

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo,
resistência antimicrobiana e verificação da presença de gene de
enterotoxinas de isolados de *Staphylococcus* spp.**

Josi Guimarães César

Pelotas, 2015

JOSI GUIMARÃES CÉSAR

**Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo,
resistência antimicrobiana e verificação da presença de gene de
enterotoxinas de isolados de *Staphylococcus* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Nutrição e
Alimentos da Faculdade de Nutrição da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Ângela Nunes Moreira
Prof^a. Dr^a. Jozi Fagundes de Mello

Pelotas, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C421c César, Josi Guimarães

Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo, resistência antimicrobiana e verificação da presença de gene de enterotoxinas de isolados de *Staphylococcus* spp. / Josi Guimarães César; Kelly Lameiro Rodrigues, orientadora; Ângela Nunes Moreira e Jozi Fagundes de Mello, coorientadoras. - Pelotas, 2015.
98 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Micro-organismos indicadores. 2. Restaurantes. 3. Multirresistência. 4. Multiplex PCR. I. Rodrigues, Kelly Lameiro, orient. II. Moreira, Ângela Nunes, coorient. III. Mello, Jozi Fagundes de, coorient. IV. Título.

CDD: 641.1

Banca examinadora:

Prof. Dra. Kelly Lameiro Rodrigues
(Universidade Federal de Pelotas - UFPel)
(Presidente)

Prof. Dra. Ângela Nunes Moreira
(Universidade Federal de Pelotas - UFPel)
(Titular)

Prof. Dra. Jozi Fagundes de Mello
(Universidade Federal de Pelotas - UFPel)
(Titular)

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra
(Universidade Federal de Pelotas - UFPel)
(Titular)

Prof. Dra. Helenice Gonzalez de Lima
(Universidade Federal de Pelotas - UFPel)
(Titular)

Prof. Dra. Márcia Rúbia Duarte Buchweitz
(Universidade Federal de Pelotas - UFPel)
(Suplente)

Dedico este trabalho aos meus pais, meus avós, meus padrinhos e tios, minha irmã, à Ni e ao meu namorado.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradecer especialmente e eternamente aos meus pais, Denise e Paulo, que são os responsáveis por tudo que sou, pelo apoio incondicional na realização dos meus sonhos e pela confiança, dedicação, paciência, mas principalmente pelo amor, carinho e amizade. Aos meus avós Thereza, João, Teresa e Luzardo pelo amor, pela confiança, pelo patrocínio e pelo apoio aos meus estudos, mesmo o vô Luzardo não estando mais presente fisicamente tenho certeza de que acompanhou meu caminho até aqui.

À minha irmã Paula por estar sempre presente, pela amizade, pela parceria e por me aturar diariamente. À minha filhota de quatro patas Ni por estar ali pra eu abraçar, beijar e apertar quando precisasse, pela tranquilidade transmitida por sua presença e por uma boa lambida, é claro. Às gatinhas da minha vida, Baby e Floco e ao chato do Billy por fazerem parte da família e tornarem meus dias mais felizes.

Aos meus padrinhos Dóris e Luzardo e aos tios Tânia e Laerte que de alguma forma me apoiaram, confiaram no meu trabalho e estavam torcendo por mim. Especialmente, a minha dinda que não mede esforços para realizar os meus sonhos.

Ao Jusoan, meu amor, meu melhor amigo, meu companheiro, muito obrigada, por seres quem és na minha vida, pelos momentos de alegria, pelo apoio incondicional, pela força, paz, tranquilidade e segurança nas horas em que mais precisei, mas principalmente pelo colo, abraço, carinho que sempre estavam disponíveis e pela compreensão das privações que muitas vezes tivemos que passar para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha orientadora Kelly, por toda paciência e dedicação que teve comigo durante todo o tempo, mas principalmente pelos ensinamentos que recebi e as minhas co-orientadoras Jozi e Ângela que contribuíram muito para realização deste trabalho.

À Carla Pastore pela ajuda e incentivo no início desta jornada. À professora Ivana que me apoio dès de o início e continuou me incentivando como aluna durante estes dois anos.

Agradecer as graduandas em Nutrição Andriele e Carol pela ajuda, dedicação e apoio na realização deste trabalho, aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos pela competência e seriedade em seus trabalhos e agradecer a CAPES pela bolsa de estudos.

Muito Obrigado a todos.

Resumo Geral

CÉSAR, Josi Guimarães. **Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo, resistência antimicrobiana e verificação da presença de gene de enterotoxinas de isolados de *Staphylococcus* spp.** 2015. 98f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

Estabelecimentos que comercializam alimentos prontos para o consumo devem atender às normas de segurança em relação às condições higienicossanitárias, a fim de evitar doenças transmitidas por alimentos. *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* são os principais agentes causadores de surtos no Brasil, e os restaurantes comerciais estão entre os estabelecimentos frequentemente envolvidos nesses casos. O objetivo deste estudo foi avaliar as condições higienicossanitárias de preparações a base de carne bovina, salada de alface e sobremesas de restaurantes comerciais, por meio da quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. e da pesquisa de *Salmonella* spp. Além disso, verificar a presença de genes de enterotoxinas clássicas e testar a resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* spp. O estudo foi realizado em nove restaurantes tipo *buffet* da cidade de Pelotas – RS, e as análises microbiológicas foram realizadas seguindo a metodologia do *Bacteriological Analytical Manual*. Os isolados de *Staphylococcus* spp., foram submetidas ao teste de resistência antimicrobiana pelo método de disco-difusão conforme o Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* e submetidos a análise molecular pela técnica de multiplex PCR. A qualidade microbiológica das saladas de alface mostrou-se inadequada, pois apesar da ausência de *Salmonella* spp., mais da metade das amostras apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação, com presença dos micro-organismos *E. coli* e *Staphylococcus* spp., o qual apresentou elevado percentual de resistência antimicrobiana e sensibilidade aos antimicrobianos gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim e cloranfenicol. Em relação às amostras de preparações à base de carne bovina e sobremesas as condições higienicossanitárias mostraram-se adequadas para maioria. Os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência antimicrobiana aos antibióticos β -lactâmicos e apresentaram confirmação para genes de EE.

Palavras Chave: Micro-organismos indicadores, Restaurantes, Multirresistência, Multiplex PCR.

Abstract

CÉSAR, Josi Guimarães. **Sanitary hygienic conditions of food ready-to-eat, antimicrobial resistance and verifying the presence of enterotoxin gene of *Staphylococcus* spp. isolated.** 2015. 98f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

Business establishments which commercialize food ready for consumption should be aware of safety regulations in relation to hygienic and sanitary conditions, in order to avoid diseases transmitted by food. *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* are the most important agents which cause outbreaks in Brazil, and restaurants are among the most frequently involved establishments in these cases. This study aimed at evaluating hygienic and sanitary conditions in the preparation of food made out of beef, lettuce salad and desserts of commercial restaurants, through thermotolerant coliforms counting, *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. and the *Salmonella* spp. research. Besides that, it also aims at verifying the presence of genes of classical enterotoxins and testing the antimicrobial resistance of isolated of *Staphylococcus* spp. This study was carried out in nine buffet restaurants in the city of Pelotas –RS, and the microbiological analyses were conducted following the methodology of *Bacteriological Analytical Manual*. The isolated of *Staphylococcus* spp. were submitted to the antimicrobial resistance test through disc-diffusion method according to *Clinical and Laboratory Standards Institute* manual and submitted molecular analyses through multiplex PCR technique. The microbiologic quality of lettuce salad has shown to be inadequate, because, besides the absence of *Salmonella* spp., more than half of the samples have presented contamination by thermotolerant coliforms above the permitted by legislation, with the presence of pathogens *E. coli* and *Staphylococcus* spp., which have presented elevated percentage of antimicrobial resistance and antimicrobial susceptibility for gentamicin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazol and chloramphenicol. In relation to samples of preparation made out of beef and desserts the hygienic and sanitary conditions have shown to be adequate for most. The isolated of *Staphylococcus* spp. presented antimicrobial resistance to antibiotics β -lactams and have presented confirmation for genes of SE.

Keywords: Microorganisms indicators, Restaurants, Multidrug resistance, multiplex PCR.

Lista de Tabelas

Artigo 1.....

Tabela 1. Quantificação de coliformes termotolerantes em amostras de salada de alface. Pelotas, 2015. (n=36) **52**

Tabela 2. Quantificação de *Staphylococcus* spp. em amostras de salada de alface. Pelotas, 2015. (n=36). **54**

Tabela 3. Teste de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de salada de alface. Pelotas, 2015. (n=30). **56**

Artigo 2.....

Tabela 1. *Primers* utilizados na detecção de gene de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp.. **73**

Tabela 2. Quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., em preparações à base de carne bovina e sobremesas. Pelotas, 2015. **75**

Tabela 3. Teste de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de preparações à base de carne bovina e sobremesas. Pelotas, 2015. (n=38) **78**

Lista de Abreviaturas e Siglas

Aa - Atividade de água

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - Caldo de Infusão Cérebro e Coração

BP - Ágar Baird Parker

CE- Ceará

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderida

DNA - Ácido desoxirribunucleídeo

dNTP - Desorribonucleotídeo trifosfatado

DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

DTA - Doença transmitida por alimento

E. coli – *Escherichia coli*

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EC - *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EE – Enterotoxina estafilocócica

EEs – Enterotoxinas estafilocócica

EHEC - *Escherichia coli* enterro-hemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica clássica

Est. - Estimado

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigenica

FDA: Food and Drug Administration

g: Gramas

HE- Ágar Hektoen

IFN- γ - Interferon- γ

IL-2 - Interleucina-2

L-BEM - Ágar Levine Eosina Azul de Metileno

LST - Lauril Sulfato de Sódio

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MH - Ágar Muller-Hinton

mL: Mililitro (s)

mPCR - multiplex PCR

n - Número

NaCl - Cloreto de sódio

NMP/g - Número Mais Provável por grama de alimento

pb - Pares de base

PCA - Ágar Padrão para contagem

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PI – Piauí

PLP - Proteínas de ligação à penicilina

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RJ - Rio de Janeiro

RS - Rio Grande do Sul

RV - Rappaport-Vassiliadis

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SE - staphylococcal enterotoxin

SP - São Paulo

SPC – *Staphylococcus* coagulase negativa

SPN – *Staphylococcus* coagulase positiva

TBE: Tampão Tris Borato Ácido Etilenodiamino Treta-Acético

TNase - Termonuclease

TO – Tocantins

TT - Tetrionato

UFC/g - Unidades Formadoras de Colônia por grama

UFPEL - Universidade Federal de Pelotas

UPR - Unidades Produtoras de Refeições

XLD - Ágar Xilose-lisina-desoxicolato

Lista de Símbolos

%: Porcentagem

® - Marca comercial

μL: Microlitro

Da - Dalton

°C - Grau Celsius

β – Beta

γ – Gama

Sumário

1 Introdução Geral.....	15
1.1 Justificativa.....	17
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo geral.....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
1.3 Hipóteses	18
2 Revisão bibliográfica	19
2.1 Restaurantes comerciais e a segurança dos alimentos	19
2.2 Micro-organismos relacionados a surtos de DTA	21
2.2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
2.2.3 Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.4 <i>Salmonella</i> spp.	28
Projeto de Pesquisa	
3 Relatório de Campo	43
4 Artigo 1.....	45
5 Artigo 2.....	66
6 Considerações finais	85
7 Referências Gerais.....	86

1 Introdução Geral

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) vêm aumentando significativamente em todo o mundo, existem alguns fatores determinantes para que esse aumento venha ocorrendo, dos quais, destacam-se o crescimento populacional, os grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, a crescente necessidade de produção de alimentos em grande escala, a qualidade dos alimentos ofertados às populações e a deficiente fiscalização dos órgãos públicos na produção de alimentos (BRASIL, 2011; WELKER et al., 2010).

Nos últimos anos também houve um grande aumento no número de estabelecimentos comerciais destinados à produção e à comercialização de alimentos, incluindo os restaurantes comerciais com sistema de distribuição do tipo *buffet*. Este processo de expansão nem sempre acompanha a qualidade das refeições produzidas, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de DTA. E os fatores causadores relacionam-se diretamente com o processo produtivo e com os manipuladores de alimentos (CAVALLI & SALAY, 2004; BRASIL, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2014, ocorreram 9.719 surtos de DTA no Brasil, 192.803 pessoas ficaram doentes e ocorreram mais de 112 óbitos, entretanto, mais da metade (5.703) dos surtos foram ignorados, inconclusivos ou inconsistentes (BRASIL, 2011; BRASIL 2014). Os patógenos mais frequentemente identificados em surtos foram *Salmonella* spp., com 1564 notificações, seguido de *Staphylococcus aureus*, com quase 800 notificações, e *Escherichia coli*, com 547 notificações. Dentre os estabelecimentos envolvidos em surtos as residências estão em primeiro lugar com 39,1% (n=3773) e os restaurantes e padarias em segundo lugar com 15,4% (n= 1492) das notificações. Além disso, os alimentos com maiores notificações de surtos foram os alimentos mistos e as preparações à base de ovos e a região Sul do Brasil apresentou maior notificação de surtos, seguida pela região Centro-Oeste (BRASIL, 2014).

Coliformes termotolerantes são indicadores das condições higienicossanitárias e *Escherichia coli* é o micro-organismo mais importante

deste grupo, por ser indicador de contaminação fecal. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar glicose com produção de gás e ácido a 45°C, e seu hábitat natural é a microbiota intestinal de animais de sangue quente (HOLT et al., 1994). Estes micro-organismos apresenta outra característica importante: quando detectado em um alimento, pode indicar uma possível ocorrência de outros micro-organismos patogênicos para os homens e os animais. Além disso, *E. coli* têm sido geralmente associada a doenças diarreicas, mas pode causar também colite hemorrágica, e portanto, é um problema de saúde pública mundial, com mais de dois milhões de mortes por ano (FRANCO & LANDGRAF, 2008; SOUSA, 2008).

Salmonella spp. tem como principal reservatório o trato gastrointestinal de homens é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, e a maioria das espécies são móveis, com temperatura de multiplicação ideal de 35-37°C. Esta bactéria causa três tipos de doenças febre tifoide, febre entérica e enterocolites (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O gênero *Staphylococcus* spp. apresenta forma de cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e algumas espécies podem produzir catalase e coagulase. Este gênero está amplamente distribuído pelo ambiente e também é encontrado no trato respiratório superior, especialmente na narina anterior, bem como na superfície da pele de humanos. *Staphylococcus aureus* é um importante agente patogênico capaz de causar uma ampla gama de infecções, e ainda é responsável por surtos de intoxicação alimentar (SILVA et al., 2010; FRANCO & LANDGRAF, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda somente a análise de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, e possivelmente, por isso, são as espécies mais estudadas, entretanto, espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa têm sido envolvidas em uma variedade de infecções humanas e animais (BRASIL, 2001; CUNHA et al., 2006; JUNQUEIRA et al., 2009).

