

A constituição do sushi é dada pela combinação do arroz japonês, preparado com vinagre de arroz, com pescados crus, que pode incluir a alga *nori* (folhas finas e secas, feitas a partir da desidratação de algas comestíveis do gênero *Porphyra*), frutas, hortaliças e o *kani-kama* (alimento à base de peixe com sabor artificial de carne de caranguejo). Além de seus componentes principais, pode haver a adição de diversos acompanhamentos como a raiz forte (*wasabi*) e o gengibre (PRADO et al., 2015).

Normalmente o preparo do arroz japonês começa com uma lavagem manual com água após seu recebimento. Em seguida, escorre-se a água e deixa-se o arroz secando em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Após esse período, se realiza a cocção em água fervente por 12 minutos e em seguida desliga-se a fonte de calor. Dessa forma, o arroz permanecerá esfriando à temperatura ambiente por mais 10 minutos, quando então são adicionados os demais ingredientes (vinagre, açúcar,

sal e outros temperos, como alga kombu e sake kirim), compondo o molho Sú. Essa mistura muitas vezes é realizada manualmente, segundo a tradição japonesa, em recipientes de bambu. Como o bambu é um material difícil de ser higienizado, recomenda-se que, para essa mistura, se utilize recipientes feitos com materiais que estejam de acordo com a legislação brasileira, como o aço inoxidável ou plásticos adequados (SOUSA; AMARAL; OLIVEIRA, 2012).

Por conter ingredientes perecíveis, o sushi pode ser um causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Embora a incidência de surtos causados por pescados pareça ser menor do que em produtos dos setores de aves, laticínios e outras carnes, o preparo manual do sushi e a procedência da matéria-prima podem se tornar fontes de contaminação por bactérias patogênicas. Surtos de *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Bacillus cereus* foram relatados nos últimos anos envolvendo sushi e sashimi em diversos países (ESTADOS UNIDOS, 2016; HARADA et al., 2013; JAIN et al., 2008).

Essas bactérias podem contaminar o produto de diferentes formas, como contaminação cruzada por utensílios, falta de higiene dos manipuladores, origem da matéria-prima, entre outros. Normalmente, as preparações são comercializadas em restaurantes típicos, especializados em culinária japonesa. Esses restaurantes, mesmo com o preço, geralmente, mais elevado, são muito valorizados pela população de diversos países, inclusive a brasileira (UGGIONI; PROENÇA; ZENI, 2010).

No Brasil, muitas vezes o sushi é comercializado em restaurantes comuns, sem a influência dos hábitos da culinária japonesa, juntamente com cardápios diversos. Dessa forma, o preparo destes alimentos pode ser realizado por manipuladores não treinados ou com pouca experiência, os quais podem não conhecer os cuidados necessários para manter os sushis seguros (PROENÇA, 2010).

Como a manipulação de ingredientes no preparo do sushi é muito frequente, patógenos como *S. aureus*, *E. coli* e mesmo *Salmonella* devem ser controlados, uma vez que estão fortemente ligados a surtos decorrentes da falta de Boas Práticas. Um dos principais ingredientes do sushi é o arroz cozido, dessa forma, também o *B. cereus* se torna um importante patógeno de interesse na segurança desse alimento

devido à alta prevalência de surtos envolvendo essa matéria-prima (JUNEJA et al., 2019).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2018), no período de 2000 a 2017, ocorreram 12.503 surtos alimentares no Brasil, afetando 236.403 pessoas (taxa de mortalidade de 0,08%). Dentre as bactérias patogênicas identificadas, *Salmonella* sp. foi a que mais causou surtos (14,4%), seguido por *S. aureus* (7,7%), *E. coli* (6,5%) e *B. cereus* (3,1%). Entretanto, ao contrário do que é notificado no Brasil, em Porto Alegre, dados recentes apontam *B. cereus* como o principal patógeno causador de surtos, com uma prevalência de 32,2% (LENTZ et al., 2018).

3.1.1. *Bacillus cereus*

A espécie *B. cereus* é uma bactéria anaeróbia facultativa formadora de esporos, Gram positiva, com morfologia de bastonetes, podendo se locomover por flagelos peritríqueos. Por ser esporulada, resiste a processos de cocção e pode se multiplicar em alimentos cozidos pela falta de competição da microbiota. Como o *B. cereus* é ubíquo, ou seja, está presente em diversos locais da natureza como o solo, vegetação, água, cereais e peixes, é comum encontra-lo naturalmente em baixas concentrações na matéria-prima de produtos alimentícios (<10² UFC/g). Os surtos normalmente são causados quando o alimento é exposto a altas temperaturas por um longo período, uma vez que essa bactéria possui uma temperatura ótima de crescimento em torno de 35°C, podendo atingir uma concentração de 10⁵ a 10⁸ UFC/g (dose infectante). Diferente de outros tipos de bactérias esporuladas como as do gênero *Clostridium*, o *B. cereus* em sua maioria é catalase positivo. Além disso, consegue se multiplicar em temperaturas que variam de 6°C a 48°C e em uma faixa de pH variando de 4,9 a 9,3 (FORSYTHE, 2013).

Existem dois tipos de síndromes causadas por essa bactéria: a síndrome emética e a síndrome diarreica (Quadro 1). A síndrome emética ocorre após se ingerir um alimento com a toxina emética (cereulida) com os sintomas sendo evidentes poucas horas depois do consumo. Essa toxina não é inativada durante o processo de cocção ou pela passagem no trato gastrointestinal devido à sua resistência a altas temperaturas, pH extremos e degradação proteolítica. Dentre os sintomas associados,

destacam-se dores abdominais, diarreia e náuseas. Alimentos cozidos como arroz, massa e batata geralmente são os mais envolvidos em surtos que podem resultar nessa síndrome, uma vez que a toxina resiste a altas temperaturas. Já a síndrome diarreica manifesta os sintomas após várias horas, uma vez que as toxinas hemossilina BL, enterotoxina não-hemolítica e citotoxina K normalmente são produzidas dentro do intestino delgado do indivíduo após o consumo de alimentos contaminados pela bactéria. O complexo de toxinas é termossensível, podendo ser inativado pela cocção. Os sintomas são semelhantes à síndrome emética, sendo que vômitos e mal-estar também podem ocorrer. A ocorrência da síndrome diarreica pode estar envolvida com a ingestão de diversos tipos de alimentos contaminados, como produtos cárneos e lácteos, sopas, vegetais e pescados (KUMARI; SARKAR, 2016; FORSYTHE, 2013).

Quadro 1 - Características das síndromes causadas por *B. cereus*.

	Síndrome Emética	Síndrome Diarreica
Dose infectante (UFC/g)	10 ⁵ – 10 ⁸	10 ⁵ – 10 ⁷
Produção da toxina	Pré-formada no alimento	Pode ser produzida no intestino delgado
Estabilidade da toxina	Muito estável (126°C, 90min / pH 2 - 11)	Inativada a 56°C, 30 minutos
Temperatura de produção da toxina	15°C – 50°C	6°C a 21°C
Período de incubação	0,5 – 6 horas	8 – 24 horas
Duração da doença	6 – 24 horas	12 – 24 horas
Principais sintomas	Dores abdominais, vômito, diarreia e náusea	Náusea, mal-estar e diarreia
Alimentos frequentemente relacionados	Arroz, massa e batata	Produtos cárneos e lácteos, sopas, vegetais e peixes

Adaptado de Forsythe (2013).

3.1.2. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa com morfologia de bastonetes móveis, não formadora de esporos, pertencente à família das

Enterobacteriaceae. Sua multiplicação ocorre em uma faixa de pH que varia de 4,4 a 9,0 e são inativadas em temperaturas a partir de 60°C (74°C no centro geométrico do alimento). Normalmente essas bactérias são encontradas no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, fazendo parte da microbiota intestinal de humanos. Assim, são comumente utilizadas como um indicador de qualidade higiênico-sanitária. Na maioria das vezes a *E. coli* não causa doenças, entretanto algumas cepas desenvolveram genes de virulência que podem estar localizados em seu próprio genoma, em bacteriófagos incorporados ou em plasmídeos (FORSYTHE, 2013).

Dentre os grupos de *E. coli* patogênicas, o grupo mais conhecido por envolvimento em surtos alimentares é o das enterohemorrágicas (EHEC), onde destacam-se o sorotipo O157:H7 (dose infectante de 5 a 50 UFC/g) e os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (chamadas de “big six”). Essas bactérias são produtoras de uma toxina denominada Shiga (stx), portanto também são conhecidas como STEC (*Shiga-toxin-producing E. coli*). As toxinas Shiga são citotoxinas de origem proteica codificadas por bacteriófagos inseridos no cromossomo da bactéria. Dentre as principais doenças causadas pelas STEC, destaca-se a colite hemorrágica (CH) que pode evoluir para a Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU), causando diarreia sanguinolenta, dores abdominais, anemia, insuficiência renal e trombocitopenia. A SHU pode evoluir e em casos mais severos causa a morte na ausência de tratamento (FARROKH et al., 2013; LINDEN et al., 2013). Ainda não se tem dados oficiais de surtos causados pelas STEC no Brasil, entretanto, foram relatados casos de SHU na última década sem que o patógeno fosse identificado oficialmente (SANTOS et al., 2017; LOIKO et al., 2016). No Rio Grande do Sul, o sorotipo O157:H7 tem sido isolado nos últimos anos de água de irrigação e lavagem de alfaces em produtores locais (DECOL et al., 2017; RODRIGUES et al., 2014).

Uma das características que mais diferencia a *E. coli* dos demais coliformes é a fermentação da lactose com produção de gás e ácido a 45°C em um período de 24-48 horas, mostrando que são bactérias mais termotolerantes do que os coliformes totais em geral (fermentam a lactose com produção de gás a 35°C em um período de 24-48 horas) (FORSYTHE, 2013). A *E. coli* normalmente é utilizada como indicador das condições sanitárias de água e alimentos, pois sua presença indica um risco potencial de microrganismos patogênicos. Normalmente a contaminação dos

alimentos com *E. coli* ocorre por falhas nas Boas Práticas, como não lavar as mãos adequadamente antes de manipular o produto (MARTIN et al., 2016).

3.1.3. *Staphylococcus aureus*

A espécie *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva em formato de cocos que se agrupam formando diferentes arranjos (em pares, cadeias pequenas ou agrupamentos semelhantes a um cacho de uva). É uma bactéria anaeróbia facultativa, coagulase positiva e pode causar diversas síndromes como pneumonia, endocardite, septicemia, faringite, laringite, conjuntivite e até intoxicação alimentar, sendo essa última síndrome causada pela produção de enterotoxina. A quantidade de enterotoxina necessária para causar a intoxicação alimentar é de 1µg/kg (300 - 500ng) ou mais, produzida a partir de uma concentração de bactérias no alimento contaminado de 10⁵ UFC/g. Normalmente, os motivos das intoxicações alimentares causadas pelas enterotoxinas do *S. aureus* estão relacionados às suas resistências. Essas toxinas são resistentes a enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina, além de ser estáveis quando submetida a altas temperaturas (100°C por 30min, D_{98,9} = >2 horas), ou seja, resistem ao processo de cocção de alimentos e a proteólise no trato gastrointestinal. Por mais que as toxinas sejam resistentes, as células vegetativas de *S. aureus* podem ser rapidamente destruída pelo calor (D_{65,5} = 0,2 – 2 minutos), porém resistem a baixas umidades e altas concentrações de sal (FORSYTHE, 2013). A Tabela 1 mostra algumas condições de multiplicação e produção de toxinas do *S. aureus*.

Tabela 1 - Condições de multiplicação e produção de toxina do *S. aureus*.

Parâmetro	Multiplicação	Produção da toxina
Temperatura (°C)	7 - 48	10 - 48
pH	4 - 10	4,5 - 9,6
Atividade de Água	0,83 - 0,99	0,87 - 0,99

Adaptado de Forsythe (2013).

A halofilia, ou seja, a capacidade de multiplicação em ambientes com elevado teor de sal, é outro fator importante de resistência dessa bactéria. Devido a essa característica, essa espécie pode ser encontrada em diversos ambientes, porém o principal local é em humanos e em animais. Como ela resiste a ambientes mais severos (concentração alta de sais), pode ser encontrada naturalmente nas narinas,

garganta, cabelos e na pele de cerca de 50% ou mais dos humanos saudáveis. Esses locais do corpo estão diretamente ligados às Boas Práticas, uma vez que quando não aplicadas, o manipulador se torna uma possível fonte de contaminação do produto (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

Produtos crus normalmente não estão relacionados com intoxicações causadas por esse microrganismo, uma vez que ele não é um bom competidor nesse meio. Entretanto, em alimentos que passaram por um tratamento térmico e possuem uma microbiota menor, a incidência é mais frequente. Dentre os alimentos relacionados com intoxicações pelo *S. aureus*, destacam-se produtos cárneos, frango, salada de batata, ovo, salgadinhos, tortas, chocolate, sanduíches, produtos lácteos e principalmente produtos manipulados sem Boas Práticas. Os sintomas da intoxicação ocorrem de forma rápida (1 a 7 horas), apresentando náuseas severas, contrações e dores abdominais, vômito e diarreia. Normalmente os surtos envolvem grupos pequenos e localizados (ERCOLI et al., 2017; FETSCH et al., 2014; FORSYTHE, 2013).

3.2. Microbiologia Preditiva

A microbiologia preditiva é uma área da microbiologia de alimentos que utiliza modelos matemáticos a partir de dados microbiológicos obtidos experimentalmente. Através dessa ferramenta, é possível se obter respostas rápidas com o intuito de auxiliar na tomada de decisões relativas à segurança dos alimentos. Esse tipo de informação pode ser utilizado em sistemas de gestão da segurança de alimentos simulando o comportamento de microrganismos quando submetidos a diferentes fatores intrínsecos (pH, atividade de água, concentração salina, substâncias inibidoras, etc) e extrínsecos (temperatura, pressão de vapor, pressão de oxigênio, etc) do alimento (ELIAS, 2018).

A utilização da microbiologia preditiva vem se tornando cada vez mais frequente nos sistemas de gestão da segurança de alimentos. Os principais usos dessa ferramenta se encontram em planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF), Boas Práticas (BP), avaliações e gestão de riscos, estudos de vida útil ou de prateleira e desenvolvimento de novos produtos. A utilização de bancos de dados, feitos a partir de pesquisas científicas, possibilita a utilização desses modelos no cotidiano, auxiliando na tomada

de decisões e na praticidade de se obter informações confiáveis de forma rápida (FORSYTHE, 2013; MEMBRÉ; LAMBERT, 2008).

3.2.1. Classificação e Desenvolvimento dos Modelos Preditivos

Existem três classificações de modelos preditivos de acordo com o tipo de estrutura e de variáveis utilizadas. O modelo primário considera a variação da concentração microbiana em relação ao tempo. Nesse modelo, são observadas as curvas de multiplicação e de inativação de microrganismos. Os modelos secundários utilizam os modelos primários para obter dados como os parâmetros cinéticos, ou seja, a taxa de multiplicação microbiana, o tempo de fase lag e a população final máxima, relacionando-os com fatores ambientais, como pH, temperatura e atividade de água. Já os modelos terciários utilizam os dois tipos de modelos anteriores para realizar estimativas através de *softwares*, utilizando condições estipuladas pelo operador (WHITING; BUCHANAN, 1993).

Para se utilizar um modelo preditivo em uma pesquisa, é imprescindível que se faça um desenho experimental, ou seja, considerar fatores experimentais que vão influenciar na modelagem. Dentre os principais fatores destacam-se o objetivo do modelo, os fatores a serem controlados, as características do inóculo, o substrato utilizado e a quantidade de pontos a serem coletados (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2012).

1. Objetivo do modelo: determinar se o modelo será para avaliar a multiplicação cinética, inativação (sobrevivência ou morte), transferência (contaminação cruzada), interação entre espécies, etc.
2. Fatores controlados: determinar os parâmetros que serão controlados, como a temperatura, pH, atividade de água, etc. Além disso, os níveis e combinações deles caso seja necessário.
3. Características do inóculo: ter um registro/controlar a origem das cepas utilizadas no experimento, ou seja, se elas são de procedência padronizada (p. ex. ATCC – *American Type Culture Collection*) ou isoladas de algum alimento ou surto. Além disso, deve-se utilizar as culturas em seu estado fisiológico ideal (metabolismo ativado), podendo-se utilizar meios de cultura tradicionais para essa finalidade como TSB (caldo de soja tripticaseína) ou BHI (infusão de coração e cérebro). Normalmente se inocula inicialmente aproximadamente 10^2

a 10^3 UFC/g no alimento para curvas de multiplicação e 10^7 UFC/g para curvas de inativação ou sobrevivência, dependendo do tipo de microrganismo (SOUSA et al., 2014).

4. Substrato utilizado: deve-se levar em consideração as características do meio de cultura caso seja utilizado, de forma que se assemelhe ao alimento de interesse. Caso se inocule diretamente no alimento, deve-se levar em consideração os fatores intrínsecos e extrínsecos, além da microbiota acompanhante já existente nele, pois esta pode competir com o microrganismo de interesse
5. Quantidade de pontos a serem coletados: normalmente são coletados 15 pontos, sendo que o mínimo são 10 e 20 é considerado ótimo. Os pontos devem se distribuir por toda a curva de crescimento ou inibição, dando-se preferência pelos pontos de inflexão, onde a frequência de coleta de dados deve ser maior.

3.2.2. Modelos de Multiplicação

O modelo de multiplicação proposto por Baranyi e Roberts (1994), é um dos modelos mais utilizados para prever o comportamento de patógenos alimentares. Este modelo é utilizado em um *software* de fácil acesso chamado Combase, disponível gratuitamente. Utiliza-se esse modelo quando a bactéria se encontra normalmente em um ambiente favorável, apresentando uma taxa de crescimento positiva, ou seja, multiplicação bacteriana. A equação que representa esse modelo é:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{max} A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{max} A(t)} - 1}{e^{(N_{max} - N_0)}} \right]$$

$$\text{Onde, } A(t) = t + \frac{\frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{\mu_{max} t + q_0})}{1 + q_0}$$

N_t é o tamanho da população;

N_0 é o tamanho da população inicial;

N_{max} é a população máxima

t é o tempo;

μ_{max} é a taxa máxima de multiplicação específica;

q_0 é uma constante que varia de acordo com cada espécie de bactéria.

3.2.3. Modelos de Inativação

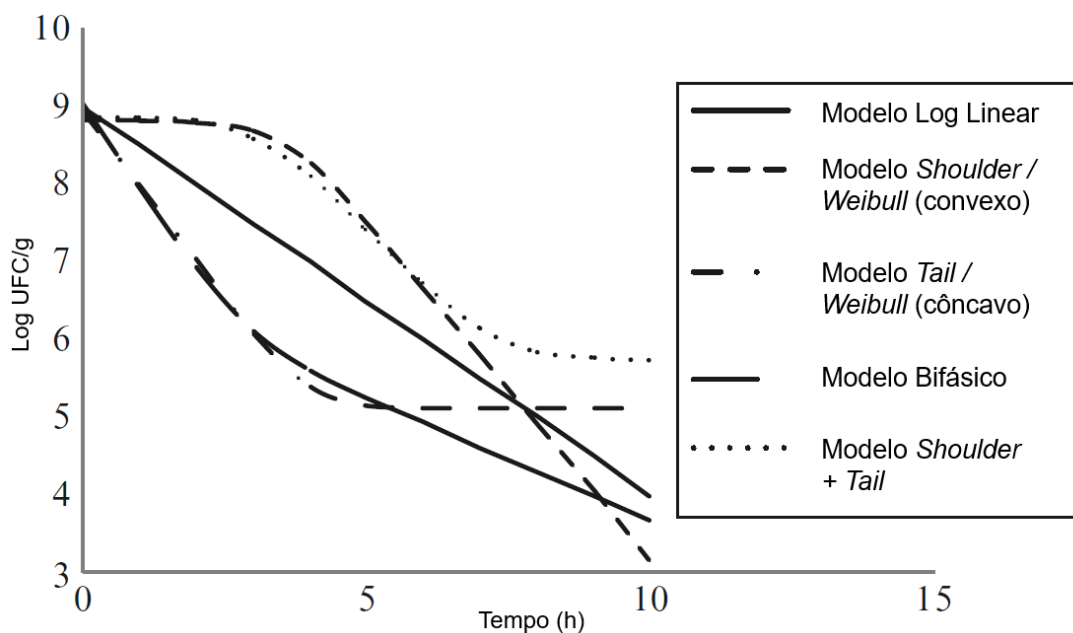
Os modelos de inativação, diferente dos modelos de multiplicação, descrevem o comportamento dos microrganismos quando expostos a ambientes não favoráveis ou letais. Dessa forma, não se mensura a taxa em que eles se multiplicam, mas sim que são inativados. Os principais tipos de modelos de inativação são baseados em regressões lineares e o não-lineares. A escolha do modelo depende do tipo de comportamento que o microrganismo terá em determinado ambiente. O modelo linear era tradicionalmente o mais utilizado, entretanto, os modelos não-lineares estão se ajustando melhor a situações onde há uma certa resistência dos microrganismos. Essa resistência faz com que a curva de inativação possa apresentar inflexões ao longo do tempo, podendo assumir um formato de “cauda” tanto no início como no final da curva (*shoulder* e *tail*), onde a taxa de inativação é baixa.