Staphylococcus spp. pode adquirir resistência aos antimicrobianos, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, pode desenvolver resistência a meticilina e a outros antimicrobianos, e pode levar o indivíduo a um quadro de infecção grave com dificuldade de tratamento (JUNQUEIRA et al., 2009, PEREIRA et al.,

2009). Além disso, algumas cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva podem causar intoxicação alimentar pela produção de enterotoxinas estafilocócicas (EEs), que ocorrem em 95% dos surtos, e não são inativadas pelo calor. Também são divididas em diferentes tipos sorológicos, sendo as EEs clássicas (A, B, C, D e E) as mais estudadas e as técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e multiplex PCR (mPCR), têm sido uma importante ferramenta na detecção destes diferentes genes de EEs (CUNHA et al., 2006; STAMFORD et al., 2006; Germini et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2011).

1.1 Justificativa

Como a procura por alimentos servidos em restaurantes vem aumentando na última década, pretende-se avaliar os micro-organismos que são frequentemente associadas a surtos de DTA. Por meio de três diferentes tipos de pratos prontos para consumo disponibilizados aos consumidores serão quantificados coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e verificada a presença de *Salmonella* spp. Para os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa pretende-se avaliar a resistência antimicrobiana e o genótipo de genes produtores de EEs. DTA é um potencial problema de saúde pública em muitos países, por isso, torna-se importante que as informações obtidas neste estudo possam ser utilizadas por órgãos de Vigilância Sanitária, para a elaboração de políticas públicas que busquem a preservação da saúde dos consumidores. Este estudo pretende contribuir para a avaliação higienicossanitária de refeições servidas em restaurantes comerciais, tipo *buffet*, da cidade de Pelotas, além de suprir a falta de informações para o município.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

- Quantificar a presença de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. e verificar a presença de *Salmonella* spp. em pratos prontos para o consumo de restaurantes comerciais do município de Pelotas – RS, e caracterizar os isolados de *Staphylococcus* spp. quanto a presença de genes de enterotoxinas e resistência a antimicrobianos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a presença de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. em preparações à base de carne bovina, saladas cruas e sobremesas, prontos para o consumo.
- Verificar a presença de *Salmonella* spp. em saladas cruas prontas para o consumo.
- Avaliar a resistência antimicrobiana nos isolados de *Staphylococcus* spp. de preparações à base de carne bovina, saladas cruas e sobremesas.
- Verificar a presença dos genes das EEs A, B, C, D, E nos isolados de *Staphylococcus* spp. de preparações à base de carne bovina e sobremesas.

1.3 Hipóteses

- Há isolados de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. em preparações à base de carne, saladas cruas e sobremesas, servidas em restaurantes do tipo *buffet* do município de Pelotas.
- Há presença de *Salmonella* spp. em saladas cruas, servidas em restaurantes tipo *buffet* do município de Pelotas.
- Há isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência a antimicrobianos a antimicrobianos.
- Há presença de gene de EEs clássica (A, B, C, D, E) nos isolados de *Staphylococcus* spp., provenientes de amostras de preparações à base de carne bovina e sobremesas.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Restaurantes comerciais e a segurança dos alimentos

A maior participação da mulher no mercado de trabalho e a alta concentração populacional nos grandes centros geraram um aumento significativo no número de estabelecimentos de produção e comercialização de alimentos (OLIVEIRA et al., 2005). O mercado de alimentação fora do lar, que envolve padarias, restaurantes, bares, empresas de refeições coletivas ou qualquer estabelecimento que elabore alimentos prontos para o consumo, movimentou aproximadamente R\$ 100 bilhões no Brasil e anualmente cresce em média 15% ao ano desde 2004 (ABRASEL, 2010).

Entre os estabelecimentos voltados para a alimentação fora do lar destaca-se o segmento de Unidades Produtoras de Refeições (UPR) comerciais ou restaurantes comerciais, que incluem os restaurantes do tipo *buffet*, *self-service*, *fast-foods*, pratos prontos para o consumo, restaurantes à *la carte*, bares e lanchonetes (SANTOS et al., 2011). Independentemente do tipo de segmento, todos os estabelecimentos que produzem e comercializam alimentos prontos para o consumo devem atender às normas de segurança em relação às condições higienicossanitárias, seguindo o conceito de segurança dos alimentos (POPOLIM, 2007).

O conceito de alimento seguro é aquele que não causa dano à saúde do consumidor sendo importante não somente para a saúde pública, mas também pelo seu papel no comércio (BARENDZ, 1998). A garantia da inocuidade dos alimentos é hoje uma vantagem competitiva entre as empresas, pois o consumidor está cada vez mais exigente em relação à sua expectativa no momento de adquirir determinado produto. A identificação de um alimento de qualidade duvidosa e que possa comprometer a saúde do consumidor, pode ter grande repercussão negativa para a imagem da empresa produtora. Além disso, o impacto econômico negativo causado por alimentos contaminados alcança níveis cada vez mais preocupantes, acarretando grandes perdas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000).

O processo de expansão dos restaurantes comerciais se acelera a cada ano, porém nem sempre este crescimento é acompanhado de cuidados higiênicos com a qualidade das refeições produzidas, o que aumenta a

probabilidade de ocorrência de DTA. As DTA são originadas pela ingestão de água e/ou de alimentos contaminados por micro-organismos, toxinas e/ou outros agentes químicos ou físicos. A qualidade higienicossanitária como fator de segurança dos alimentos tem sido amplamente estudada e discutida, uma vez que as DTA podem ter várias causas. Estudos mostram que a maioria dos surtos apresenta relação direta com processos inadequados e/ou manipulação imprópria, maus hábitos de higiene, além da ausência de um controle rigoroso no processamento, armazenamento e distribuição dos alimentos (WEINGOLD et al., 1994; MARTINÉZ-TOMÉ et al., 2000; CAVALLI & SALAY, 2004; CAVALLI & SALAY, 2007; ROSA et al., 2008; PHILLIP & ANITA, 2010).

Os micro-organismos são os principais agentes etiológicos de infecções e intoxicações alimentares, e no Brasil, dados epidemiológicos mostram que *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *E. coli* destacam-se por serem os principais agentes causadores de surtos de DTA (BRASIL, 2014). Especificamente no estado do Rio Grande do Sul, RS, os principais micro-organismos identificados em amostras de alimentos provenientes de surtos de DTA são *E. coli* (41% das contaminações), *Salmonella* spp. (25%) e *Staphylococcus* coagulase positiva (21%). Considerando apenas as amostras com contaminações maiores que $1,0 \times 10^3$ Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g) ou Número Mais Provável por grama de alimento (NMP/g) ou presença/25g, no caso de *Salmonella* spp., os principais micro-organismos identificados são *Salmonella* spp. (37%), *Staphylococcus* coagulase positiva (28%), e *E. coli* (22%) (BRASIL, 2011). Além disso, os alimentos que estavam envolvidos em surtos de DTA entre os anos de 2006 e 2014 foram alimentos mistos, produtos à base de carne, pratos prontos para o consumo, saladas, doces e sobremesas e produtos lácteos, com os estabelecimentos comerciais em segundo lugar (18%) no *ranking* de locais de ocorrência dos surtos (WELKER et al., 2010; BRASIL, 2014).

A legislação brasileira estabelece limites específicos para os diferentes tipos de alimentos. Para saladas cruas são exigidas análises dos micro-organismos coliformes termotolerantes, com limite de até 10^2 NMP/g de alimento e *Salmonella* spp. que apresenta como padrão ausência em 25 gramas de alimento. Para preparações à base de carne são exigidos os micro-

organismos coliformes termotolerantes com limites de 2×10 NMP/g de alimento e *Staphylococcus* coagulase positiva com limites de até 10^3 UFC/g de alimentos. E para sobremesas são exigidos os micro-organismos coliformes termotolerantes com limites de 10^2 NMP/g de alimento e *Staphylococcus* coagulase positiva com limites de até 10^3 UFC/g de alimentos (BRASIL, 2001).

2.2 Micro-organismos relacionados a surtos de DTA

2.2.1 *Staphylococcus* spp.

Este gênero pertencente à família *Micrococcaceae* com células esféricas de 0,5 a 1,5 μ m de diâmetro, são cocos Gram-positivos (isolados, aos pares ou aglomerados) e ao microscópio, apresentam formato de cacho de uva, são anaeróbios facultativos e crescem a uma temperatura de 7 a 47,8°C, tendo sua temperatura ótima entre 30 a 37°C, e ao produzir catalase apresentam melhor crescimento sob condições aeróbias. Além disso, toleram concentrações de 7,5 a 15% de cloreto de sódio (NaCl), e são os únicos capazes de crescer em atividade de água (Aa) de 0,86, que é considerado um valor mínimo para bactérias não halofílicas. Também podem produzir toxinas, são imóveis, não formadoras de endósporo e quimiorganotróficos, ou seja, utilizam substratos de matéria orgânica como fonte de energia para o metabolismo fermentativo e respiratório, atuando sobre carboidratos, com produção de ácido. As espécies de *Staphylococcus* podem ser catalase positiva, coagulase positiva, oxidase negativa e termonuclease (TNase) positiva. Atualmente, existem 49 espécies de *Staphylococcus*, sendo *S. aureus* a mais importante em alimentos (DSMZ, 2013). Entretanto, existem outras espécies que possuem um potencial interesse em alimentos: *S. hyicus*, *S. chromogens*, *S. intermedius* (FRANCO & LANDGRAF, 2008; HOLT et al., 1994).

Staphylococcus spp. é associado à manipulação de alimentos, pois é facilmente encontrado na cavidade nasal, pele, mãos e feridas infectadas de manipuladores de alimentos. A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pelo micro-organismo durante sua multiplicação no alimento (KÉROUANTON, 2007). As espécies de *Staphylococcus* spp. podem causar intoxicação alimentar, mas, atualmente, as

espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva estão envolvidas em um maior número de surtos alimentares, comparadas com as espécies coagulase negativa. *Staphylococcus epidermidis* é um exemplo de *Staphylococcus* coagulase negativa que foi envolvido em um surto alimentar (DOYLE, 1989). Os alimentos comumente envolvidos em surtos por *S. aureus* são carnes e produtos cárneos (presunto), produtos lácteos e derivados (queijos), aves, ovos, saladas mistas com vários ingredientes (ovo, atum, batata, frango), macarrão, patês, molhos, tortas de cremes, bombas de chocolates e sanduíches com recheios (SILVA et al., 2010).

Superantígenos são moléculas que têm a capacidade de estimular as células-T (BHUNIA, 2008). As EEs pertencem à família de superantígenos que foram originalmente identificados em *S. aureus* e durante muito tempo foram considerados os únicos capazes de produzir EEs (LINA et al., 2004; PODKOWIK et al., 2013). Os superantígenos produzidos por EE se diferenciam das toxinas produzidas por outros micro-organismos, porque não estimulam indiscriminadamente as células T, ligando-se apenas em receptor específico. As EEs entram na circulação sanguínea e são apresentadas as células T que se proliferam e produzem grandes quantidades de interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), provocando danos nas células epiteliais do intestino e destruindo as vilosidades intestinais (BHUNIA, 2008).

As EEs produzidas pelos *Staphylococcus* spp. são proteínas de baixo peso molecular (26.000 a 34.000 Da) e até o momento são conhecidas 21 espécies de toxinas (SEIG-SEIQ, SER-SET, SEIU-SEIV), além das EEs clássicas (A, B, C, D e E) (SCHELIN et al., 2011; PODKOWIK, et al., 2013). As EEs são altamente termoestáveis e resistentes à cocção ou a ação de enzimas proteolíticas (BALABAN & RASOOLY, 2000), e são produzidas entre 10 e 46°C, com temperatura ótima de 40 a 45°C (HOLT et al., 1994). A produção de toxinas é expressa diferencialmente e dependem da fase de crescimento dos micro-organismos, da densidade bacteriana, do pH e dos níveis de CO₂ do meio. As EEA e EEE são sintetizadas principalmente durante a fase exponencial, enquanto a EEB, EEC, e EED são produzidas durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária de crescimento (BHUNIA, 2008).

A EEA é o sorotipo mais comum e sua produção não é regulada por gene acessório regulador; a EEB é a toxina mais resistente ao calor (estável a 60°C por 16h) e a ação de enzimas proteolíticas gastrointestinais, tais como a quimotripsina e tripsina; a EEC é uma proteína altamente conservada, seus antígenos são divididos em três subtipos: EEC1, EEC2 e EEC3; a EED é o segundo sorotipo mais comum nas intoxicações alimentares; enquanto que a EEE é raramente relatada em alimentos e em animais envolvidos na produção de alimentos, e seu envolvimento em surtos também é pouco frequente (BHUNIA, 2008; ARGUDÍN, MENDOZA & RODICIO, 2010).

Os sintomas da intoxicação dependem de alguns fatores como o grau de suscetibilidade da pessoa, da concentração da EE no alimento e da quantidade de alimento consumido. Náuseas, vômitos, câibras abdominais, diarreia e sudorese são os principais sintomas da intoxicação. Dores de cabeça, calafrios, cólicas, prostração, queda de pressão arterial, queda de temperatura e febre, também podem ocorrer quando a toxina é ingerida em grande quantidade (HOLT et al., 1994; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O desenvolvimento de técnicas moleculares tornou-se uma ferramenta importante para a detecção e identificação de micro-organismos patógenos em diversos alimentos. Por PCR é possível verificar se o isolado possui os genes que codificam as toxinas, pois é uma técnica molecular que tem por objetivo amplificar segmentos de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra e é simples, rápida, sensível e com alta especificidade para detecção de micro-organismos patógenos (ZAHA et al., 2012; RALL et al., 2010; NORMANNO et al., 2007). Mas, a mPCR, que é uma derivação da PCR, apresenta vantagens como melhor sensibilidade, especificidade e velocidade de detecção de organismos patogênicos, sendo capaz de amplificar simultaneamente vários genes alvos (Park et al., 2007; Germini et al., 2009; Xu et al., 2012).