Uma das ferramentas quantitativas para a modelagem da inativação de microrganismos é um *software* gratuito chamado GInaFIT (*Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool*) (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005), utilizado como um *plug-in* da plataforma Microsoft Excel, incluindo uma ampla variedade de modelos de inativação primárias utilizando regressões lineares e não-lineares. O GInaFIT é capaz de estimar 9 tipos de modelos distintos (Figura 1):

1. Curvas clássicas Log-linear (reta);
2. Curvas apresentando uma inflexão inicial (*shoulder*) antes de uma inativação Log-linear (reta);
3. Curva apresentando uma inflexão final (*tail*) após uma inativação Log-linear (reta);
4. Curva apresentando inflexões tanto iniciais quanto finais (*shoulder + tail*);
5. Curvas côncavas;
6. Curvas convexas;
7. Curvas inicialmente côncavas ou convexas com uma inflexão final (*tail*);

8. Curvas que apresentem uma cinética bifásica de inativação;
9. Curvas que apresentem uma cinética bifásica de inativação após uma inflexão inicial (*shoulder*).

Figura 1 - Representação genérica dos modelos mais utilizados para a inativação de patógenos em alimentos.



3.2.3.1. Modelo Weibull

O modelo Weibull é baseado em uma regressão não linear e normalmente é utilizado para a predição de inativações térmicas em modelos primários. Esse modelo é constituído por dois parâmetros: o parâmetro escalar α (tempo) e o parâmetro adimensional β . O logaritmo do parâmetro α varia diretamente com a temperatura, porém o mesmo não se aplica ao parâmetro β (Figura 3). O parâmetro β tem relação com a concavidade da curva de inativação, podendo ter concavidade para baixo ($\beta > 1$) ou para cima ($\beta < 1$). Caso $\beta = 1$, é considerado que cada célula microbiana possui a mesma susceptibilidade de ser destruída (VAN BOEKEL, 2002). A equação que rege esse modelo é:

$$\log S_t = -\frac{1}{2,303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta$$

Onde,

$$S_t = \frac{N_t}{N_0};$$

N_t é o tamanho da população;

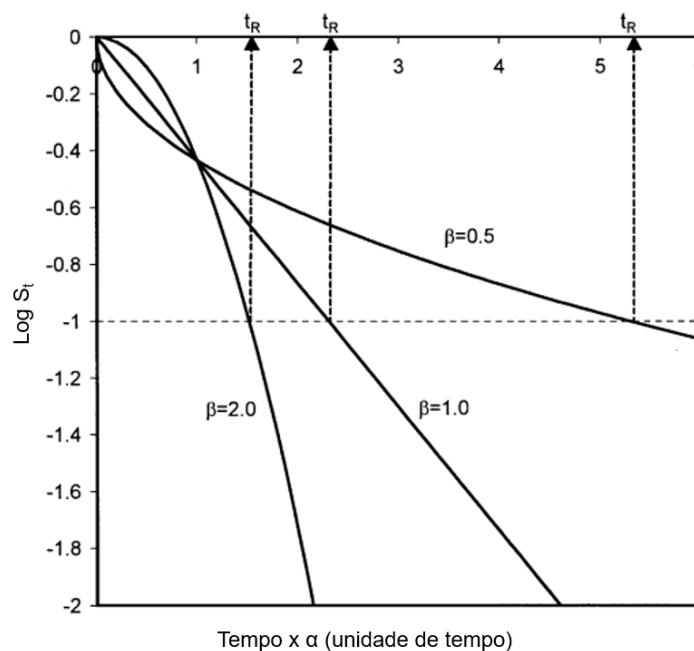
N_0 é o tamanho da população inicial;

t é o tempo;

α é o parâmetro escalar (unidades de tempo) linearmente dependente da temperatura (análogo ao valor D);

β é o parâmetro adimensional relacionado à concavidade da curva de inativação.

Figura 2 - Representação genérica da curva de sobrevivência de acordo com o modelo Weibull para três valores de β distintos. As linhas tracejadas indicam o tempo (t_R) para que haja 90% de redução do número de microrganismos para $\beta = 2, 1$ e $0,5$ respectivamente.



3.2.3.2. Modelo *Shoulder/Tail*

Os modelos *shoulder/tail* são baseados na existência de inflexões na curva de inativação. O formato da curva e o tipo de modelo associado a ela podem variar dependendo do tipo de microrganismo envolvido (Figura 3). A inativação pode ser influenciada pela intensidade do estresse (uma forma côncava pode se tornar convexa

ou sigmoidal), pelo estado fisiológico da célula, pela fase de multiplicação (fase exponencial ou estacionária), por condições de estresse antes da análise, etc.

Segundo Albert e Mafart (2005), o efeito *shoulder*, que ocorre no início da curva de inativação, sugere uma resistência inicial do microrganismo ao estresse, onde há pouca ou nenhuma inativação. Já o efeito *tail*, que ocorre no final da curva de inativação, pode sugerir vários níveis de resistência, como aglomerações de células, efeito de proteção ao meio, populações misturadas, etc.

Geeraerd, Herremans e van Impe (2000) desenvolveram um modelo que rege o comportamento *shoulder/tail* através da equação:

$$N_t = \left[(N_0 - N_{res}) \exp(-k_{max}t) \frac{e^{-k_{max}t_l}}{1 + [e^{(k_{max}t_l)} - 1] e^{(-k_{max}t)}} + N_{res} \right]$$

Onde,

N_t é o tamanho da população;

N_0 é o tamanho da população inicial;

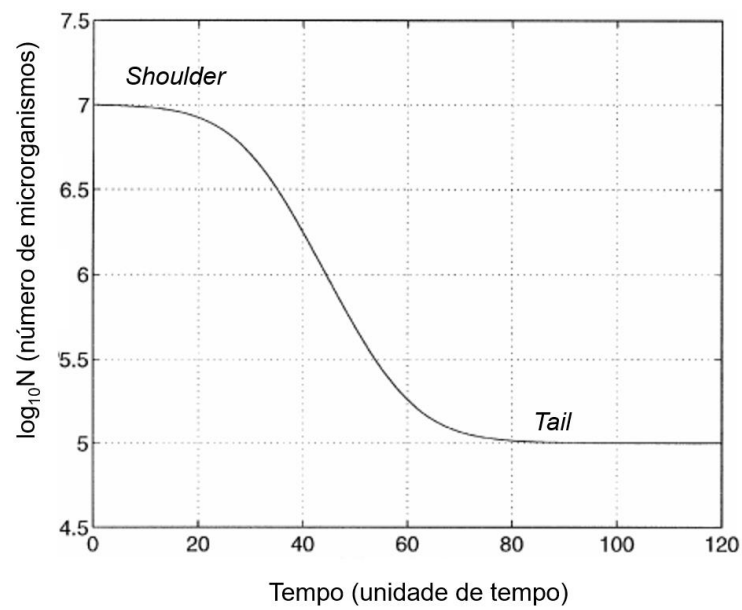
N_{res} é a densidade da população residual;

t é o tempo;

t_l é o tempo anterior à inativação;

k_{max} é a taxa máxima de inativação;

Figura 3 - Representação genérica da curva de sobrevivência de acordo com o modelo *shoulder/tail*.



Os materiais e métodos, resultados assim como a discussão desse trabalho serão apresentados a seguir, na forma de artigo científico.

4. ARTIGO

Hygiene Practices at Preparation and Bacterial Growth on Sushi in Southern Brazil

Diego Chemello Muller¹, Luciana Meneghetti Gehrke¹, Paula Marques Rivas², Gabriela Borges de Moraes², Jessica Moreira Cannavon², Susana de Oliveira Elias¹, Lucas Fallavena¹, Eduardo Cesar Tondo¹

1 Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS. Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale – Prédio 43212, Laboratório 205 – CEP 91501-970 - Porto Alegre/RS/Brasil.

2. Equipe de Vigilância de Alimentos de Porto Alegre – CGVS – SMS- PMPA Avenida Padre Cacique, 372. CEP 90810-240, Porto Alegre/RS/Brazil.

Abstract

Good Hygiene Practices and sushi preparation were followed in 29 sushi restaurants in Southern Brazil. The growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* were evaluated at different pH. After that, the growth of the same microorganisms was modelled at 7°C and 25°C in sushi pieces presenting pH 4.2. Results demonstrated that the majority of restaurants had adequate facilities, equipment, water supply, and pest controls, however, an expressive percentage of them demonstrated inadequacies concerning important food safety issues as temperature control and supplier's assurance of the raw fish. The pH of rice used to prepare sushi varied from 4.0 to 4.3 and was considered adequate, because no one of the evaluated microorganisms were able to expressively growth at pH ranging from 4.0 - 4.5 in BHI medium (24h). Artificially contaminated hossomaki sushi pieces did not support growth of *E. coli*, *S. aureus*, or *B. cereus* at 7°C and 25°C, and this result was attributed to the pH 4.2. Based on the results, the most important control measures identified in sushi preparation were: 1) supplier assurance of raw fish, 2) temperature control of raw fish, and 3) pH control of sushi pieces.

Keywords: Japanese food, foodborne pathogens, pH, temperature

Highlights:

- 29 sushi restaurants were investigated about Good Hygiene Practices.
- Growth of *E. coli*, *S. aureus*, and *B. cereus* were evaluated at different pH on sushi.
- Majority of restaurants had adequate equipment, water supply, and pest controls.
- Important control measures were supplier assurance/temperature control of raw fish.
- The safety pH of sushi is under 4.5.

1. Introduction

In the last few years, an expressive increase of the consumption of sushi has been observed worldwide and also in Brazil. The increase of sushi market also occurred in Porto Alegre city, Southern Brazil, where, in 2012, there were 64 restaurants serving sushi, in 2015 were 119, and, in 2018, 150 (SINDICATO DE HOSPEDAGEM E ALIMENTAÇÃO DE PORTO ALEGRE E REGIÃO-SINDHA, 2018). Concomitantly to the increase of consumption, several foodborne diseases involving sushi were also reported in Brazil and other countries (JAIN et al., 2008; BRAZIL, 2010).

Although it is an old habit among Japanese population, sushi consumption was not as popular as it is nowadays worldwide. The sushi consumption only reached global scale around 1970, as a consequence of Japan's emergence on the global economic scene and a boom in sushi restaurants in the USA (BESTOR, 2000). In Brazil, sushi consumption started around 100 years ago, when Japanese families arrived to work in coffee farms. These families have established residence especially in Southeast and Southern regions of Brazil, introducing new cultural habits and among them how to prepare sushi and sashimi.

Sushi is the combination of Japanese rice, added with rice vinegar, raw or cooked fish, sometimes, edible dry algae (*Porphyra* sp.), fruits, vegetables, kanikama (crab-meat food), wasabi, and ginger (PRADO et al., 2015). There are at least 14 sushi variations, based on differences of ingredients, preparation and/or display kinds. There are also at least six types of sushi that are linked with regions of Japan that cannot be paired with those 14 variations (SILVA; YAMAO, 2006). Independently of the kind of sushi, its preparation involves a lot of manipulation and frequently the use of raw ingredients, increasing the risk of microbial contamination and consequently the occurrence of foodborne diseases. Pathogens may be introduced by handler's hands, raw material as fishes, or by cross contamination from utensils and there is no thermal processing step to eliminate microbial contamination. However, using adequate Good Hygiene Practices (GHP) and proper control measures during processing, sushi can be considered safe for consumption.

The main reasons for the involvement of sushi with foodborne diseases in Brazil are the usual large-scale production and the long-time exposure time of sushi pieces at environmental temperature, before consumption. In Japan, the volumes of sushi prepared in many traditional restaurants are much lower than those produced in

Brazilian restaurants, and sushi pieces are immediately consumed after preparation, reducing the probability of microbial multiplication.

According to the Department of Health Surveillance (BRAZIL, 2018), Brazilian Ministry of Health, between 2000 and 2017, there were 12,503 foodborne diseases outbreaks in Brazil, affecting 236,403 people (mortality rate of 0.08%). *Salmonella* sp. (14.4%) was the most prevalent pathogen, followed by *S. aureus* (7.7%), *E. coli* (6.5%) and *B. cereus* (3.1%). However, contrary to what is reported in Brazil, recent data indicate *B. cereus* as the main pathogen involved in outbreaks in Porto Alegre, with a prevalence of 32.2% (LENTZ et al., 2018).

In order to assure the safety of this kind of preparation, control measures should focus on the quality of raw ingredients, prevention of cross contamination and prevention of microbial multiplication. The former two aspects depending on the correct adoption of GHP, while the latter depends on the control of pH and temperatures. The objective of the present study was to evaluate the processing and sanitary conditions and bacterial growth on sushi prepared in Southern Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Technical visits and official inspections

From August to December 2013, 29 Japanese restaurants specialized in preparation of sushi, were visited in Porto Alegre, the capital city of the State of Rio Grande do Sul, Southernmost State of Brazil. The visits aimed to evaluate the GHP and the flowchart of preparation of sushi. Among the visits, 12 were carried out by officers of Surveillance Service of Porto Alegre city and the other 16 visits were performed by a food safety expert. All the visits were carried out without previous information and each sushi establishment was audited one time.

Each technical visit or official inspection was done in two to four hours, using a risk-based instrument developed to evaluate the hygienic and sanitary conditions and grading of food services during 2014 FIFA World Cup, with some modifications (BRAZIL, 2013; CUNHA et al., 2014). After audits and if necessary, official sanitary actions were adopted by Sanitary Surveillance officers, as notifications, food apprehensions, food discards, interruption of activities, among others.

The major aspects observed in audits were: 1) water supply; 2) structure and facilities; 3) sanitation procedures; 4) pest control activities; 5) food handlers behavior; 6) food preparation (ingredients used in sushi preparation; temperature of fish at

reception; temperature of ready-to-eat sushi at distribution; pH of rice used for sushi preparation; duration of preparation); 7) storage, transportation and distribution; 8) technical responsibility, documentation, and records. The pH of sauce (sushizu) and sauced rice used for sushi preparation were analyzed using pH-measure strips (Merck). The temperatures of ready-to-eat raw fishes and sushi were measured using an infrared food thermometer (Akso) and a digital food thermometer (Incoterm).

2.2. Bacterial growth in different pH and on sushi pieces

2.2.1. Bacterial Strains

Aiming to study the bacterial growth on sushi, hossomaki sushi pieces were artificially contaminated with the following bacteria, separately. *B. cereus* strain (BCSST01) isolated from a rice sample involved in a foodborne outbreak occurred in the State of Rio Grande do Sul (RS), in 2014. *S. aureus* (SASFS02) isolated from a food sample involved in a foodborne outbreak occurred also in the State of RS, in 2003. *E. coli* ATCC 25972 from the Culture Collection of the Food Microbiology and Food Control Laboratory of the Institute of Food Science and Technology (ICTA/UFRGS). Outbreak strains were kindly provided by the Official Laboratory of Public Health of Rio Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN/RS). Before the evaluation of growth on sushi pieces, all bacteria were tested in Brain Heart Infusion Broth (BHI Merck, Darmstadt, Germany) with different pH (4.0, 4.5, 5.0, and 6.0), at 37°C for 24 hours. Optical density of bacterial suspensions was measured at 630 nm using a UV/visible spectrophotometer (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences).

2.2.2. Transport and preparation of samples

Hossomaki samples were acquired from a sushi restaurant of Porto Alegre city, where the production procedures were standardized, well controlled, and high levels of GHP procedures were verified. Control registers demonstrated adequate pH control and low variation in pH values among sushi pieces produced. All of the collected samples were transported by car inside thermal boxes, under refrigeration (7°C), in less than 1 h, to the Food Microbiology and Food Control Laboratory of the Institute of Food Science and Technology - ICTA/UFRGS for further analyses.

2.2.3. Microbial inoculation of hossomaki sushi

All the bacterial strains were cultivated in 5 mL of BHI, at 37°C, for 24h. This procedure was carried out twice, aiming to physiological activation of strains. After that, the cultures were centrifuged for 2 min at 5000 rpm, the supernatants were discharged

and pellets were washed with 0.1% peptone water (Merck). This procedure was repeated 3 times. Cells were re-suspended with 0.1% peptone water and final cell concentrations of approximately 10^7 CFU/mL of *B. cereus* and 10^8 CFU/mL of *E. coli* ATCC 25972 and *S. aureus* were obtained. Decimal serial dilutions were prepared using 0.1% peptone water, and 1 mL of appropriate dilution was inoculated on each hossomaki sample, reaching the final concentration of approximately 10^3 (3.0-3.8 log) CFU/g.

2.2.4. Microbiological counts

Artificially contaminated hossomaki sushi pieces were stored at 7°C and 25°C, during different time periods. These temperatures were chosen, simulating two different scenarios: 1) inadequate refrigeration; 2) environmental temperature at distribution inside sushi restaurants. Sampling was carried out in varied time intervals, depending on the temperature of storage and the expected bacterial growth curve. At each time point, 10 g of sample were aseptically weighed, 90 mL of peptone water was added, and homogenized inside a sterile plastic bag using a stomacher, for 60s. After that, serial decimal dilutions were done in 0.1% peptone water, and 0.1 mL samples of the appropriate dilutions were spread on selective and non-selective agar plates. Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) Agar (Merck), ChromoCult[®] Coliform Agar (Merck) and Baird-Parker Agar (Merck) were used to grow *B. cereus* (30°C for 24h), *E. coli* ATCC 25972 (37°C for 24h) and *S. aureus* (37°C for 48h), respectively. Total colony-counts (TCC) were enumerated using pour-plate method on plate count agar media (PCA, Merck), incubated at 30°C, for 72h. All the bacterial counts were carried out in triplicate. The experiments were repeated at least twice and the results were expressed as CFU/g.

2.2.5. pH measurement

When the hossomaki samples arrived at Laboratory, a sample of 10 g was weighed inside a Beaker homogenized with 100 ml of distilled water, according to the methods preconized by Odair Zenebon (2005). The pH was measured directly in the solution with the QUIMIS pHmeter Q400AS, in duplicate. Furthermore, the pH of sushi components (rice, raw fish and seaweed) were measured, separately, using Macherey-Nagel Universal pH paper (in triplicate).

2.2.6. Modeling the growth data

Survival curves of *B. cereus*, *E. coli*, and *S. aureus* on sushi were obtained by fitting the experimental data with Combase (BARANYI; ROBERTS, 1994) and GlnaFIT

Excel add-in software (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005) using shoulder/tail and Weibull models.

3. Results

3.1. Technical visits and official inspections

Technical audits and official inspections demonstrated different conditions among the 29 restaurants, depending on the item evaluated (Table 2). For example, all restaurants presented facilities with exclusive use of running potable water, appropriate connections to the sewer system and septic tank. However, 8 out of 29 did not demonstrate that water reservoir was cleaned and sanitized at intervals not exceeding six months, keeping records of this operation, as is mandatory by sanitary regulation of Southern Brazil.

The majority of restaurants demonstrated adequate facilities, including kitchens and consumptions saloons, and equipment for sushi preparation, and 21 out 29 presented appropriate toilets, equipped with all necessary items for personal hygiene, i.e. toilet paper, odorless antiseptic liquid soap or odorless liquid soap and antiseptic, paper collectors with lids operated without manual contact and non-recycled paper towels or other hygienic and safe system for drying hands. The unconformities observed in the 8 establishments ranged from the lack of individual items like toilet paper, liquid soap, antiseptic, etc. and lack of hygienic conditions of toilets. Even though the majority of establishments had appropriate facilities, in only 13 of them the facilities, equipment, furniture, and utensils demonstrated proper hygienic–sanitary conditions and only 16 demonstrated appropriate frequency of sanitization.

In relation to pest control, 25 establishments showed facilities, equipment, furniture and utensils free from the presence of animals and insects, probably because the majority (25) demonstrated that the pest control was performed by specialized companies. However, actions to prevent attraction, shelter, access, and dissemination of vectors and urban pests were deficient in 17 restaurants. These results means that establishments demonstrated one or more of the following problems: a) lack of closed drains; b) lack of rubber protection below doors; c) lack of anti-insect wets on windows, among others.

Audits demonstrated that food handlers did not work injured or presenting symptoms of diseases, and do not smoke, sing, whistle, sneeze, spit, cough, eat, handle money or speak unnecessarily, during food preparation in the majority of

restaurants (22). However, in 19 restaurants people that handled raw foods did not wash and disinfect their hands frequently and at appropriate times, during food preparation.

At reception, approximately 30% of restaurants subjected foods to inspections and approvals or control the hygienic–sanitary conditions and temperatures. In those ones where temperature was controlled, the mean temperatures of raw fishes at reception was $-1.89 \pm 4.46^{\circ}\text{C}$, varying from -12.3 to 5.7°C .

In 23 of 29 restaurants, the foods subjected to thawing were kept under refrigeration below 5°C , however in 14, perishable products were exposed to room temperature for long periods, what was considered inappropriate. This occurred due to long time of preparation, overloaded exposers, or exposers with inadequate temperatures or open doors.

Only 7 restaurants controlled the effectiveness of the heat treatment of foods (rice), and 17 of them presented a calibrated thermometer to measure the temperature of foods. 18 establishments kept cooked food refrigerated at temperatures below 5°C , conserved prepared food before consumption below 5°C and monitored the temperature of the equipment. The mean temperature of sushi and raw salmon at refrigerated distribution was $6.23 \pm 3.86^{\circ}\text{C}$, varying from -1.2 to 12°C . At 2 restaurants, sushi pieces presented temperatures of 19°C . In 26 establishments there was a properly trained professional for controlling food safety activities, and 16 of them followed a Good Manufacturing Practices Manual and Standard Operating Procedures.