O estudo de Normanno et al. (2007) avaliou produtos lácteos e carnes comercializados na Itália, e foi encontrando 10% (n=100) dos produtos cárneos e 17% (n=109) dos produtos lácteos contaminados com *S. aureus*, e a EE prevalente foi a EED (33,6%), seguida pelas EEA (18,4%), EEC (15,2%) e EEB (6,4%). Cunha Neto, Silva & Stamford (2002), analisaram diferentes produtos à base de carne de supermercados e restaurantes comerciais, no estado de

Pernambuco, Brasil, e todas as amostras estavam acima do padrão microbiológico estabelecido pela legislação sanitária brasileira, (RDC nº 12/ 2001) para *Staphylococcus* coagulase positiva, mas nenhum isolado produziu EE. Em outro estudo que avaliou morcela vendida no Sul do Brasil, foram encontradas 48,8% (n=40) de EEs produzidas por *Staphylococcus* spp., sendo 32,9% (n=27) de *Staphylococcus* coagulase negativa e 15,9% (n=13) de *Staphylococcus* coagulase positiva, e o gene mais frequente foi o EEA (28,6%), seguido do EEB (27,5%), EEC (20%), EEE (17,5%) e EED (5%) (MOURA et al., 2012).

A resistência a antimicrobianos é um dos maiores problemas de saúde pública relacionada à presença de micro-organismos em muitos países. O uso indiscriminado de antimicrobianos por produtores, para crescimento e tratamentos de animais com fins alimentícios, pode ser um dos fatores para a resistência antimicrobiana. Outro fator que interfere na resistência antimicrobiana é a contaminação de alimentos e da água, provavelmente pela grande quantidade de micro-organismos que vivem no ambiente. *S. aureus* pode desenvolver resistência a vários antimicrobianos, como por exemplo, a meticilina, o que torna seu combate difícil (PEREIRA et al., 2009; NORMANNO et al., 2007; BARBER, MILLER e MCNAMARA, 2003; ENRIGHT, 2003).

Os antimicrobianos são divididos em várias classes que estão descritas a seguir juntamente com o seu mecanismo de ação e de resistência. A classe dos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, monobactams) inibem a síntese do peptidoglicano e são resistentes pela produção de β -lactamases, pelas modificações estruturais das proteínas ligadoras de penicilina (PLP) e pela diminuição da permeabilidade bacteriana. As quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina) inibem a atividade da enzima DNA girase ou topoisomerase II e são resistentes devido a alteração nessa enzima, por alteração da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana ou por bomba de efluxo. Os glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina) inibem a síntese do peptidoglicano, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferem na síntese de RNA citoplasmático, por anos não houve descrição de resistência para este antimicrobiano. As oxazolidinonas (linezolida) inibem a síntese proteica e são

resistentes devido a mutação no gene 23SrRNA. Os aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina) inibem a síntese de proteína na fração 30S ou produzem proteínas defeituosas e são resistentes por alteração dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade e modificação enzimática da droga. Os macrolídeos (azitromicina, claritromicina, eritromicina) inibem a síntese proteica dependente de RNA e sua resistência pode surgir por diminuição da permeabilidade da célula ao antimicrobiano, alteração no sítio receptor da porção 50S do ribossoma e inativação enzimática. As lincosaminas inibem a síntese proteica nos ribossomos e sua resistência está associada às alterações no sítio receptor do ribossoma e por mudanças mediadas por plasmídeos. As estreptograminas (quinopristina e dalfonopristina) são da mesma família dos macrolídeos e lincosaminas, inibem a síntese proteica bacteriana e sua resistência é mediada por plasmídios ou por mecanismo enzimático relacionado à bomba de efluxo. Os nitroimidazólicos (metronidazol) inativam e impedem a síntese enzimática dos micro-organismos. O cloranfenicol inibe a síntese proteica da bactéria e sua resistência pode ser adquirida por plasmídeos ou por alterações de permeabilidade à droga. As sulfonamidas (sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol) inibem o metabolismo do ácido fólico e os mecanismos de resistência são diferentes para cada antimicrobiano do grupo. As tetraciclinas impedem a síntese proteica e sua resistência ocorre por diminuição da acumulação da droga no interior da célula ou é mediada por plasmídeos ou transposons (BRASIL, 2007).

Para *Staphylococcus* a resistência a antimicrobianos normalmente ocorre por mutações de seus genes, que causam alterações no sítio de ação do antimicrobiano ou por adquirir genes de resistência da mesma espécie ou de outras, que envolve a inativação ou destruição da droga, e é transmitida por plasmídeos e transposons (SANTOS, 2007).

O estudo de Pereira et al. (2009) realizado em Portugal, com diversos tipos de amostras alimentícias, mostrou que 15% (n=22) dos isolados de *S. aureus* eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 51% (n=75) mostraram-se intermediários e/ou resistentes no mínimo a três antibióticos.

Resch, Nagela & Hertelb (2008), na Europa, testaram a resistência antimicrobiana em 330 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa em diversos alimentos, e encontraram que os alimentos com mais de 80% de resistência antimicrobiana foram queijos duro e mole, salsicha e carnes fermentadas e que cinco das seis espécies estudadas eram resistentes a pelo menos dois antibióticos. No estudo de Junqueira et al. (2009), realizado na cidade do Rio de Janeiro, RJ, das 31 amostras de saladas analisadas, 32,2% (n=10) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superiores às permitidas pela legislação vigente. Três cepas foram identificadas como *S. aureus*, isoladas de diferentes amostras de saladas, e foram analisadas quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, e todas foram resistentes à penicilina, ampicilina e canamicina.

2.2.3 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

O grupo dos coliformes termotolerantes pertence à família *Enterobacteriace*, caracterizados como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de endósporo e são capazes de fermentar lactose com produção de gás a temperatura de 44 a 45,5°C. O grupo de *Escherichia*, pertence ao grupo de coliformes termotolerantes, e é representado por 90% de *E. coli*, considerando que as outras espécies presentes no grupo, *Enterobacter* e *Klesbsiella*, são menos representativas (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Escherichia possui 1,1 a 1,5µm por 2,6µm de tamanho, podendo ocorrer em pares ou isoladamente, várias cepas possuem cápsulas ou microcápsulas, são móveis pela presença de flagelos peritricos, anaeróbias facultativas com temperatura ótima de crescimento a 37°C e quimiorganotróficas, ou seja, capazes de realizar um metabolismo fermentativo e respiratório, catabolizando glicose e outros hidratos de carbono formando ácido e gás. Apresentam como características bioquímicas oxidase negativa, catalase positiva, vermelho de metila positiva, urease negativa e, normalmente citrato negativo. Todas as espécies fermentam L-arabinose, maltose, D-manitol, D-manose, L-ramnose,

trealose e D-xilose. Atualmente são conhecidas sete espécies de *Escherichia* (HOLT et al., 1994; FRANCO & LANDGRAF, 2008; DSMZ, 2013).

O grau de patogenicidade (virulência) é a capacidade que um micro-organismo possui de causar doença, isso depende de cada micro-organismo, dose infectante, produção de toxinas e susceptibilidade do indivíduo. Os mecanismos utilizados pelos micro-organismos para causar virulência são agressividade, toxicidade e hipersensibilidade, as DTA são causadas, principalmente, pelos dois primeiros tipos (SILVA-JÚNIOR, 2012; FRANCO & LANDGRAF, 2008; HOLT et al., 1994). *E. coli* apresenta antígenos somáticos O associados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas dos flagelos e antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares, sendo descritos 173 antígenos O, 56 H e 100 K. As linhagens de *E. coli* patogênicas são: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderida (DAEC), a diferenciação das linhagens estão nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicos.

EPEC causa gastroenterite em crianças, recém-nascidos e lactantes jovens que são mais susceptíveis a infecção, provoca diarreia com dores abdominais, vômitos e febre e tem duração de até 24 horas. EIEC causa manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*: a incapacidade de descarboxilar lisina, não fermentar ou fermentar tardiamente lactose e ausência de flagelos, normalmente, causa disenteria, cólicas abdominais, febre e mal-estar geral, com eliminação de sangue e muco nas fezes, e tem duração de sete a 12 dias. ETEC, também conhecida como diarreia do viajante, possui cepas capazes de produzir EE, e podem causar diarreia aquosa, acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas. Se for a forma mais leve da doença é autoeliminada, mas se apresentar a doença na forma mais grave, semelhante à cólera, pode durar várias semanas. EHEC apresenta algumas características diferenciais: não é capaz de utilizar o sorbitol, é β -glucuronidase negativas e tem dificuldades ou não se multiplicam em temperaturas de 44-45,4°C. O sorotipo mais conhecido é O157:H7 e causa colite hemorrágica (dores abdominais severas, diarreia aguda, seguida de

diarreia sanguinolenta - a diarreia ocorre em grandes volumes de sangue e há ausência de febre), e dura em média quatro dias. EAEC causa diarreia persistente em adultos e crianças, é semelhante à ETEC e a lesão que causa na mucosa é mais significativa, a diarreia dura mais de 14 dias. Além disso, possui ilhas de patogenicidade que carregam os genes para EE e atividade mucinase. DAEC provoca diarreia infantil, sem sangue ou leucócitos nas fezes e produz uma aderência difusa nas células, a diarreia está relacionada à idade da criança e quanto mais velha maior o volume (BHUNIA, 2008; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

E. coli indica a contaminação microbiana de origem fecal, quando detectada nos alimentos, os quais são insatisfatórios para o consumo. Além disso, tem como habitat primário o trato gastrointestinal de humanos e animais, podendo ser patogênica e por isso em alimentos como vegetais frescos é a única, dentre as *Escherchia*, indicadora de contaminação fecal, uma vez que os outros indicadores são encontrados naturalmente nestes alimentos. A importância de se pesquisar o grupo de coliformes termotolerantes e *E. coli* está diretamente relacionada às condições higienicossanitárias dos alimentos, além de indicar uma possível presença de outros enteropatógenos importantes em alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2008; HOLT et al., 1994).

Alves e Ueno (2010), na cidade de Taubaté, SP, Brasil, avaliaram a qualidade sanitária de alimentos em restaurantes *self-service*, encontraram *E. coli* em 70,4% (n=19) dos alimentos frios e 29,6% (n=8) dos alimentos quentes pesquisados. Outro estudo que analisou micro-organismos envolvidos em surtos de DTA no Rio Grande do Sul encontrou *E. coli* em 41% (n=52) dos alimentos analisados (WELKER et al., 2010).

2.2.4 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, e é caracterizado como bacilo Gram-negativo, não produtor de esporos, anaeróbio facultativo, capaz de produzir gás a partir da glicose, com exceção de *S. Typhi*, capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, e a maioria das espécies são móveis por possuírem flagelos peritríquios, com exceção de *S.*

Pullorum e *S. Gallinarum*. Além disso, sua temperatura de multiplicação varia de 5°C a 47°C, mas a temperatura ideal é de 35-37°C, enquanto que o pH ótimo de multiplicação é próximo a sete (7) e pode tolerar concentrações de sal de até 9% (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O principal reservatório de *Salmonella* é no trato gastrointestinal de homens e animais e pode causar doenças como febre tifoide (*S. Typhi*), febre entérica (*S. Paratyphi*) e enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais espécies de *Salmonella*. A febre tifoide é a forma mais invasiva da doença, só acomete a espécie humana, e apresenta sintomas graves (septicemia, febre alta, diarreia e vômitos), enquanto que a febre entérica apresenta sintomas semelhantes a febre tifoide, mas mais brandos. Já as enterocolites apresentam sintomas de diarreia, febre, dores abdominais e vômitos, duram de um a quatro dias, e normalmente, não precisam de tratamento com antimicrobiano (BHUNIA, 2008; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

No Brasil, *Salmonella* é o micro-organismo mais envolvido em surtos alimentares e *S. Typhimurium* é o sorotipo mais frequente encontrado em alimentos. Diversos alimentos estão envolvidos em surtos alimentares como à base de carnes, queijo, laticínios, ovos, saladas à base de ovos, sorvetes e outras sobremesas caseiras. No entanto, alimentos como frutas e legumes, alface, tomate, coentro, alface-brotos e amêndoas também foram implicados em surtos recentes (BRASIL, 2001; BHUNIA, 2008; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Um estudo que avaliou 126 hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Fortaleza, CE, encontrou 12,7% (n=16) de contaminação por *Salmonella*, sendo uma amostra (0,8%) de alface (TRESSELER et al., 2009). E outro estudo que avaliou nove saladas cruas em restaurante tipo *self-service* em Teresina, PI, e encontrou 11,1% (n=1) de contaminação por *Salmonella* (ROCHA, SOARES E BESERRA, 2014).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Projeto de Pesquisa

**Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. em alimentos
prontos para o consumo e verificação da presença de toxinas
estafilocócicas**

Josi Guimarães César

Pelotas, 2014

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues – UFPel (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Jozi Fagundes de Mello - UFPel (Co-orientador)

Prof^a. Dr^a. Ângela Nunes Moreira – UFPel (Co-orientador)

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra – UFPel (Titular)

Prof^a Dr^a Márcia Rúbia Duarte Buchweitz - UFPel (Suplente)

Sumário

RESUMO.....	33
1 Materiais e Métodos	34
1.1 Delineamento experimental e amostragem.....	34
1.1.1 Coleta das amostras.....	35
1.2 Análises microbiológicas	35
1.3 Verificação da presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas	38
1.4 Verificação da resistência antimicrobiana	38
1.5 Aspectos éticos	39
1.6 Análise estatística	39
2 Cronograma	40
3 Orçamento	41
4 Produção esperada	42

RESUMO

Estabelecimentos que produzem e comercializam alimentos prontos para o consumo devem atender às normas de segurança em relação às condições higienicossanitárias, a fim de evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos. Dados epidemiológicos mostram que *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli* destacam-se por serem os principais agentes causadores de surtos no Brasil, e os restaurantes figuram entre os estabelecimentos frequentemente envolvidos nestes surtos. O objetivo deste estudo é verificar e quantificar a presença de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e isolar *Staphylococcus* spp. em pratos prontos para o consumo à base de carne, saladas cruas e sobremesas de restaurantes comerciais. Além disso, verificar a presença dos genes das enterotoxinas A, B, C, D e E e a resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* spp. O estudo será realizado em nove restaurantes tipo *buffet* da cidade de Pelotas – RS, onde será realizada a coleta de uma amostra de cada tipo de prato (à base de carne, salada crua e sobremesa), uma vez por semana, em um período de quatro semanas, totalizando 12 amostras de alimentos por restaurante, e ao final do estudo 108 amostras de alimentos.

Palavras chave: unidades produtoras de refeições, qualidade higienicossanitária, caracterização molecular, resistência antimicrobiana.

1 Materiais e Métodos

1.1 Delineamento experimental e amostragem

Este será um estudo transversal a ser realizado em restaurantes do tipo *buffet*, da cidade de Pelotas/RS.