3.2. Bacterial Growth in different pH and on Sushi pieces

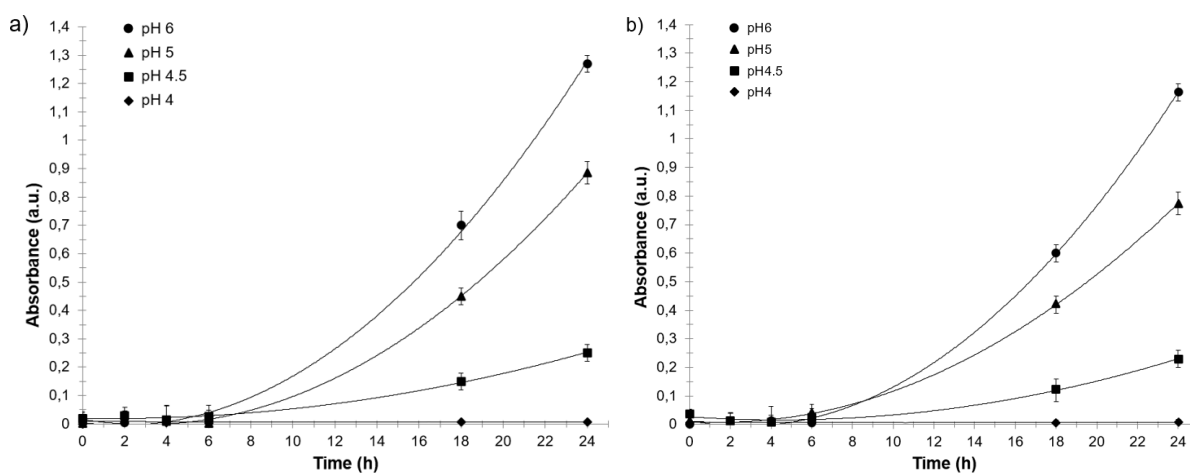
Optical density of bacterial suspensions did not change in any of the tested pH during 6 hours at 37°C . All the bacteria cultivated in BHI with pH 4.0 and 4.5 did not demonstrate significant increase of optical density, however the same microorganisms demonstrated expressive growth at pH 5.0 and 6.0 at 37°C during 24 hours (Figure 4).

Hossomaki samples used as controls did not show any *B. cereus* or *E. coli* contamination, before the experiments. However, the presence of *S. aureus* in low concentration ($<10^2$ CFU/g) was detected in some samples, probably due to handling during preparation. Hossomaki sushi pieces demonstrated mesophilic counts ranging from 4.0 to 5.0 log CFU/g in control samples (data not shown).

Artificially contaminated sushi pieces exposed to 7°C demonstrated initial and final counts of *E. coli* and *B. cereus* of 3.09 ± 0.06 and $2.25 \log \pm 0.16$ CFU/g, going to

3.69 ± 0.06 and 0 log CFU/g, respectively, after 30h (Figures 5 and 7). *S. aureus* demonstrated a constant profile in counts (3.88 ± 0.06 to 4.01 ± 0.10 log CFU/g) during 28h (Figure 6). Mesophilic counts were carried out in parallel to each pathogen measurement and the counts remained practically the same (from 5.70 to 5.74 log CFU/g; from 5.03 to 5.41 log CFU/g; and from 5.87 to 5.74 log CFU/g), after 30h. At 25°C, the initial and final counts of *E. coli* were 3.09 ± 0.08 and 3.07 ± 0.13 log CFU/g, respectively, after 30 h. Mesophilic counts increased from 4.60 to 5.93 log CFU/g in the same period, and the lag phase was 12 hours. The initial and final counts of *S. aureus* were 3.77 ± 0.10 and 3.15 ± 0.16 log CFU/g, respectively, after 30 h. Mesophilic counts of these samples increased from 5.11 to 6.32 log CFU/g, during this period, presenting lag phase of at least 12 hours. The initial and final counts of *B. cereus* reduced from 3.65 ± 0.06 to 1.65 ± 0.10 log CFU/g, respectively, during 34 h. Interestingly, it was observed that hossomaki sushi pieces exposed to 25°C reduced 2 log CFU/g of *B. cereus*, during 34 h. Mesophilic counts of these samples increased from de 4.73 to 7.23 log CFU/g in the same period, and lag phase was around 12 hours. The pH of hossomaki sushi samples remained constant (4.2) throughout the experiments.

Figura 4 - Optical density of bacterial suspensions tested in Brain Heart Infusion Broth with different pH (4.0, 4.5, 5.0, and 6.0) during 24 hours at 37°C to *E. coli* (a), *S. aureus* (b), and *B. cereus* (c). Each symbol represents a mean of triplicate results.



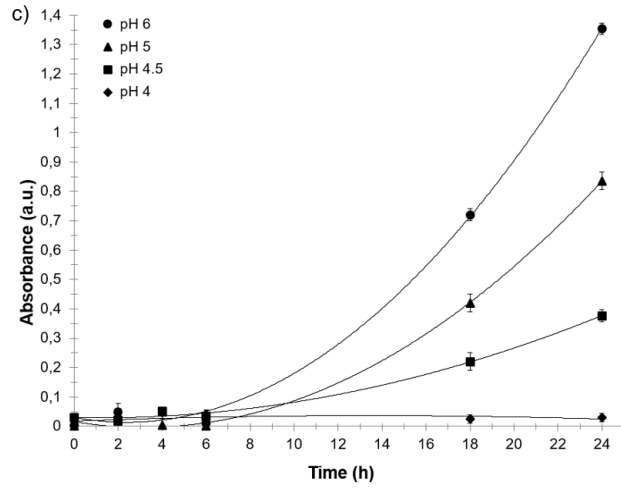


Figure 5 - Survival of *E. coli* on hossomaki sushi stored at 7°C (▲) and 25°C (●), fitting data to the GlnaFiT Excel add-in software and ComBase. Each symbol represents a mean of duplicate results.

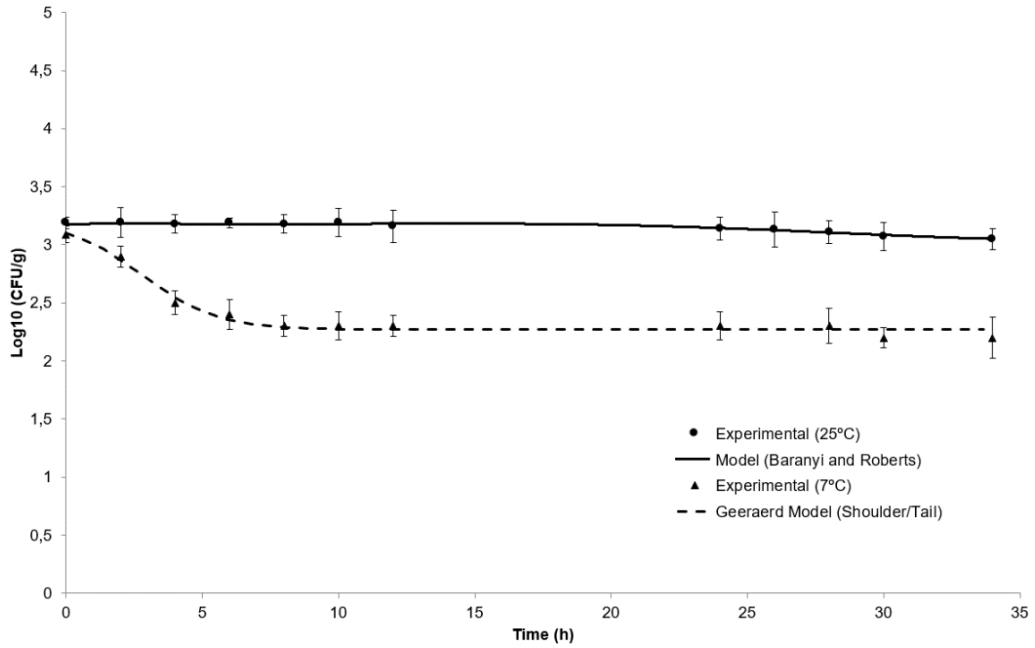


Figura 6 - Survival of *S. aureus* on hossomaki sushi stored at 7°C (▲) and 25°C (●), fitting data to the GlnaFiT Excel add-in software and ComBase. Each symbol represents a mean of duplicate results.

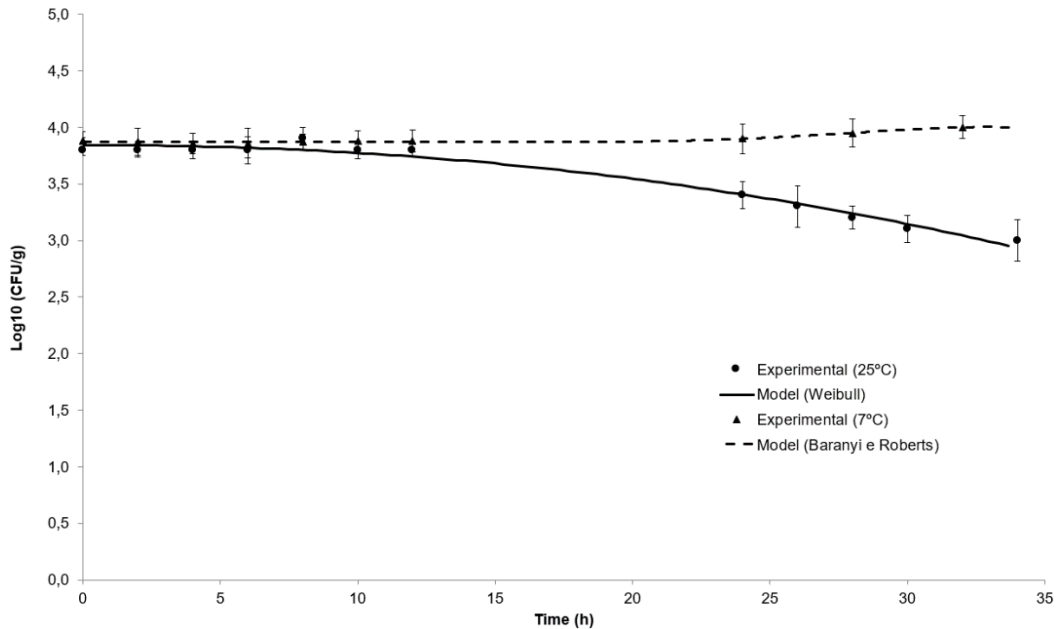
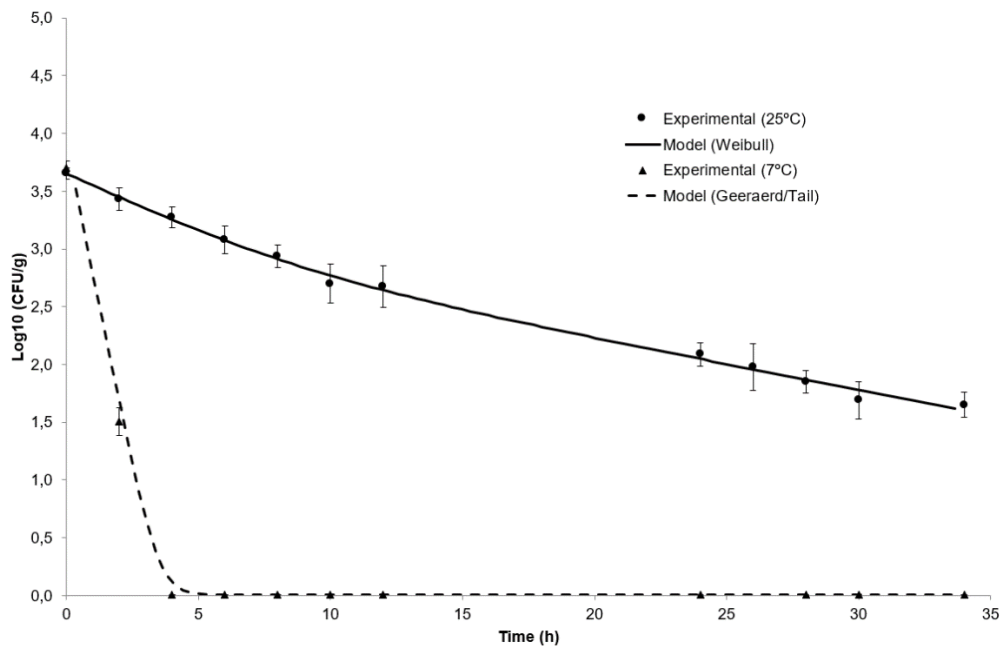


Figura 7 - Survival of *B. cereus* on hossomaki sushi stored at 7°C (▲) and 25°C (●), fitting data to the GlnaFiT Excel add-in software. Each symbol represents a mean of duplicate results.



4. Discussion

Food services are establishments where food meals are prepared and frequently consumed, including fast foods, hotels, school kitchens, restaurants, including those that prepare sushi. During the last years, food services have emerged as the main locals where consumers get their food (YIANNAS, 2009) and, in order to fulfill this immense demand, there are several establishments working with adequate conditions, at the same time that others carry out their activities without ideal conditions or GHP procedures.

As expected, diverse scenarios were found in Japanese restaurants in Southern Brazil, where different GHP and process control levels were observed. For example, all restaurants were operating using adequate water supply, presenting potable water, sewer system, and septic tank, however, 27% of them were not able to prove cleaning procedures of water reservoir each 6 months, that is mandatory in Southern Brazil (RIO GRANDE DO SUL, 2009). Further, most of restaurants had adequate facilities, equipment and utensils necessary for sushi preparation, and the majority (72%) demonstrated appropriate toilets equipped with all necessary products for personal hygiene. This adequate basic sanitary and structure conditions of Japanese restaurants can be explained because this sector had expanded expressively and owner generally have resources to invest in facilities and infra-structure. Beyond this, in Porto Alegre city, practically all food services have access to public potable water, and the control of water and structure of restaurants have been one of the main focus of Sanitary Surveillance officers. This is especially true in those restaurants that receive several clients, as sushi establishments, because they may represent higher risk and affect higher numbers of people.

Audits and inspections also revealed that restaurants had adequate pest controls, because facilities, equipment and utensils were free of animals and insects, even though, procedures to avoid attraction, shelter, access and dissemination of insects had to be improved in more than a half of restaurants. The adequate pest control carries out by specialized companies is obligatory in Brazil and Southern Brazil by different regulations (BRAZIL, 2004; RIO GRANDE DO SUL, 2009), especially when chemical products have to be applied. Further, due to the expressive growing of sushi's restaurant in Southern Brazil, pest control and absence of any kind of insects or animals are important concerns of consumers, motivating owners to implement adequate pest controls and the use of chemical products. Other factor that probably

motivate and make possible adequate structure and pest controls is the average price of Japanese meal in Porto Alegre city. While an average meal in a buffet food service costs around U\$ 4 - 10, sushi meals may cost U\$ 7 to 25, per person. With higher profits, restaurants can invest more in quality issues.

While general infra-structure and basic sanitary conditions of restaurants demonstrated to be adequate in the majority of restaurants, diverse inadequacies concerning procedures and process control were observed. For example, practically half of establishments demonstrated that facilities, furniture and utensils were not in proper hygienic-sanitary conditions and the frequency of sanitation was not adequate. In 19 restaurants, employees did not wash their hands at all adequate moments, i.e. at arriving, before handling food, after touching contaminated materials, after using toilets, and when needed. This is particularly worrisome because preparation of sushi necessarily will involve a lot of manipulation and contaminated handler hands may result in sushi contamination. Supporting this possibility, some hosomaki pieces had *S. aureus* before artificial contamination. Appropriate food manipulation is very important in any kind of food service and failures may result in foodborne illnesses. Harada et al. (2013) described a foodborne outbreak during a 2-day traditional festival in Osaka, Japan. Among 126 customers who patronized a particular Japanese restaurant during the event, 102 developed symptoms of gastrointestinal disease. Strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype O169:H41 were isolated from one food sample and from fecal samples collected from 19 of 34 patients and 2 of 4 food handlers. The cause of the outbreak was attributed to improper handling of raw materials or pre-prepared meals. Jain et al. (2008) described another outbreak due to sushi contamination by food handlers, in Nevada, USA. In August and November 2004, 2 clusters of diarrhea cases occurred among patrons of 2 affiliated sushi restaurants (A and B). In August 2004, a stool sample from one ill sushi restaurant A patron yielded ETEC. In December 2004, a third cluster of diarrhea cases was identified among sushi restaurant B patrons. One-hundred thirty patrons of sushi restaurant B reported symptoms. Illness was associated with consumption of butterfly shrimp, but only sushi restaurant B patrons reported diarrhea. Poor food-handling practices and infected food handlers likely contributed to this outbreak.

Food Surveillance reports about foodborne diseases of Porto Alegre city, occurred from 2004 to 2014, demonstrated that there were thirteen outbreaks involving the consumption of sushi. In total, 35 people became sick, presenting one or several

of the following symptoms: nausea, vomits, diarrhea, abdominal pain, sickness, headache, and fever. In the majority of outbreaks, sushi pieces were consumed inside restaurants where they were prepared, however in 5 outbreaks the consumption occurred at private residences or at workplaces of victims, as well. Among the sick people, eleven were men and twenty-four were women with ages ranging from 10 to 50 years old. Etiological agents were not identified in the majority of outbreaks, except in two of them that the identified microorganisms were *E. coli* and *B. cereus*. The causal factors were not always identified, but when it was possible, they were identified as cross contamination due to failures in manipulation of food handlers, inadequate hygienic conditions of equipment and utensils, maintenance of sushi pieces for long time at environmental temperature or inadequate refrigeration temperature.

One important issue of concern was that most of the irregularities in sushi restaurants of Southern Brazil were observed in controls of raw materials and control process, during food preparation. According to Tondo and Bartz (2014), even though adequate installations are very important to produce safe food, the use of potable water and the implementation of process controls, as the control of temperature, time of exposure, pH, etc., are priorities in order to prevent foodborne diseases. The adequate process controls are essential because they may eliminate, reduce or control the bacterial contamination occurred due to non-conformities of infra-structure, facilities, manipulation, and even contamination of raw materials. Our results demonstrated that among the 29 establishments, approximately 30% did not perform inspections and approvals of raw fish at reception and the temperatures were not checked. Practically the same percentage of restaurants presented inadequacies in relation to the integrity of primary packaging, hygienic-sanitary conditions of raw materials and ingredients received, and lack of information on labels of raw materials at reception. This is other important issue to be improved because raw fish is a frequent ingredient of sushi and microbial contamination depends on controls implemented by suppliers. Actually, suppliers are responsible for the microbial assurance of raw fish received by sushi restaurants, and these establishments must to guarantee the adequate storage at appropriate temperature, from reception to consumption. According to Yiannas (2009) in order to dramatically reduce risk, future strategies must focus on eliminating the presence of pathogenic organisms on raw and processed products before they enter food services, rather than eliminating them at the restaurant. This is particularly important for sushi establishments, because there is no step in the flowchart of

production able to eliminate microbial contamination present on raw fish of sushi. According to Codex Alimentarius Commission (2003), hazards of fish and fishery products are *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and Parasites of public health significance as trematodes, nematodes, cestodes. In some products, *S. aureus* and *Clostridium botulinum* can be included, as well. In order to control all of them, preventive measures must be applied at suppliers. According to FAO (FOOD STANDARDS AGENCY, 2012) that provides guidance for the legal requirements of England, Wales, and Northern Ireland about freezing for fishery products intended to be eaten raw or lightly cooked, fishery products that are subject to a freezing treatment must be frozen at -20°C for not less than 24 hours, or -35°C for not less than 15 hours, and the freezing must reach all parts of the product. The same document also reported that fishery products that were commercially frozen at -18°C for at least 4 days for storage, transport and distribution are exempt from the freezing requirements referred above. Other exemption is in the case of farmed fish when cultured from embryos and fed on a diet that cannot contain viable parasites and were cultivated in environments that are free of viable parasites. Similar parameters were proposed by ICMSF (2015) who reported that raw fish should be cultivated under GHP/GMP and must be stored at least at -18°C or -20°C in order to eliminate parasites before use in sushi preparation.

Several failures on temperature controls were verified by our study. For example, practically a half of restaurants exposed perishable foods to environmental temperature for long periods; thawing was not always carried out adequately (ex. under refrigeration); the cooking temperature was not always controlled or the effectiveness of heat treatment was evaluated; there was no calibrated thermometer in several restaurants, suggesting that the control of temperature was not a priority; prepared food was stored at inadequate temperatures; and the reduction of temperature of prepared food was not always performed adequately. Analyzing the flowchart of preparation of sushi in Southern Brazil it was possible to observe that the preparation of sushi generally begins on mornings, when rice is cooked and cooled. At several restaurants, rice is prepared one day before, highlighting the necessity of appropriate storage. After cook, rice is then mixed with rice vinegar, what have to be done property in order to guarantee complete pH reduction of the whole batch of rice. After that, sushi pieces are prepared by hand of sushiman, what may take several hours, depending on the quantity of sushi produced. In Brazil, due to the current high consumption, big

amounts of sushi are prepared in restaurants, and after sushi pieces are ready, they can remain several hours waiting for distribution and consumption. Based on this, problems with the control of temperature during the preparation can be critical, and it may result on multiplication of microorganisms especially if the pH of rice is not controlled. Our results demonstrated that no one of the evaluated microorganisms were able to growth at pH 4.0 and a slightly increase of OD_{630nm} was observed at pH 4.5 after 24 hours at 37°C. Corroborating these findings Jay (2005) Cotter and Hill (2003), Hocking (2003), and Lambert and Stratford (1999) have reported that foods with pH around 4.0 - 4.5 may prevent microbial multiplication, because most of food pathogens do not multiply at this pH range. Highlighting the necessity of pH control in rice for sushi, the food regulation of New South Wales (NSW) Food Authority advocates that cooked rice added with vinegar have to present a pH of 4.6 or less (NSW FOOD AUTHORITY, 2007).