Para realizar o delineamento experimental, as informações sobre o número e a localização dos estabelecimentos foram coletadas na Secretaria Municipal de Saúde do município de Pelotas – Gerência de Vigilância Sanitária, Setor de Alimentos. A população amostral foi estabelecida a partir de uma probabilidade de confiança de 95%, sendo seu cálculo realizado a partir do número total de restaurantes que possuem sistema de distribuição do tipo *buffet*, existentes no município (95), e utilizou-se dados de prevalência de contaminação de pratos prontos para o consumo por *Staphylococcus* spp., que foi de 30%, utilizando-se como referência alguns estudos semelhantes (SORIANO et al., 2002, JUNQUEIRA et al, 2009, BRICIO, LEITE & VIANA, 2005). Com base no cálculo realizado no programa EpiInfo 6.0, a representatividade numérica indicou o número de nove restaurantes como amostra, a escolha dos restaurantes participantes será feita através de sorteio aleatório. Após o sorteio e a definição dos restaurantes, será realizada uma visita aos mesmos, para conhecer os tipos de pratos que são ofertados. Posteriormente, será definido um padrão para os três tipos de pratos (carne, saladas e sobremesas) que serão coletados. As coletas serão realizadas em um terço do tempo total do término da distribuição, variando de acordo com o horário de funcionamento de cada restaurante.

1.1.1 Coleta das amostras

Em cada restaurante será coletada uma amostra de cada tipo de prato (a base de carne, salada crua e sobremesa), uma vez por semana, em um período de quatro semanas, totalizando 12 amostras de alimentos por restaurante. Ao final do estudo serão nove restaurantes com 108 amostras dos três tipos de pratos. As amostras serão adquiridas simulando uma situação real de compra, onde os pesquisadores farão a coleta no balcão de distribuição em embalagens descartáveis disponibilizadas pelos próprios estabelecimentos, identificando-se o tipo de preparação, a hora de coleta e a data. Cada embalagem será devidamente fechada, identificada, transportada e armazenada de forma asséptica até o momento das análises. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e o início das análises não ultrapassará duas horas.

1.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas e a verificação de resistência antimicrobiana serão realizadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. A metodologia utilizada para as análises microbiológicas será a recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 2001).

Para a contagem de coliformes termotolerantes será pesada 25g da amostra e adicionada a 225mL de água peptonada 0,85% (Merck®). A partir desta diluição inicial, outras diluições decimais serão preparadas para a contagem de coliformes pelo método do Número Mais Provável (NMP - 3 tubos). Um mililitro de cada diluição será transferido para tubos contendo 10mL

de caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST, Merck®) com tubos de Durham invertidos, sendo incubados a 35°C por 48h. Uma alçada de material de cada tubo positivo (turvação e formação de gás) será transferida para tubos contendo 10mL de caldo *Escherichia coli* (EC, Merck®) e tubos de Durham invertidos, incubados a 45°C por 48h. Os resultados de tubos positivos do caldo EC serão utilizados para estimar as contagens de coliformes termotolerantes com o auxílio da tabela do NMP.

Para análise de *E. coli*, de cada tubo positivo do caldo EC será transferida uma alçada da cultura estriada por esgotamento em placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB, Merck®), incubadas a 36°C por 24h. Serão consideradas colônias típicas as nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico. Serão transferidas duas colônias típicas para placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA, Merck®) e incubadas a 36°C por 24h. As colônias serão submetidas à coloração de Gram e culturas puras serão submetidas às provas bioquímicas: teste de citrato, teste de indol, teste de Voges-Proskauer e vermelho de metila.

Para análise de *Salmonella* spp., inicialmente será realizado um pré-enriquecimento, adicionando-se 225mL de caldo Lactosado (Merck®) à 25g amostra, incubando-se a 37°C por 24h. Após a incubação, será transferido 1mL para o caldo Tetracionato (TT, Merck®), adicionado de 0,1mL de verde brilhante e 0,2mL de iodo, e 0,1mL para o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Merck®), seguido de incubação a 42°C por 24h. A partir desses meios de enriquecimento seletivo, será semeado em ágar Hektoen (HE, Merck®) e ágar Xilose-lisina-

desoxicolato (XLD, Merck®), seguido de incubação a 37°C por 24h. Colônias consideradas características, pretas, serão submetidas a testes bioquímicos.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp. será utilizada a metodologia de *Staphylococcus* coagulase positiva. Será pesado 25g da amostra e adicionada a 225mL de água peptonada 0,85% (Merck®), preparando-se, a partir desta diluição inicial, outras diluições decimais. Será inoculado 1mL de cada diluição, dividido em três placas de Agar Baird Parker (BP, Merck®) enriquecido com emulsão gema de ovo e telurito de potássio, pela técnica do espalhamento em superfície. As placas serão incubadas a 37°C por 48h e, após esse período, as colônias presuntivas típicas e atípicas serão contadas e expressas em Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g). Serão consideradas colônias típicas aquelas circulares, lisas, convexas, de 2-3mm de diâmetro, negras com textura úmida, bordas esbranquiçadas e rodeadas por uma zona opaca e frequentemente com um halo transparente. Para as colônias atípicas, serão consideradas, aquelas negras ou acinzentadas com um ou dois halos e também aquelas sem halos. As colônias isoladas serão submetidas à coloração de Gram e serão selecionadas aquelas puras e características. Em seguida, será inoculada uma alçada de cada colônia selecionada em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Merck®) que serão incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, será realizado o teste da coagulase, onde será transferido 0,2mL do cultivo em BHI para um tubo contendo Coagulase Plasma EDTA 0,5mL, e incubado a 37°C por 6h. Aqueles que formaram coágulo serão considerados positivos, os demais negativos.

1.3 Verificação da presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

As análises moleculares serão realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. A partir dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, será extraído o DNA cromossomal utilizando um kit comercial (PureLink Genomic DNA – K1820-01, Invitrogen®). Posteriormente, os DNAs serão submetidas à técnica de mPCR a fim de verificar a presença dos genes das EEs A, B, C, D e E (EEA, EEB, EEC, EED e EEE). Os *primers* para identificação dos genes das EEs foram os definidos por Mehrotra, Wang, Johnson (2000).

Os produtos da PCR serão visualizados em eletroforese com gel de agarose 1,5% (Invitrogen) corado com brometo de etídeo (Promega), em tampão TBE 0,5X, sob luz ultravioleta, e fotografados (Kodak Digital Science™ DC120). O Tampão de corrida utilizado foi 6x DNA Loading (Ludwig Biotec®) e o marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Ludwig Biotec®). O controle negativo das reações consistirá da mesma composição da reação de PCR, porém com água Milli-Q estéril substituindo o DNA. Serão utilizados DNAs de *S.aureus* ATCCs 13565 (EEA), 14458 (EEB), 19095 (EEC), 23235 (EED) e 21664 (EEE) como controles positivos.

1.4 Verificação da resistência antimicrobiana

A partir dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa serão realizada a verificação da resistência antimicrobiana por meio da técnica de difusão em disco, seguindo as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Primeiramente, os isolados serão cultivadas em caldo BHI (Merck®) a 36°C, e posteriormente inoculadas em solução salina

0,85% (Merck®) até obter a escala 0,5 de Mac Farland. Com um suabe úmido na solução salina será feito o espalhamento na placa com Agar Muller Hinton (MH, Merck®). Uma pinça estéril e seca será utilizada para pegar e dispor os discos de antibióticos (Invitrogen®) na placa que será incubada a 37°C por 24h. A leitura será realizada com auxílio de uma régua, medindo os centímetros do halo de uma extremidade à outra e comparando o resultado com a tabela de padrão de resistência CLSI. Os 12 antimicrobianos testados serão: ampicilina (10µg), penicilina (10 unidades), oxacilina (1µg), clindamicina (2µg), sulfametoxazol e trimetoprim (23,75/1,25µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg), ciprofloxacina (5µg), cefepima (30µg), rifampicina (5µg) (CLSI, 2007).

1.5 Aspectos éticos

Em relação aos aspectos éticos é compromisso dos pesquisadores envolvidos a total preservação da identificação dos locais de coleta das amostras. O projeto não envolve experimentação em animais ou em humanos, e, além disso, não será realizada aplicação de questionários e/ou entrevistas nos estabelecimentos.

1.6 Análise estatística

As análises estatísticas descritivas serão realizadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS® (Chicago, version 17.0, 2008).

2 Cronograma

Etapas	2013					2014												2015				
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai
Revisão Bibliográfica																						
Elaboração do Projeto																						
Qualificação																						
Coleta e análises microbiológicas das amostras																						
Análise Molecular																						
Resistência Antimicrobiana																						
Digitação dos dados																						
Redação da dissertação																						
Defesa da dissertação																						

Meses/Ano

3 Orçamento

Materiais	Valor total (R\$)
Meios de cultura para isolamento das bactérias	1.850,00
Plásticos (eppendorfs, ponteiras, placas de Petri)	990,00
Material para PCR e eletroforese	1.000,00
Alimentos prontos para o consumo	540,00
Total	4.380,00

4 Produção esperada

- Dois artigos científicos, no mínimo, publicados ou aceitos para publicação em periódicos de impacto técnico científico.
- Apresentação de quatro trabalhos, no mínimo, em congressos da área.

3 Relatório de Campo

As análises ocorreram conforme o planejado, totalizando a coleta de 108 amostras (saladas de alface, preparações à base de carne bovina e sobremesas), realizadas nos restaurantes selecionados, nos meses de fevereiro a maio de 2013. As amostras coletadas foram levadas diretamente ao laboratório para realização das análises microbiológicas de *Staphylococcus* spp., coliformes fecais, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Posteriormente, os isolados de *Staphylococcus* spp. foram testadas para resistência a antimicrobianos, e foram testadas quanto a presença de gene de EE clássicas (A, B, C, D, e E).

Optou-se pela mudança na metodologia de escolha dos restaurantes porque houve a análise de outras bactérias indicadoras da qualidade higienicossanitária em alimentos, além de *Staphylococcus* spp. De todos os restaurantes (n= 95) tipo *buffet* do município, quatro foram excluídos por não conseguir sua localização, de acordo com os dados fornecidos, então considerou-se que fecharam ou mudaram de endereço, ficando o número final de 91 restaurantes, e escolheu-se 10% (n=9) para serem analisados. Contudo a mudança na metodologia manteve o número de restaurantes (n=9) selecionados no início do estudo.

A análise de *Salmonella* spp. não estava prevista no projeto de pesquisa, mas devido às condições financeiras favoráveis conseguiu-se realiza-la. Entretanto, o orçamento permitiu realizar esta análise em 36 amostras e optou-se pela análise de preparações à base de verduras e legumes crus (salada de alface), por ser uma exigência da legislação brasileira (RDC-12) e com isso contemplar todas as análises microbiológicas previstas para estes alimentos. Outra divergência do projeto foi a realização da técnica de multiplex PCR em todas as amostras, que substituiu a técnica de uniplex PCR por apresentar melhor sensibilidade, eficiência, especificidade e velocidade de detecção de micro-organismos patogênicos, amplificando simultaneamente vários genes alvos.

Após a aprovação da dissertação pela banca examinadora, os dados obtidos serão enviados para Vigilância Sanitária, Setor de Alimentos a fim de contribuir para a fiscalização do município.

ARTIGO 1

Título: Avaliação microbiológica de saladas de alface e perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp.

Revista: Ciência & Saúde Coletiva

Qualis em Nutrição: B2

Qualis em Ciência dos Alimentos: B5

ARTIGO 2

Título: Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo, resistência antimicrobiana e verificação da presença de gene de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp.

Revista: Food Control

Qualis em Nutrição: A2

Qualis em Ciência dos Alimentos: A2

4 Artigo 1

Avaliação microbiológica de saladas de alface e perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp.

Microbiological evaluation of lettuce salad and profile of antimicrobial of *Staphylococcus* spp.

JOSI GUIMARÃES CÉSAR¹; ANDRIELE MADRUGA PERES²; CAROLINE PEREIRA DAS NEVES²; ÉRICA TUPINQUIM FREITAS DE ABREU²; JOZI FAGUNDES DE MELLO³; ÂNGELA NUNES MOREIRA³; KELLY LAMEIRO RODRIGUES³

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, – josigcesar@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição, Curso de Nutrição – neves_caroline@ymail.com; andriiiele@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição, Departamento de Nutrição – jozimello@gmail.com; angelamoreira@yahoo.com; lameiro_78@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de saladas de alface e verificar a resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* spp. Foram coletadas 36 amostras de saladas de alface em nove restaurantes e realizada a quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. e pesquisa de *Salmonella* spp., seguindo a metodologia do *Bacteriological Analytical Manual*. Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de resistência antimicrobianos pelo método de disco-difusão. Das 36 amostras de salada de alface, 61,1% apresentaram quantificação de coliformes termotolerantes acima do permitido

pela legislação brasileira, e houve confirmação de *E. coli* em 5,6% das amostras. A quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva representou 5,6% dos isolados e *Staphylococcus* coagulase negativa representou 77,8%. Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* spp. Dos 30 isolados de *Staphylococcus* spp. testados, 56,7% foram resistentes a penicilina, 46,7% a oxacilina, 26,7% a eritromicina e 23,3% foram multirresistentes. A qualidade microbiológica das saladas de alface mostrou-se inadequada, devido a presença de micro-organismos patogênicos, além disso, os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram elevado percentual de resistência antimicrobiana.

Palavras Chave: Micro-organismos indicadores, Restaurantes, Antibióticos.

Abstract

It aimed at evaluating the microbiological quality of lettuce salads and verifying the antimicrobial resistance of isolated of *Staphylococcus* spp. 36 samples of lettuce salad were collected in nine restaurants and carried out countings of thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. and *Salmonella* spp. research, following the *Bacteriological Analytical Manual* methodology. Isolated of *Staphylococcus* spp. were submitted to antimicrobial resistance test through disc-diffusion. From the 36 samples of lettuce salad, 61,1% have presented counting of thermotolerant coliforms above the permitted by legislation, and confirmation of *E. coli* at 5,6% of samples. The counting of positive coagulase *Staphylococcus* has represented 5,6% and the negative coagulase *Staphylococcus*, 77,8% of samples. All samples have represented absence of *Salmonella* spp. From isolated 30 of *Staphylococcus* spp. tested, 56,7% were resistant to penicillin, 46,7% to oxacillin, 26,7% to erythromycin and 23,3% were multiresistant. The

microbiological quality of lettuce salad has shown to be inadequate and the isolated of *Staphylococcus* spp. have shown elevated percentage of antimicrobial resistance.

Keywords: Microorganisms Indicators, Restaurants, Antibiotics.