In the present study, further, hossomaki sushi pieces presenting pH 4.2 were artificially contaminated with *E. coli*, *S. aureus*, and *B. cereus*. Contaminated sushi pieces were exposed to 7°C and 25°C, simulating an abuse refrigeration temperature (7°C, being <5°C the preconized temperature) and assuming that 25°C is a possible and frequent environmental temperature inside sushi restaurants. The microorganisms were chosen because *E. coli* and *S. aureus* are well known Gram-negative and Gram-positive food contaminants, respectively, and *B. cereus* is a common pathogen involved with foodborne outbreaks due to consumption of rice meals (OH et al., 2015). According to the microbial results, no growth was detected at 7°C, during 30 hours, and the counts of *E. coli* and *B. cereus* even decreased. At 25°C, *E. coli*, *S. aureus*, and *B. cereus* did not demonstrate significant growth after 30h, and this can be attributed to the pH because these microorganisms are mesophylls that easily multiply at this temperature. Corroborating these findings, counts of mesophilic microorganisms on sushi presented lag phase of at least 12 hours at 25°C. The pH control of rice mixed with vinegar seems to be an effective measure to control microbial multiplication in sushi. Rusul and Yaacob (1995) have tested 194 *B. cereus* isolates for growth temperature, pH profile and enterotoxin production. 91.8% of the strains were enterotoxigenic and 50% of the enterotoxigenic strains were capable of growing at 5°C. However, enterotoxigenic strains did not grow at pH 4.0, but 42.0% of the strains were able to grow at pH 4.5, after 7 days, at 37°C. This period is much longer than periods of sushi preparation and consumption in Southern Brazil and worldwide. Based on this

information, if sushi pieces present pH around 4.0 – 4.5 it is possible to conclude that most food pathogens will not growth. Further, we contaminated whole hossomaki pieces including those that had raw fish, and pathogens did not growth as well, suggesting that the pH also prevent microbial growth on fish. In order to verify this result, raw fish inside hossomakis were took off and pH was measured, demonstrating values of 4.0 – 4.2. The pH barrier can also be important to control microbial multiplication in sushi that are exposed to consumption. Currently, the preconized temperature for refrigerated foods exposed to consumption in RS is $< 5.0^{\circ}\text{C}$ (RIO GRANDE DO SUL, 2009). This temperature is not always easy to be reached in sushi pieces because transference of temperature is difficult in this kind of food and equipment is not always as good as those able to decrease the temperature. Our results demonstrated that microorganisms did not growth on hossomaki pieces, presenting pH 4.2, at 7°C , and this result suggests that even higher temperatures than $< 5.0^{\circ}\text{C}$ could be used at exposure of sushi if pH is controlled.

Based on the results, it is possible to conclude that several of the Japanese restaurants presented adequate general hygienic and sanitary conditions, concerning infrastructure, water supply and pest control. However, during the evaluation of flowchart processing, the majority of inadequacies were verified in process controls, as inadequate temperatures. Analyzing the characteristics of sushi, its probable microbial hazards (ex. *B. cereus*, *S. aureus*, *Diphyllobothrium* spp., etc.) and flowchart of preparation, we indicated the necessity of safety assurance from suppliers of raw fish and temperature control, during the entire process of raw fish. Further, it is also necessary the pH control of rice < 4.5 in order to prevent bacterial multiplication. These measures may contribute significantly to the safety of sushi.

Acknowledgements

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAUFRGS (Fundação de Apoio da Universidade do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Table 2 - Risk-based instrument and respective results after evaluation of hygienic and sanitary conditions of 29 sushi restaurants of Southern Brazil.

Item Evaluated	CONFORM	NOT CONFORM	NOT APPLICABLE
1. Water supply			
1.1 Exclusive use of drinking water for food handling (public water supply or alternative solution with semiannual tests confirming that the water is safe to drink according to laboratory reports).	26	3	0
1.2 Facilities with running water	29	0	0
1.3 Facilities have connections to the sewer system or septic tank.	29	0	0
1.4 Reservoir in proper hygienic condition.	22	7	0
1.5 Reservoir properly covered and maintained (absence of cracks, leakage, infiltrations and peeling, among other defects).	22	7	0
1.6 Water reservoir sanitized at intervals not exceeding six months, keeping records of the operation.	21	8	0
1.7 Material that internally coats the water reservoir does not compromise the water quality.	22	7	0
2. Structure			
2.1 Toilets have hand sinks and products for personal hygiene (toilet paper, odorless antiseptic liquid soap or odorless liquid soap and antiseptic, collectors with lids operated without manual contact and non-recycled	20	8	1

paper towels or other hygienic and safe system for drying the hands).			
2.2 Presence of physical separation or another effective means of separation of different activities to prevent cross-contamination.	18	11	0
3. Sanitization of the facilities, equipment, furniture and utensils			
3.1 Facilities, equipment, furniture and utensils kept in proper hygienic–sanitary condition.	13	16	0
3.2 Appropriate frequency of sanitization of equipment, furniture and utensils.	16	13	0
3.3 Utensils used for the sanitization of the facilities different from those used for the sanitization of the equipment and utensils in contact with food.	27	2	0
3.4 Dilution, contact time and method of use or application of sanitizing products follows the manufacturer's instructions.	22	7	0
3.5 Sanitizing products regularized by the Ministry of Health.	22	7	0
4. Integrated control of vectors and urban pests			
4.1 Control of vectors and urban pests performed by a specialized and properly legalized company.	24	5	0
4.2 Existence of a set of effective and continuous actions to prevent attraction, shelter, access and dissemination of vectors and urban pests	12	17	0
4.3 Constructions, facilities, equipment, furniture and utensils free from the presence of animals, including vectors and urban pests.	25	4	0

5. Food handlers			
5.1 Handlers removed from the food preparation when they have injuries or symptoms of diseases.	25	4	0
5.2 Employees wash hands thoroughly when arriving at work, before and after handling food, after any interruption of work, after touching contaminated materials, after using the toilet and whenever it is needed.	10	19	0
5.3 Food handlers do not smoke and speak when unnecessary and do not sing, whistle, sneeze, spit, cough, eat, handle money or engage in other activities that may contaminate food.	22	7	0
6. Raw materials, ingredients and packaging			
6.1 Subjected to inspection and approval at reception.	18	11	0
6.2 Raw materials, ingredients and packaging used for preparation are maintained under proper hygienic–sanitary conditions.	20	9	0
6.3 Intact primary packaging of raw materials and ingredients.	20	9	0
6.4 Use of raw materials and ingredients within the expiration date, taking into consideration the order of receipt.	16	13	0
6.5 Raw materials properly portioned, packaged and labeled with at least the following information: name of product, date of portioning and expiration date after opening or removal of the original packaging.	14	15	0

6.6 Temperature of raw material and ingredients verified at reception and storage.	19	10	0
6.7 Ice used in food made from drinking water and kept under hygienic–sanitary condition.	22	2	5
7. Food preparation			
7.1 Sinks in the food preparation area equipped with products for hand hygiene (odorless antiseptic liquid soap or odorless liquid soap and antiseptic product, non-recycled paper towels or other hygienic and safe system for drying the hands).	23	6	0
7.2 During the food preparation process, people that handle raw foods wash and disinfect their hands before handling prepared food.	19	7	3
7.3 Perishables products exposed to room temperature for only the minimum time required for food preparation.	15	14	0
7.4 Thawing performed as directed by the manufacturer and using one of the following techniques: refrigeration at a temperature below 5 °C or in microwave oven when the food is to be cooked immediately.	23	6	0
7.5 Foods subjected to thawing are kept under refrigeration if they are not immediately used and not refrozen.	25	4	0
7.6 Heating of foods to ensure that all parts of the food reach a temperature of at least 70 °C, or other combination of time and temperature that ensures the hygienic–sanitary quality of food.	14	12	3

7.7 The effectiveness of the heat treatment is evaluated.	7	13	9
7.8 Availability of a properly calibrated thermometer with which to measure the temperature of food.	17	12	0
7.9 After cooling, prepared food kept refrigerated at temperatures below 5 °C or frozen at temperature equal to or below -18 °C.	21	7	1
7.10 Food to be consumed raw, when applicable, subjected to a sanitization process with an appropriate certified product applied in such a way as to avoid residues.	22	6	1
7.11 Avoidance of direct or indirect contact between raw foods, semi-ready and ready-to eat food.	25	3	1
7.12 Temperature of the prepared food reduced from 60 °C to 10 °C within 2 hours during the cooling process.	14	8	7
8. Storage, transportation and display of the prepared food			
8.1 Prepared food stored under refrigeration or freezing is labeled with at least the following information: name, date of preparation and expiration date.	16	13	0
8.2 The maximum period for the consumption of prepared and refrigerated food is 5 days if the storage temperature is equal to or below 4 °C. When temperatures above 4 °C and below 5 °C are used, the maximum period for consumption is reduced.	18	10	1
8.3 During food display, handlers follow procedures that minimize the risk of	19	10	0

contamination of prepared food by hand antisepsis and by the use of utensils or disposable gloves, if applicable.			
8.4 Prepared food kept refrigerated at a temperature equal to or below 5 °C.	18	9	2
8.5 Prepared food kept at temperatures above 60 °C	12	6	11
8.6 Temperature of the display equipment regularly monitored.	21	8	0
8.7 Prepared foods maintained in the storage area or awaiting transportation are labeled (name of product, date of preparation and expiration date) and protected from contaminants.	13	5	11
8.8 Storage and transportation occur under time and temperature conditions that do not compromise the hygienic–sanitary quality of the prepared food.	3	2	24
8.9 Food preserved at hot temperatures maintained at temperatures above 60 °C; time from preparation to display of the food not to exceed 6 hours.	11	9	9
9. Responsibility, documentation and records			
9.1 Presence of a properly trained individual responsible for food handling activities (technical manager, owner or designated employee).	26	3	0
9.2 The company follows the Manual of Good Practices and the Standard Operating Procedures.	16	13	0

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O número de estabelecimentos que comercializam sushis está aumentando tanto no Brasil, como em nível mundial. A partir dessa frequência de consumo, diversos surtos vêm sendo notificados, sendo causados principalmente por falhas nas Boas Práticas ou contaminação da matéria-prima.

Este estudo avaliou as condições higiênico-sanitárias de 29 estabelecimentos produtores de sushi localizados na cidade de Porto Alegre, realizando inspeções nos locais e aplicando um *check-list*, com o intuito de identificar os principais motivos para as não-conformidades ocorrerem. Além disso, a multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foi avaliada, tanto em pH diferentes como nos sushis utilizados na pesquisa, nas temperaturas de 7°C e 25°C.

Com base nos resultados obtidos, medidas de controle para a prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no processamento de sushis foram estabelecidas. Essas medidas são: 1) a garantia dos fornecedores de peixes crus; 2) o controle de temperatura do peixe cru; 3) o controle de pH do arroz dos sushis.