Introdução

A procura por estabelecimentos que oferecem alimentos prontos para o consumo aumentou, contudo, os alimentos disponibilizados nestes locais podem estar contaminados com micro-organismos patogênicos podendo causar doenças transmitidas por alimentos (DTA)¹⁻³. Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* são micro-organismos indicadores de contaminação fecal, *Staphylococcus* spp. é indicador das condições sanitárias inadequadas durante o processamento dos alimentos e *Salmonella* spp. é um micro-organismo importante por ter potencial para causar infecção alimentar⁴. No Brasil, dados epidemiológicos mostram que *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Escherichia coli* são os principais agentes causadores de surtos de DTA⁵.

O consumo de hortaliças aumentou nos últimos anos, por proporcionar benefícios à saúde, facilidades no preparo e economia de tempo^{6,7}. Entretanto, as hortaliças se deterioram com facilidade e o risco de contaminação aumenta quando fragmentadas, pela exposição do interior da célula vegetal, facilitando o acesso dos micro-organismos aos nutrientes e propiciando sua reprodução, o que leva a uma crescente preocupação com a qualidade microbiológica destes alimentos⁶⁻⁸. Além disso, o risco de consumir alimentos crus está relacionado ao fato de não passarem por tratamento térmico, que elimina os micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus* spp., aumentando o risco de contaminação dos mesmos, caso não sejam higienizados adequadamente^{9,10}.

A alface (*Lactuca sativa*) é consumida em todo o mundo e é muito importante no mercado brasileiro^{2,6,11}. Dentre os vegetais folhosos é a mais consumida, e possui propriedades benéficas para a saúde, como o alto teor de fibras e propriedades antioxidantes^{2,8}. Entretanto, a alface tem sido associada à contaminação por alguns micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*^{12,13}.

Staphylococcus spp. pode estar envolvido em surtos de intoxicação alimentar, mas SCP é mais frequente^{5,9,10}. *S. aureus* é a principal causa de infecções sistêmicas bacterianas em diversos países e sua origem não é alimentar. Além disso, tem a capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos, sendo esse o principal problema no tratamento das infecções, estando ainda associado à multirresistência bacteriana¹⁴.

A resistência a antimicrobianos é um problema crescente, devido ao uso inadequado de antimicrobiano na criação de animais e na saúde pública. Diversas bactérias circulantes no ambiente são resistentes e podem contaminar água e alimentos causando doenças^{15,16}. Devido a sua capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos, o número de infecções estafilocócicas aumentou, tendo como consequência um número maior de cepas multirresistentes, dificultando e prolongando o tratamento de infecções¹⁷⁻²⁰.

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica pela quantificação de coliformes termotolerantes, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e pela pesquisa de *Salmonella* spp. de saladas de alface comercializadas em restaurantes de Pelotas, e também objetivou-se verificar a resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Métodos

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

Foi realizado um estudo transversal em restaurantes do tipo *buffet*, da cidade de Pelotas/RS. Para o delineamento experimental foram utilizadas as informações sobre o número e a localização dos estabelecimentos disponíveis na Secretaria Municipal de Saúde do município de Pelotas – Gerência de Vigilância Sanitária, Setor de Alimentos. A população amostral foi estabelecida a partir do número total de restaurantes que possuem sistema de distribuição do tipo *buffet*, existentes no município (91), e foram escolhidos, por sorteio aleatório, nove restaurantes, representando 10% do total.

COLETA DAS AMOSTRAS

Em cada restaurante (n=9) foi coletada uma amostra de salada de alface, uma vez por semana, em um período de quatro semanas, totalizando 36 amostras. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra, com a coleta realizada no balcão de distribuição, em embalagens térmicas descartáveis disponibilizadas pelos próprios estabelecimentos. Cada embalagem foi devidamente fechada, identificada e transportada imediatamente ao laboratório para a realização das análises.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas quantificações de coliformes termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* spp. de acordo com a exigência da legislação brasileira²¹. Além disso, foram realizadas quantificações de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. que não são exigidos pela legislação.

A metodologia utilizada para as análises microbiológicas foi a recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual*²². A quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada pelo método do Número Mais Provável (NMP), onde foi realizado um teste presuntivo em caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST, Merck®) e um teste confirmativo em caldo *Escherichia coli* (EC, Merck®). Após a quantificação de coliformes termotolerantes, a análise continuou para confirmação de *E. coli*, onde a cultura confirmada foi estriada por esgotamento em placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-BEM, Merck®), incubadas a 36°C por 24h. E aquelas consideradas colônias típicas foram transferidas para placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA, Merck®) e incubadas a 36°C por 24h. As colônias foram submetidas à coloração de Gram e as culturas puras foram submetidas às provas bioquímicas.

Para análise de *Samonella* spp., inicialmente foi realizado um pré-enriquecimento em Água Peptonada Tamponada (Merck®), incubando-se a 37°C por 24h. Após a incubação, transferiu-se 1mL para o caldo Tetrionato (Merck®), adicionado de 0,1mL de verde brilhante e 0,2mL de iodo, e 0,1mL para o caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®), seguido de incubação a 42°C por 24h. A partir desses meios de enriquecimento seletivo, semeou-se em ágar Hektoen (HE, Merck®) e ágar Xilose-lisina-desoxicolato (XLD, Merck®), seguido de incubação a 37°C por 24h. Colônias consideradas características foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp. foram realizadas três diluições decimais e 1mL de cada diluição foi dividido em três placas de Agar Baird Parker (BP, Merck®) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio 1%, pela técnica do espalhamento em superfície, incubadas por 37°C por 48h. Após esse período,

as colônias presuntivas típicas e atípicas foram contadas e expressas em Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g). As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e então selecionadas aquelas puras e características. Em seguida, foi inoculada uma alçada de cada colônia selecionada em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Merck®) que foram incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, foi realizado o teste da coagulase, aqueles que formaram coágulo foram considerados positivos, os demais negativos.

VERIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A partir dos isolados de SCP e *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) foi realizada a verificação da resistência a antimicrobianos por meio da técnica de difusão em disco, seguindo as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)²³. Primeiramente, os isolados foram cultivados em caldo BHI (Merck®) a 36°C, e inoculados em solução salina 0,85% (Merck®) até a obtenção da escala 0,5 de Mac Farland. Após foi realizado o espalhamento do cultivo na placa com Agar Muller Hinton (MH, Merck®) e os discos de antimicrobianos (Invitrogen®), para bactérias Gram positivo, foram dispostos na mesma, que foi incubada a 37°C por 24h. A leitura foi realizada medindo os centímetros do halo de uma extremidade à outra e o resultado foi obtido por comparação com a tabela de padrão de resistência da CLSI²³. Os 12 antimicrobianos testados compunham o disco de antimicrobianos: ampicilina (10µg), penicilina (10 unidades), oxacilina (1µg), clindamicina (2µg), sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg), ciprofloxacina (5µg), cefepima (30µg), rifampicina (5µg)²³.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas descritivas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® (Chicago, version 17.0, 2008), para o teste de resistência a antimicrobianos.

Resultados e Discussão

Das 36 amostras de salada de alface analisadas, 61,1% (n=22) apresentaram quantificação de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira, que estabelece contagens de até 10^2 NMP/g²¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de coliformes termotolerantes em amostras de salada de alface. Pelotas, 2015. (n=36)

	Amostras	
	n (%)	Contagens (NMP/g)
Coliformes termotolerantes	15 (41,7)	$1,1 \times 10^3$ a $> 1,1 \times 10^3$
	7 (19,4)	$1,6 \times 10^2$ a $4,6 \times 10^2$
	10 (27,8)	3,6 a 93
	4 (11,1)	< 3

NMP/g – Número Mais Provável por grama de alimento.

Um estudo realizado no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, avaliou 30 amostras de saladas de alface em restaurantes *self-service* e encontrou 73,3% (n=22) de contaminação por coliformes termotolerantes e 19,9% (n=6) estavam acima do permitido pela legislação²⁴. Outro estudo realizado em Gurupi, TO, Brasil, também avaliou a qualidade microbiológica de saladas de alface, em 10 restaurantes *self-service* e encontrou 60% (n=12) de contaminação por coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação²⁵.

Das 36 amostras de salada de alface analisadas, 5,6% (n=2) tiveram confirmação para *E. coli*, com contagens de 3,6 NMP/g em cada amostra. Outros estudos confirmaram a presença de *E. coli* em alfaces prontas para o consumo com percentuais variando entre 3,5 a 30% de contaminação^{24,26-28}.

Quando há uma alta quantificação de coliformes termotolerantes em alimentos prontos para o consumo, indica uma inadequação em relação a qualidade da matéria-prima ou com as condições de processamento do alimento e indica que pode existir a presença de outros enteropatógenos importantes em alimentos. A contaminação por coliformes termotolerantes pode ocorrer pelo meio ambiente ou pelas fezes de homens e animais e *E. coli* é um importante coliforme termotolerante por ser o único com hábitat em animais de sangue quente e humanos e ser indicador de contaminação fecal em produtos frescos, embora a legislação brasileira não determine padrão deste micro-organismo para saladas cruas^{21,24,29-31}. Com isso, considera-se que os alimentos prontos contaminados por coliformes termotolerantes e com confirmação de *E. coli* refletem condições higienicossanitárias insatisfatórias, devido a isso, atribui-se que a contaminação das saladas de alface esta relacionada ao fato de serem servidas cruas e que possivelmente houve uma inadequação nos procedimentos de higienização e

sanitização durante a manipulação destes alimentos ou houve contaminação no pós-processamento^{4,24,27,28}.

Todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de alimento, estando de acordo com a legislação nacional²¹. Estes resultados foram semelhantes a outros estudos que avaliaram *Salmonella* spp. em salada de alface^{24,26-28,32}.

Das 36 amostras analisadas de salada de alface, 5,6% (n=2) foram quantificadas para SCP, enquanto, 77,8% (n=28) foram quantificadas para SCN (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação de *Staphylococcus* spp. em amostras de salada de alface. Pelotas, 2015. (n=36).

	Amostras	
	n (%)	Contagens (UFC/g)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1 (2,8)	2×10^5
	1 (2,8)	2×10^3 (est.)
	34 (94,4)	< 10
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	13 (36,1)	1×10^5 a 5×10^5
	9 (25,0)	1×10^4 a $7,0 \times 10^4$
	5 (13,9)	3×10^3 a 9×10^3
	1 (2,8)	9×10^2
	8 (22,2)	< 10

UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por grama de alimento.

Contagem estimada – (est.).

Um estudo realizado em São Bernardo do Campo, SP, Brasil, avaliou 30 amostras de saladas verdes cruas, em restaurantes do tipo *self-service* e encontrou 3,3% (n=1) das amostras com quantificação para SCP³³. Outro estudo realizado em Porto Alegre, RS, Brasil, avaliou 26 amostras de vários alimentos, incluindo saladas cruas e saladas processadas ou cozidas, e encontrou 57,7% (n=15) de contaminação por SCN.

Este mesmo estudo também avaliou as mãos de 21 manipuladores de alimentos e encontrou nove portadores de *Staphylococcus* spp.³⁴.

Staphylococcus spp. pode ser responsável por intoxicação alimentar e infecções. A contaminação dos alimentos, normalmente ocorre pela inadequada higienização das mãos dos manipuladores, portanto uma manipulação inapropriada dos alimentos permite a multiplicação deste micro-organismo, que acima de 10^5 UFC/g pode produzir 1ng/g de toxinas nos alimentos e causar surtos alimentares^{5,18,30,31,35,36,37}. Além disso, *Staphylococcus* spp. também é capaz de adquirir resistência a várias classes de antimicrobianos, e pode causar morbidade e mortalidade por infecções³⁸⁻⁴¹.

A partir dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizado o teste de resistência antimicrobiana (n=30). Os isolados analisados apresentaram maior percentual de resistência para penicilina (56,7%), oxacilina (46,7%) e eritromicina (26,7%). Apenas um isolado (3,3%) apresentou resistência intermediária a um antimicrobiano, a eritromicina. Além disso, todos os isolados de *Staphylococcus* spp. analisados apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano gentamicina (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de salada de alface. Pelotas, 2015. (n=30).

Antimicrobianos	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Vancomicina	96,7	0	3,3
Eritromicina	70	3,3	26,7
Cloranfenicol	93,3	0	6,7
Rifampicina	96,7	0	3,3
Cefepima	93,3	0	6,7
Oxacilina	53,3	0	46,7
Penicilina	43,3	0	56,7
Ciprofloxacina	90	0	10
Gentamicina	100	0	0
Tetraciclina	96,7	0	3,3
Sulfametoxazol/Trimetoprim	96,7	0	3,3

Outros estudos que avaliaram a resistência antimicrobiana de *S. aureus* isolado de alimentos e humanos encontram 58,5% (n=31) das amostras resistentes a penicilina⁴⁰, 47,6% (n=133) resistentes a oxacilina⁴², 22,7% (n=29) resistentes a eritromicina⁴³ e 100% (n=8) das amostras sensíveis a gentamicina⁴⁴.

A resistência antimicrobiana é um indicativo da patogenicidade de *Staphylococcus* spp. que pode ser fonte de contaminação nos alimentos prontos para o consumo^{41,44,45}. Tanto a penicilina quanto a oxacilina pertencem à classe de antimicrobianos β -lactâmicos, e a resistência antimicrobiana ocorre por interferirem na síntese e remodelação dos peptidoglicanos bacterianos. No entanto, a eritromicina pertencente à classe dos macrolídios e a resistência antimicrobiana ocorre por inibição da síntese proteica das células bacterianas suscetíveis na subunidade ribossomal 50S. Em bactérias Gram positivas, a resistência β -lactâmica ocorre principalmente como resultado da alteração da proteína alvo, com a degradação enzimática. *Staphylococcus* spp. possui resistência natural aos β -lactâmicos quando expostos à penicilina^{39, 46-48}.

Dentre os 30 isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados para resistência antimicrobiana 23,3% (n=7) foram multirresistentes. Sendo que um dos isolados apresentou resistência a seis antimicrobianos (clindamicina, vancomicina, eritromicina, rifampicina, oxacilina e penicilina). Estudos semelhantes que testaram resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* também encontraram multirresistência aos mesmos antimicrobianos^{44,49,50}.

Vários mecanismos podem levar à multirresistência bacteriana, como a diminuição intracelular do antimicrobiano, por uma alteração na permeabilidade da membrana externa, diminuindo o transporte através da membrana interna, ou efluxo ativo, através da mutação ou modificação enzimática e do desvio do fármaco ao alvo⁵¹. A presença de isolados multirresistentes pode aumentar do número de infecções de difícil tratamento, limitar o uso de antimicrobianos disponíveis e consequentemente dificultar o tratamento clínico, aumentar a proliferação de infecções, os custos hospitalares e o número de óbitos^{14,52}.

Conclusão

A qualidade microbiológica das saladas de alface mostrou-se inadequada, pois apesar da ausência de *Salmonella* spp., mais da metade das amostras foram quantificadas com coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação. Além disso, verificou-se a presença de patógenos importantes em alimentos como *E. coli* e *Staphylococcus* spp., o qual apresentou elevado percentual de resistência antimicrobiana dos micro-organismos isolados.

Referências

- 1 - Welker CAD, Both JMC, Longaray SM, Haas S, Soeiro MLT, Ramos RC. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Bioc* 2010; 8(1):44-48.
- 2 - Pereira EL, Rodrigues A, Ramalhosa E. Influence of working conditions and practices on fresh-cut lettuce salads quality. *Food Control* 2013; 33(2):406–412.
- 3 - Leong D, Alvarez-Ordóñez A, Jordan K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Front Microbiol* 2014; 5:4361-4368.
- 4 - Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. 1th Edition. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- 5 - Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão de Alimentos Hídrica e Alimentar (VE-DTA). Dados epidemiológicos de 200 a 2014. Brasília; 2014.
- 6 - Rico D, Martín-Diana AB, Barat JM, Barry-Ryan C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends Food Sci Technol* 2007; 18:373–386.
- 7 - Manzocco L, Foschia M, Tomasi N, Maifreni M, Costa LD, Marino M, Cortellac G, Cescod S. Influence of hydroponic and soil cultivation on quality and shelf life of ready-to-eat lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr). *J Sci Food Agric* 2011; 91(8):1373-1380.

- 8 - Zhou T, Harrison AD, Mckellar R, Young JC, Odumeru J, Piyasena P. Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. *Food Res Int* 2004; 37:875–881.
- 9 - Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. *Clin Infect Dis* 2013; 57(3):425-33.
- 10 - Ho J, Boost M, O'Donoghue M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in foodhandlers, 2002-2011. *Epidemiol Infect* 2014; 13:1-10.
- 11 - Mogharbel ADI, Masson ML. Perigos associados ao consumo da alface, (*Lactuca sativa*), *in natura*. *Alim Nutr Araraquara* 2005; 16(1):83-88.
- 12 - Jablasone J, Warriner K, Griffiths M. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *Int J Food Microbiol* 2005; 99(1):7-18.
- 13 - Jeddi MZ, Yunesian M, Gorji ME, Noori N, Pourmand MR, Khanik GRJ. Microbial Evaluation of Fresh Minimally-processed Vegetables and Bagged Sprouts from Chain Supermarkets. *J Health Popul Nutr* 2014; 32(3):391–399.
- 14 - Deleo FRE, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.* 2009; 119(9):2464–2474.
- 15 - Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. Occurrence, characterization and

antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* 2007; 115(3):290-296.

16 - Resch M, Nagel V, Hertel C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int J Food Microbiol* 2008; 127(1-2):99-104.

17- Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McCallister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Infect Dis* 2008; 197(9):1226–1234.

18 - Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(9):629–641.

19 - Montoya IC, Mira MO, Álvarez IA, Cofre JG, Cohen JV, Donoso GW, Torres JPT. Resistencia inducible a clindamicina em *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev Chil Pediatr* 2009; 80(1):48-53.

20 - Rinsky JL, Nadimpalli M, Wing S, Hall D, Baron D, Price LB, Larsen J, Stegger M, Stewart J, Heaney CD. Livestock-Associated Methicillin and Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Is Present among Industrial, Not Antibiotic-Free Livestock Operation Workers in North Carolina. *PLoS One* 2013; 8(7):e67641.

21 - Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC No. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário oficial da União*, 2001.

- 22 - Food and Drug Administration (FDA). *Bacteriological Analytical Manual*. Gaithersburg, AOAC International; 2001.
- 23 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing*. EUA; 2007.
- 24 - Brandão MLL, Almeida DO, Bispo FCP, Bricio SML, Marin VA, Miagostovich MP. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J Food Sci* 2014; 79(5):961-6.
- 25 - Junior JP, Gontijo EEL, Silva MG. Perfil parasitológico e microbiológico de alfaces comercializadas em restaurantes *self-service* de Gurupi-TO. *Rev Cient do ITPAC Araguaína* 2012; 5(1):Pub.2.
- 26 – Loncarevic S, Johannessen GS, Rorvik LM. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Lett Appl Microbiol* 2005; 41(2):186–189.
- 27 – Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguer A M, Gatiús F, Abadías M. Microbiological quality of fresh lettuce from lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiol* 2010; 27(5):679–684.
- 28 – Althaus D, Hofer E, Corti S, Julmi A, Stephan R. Bacteriological Survey of Ready-to-Eat Lettuce, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts Collected from the Swiss Market. *J Food Prot* 2012; 75(7):1338-41.
- 29 - Silva ND, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 4th Edition. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

- 30- Silva-Júnior EA. *Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação*. 6th Edition. São Paulo: Livraria Varela, 2012.
- 31- Oliveira ABAC, Silveira R, Trindade JT, Cardoso EC, Itapema MR. Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2013; 18(4):955-962.
- 32- Maistro LC, Miyaa NTN, Sant'anab AS, Pereira JL. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP – Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. *Food Control* 2012; 28(2):258–264.
- 33 - Calil BEM, Ferreira FLA, Brazão CS, Sovenhi CC. Qualidade microbiológica de saladas oferecidas em restaurantes tipo *self-service*. *ASA* 2013; 1(1): 36-42.
- 34 - Mello JF, Rocha LB, Lopes ES, Frazzon J, Costa M. Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services. *Braz J Microbiol* 2014; 45(3):1031-1037.
- 35 - Rizek CF, Matté MH, Dropa M, Mamizuka EM, De Almeida LM, Lincopan N, Matté GR, Germano PM. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(4):561–63.
- 36 - Gücükoğlu A, Çadirci Ö, Terzi G, Kevenk TO, Alişarli M. Determination of enterotoxigenic and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in ice cream. *J Food Sci* 2013; 78(5):738-41.

- 37- Bhunia, A. *Foodborne microbial pathogens – mechanisms and pathogenesis*. New York: Springer, 2008.
- 38 - Erkan M, Vural A, Oezekinci T. Investigating the presence of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci (CNS) in some leafy green vegetables. *Res Biol Sci* 2008; 3:930–933.
- 39 - Spanu V, Scarano C, Cossu F, Pala C, Spanu C, De Santis EP. Antibiotic Resistance Traits and Molecular Subtyping of *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Sheep Milk Cheese. *J Food Sci* 2014; 79(10):2066-2071.
- 40 - Wang X, Wang X, Wang Y, Guo G, Usman T, Hao D, Tang X, Zhang Y, Yu Y. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Lett Appl Microbiol* 2014; 58(6):527-34.
- 41 - Sousa M, Silva N, Igrejas G, Silva F, Sargo R, Alegria N, Benito D, Gómez P, Lozano C, Gómez-Sanz E, Torres C, Caniça M, Poeta P. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. *Vet Microbiol* 2014; 171(3-4):436-440.
- 42 - Pournajaf A, Ardebili A, Goudarzi L, Khodabandeh M, Narimani T, Abbaszadeh H. PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(Suppl. 1):293–297.
- 43 - Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Curr Microbiol* 2010; 60(5):379–386.

- 44 - Hassan AS, Altalhi AD, Gherbawy YA, El-Deeb BA. Bacterial Load of Fresh Vegetables and Their Resistance to the Currently Used Antibiotics in Saudi Arabia. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(9):1011-1018.
- 45 - Podkowik M, Bystron J, Bania J. Genotypes, Antibiotic Resistance, and Virulence Factors of Staphylococci from Ready-to-Eat Food. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9(1):91-93.
- 46 - Xu J, Shi C, Song M, Xu X, Yang P, Paoli G, Shi X. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Traits of Foodborne Staphylococcus aureus Isolates from Shanghai. *J Food Sci* 2014; 79(4):635-642.
- 47 - Weisblum, B. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(3):577-585.
- 48 - Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 78:3-13.
- 49 - Hammad AM; Watanabe W, Fujii T, Shimamoto T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Int J Food Microbiol* 2012; 156(3):286-289.
- 50 - Ye Y, Jiang Q, Wu Q, Zhang J, Lu J, Lin L. The Characterization and Comparison of Staphylococcus aureus by Antibiotic Susceptibility Testing, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus–Polymerase Chain Reaction, and Random Amplified Polymorphic DNA–Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9(2):168-171.

51 - Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1):79–114.

52 - Wang X, Li G, Xia X, Yang B, Xi M, Meng J. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China. *Foodborne Pathog Dis* 2014; 11(4):28128-6.

CONTRIBUIÇÕES INDIVIDUAIS

JG CÉSAR e KL RODRIGUES – desenvolvimento do trabalho, análises laboratoriais e texto final.

AM PERES, CP DAS NEVES, ÉTF ABREU – desenvolvimento das análises laboratoriais.

JF MELLO e ÂN MOREIRA – desenvolvimento do trabalho e texto final.

5 Artigo 2

Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo, resistência antimicrobiana e verificação da presença de gene de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp.

JOSI GUIMARÃES CÉSAR¹; ANDRIELE MADRUGA PERES²; CAROLINE PEREIRA DAS NEVES²; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA³; JOZI FAGUNDES DE MELLO⁴; ÂNGELA NUNES MOREIRA⁴; KELLY LAMEIRO RODRIGUES⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos – josigcesar@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição, Curso de Nutrição – neves_caroline@ymail.com; andriiele@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - marcosferreiravet@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição, Departamento de Nutrição – jozimello@gmail.com; angelamoreira@yahoo.com; lameiro_78@hotmail.com

Resumo

A procura por estabelecimentos que oferecem alimentos prontos para o consumo aumentou, contudo, os alimentos disponibilizados nestes locais podem estar contaminados com micro-organismos patogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar as condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo, por meio de quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, além de verificar resistência antimicrobiana e presença de gene de enterotoxinas clássicas nos

isolados de *Staphylococcus* spp. Foram coletadas 36 amostras de preparações alimentares à base de carne bovina e 36 amostras de sobremesa em nove restaurantes da cidade de Pelotas-RS. As quantificações dos micro-organismos foram realizadas seguindo a metodologia do *Bacteriological Analytical Manual*. Os isolados de *Staphylococcus* spp., foram submetidos ao teste de resistência antimicrobiana pelo método de disco-difusão conforme o Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* e submetidos a multiplex PCR para verificação de genes de enterotoxinas. Das 36 amostras à base de carne bovina, 2,8% (n=1) apresentaram quantificações de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação, assim como para a confirmação de *E. coli*. *Staphylococcus* coagulase positiva estava presente em 2,8% (n=1) das amostras e este resultado estava de acordo com a legislação e para *Staphylococcus* coagulase negativa 41,6% (n=15) das amostras estavam contaminadas. Das 36 amostras de sobremesas, 2,8% (n=1) apresentaram quantificação de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação, sem confirmação para *E. coli*. Todas as amostras de sobremesa que apresentaram quantificação para *Staphylococcus* coagulase positiva estavam dentro dos valores permitidos pela legislação e 50% (n=18) das amostras foram quantificadas com *Staphylococcus* coagulase negativa. Das 38 isolados de *Staphylococcus* spp. testados para resistência antimicrobiana 39,5% foram resistentes a penicilina, 34,2% a oxacilina e 5,3% (n=2) foram multirresistentes e o gene mais frequentemente encontrado foi o de enterotoxina E (n=3). Obteve-se um percentual de quantificação de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus* spp., além de um percentual de multirresistência e da presença de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp.

Palavras Chave: Micro-organismos indicadores, Micro-organismos patógenos, Restaurantes, Antimicrobianos, multiplex PCR.

Highlights:

Avaliação de alimentos prontos para o consumo comercializados em restaurantes. Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. Condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo. Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. de alimentos prontos para o consumo. Presença de gene de enterotoxina de *Staphylococcus* spp. em alimentos prontos para o consumo.

Introdução

Nos últimos anos, os hábitos alimentares da população mudaram e a alimentação fora do lar tornou-se uma alternativa em crescimento (Pereira, Rodrigues e Ramalhosa, 2013). Entretanto, os alimentos prontos para o consumo podem apresentar risco de contaminação microbiana que pode ocorrer durante o seu processamento, principalmente devido à manipulação inadequada. A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) pode ser considerada uma consequência dessa contaminação o que torna o fornecimento de alimentos seguros um desafio (Ghosh, Wahi, Kumar, & Ganguli, 2007; Cambero et al., 2012; Nyenje et al., 2012; Odwar Kikuvi, Kariuki, & Kariuki, 2014).

Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* são micro-organismos indicadores de contaminação fecal e *Staphylococcus* spp. das condições

sanitárias durante o processamento dos alimentos (Franco & Landgraf, 2008). Além disso, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Escherichia coli* são bactérias patogênicas, associadas a alimentos à base de carnes e sobremesas, que podem causar DTA (BRASIL, 2014).

Devido a uma inadequada manipulação, SCP pode estar presente nos alimentos e pode produzir toxinas, dependendo da sua concentração no alimento, e ocasionar surtos de intoxicação alimentar. *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) é frequentemente isolado em alimentos e também apresentam a capacidade de produzir enterotoxinas (Zell et al., 2008; Brasil, 2014). Quando os alimentos são submetidos a um insuficiente processo térmico na sua elaboração, são passíveis de sofrer proliferação estafilocócica e produção de enterotoxinas estafilocócicas (EEs), que são altamente resistentes ao calor e resistentes à maioria das enzimas proteolíticas que permitem a preservação de sua atividade no trato gastrointestinal (Lina et al., 2004; Hennekinne, Buyser e Dragacci, 2012; Bennett, Walsh e Gould, 2013; Podkowik et al., 2013; Ho, Boost e O'Donoghue, 2014). As principais EEs produzidas por *Staphylococcus* spp. são as clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) podendo ter seus genes detectados por técnicas como multiplex PCR (mPCR) que tem por objetivo amplificar simultaneamente vários genes alvos na detecção de micro-organismos patogênicos (Park et al., 2007; Germini, Masola, Carnevali, & Marchelli, 2009; Xu et al., 2012).

Staphylococcus spp. é capaz de adquirir resistência à várias classes de antimicrobianos e causar inúmeras infecções (Rizek et al., 2011; Spanu et al., 2012; Gücükoğlu et al., 2013; Sousa et al., 2014). Normalmente, a resistência

de *Staphylococcus* spp. é mais comum aos antimicrobianos β -lactâmicos, como penicilina e oxacilina (Rizek et al., 2011; Sousa et al., 2014; Regecová et al., 2014). Nos últimos anos, vem aumentando o número de infecções estafilocócicas e consequentemente o número de cepas multirresistentes, dificultando e prolongando o tratamento das infecções (Gorwitz, 2008; Chambers e DeLeo, 2009; Montoya, 2009; Rinsky, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar as condições higienicossanitárias de alimentos prontos para o consumo, por meio da quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. Além disso, verificar o perfil de resistência antimicrobiana e a presença de genes de EEs clássicas (A, B, C, D e E) nos isolados de *Staphylococcus* spp.