A partir da realização desse estudo, encontros com a Vigilância Sanitária de Porto Alegre foram realizados em 2015, visando o desenvolvimento de uma nova legislação que possuísse exigências mínimas para produção, preparo e comercialização de sushis e sashimis na capital. Essa iniciativa foi inédita no Brasil, sendo Porto Alegre o primeiro município com esse tipo de legislação. No ano de 2016, a Portaria SMS Nº 1109 de 23/08/2016 foi publicada no Diário Oficial de Porto Alegre, atendendo as necessidades de controle sugeridas por essa pesquisa.

De acordo com a portaria, todos os estabelecimentos que produzam, manipulem e comercializem sushis e sashimis deverão, além de seguir todos os requisitos higiênico-sanitários já constantes na legislação vigente, seguir as determinações especificadas nela. Dentre essas determinações encontram-se a exigência de congelamento dos pescados capturados em alto mar em alguma das etapas de produção na indústria; comercialização de pescados resfriados caso oriundos de cativeiro; exigência de que o arroz temperado tenha pH menor ou igual a 4,5 e seja consumido até 24 horas após o preparo; e temperatura de manutenção dos produtos

(manipulados ou não), além de normas para a exposição dos alimentos prontos, sejam frios ou quentes.

As avaliações realizadas nesse estudo puderam auxiliar no desenvolvimento de uma nova legislação para o município de Porto Alegre, servindo como embasamento científico para estipular parâmetros de controle da segurança de alimentos na saúde pública. A união entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Vigilância Sanitária de Porto Alegre foi muito importante para que a pesquisa realizada dentro da academia refletisse diretamente em aplicações reais na sociedade, tendo um impacto direto no controle da saúde da população, no que diz respeito a segurança de alimentos.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERT, I; MAFART, P. A modified Weibull model for bacterial inactivation. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 100, n. 1-3, p.197-211, 15 abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.016>.
- BARANYI, József; ROBERTS, Terry A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 23, n. 3-4, p.277-294, nov. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0).
- BESTOR, Theodore C. **How sushi went global? Foreign Policy**. 2000. Disponível em: <https://scholar.harvard.edu/files/bestor/files/bestor_2000_-_how_sushi_went_global.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Brasília, DF, 15 set. 2004. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O-RDC%2BN%2B216%2BDE%2B>>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria nº 817, de 10 de maio de 2013**. Aprova as diretrizes nacionais para a elaboração e execução do projeto-piloto de categorização dos serviços de alimentação para a Copa do Mundo FIFA 2014. Brasília, DF, 10 maio 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt0817_10_05_2013.html>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2018.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. FAO. **Code of Practice for Fish and Fishery Products.**: CAC/RCP 52-2003. 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/input/download/standards/10273/CXP_052e.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- COTTER, P. D.; HILL, C.. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.429-453, 1 set. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.67.3.429-453.2003>.
- CUNHA, Diogo Thimoteo da et al. Food safety of food services within the destinations of the 2014 FIFA World Cup in Brazil: Development and reliability assessment of the official evaluation instrument. **Food Research International**, [s.l.], v. 57, p.95-103, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.021>.
- DECOL, Luana Tombini et al. Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 65, p.105-113, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.003>.

ELIAS, Susana de Oliveira. **Avaliação Quantitativa do Tisco de Salmonella spp. e de Escherichia coli O157:H7 em Alfaca no Rio Grande do Sul.** 2018. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Icta, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

ERCOLI, Laura et al. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). **Foodborne Pathogens And Disease**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.407-413, jul. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2016.2267>.

ESTADOS UNIDOS. NAPA COUNTY PUBLIC HEALTH DEPARTMENT (NCPHD); CALIFORNIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH (CDPH). **Salmonella outbreak associated with Napa County restaurants.** 2016. Disponível em: <<http://outbreakdatabase.com/details/2016-outbreak-of-salmonella-morimoto-napa/?outbreak=sushi>>. Acesso em: 04 nov. 2018.

FARROKH, Choreh et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 162, n. 2, p.190-212, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>.

FETSCH, A. et al. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 187, p.1-6, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.017>.

FOOD STANDARDS AGENCY (Grã-bretanha). **Freezing requirements for fishery products intended to be eaten raw or lightly cooked:** Guidance for businesses that produce or sell fishery products that are intended to be eaten raw or lightly cooked. 2012. Disponível em: <<https://www.food.gov.uk/business-guidance/freezing-fish-and-fishery-products>>. Acesso em: 04 nov. 2018.

FORSYTHE, S. J.. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 476 p.

GEERAERD, A.h.; HERREMANS, C.h.; VAN IMPE, J.f.. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 59, n. 3, p.185-209, set. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00362-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00362-7).

GEERAERD, A.h.; VALDRAMIDIS, V.p.; VAN IMPE, J.f.. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.95-105, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038>.

HARADA, Tetsuya et al. A Foodborne Outbreak of Gastrointestinal Illness Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Serotype O169: H41 in Osaka, Japan. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 66, n. 6, p.530-533, 2013. Editorial Committee of Japanese Journal of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Dis. <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.66.530>.

HOCKING, A. D. (Ed.). **Foodborne microorganisms of public health significance.** 6. ed. Waterloo, N.s.w: Australian Institute Of Food Science And Technology, (nsw Branch), 2003. 742 p.

ICMSF. **Microbiologia de alimentos 8:** Utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de Produto. São Paulo: Blucher, 2015. 522 p.

- JAIN, Seema et al. An Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Sushi Restaurants in Nevada, 2004. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.1-7, jul. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/588666>.
- JAY, James M.. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.
- JUNEJA, Vijay K. et al. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 290, p.49-58, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.023>.
- KADARIYA, Jhalka; SMITH, Tara C.; THAPALIYA, Dipendra. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-9, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/827965>.
- KUMARI, Sarita; SARKAR, Prabir K.. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, [s.l.], v. 69, p.20-29, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012>.
- LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M.. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.157-164, jan. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00646.x>.
- LENTZ, Silvia Adriana Mayer et al. *Bacillus cereus* as the main casual agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.1-9, 29 mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00057417>.
- LINDEN, Inge van Der et al. Long-term survival of *Escherichia coli* O157: H7 and Salmonella enterica on butterhead lettuce seeds, and their subsequent survival and growth on the seedlings. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.214-219, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.015>.
- LOIKO, Márcia R. et al. Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. **Meat Science**, [s.l.], v. 116, p.193-200, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.01.010>.
- MARTIN, Nicole H. et al. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.1-8, 30 set. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>.
- MEMBRÉ, Jeanne-marie; LAMBERT, Ronald J.w.. Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 128, n. 1, p.10-15, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.006>.
- MILLER, H. D.. **The Great Sushi Craze of 1905, Part 1: The Unexpected History of Japanese Food in America, From Edo Bay to the Bowery**. 2015. Disponível em: <<http://eccentricculinary.com/the-great-sushi-craze-of-1905-part-1/>>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- NSW FOOD AUTHORITY. **Food Safety Guidelines for the Preparation and Display of Sushi**. 2007. Disponível em: <http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/retail/sushi_preperation_display_guidelines.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2018.

ODAIR ZENEBON (Brasil). Instituto Adolfo Lutz (Ed.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Imesp, Ms, 2005. 1000 p.

OH, Su Kyung et al. Toxin Profile, Biofilm Formation, and Molecular Characterization of Emetic Toxin–Producing *Bacillus cereus* Group Isolates from Human Stools. **Foodborne Pathogens And Disease**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.914-920, nov. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2015.2004>.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, Fernando; VALERO, Antonio. Predictive Microbiology in Foods. **Predictive Microbiology In Foods**, [s.l.], p.1-10, 10 out. 2012. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5520-2_1.

PRADO, Bárbara Grassi et al. Pontos críticos de controle na qualidade higiênico-sanitária do preparo de sushis e sashimis no município de São Vicente, São Paulo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.359-372, 2 mar. 2015. Universidade Estadual de Campinas. <http://dx.doi.org/10.20396/san.v21i1.1661>.

PROENÇA, Rossana Pacheco da Costa. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 4, p.43-47, out. 2010.

RIO GRANDE DO SUL (Secretaria da Saúde). **Portaria nº 78, de 30 de janeiro de 2009**. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. Porto Alegre, RS: Diário Oficial, 20 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/cecane/downloads/download.php?id=19>>. Acesso em: 04 nov. 2018.

RODRIGUES, Rochele de Quadros et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, [s.l.], v. 42, p.152-164, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043>.

RUSUL, Gulam; YAACOB, Nur Hayati. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.131-139, abr. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00086-l](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)00086-l).

SANTOS, Renata França Castro et al. First Report of Human Gastroenteritis Caused by *Escherichia coli* O157: NM in Brazil. **Foodborne Pathogens And Disease**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.665-666, nov. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2017.2296>.

SÃO PAULO. Museu Histórico da Imigração Japonesa no Brasil. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo. **História da imigração japonesa no Brasil**. 2018. Disponível em: <<https://www.al.sp.gov.br/noticia/?id=288309>>. Acesso em: 04 nov. 2018.

SILVA, Devarahandhi de; YAMAO, Masahiro. A yen for sushi: an analysis of demographic and behavioural patterns of sushi consumption in Japan. **Journal Of Foodservice**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.63-76, abr. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4506.2006.00021.x>.

SINDICATO DE HOSPEDAGEM E ALIMENTAÇÃO DE PORTO ALEGRE E REGIÃO (Porto Alegre). **SINDHA**. Disponível em: <<http://www.sindha.org.br>>. Acesso em: 04 nov. 2018.

SOUSA, Cármen; FRANÇA, Angela; CERCA, Nuno. Assessing and reducing sources of gene expression variability in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Biotechniques**, [s.l.], v. 57, n. 6, p.295-301, 1 dez. 2014. Future Science, LTD. <http://dx.doi.org/10.2144/000114238>.

SOUSA, Mafalda; AMARAL, Rita; OLIVEIRA, Beatriz. Boas Práticas que Contribuem para a Qualidade do Sushi em Estabelecimentos de Restauração: Good Practices that Contribute to Sushi Quality in Restaurants. **Revista Nutrícias**, [n.i.], v. 15, n. 1, p.31-33, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.mec.pt/pdf/nut/n15/n15a08.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

TONDO, Eduardo César; BARTZ, Sabrina. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2017. 268 p.

UGGIONI, Paula Lazzarin; PROENÇA, Rossana Pacheco da Costa; ZENI, Lúcia Andréia Zanette Ramos. Assessment of gastronomic heritage quality in traditional restaurants. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.7-16, fev. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732010000100002>.

VAN BOEKEL, M. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 74, n. 1-2, p.139-159, 25 mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00742-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00742-5).

WEI, Clarissa. **An illustrated guide to the complete history of sushi**. 2015. Disponível em: <<https://www.businessinsider.com/the-complete-history-of-sushi-2015-2>>. Acesso em: 04 nov. 2018.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L.. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.175-177, 1993.

YIANNAS, Frank. **Food Safety Culture: Creating a Behavior-Based Food Safety Management System**. Bentonville, Ar: Springer, 2009. 97 p.