Materiais e Métodos

Delineamento experimental e amostragem

Foi realizado um estudo transversal com restaurantes do tipo *buffet*, da cidade de Pelotas/RS/Brasil. Para o delineamento experimental foram considerados o número e a localização dos estabelecimentos, informações disponíveis na Secretaria Municipal de Saúde do município de Pelotas – Gerência de Vigilância Sanitária, Setor de Alimentos. A população amostral foi estabelecida a partir do número total de restaurantes que possuem sistema de distribuição do tipo *buffet*, existentes no município (91), e foram escolhidos, por sorteio aleatório, nove restaurantes, representando 10% do total.

Coleta das amostras

Em cada restaurante (n=9) foram coletadas duas amostras: uma preparação à base de carne bovina (n=36) e uma sobremesa (n=36), uma vez por semana, em um período de quatro semanas, totalizando 72 amostras. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra, com a coleta realizada no balcão de distribuição, em embalagens térmicas descartáveis disponibilizadas pelos próprios estabelecimentos. Cada embalagem foi devidamente fechada, identificada e transportada imediatamente ao laboratório para a realização das análises.

Análises microbiológicas

Para a avaliação das condições higienicossanitárias das preparações foram realizadas quantificações de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. sendo classificados em SCP e SCN. A metodologia utilizada para as análises microbiológicas foi a recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 2001).

A quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada pelo método do Número Mais Provável (NMP), onde foi realizado um teste presuntivo em caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST, Merck®) e um teste confirmativo em caldo *Escherichia coli* (EC, Merck®). Após a quantificação de coliformes termotolerantes, a análise continuou para confirmação de *E. coli*, onde a cultura confirmada foi estriada por esgotamento em placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-BEM, Merck®), incubadas a 36°C por 24h. E aquelas consideradas colônias típicas foram transferidas para placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA, Merck®) e incubadas a 36°C por 24h. As colônias foram

submetidas à coloração de Gram e as culturas puras foram submetidas às provas bioquímicas.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp. foram realizadas três diluições decimais e 1mL de cada diluição foi dividido em três placas de Agar Baird Parker (BP, Merck®) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio 1%, pela técnica do espalhamento em superfície, incubadas por 37°C por 48h. Após esse período, as colônias presuntivas típicas e atípicas foram contadas e expressas em Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g). As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e então selecionadas aquelas puras e características. Em seguida, foi inoculada uma alçada de cada colônia selecionada em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Merck®) que foram incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, foi realizado o teste da coagulase, aqueles que formaram coágulo foram considerados positivos, os demais negativos.

Verificação da resistência a antimicrobianos

A partir dos isolados de SCP e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) foi realizada a verificação da resistência a antimicrobianos por meio da técnica de difusão em disco, seguindo as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2007). Primeiramente, os isolados foram cultivados em caldo BHI (Merck®) a 36°C, e inoculados em solução salina 0,85% (Merck®) até a obtenção da escala 0,5 de Mac Farland. Após foi realizado o espalhamento do cultivo na placa com Agar Muller Hinton (MH, Merck®) e os discos de antimicrobianos (Invitrogen®), para bactérias Gram positivo, foram dispostos na mesma, que foi incubada a 37°C por 24h. A leitura

foi realizada medindo os centímetros do halo de uma extremidade à outra e o resultado foi obtido por comparação com a tabela de padrão de resistência da CLSI²³. Os 12 antimicrobianos testados compunham o disco de antimicrobianos: ampicilina (10µg), penicilina (10 unidades), oxacilina (1µg), clindamicina (2µg), sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg), ciprofloxacina (5µg), cefepima (30µg), rifampicina (5µg) (CLSI, 2007).

Verificação da presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas

A partir dos isolados de SCP e SCN, foi extraído o DNA cromossomal utilizando um *kit* comercial (PureLink Genomic DNA – K1820-01, Invitrogen®). O DNA extraído foi submetido à técnica de mPCR pela qual buscou-se verificar a presença de genes de EEs A, B, C, D e E (EEA, EEB, EEC, EED e EEE). Os *primers* para identificação dos genes das EEs foram os definidos por Mehrotra, Wang, & Johnson (2000) (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados na detecção de gene de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp.

Gene	Primer	Sequência oligonucleotídica (5' → 3')	Localização do gene	Produto de amplificação (pb)
EEA	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	349–368	102
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTCTCTTCGG	431–450	
EEB	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTGAAGC	666–685	164
	GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	810–829	
EEC	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	432–455	451
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	863–882	
EED	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	492–514	278
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTCGTTT	750–769	
EEE	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	237–250	209
	GSEER-2	CTTTTTTTCTTCGGTCAATC	425–445	

pb: pares de base (Mehrotra, Wang, & Johnson, 2000).

No primeiro bloco da mPCR foi utilizado 1µl de cada um dos *primers* GSEAR-1/ GSEAR-2, GSECR-1/ GSECR-2, GSEDR-1/ GSEDR-2; 2,5µl solução tampão para PCR (10x), 1,5µl de cloreto de magnésio (MgCl₂) (5U/µl), 0,5µl de mix dNTPs (100nM), 0,3µl de Taq DNA polimerase (500U) e 1µl do DNA alvo em 25µl de volume final. No segundo bloco de reação, foram utilizados os mesmos constituintes, porém com os *primers* GSEBR-1/ GSEBR-2, GSEER-1/ GSEER-2. As mPCR foram realizadas em termociclador (MJ Research, PTC-100, Peltier Thermal Cycler), nas seguintes condições: 95°C por 5min, 30 ciclos (95°C – 30’’; 55°C – 1’ e 72°C – 1’), e extensão final a 72°C por 7min.

Os produtos da mPCR foram visualizados em eletroforese com gel de agarose 1,5% (Invitrogen) corado em brometo de etídeo (Promega®), em tampão TBE 0,5X, sob luz ultravioleta, e fotografados (Kodak Digital Science™ DC120). O Tampão de corrida utilizado foi 6X DNA *Loading* (Ludwig Biotec®) e o marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA *Ladder* (Ludwig Biotec®). O controle negativo das reações consistiu-se da mesma composição da mPCR, porém com água Milli-Q estéril substituindo o DNA. Como controles positivos foram utilizados DNAs de *S.aureus* ATCCs 13565 (EEA), 14458 (EEB), 19095 (EEC), 23235 (EED) e 21664 (EEE).

Análise estatística

As análises estatísticas descritivas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® (Chicago, version 17.0, 2008) para o teste de resistência antimicrobiana.

Resultados e Discussão

Os resultados das quantificações dos micro-organismos pesquisados nas amostras à base de carne bovina e de sobremesa estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., em preparações à base de carne bovina e sobremesas. Pelotas, 2015.

Bactérias	Preparações à base de carne bovina (n=36)		Sobremesa (n=36)	
	n (%)	Contagens (\bar{x})	n (%)	Contagens (\bar{x})
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	1 (2,8)	> 1100	1 (2,8)	460
	9 (25)	6,9	10 (27,8)	71,7
	26 (72,2)	< 3	25 (69,4)	< 3
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	1 (2,8)	3,6	36 (100)	< 3
	35 (97,2)	< 3		
SCP (UFC/g)	1 (2,8)	70 est.	4 (11,1)	25 est.
	35 (97,2)	< 10 est.	32 (88,9)	< 10 est.
SCN (UFC/g)	15 (41,6)	4×10^4	18 (50)	$2,2 \times 10^4$
	21 (58,4)	< 10 est	18 (50)	< 10 est

Legenda: (est) - Contagem estimada; NMP/g – Número mais provável por grama de alimento; UFC/g – Unidade formadora de colônia por grama de alimento. SPC - *Staphylococcus* coagulase positiva. SPN - *Staphylococcus* coagulase negativa. \bar{x} - média das contagens.

Das 36 amostras de preparações à base de carne bovina, uma ($> 1,1 \times 10^3$ NMP/g) apresentou quantificação para coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação, que estabelece um limite de 2×10 NMP/g, e em uma amostra (3,6 NMP/g) foi confirmada com *E. coli*. Apenas uma amostra apresentou quantificação para SCP (7×10^1 (est.) UFC/g) estando dentro dos padrões da legislação, que determina um limite de até 10^3 UFC/g (Brasil, 2001). Foram obtidas quantificações de SCN em 41,6% das amostras (n=15).

Das 36 amostras de sobremesa, uma ($4,6 \times 10^2$ NMP/g) apresentou quantificação de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação, que estabelece um limite de 10^2 NMP/g e não houve confirmação para *E. coli*. Quatro amostras foram quantificadas com SCP (de 1×10^1 a 7×10^1 (est.) UFC/g)

e estavam de acordo com a legislação, que estabelece um limite de até 10^3 UFC/g (Brasil, 2001). A metade das amostras apresentaram quantificações para SCN (Tabela 2).

Um estudo realizado em Porto Alegre, RS, Brasil, avaliou 26 amostras de diversos alimentos, incluindo carnes cozidas e sobremesas, e encontrou 15 amostras com SCN e nenhuma amostra com SCP. Este mesmo estudo avaliou a adequação de carnes cozidas e sobremesas para coliformes termotolerantes, de acordo com a legislação brasileira, e encontrou inadequação em aproximadamente 50% de ambas as amostras (Mello, 2014).

Alves e Ueno (2010) avaliaram diferentes tipos de carnes cozidas em restaurantes do tipo *self-service* na cidade de Taubaté, SP, Brasil e encontraram 3,1% (n=1) das amostras com quantificações acima do permitido pela legislação para SCP. Todas as quantificações de coliformes termotolerantes estavam dentro do limite permitido pela legislação, embora 29,8% (n=8) das amostras foram confirmadas para *E. coli*.

Dois estudos avaliaram sobremesas, o primeiro foi realizado na Grécia, em cantinas universitárias, e avaliou 82 amostras, das quais 76,8% (n=63) estavam contaminadas por *Staphylococcus* spp. (Kotzekidou, 2013). O segundo foi realizado no México, em restaurantes públicos, e avaliou 98 amostras, das quais 58,2% (n=57) estavam contaminadas por coliformes termotolerantes e 6,1% (n=6) por *E. coli* (Vigil et al., 2009).

No presente estudo, foram poucas as amostras que apresentaram contaminação por micro-organismos indicadores. Se tratando de alimentos

cozidos, acredita-se que o tempo de cocção foi suficiente para reduzir a contaminação microbiana e que possivelmente não houve contaminação pós-cocção (Franco & Landgraf, 2008; Silva-júnior, 2012; Silva, 2010). A legislação brasileira determina apenas a investigação de SCP em alimentos, por serem produtores de toxinas e considerados de risco para a saúde humana (Brasil, 2001). Provavelmente porque SCN, por muitos anos não foi considerado patogênico, mas as pesquisas sugerem que este micro-organismo pode ser patogênico a humanos e animais (Gillespie, Headrick, Boonyayatra, & Oliver, 2009; Chajęcka-Wierzchowska, 2015).

Das 72 amostras de alimentos analisadas foram obtidos 38 isolados de *Staphylococcus* spp., sendo cinco de SCP e 33 de SCN. Destes 38 isolados, 16 foram provenientes das preparações à base de carne bovina, sendo uma amostra SCP e 22 de sobremesas, sendo quatro amostras SCP.

Foi testada a resistência antimicrobiana dos 38 isolados de *Staphylococcus* spp. Estes apresentaram maior resistência a penicilina (39,5%) e a oxacilina (34,2%) e resistência intermediária a eritromicina (5,3%) e a rifampicina (2,6%). Além disso, todos os isolados apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim (Tabela 3) e 5,3% (n=2) dos isolados foram multirresistentes.

Tabela 3. Teste de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de preparações à base de carne bovina e sobremesas. Pelotas, 2015. (n=38)

Antimicrobiano	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Clindamicina	94,7	0	5,3
Vancomicina	94,7	0	5,3
Eritromicina	84,2	5,3	10,5
Cloranfenicol	100	0	0
Rifampicina	94,8	2,6	2,6
Cefepima	94,7	0	5,3
Oxacilina	65,8	0	34,2
Penicilina	60,5	0	39,5
Ciprofloxacina	97,4	0	2,6
Gentamicina	100	0	0
Tetraciclina	100	0	0
Sulfametoxazol/Trimetoprim	100	0	0

Estudos semelhantes que avaliaram a resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* spp. encontraram 53,8% (n=80) resistentes a penicilina (Gundogan, Citak, Yucel, & Devren, 2005), 23,1% (n=78) resistentes a oxacilina (Xu et al., 2014) e aproximadamente 100% (n=16) sensíveis a cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol/ trimetoprim (Aydin et al., 2011).

A penicilina e a oxacilina interferem na síntese e remodelação dos peptidoglicanos bacterianos. As proteínas de ligação à penicilina (PLP) 2a têm baixa afinidade por estes antimicrobianos e ao substituir outras PLP permitem que a bactéria sobreviva em altas concentrações. A penicilina foi o primeiro antibiótico utilizado para combater infecções causadas por *S. aureus*, mas devido ao uso excessivo e inadequado, a bactéria adquiriu a capacidade de resistência a estes antimicrobianos (Podkowik, 2013. Sousa et al., 2014; Spanu et al., 2014; Tang, Apisarnthanarak e Hsu, 2014; Xu et al., 2014).

Dos 38 isolados de *Staphylococcus* spp. testados para verificação da presença de gene de EEs clássicas, a EEE foi a mais frequente. Dos cinco isolados de SCP, um isolado continha o gene para EEE, sendo proveniente de uma amostra de sobremesa. Dos 33 isolados SCN, dois continham o gene para EEE, dois para EEB, dois para EEC e um para EED.

Xing et al. (2014) avaliaram 128 isolados de *S. aureus* de alimentos prontos para o consumo, e encontraram 2,3% (n=3) de EEE. Mello et al. (2014) avaliaram isolados de *Staphylococcus* spp. em 26 amostras de alimentos prontos para o consumo e encontraram 3,8% (n=1) de EEB e 3,8% (n=1) de EEC.

A ingestão de EE pode causar intoxicação alimentar estafilocócica, e está diretamente relacionada a quantificação de *Staphylococcus* (acima de 10^5 UFC/g) no alimento estudado. Além disso, a intoxicação alimentar apresenta como sintomas vômitos, contrações gastrointestinais, diarreia, fraqueza e tonturas (Bhumias, 2008; Podkowik, 2013). No Brasil, *S. aureus* aparece em segundo lugar como responsável por surtos alimentares (BRASIL, 2014). No entanto, estudos brasileiros já demonstraram a presença de gene de EEs em espécies de SCN oriundos de diferentes tipos de alimentos (Oliveira, Miya, Sant'Ana, & Pereira 2010; Lyra et al., 2013; Rall et al., 2014). A EEE raramente é relatada em alimentos e seu envolvimento em surtos alimentares também é pouco frequente, enquanto que a EEA é considerada a mais comum nos casos de intoxicação alimentar estafilocócica, seguida pela EED. (Oliveira, 2011; Argudín, Mendoza & Rodicio, 2010; Alibayov, Zdenkova, Sykorova & Demnerova 2014).

Conclusão

A maioria dos micro-organismos indicadores das condições higienicossanitárias encontrado estavam de acordo com a legislação sanitária brasileira. Além disso, os isolados de *Staphylococcus* spp., apresentaram alto percentual de resistência antimicrobiana a penicilina e oxacilina. E o gene de SEE foi o mais frequente entre os isolados de *Staphylococcus* spp.

Referências

- Alibayov, B., Zdenkova, K., Sykorova, H., & Demnerova, K. (2014). Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 197-204.
- Alves, M. G., & Ueno, M. (2010). Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. *Revista de Nutrição Campinas*, 23(4), 573-580.
- Argudín, M. A., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins (Basel)*, 2(7), 1751–1773.
- Aydin, A., Muratoglu, K., Sudagidan, M., Bostan, K., Okuklu, B., & Harsa, S. (2011). Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 63-69.
- Bennett, S. D., Walsh, K. A., & Gould, L. H. (2013). Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57(3), 425-433.
- Bhunia, A. (2008). *Foodborne microbial pathogens – mechanisms and pathogenesis*. (1th ed.). New York: Springer, (Chapters 6)
- Brasil. (10 de janeiro de 2001). Diário Oficial da União. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de

janeiro de 2001. *Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Disponível em

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES.

Brasil. (2014). Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão de Alimentos Hídrica e Alimentar. *Dados epidemiológicos-DTA período de 2010 a 2014*. Disponível em

http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf 2015.

Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Escudero, R., Manzano, S., Garcia-Márquez, I., Velasco, R., & Ordóñez, J. A. (2012). Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by e-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(7), 594-599.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpińska, M., & Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2015). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46, 222-226.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2007). *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing*. Disponível em <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>.

FDA (Food and Drug Administration). (2001). *Bacteriological Analytical Manual*. Disponível em <http://911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>.

Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. (2008). *Microbiologia dos alimentos*. (2th ed.). Porto Alegre: Artmed, (Chapters 3 & 4).

Germini, A., Masola, A., Carnevali, P., & Marchelli, R. (2009). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*, 20, 733–738.

Ghosh, M., Wahi, S., Kumar, M., & Ganguli, A. (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Shigella* spp. in some raw street vended Indian foods. *International Journal of Environmental Health Research*, 17, 151–156.

- Gillespie, B. E., Headrick, S. I., Boonyayatra, S., & Oliver, S. P. (2009). Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 65-72.
- Gundogan, N., Citak, S., Yucel, N., & Devren, A. (2005). A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Science*, 69(4), 807-810.
- Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 815–836.
- Ho, J., Boost, M., & O'Donoghue, M. (2014). Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. *Epidemiology & Infection*, 13, 1-10.
- Kotzekidou, P. (2013). Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiology*, 34(2), 337-343.
- Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., & Mariuzza, R. (2004). International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *Journal of Infectious Disease*, 189, 2334–2336.
- Lyra, D. G., Sousa, F. G., Borges, M. F., Givisiez, P. E., Queiroga, R. C., Souza E. L., et al. (2013). Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2), 126-130.
- Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1032-1035.
- Mello, J. F., Rocha, L. B., Lopes, E. S., Frazzon, J., & Costa, M. (2014). Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 1031-1037.
- Odwar, J. A., Kikui, G., Kariuki, J. N., & Kariuki, S. (2014). A cross-sectional study on the microbiological quality and safety of raw chicken meats sold in Nairobi, Kenya. *BMC Research Notes*, 7, 627.

- Oliveira, A. M., Miya, N. T., Sant'Ana, A. S., & Pereira, J. L. (2010). Behavior and enterotoxin production by coagulase negative Staphylococcus in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. *Journal of Food Science*, 75(7), 475-481.
- Oliveira, A. M., Padovani, C. R., Miya, N. T., Sant'ana, A. S., & Pereira, J. L. (2011). High incidence of enterotoxin D producing Staphylococcus spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 159-163.
- Park, S. H., Kim, H. J., Kim, J. H., Kim, T. W., & Kim, H. Y. (2007). Simultaneous detection and identification of Bacillus cereus group bacteria using multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 1177–1182.
- Pereira, E. L., Rodrigues, A., & Ramalhosa, E. (2013). Influence of working conditions and practices on fresh-cut lettuce salads quality. *Food Control*, 33(2), 406–412.
- Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystroń, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 34-40.
- Rall, V. L., Miranda, E. S., Castilho, I. G., Camargo, C. H., Langoni, H., Guimarães, F. F., et al. (2014). Diversity of Staphylococcus species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 829-837.
- Regecová, I., Pipová, M., Jevinová, P., Marušková, K., Kmeť, V., & Popelka, P. (2014). Species Identification and Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from the Meat of Sea Fish. *Journal of Food Science*, 79(5), 898-902.
- Rizek, C. F., Matté, M. H., Dropa, M., Mamizuka, E. M., Almeida, L. M., Lincopan, N., et al. (2011). Identification of Staphylococcus aureus carrying the mecA gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 561–563.
- Silva, N. D., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., Gomes, R. A. R. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. (4th ed.). São Paulo: Livraria Varela, (Chapters 9 & 10).

- Sousa, M., Silva, N., Igrejas, G., Silva, F., Sargo, R., Alegria, N., et al. (2014). Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 436-40.
- Spanu, V., Scarano, C., Cossu, F., Pala, C., Spanu, C., & De Santis, E. P. (2014). Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese. *Journal of Food Science*, 79(10), 2066-2071.
- Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 3-13.
- Vigil, K. J., Jiang, Z. D., Chen, J. J., Palumbo, K. L., Galbadage, T., Brown, E. L., et al. (2009). Coliform and *Escherichia coli* contamination of desserts served in public restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4), 606-608.
- Xing, X., Li, G., Zhang, W., Wang, X., Xia, X., Yang, B., et al. (2014). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and enterotoxin gene detection of *Staphylococcus aureus* isolates in ready-to-eat foods in Shaanxi, People's Republic of China. *Journal of Food Protection*, 77(2), 331-334.
- Xu, J., Shi, C., Song, M., Xu, X., Yang, P., Paoli, G., et al. (2014). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai. *Journal of Food Science*, 79(4), 635-642.
- Xu, Y. G., Cui, L. C., Tian, C. Y., Li, S. L., Cao, J. J., Liu, Z. M., et al. (2012). A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens. *Food Control*, 25, 778-783.
- Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., & Götz, F. (2008). Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 246-251.

6 Considerações finais

- Foram isolados coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. nas saladas de alface, nas preparações à base de carne bovina e nas sobremesas, conforme o esperado. Todas as amostras de salada de alface apresentaram ausência de *Salmonella* spp. As saladas de alface apresentaram um alto percentual de micro-organismos indicadores da qualidade higienicossanitária dos alimentos quando comparadas as preparações à base de carne bovina e as sobremesas. Acredita-se que estes resultados ocorreram devido à inadequada ou insuficiente higienização das saladas de alface, já que são servidas cruas, enquanto que as preparações à base de carne bovina e as sobremesas possivelmente passaram por algum processamento térmico que foi suficiente para diminuir o crescimento dos micro-organismos estudados.
- Houve resistência a antimicrobianos nos isolados de *Staphylococcus* spp. para as amostras de salada de alface, preparações à base de carne bovina e sobremesa. Entretanto, o percentual de resistência e multirresistência antimicrobiana foram maiores para salada de alface do que para as preparações à base de carne bovina e sobremesa.
- Houve a confirmação da presença de gene de EEs clássicas (B, C, D, E) nos isolados de *Staphylococcus* spp. para as preparações à base de carne bovina e sobremesas.

De uma maneira geral pode-se concluir que a maioria das amostras à base de carne bovina e sobremesas apresentaram resultados satisfatórios, enquanto que a maioria das saladas de alface apresentaram resultados insatisfatórios, em relação aos parâmetros exigidos pela legislação sanitária brasileira.

7 Referências Gerais

ABRASEL. Associação Brasileira de Bares e Restaurantes. Refeições fora do lar – tendência leva a gastar mais (Online). Disponível em: <<http://www.abrasel.com.br/index.php/atualidade/item/4207>>. Acessado em: 26 out 2013.

ALIBAYOV, B.; ZDENKOVA, K.; SYKOROVA, H.; DEMNEROVA, K. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.107, p197-204, 2014.

ALTHAUS, D.; HOFER, E.; CORTI, S.; JULMI, A.; STEPHAN, R. Bacteriological Survey of Ready-to-Eat Lettuce, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts Collected from the Swiss Market. **Journal of Food Protection**, v.75, n.7, p.1338-41, 2012.

ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes *self-service*: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. **Revista de Nutrição Campinas**, v.23, n.4, p.573-580, 2010.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v.2, n.7, p.1751–1773, 2010.

AYDIN, A.; MURATOGLU, K.; SUDAGIDAN, M.; BOSTAN, K.; OKUKLU, B.; HARSA, S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.63-69, 2011.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.1, p.1-10, 2000.

BARBER, D. A.; MILLER, G. Y.; MCNAMARA, P.E. Models of antimicrobial resistance and food-borne illness: examining assumptions and practical application. **Journal of Food Protection**, v.66, p.700-709, 2003.

BARENDSZ, A. W. Food safety and total quality management. **Food Control**, v.9, n.2-3, 1998.

BENNETT, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases*, v.57, n.3, p.425-433, 2013.

BHUNIA, Arun. **Foodborne microbial pathogens – mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer, 2008. 276p.

BRANDÃO, M. L. L.; ALMEIDA, D. O.; BISPO, F. C. P.; BRICIO, S. M. L.; MARIN, V. A.; MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Food Science**, v.79, n.5, p.961-966, 2014.

BRASIL. Antimicrobianos - Base Teóricas e Uso Clínico, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 05 mar. 2015.

BRASIL. Dados epidemiológicos – DTA período de 2010 a 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2015.

BRASIL. Dados epidemiológicos – DTA período de 2010 a 2014. Disponível em:

<http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário oficial da União. Brasília, 2001.

BRICIO, S. M. L.; LEITE, S. G. F.; VIANA, C. M. Avaliação microbiológica de salpicão de frango e salada de maionese com ovos servidos em restaurantes self-service na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.137, p.90-95, 2005.

CALIL, B. E. M.; FERREIRA, F. L. A.; BRAZÃO, C. S., SOVENHI, C. C. Qualidade microbiológica de saladas oferecidas em restaurantes tipo *self-service*. **Atas de Saúde Ambiental**, v.1, n.1, p.36-42, 2013.

- CAMBERO, M. I.; CABEZA, M. C.; ESCUDERO, R.; MANZANO, S.; GARCIA-MÁRQUEZ, I.; VELASCO, R.; ORDÓÑEZ, J. A. Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by e-beam irradiation. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.7, p.594-599, 2012
- CAVALLI, S. B.; SALAY, E. Gestão de pessoas em unidades produtoras de refeições comerciais e segurança alimentar. **Revista de Nutrição**, v.20, n.6, p.657-667, 2007.
- CAVALLI, S. B.; SALAY, E. Segurança do alimento e recursos humanos: estudo exploratório em restaurantes comerciais dos municípios de Campinas, SP e Porto Alegre, RS. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.1, p.26-27, 2004.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; NALEPA, B.; SIERPIŃSKA, M.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, v.46, p.222-226, 2015.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.9, p.629–641, 2009.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. EUA, v.13, n.1, 2007.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterogênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas**, v.22, n.3, p.263-271, 2002.
- CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; JÚNIOR, J. P. A. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.70-74, 2006.
- DELEO, F. R. E.; CHAMBERS, H. F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, n.9, p.2464–2474, 2009.
- DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, p.79–114, 2007.

- DOYLE, Michael. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. 816p.
- DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. **Bacterial Nomenclature up-to-date: Approved lists, validation lists**. Disponível em: <<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>>. Acessado: novembro 2013.
- ENRIGHT, Mark. The evolution of resistant pathogen – the case of MRSA. **Current Opinion in Pharmacology**, v.3, n.5, p.474–479, 2003.
- ERKAN, M.; VURAL, A.; OEZEKINCI, T. Investigating the presence of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci (CNS) in some leafy green vegetables. **Research Journal of Biological Sciences**, v.3, p.930–933, 2008.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. Gaithersburg, AOAC International, 2001.
- FRANCO, Bernadette; Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.733–738, 2009.
- GHOSH, M.; WAHI, S.; KUMAR, M.; GANGULI, A. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Shigella* spp. in some raw street vended Indian foods. **International Journal of Environmental Health Research**, v.17, p.151–156, 2007.
- GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S. P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.65-72, 2009.
- GORWITZ, R. J.; KRUSZON-MORAN, D.; MCALLISTER, S. K.; MCQUILLAN, G.; MCDUGAL, L. K.; FOSHEIM, G. E.; et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **Journal of Infectious Diseases**, v.197, n.9, p.1226–1234, 2008.

- GÜCÜKOĞLU, A.; ÇADIRCI, Ö.; TERZI, G.; KEVENK, T. O.; ALIŞARLI, M. Determination of enterotoxigenic and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in ice cream. **Journal of Food Science**, v.78, n.5, 738-741, 2013.
- GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Science*, v.69, n.4, p.807-810, 2005.
- HAMMAD, A. M.; WATANABE, W.; FUJII, T.; SHIMAMOTO, T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.156, n.3, p.286-289, 2012.
- HASSAN, A. S.; ALTALHI, A. D.; GHERBAWY, Y. A.; EL-DEEB, B. A. Bacterial Load of Fresh Vegetables and Their Resistance to the Currently Used Antibiotics in Saudi Arabia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.9, p.1011-1018, 2011.
- HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.815–836, 2012.
- HO, J.; BOOST, M.; O'DONOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. **Epidemiology & Infection**, v.13, p.1-10, 2014.
- HOLT, John et al. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- JABLASON, J.; WARRINER, K.; GRIFFITHS, M. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, n.1, p.7-18, 2005.
- JEDDI, M. Z.; YUNESIAN, M.; GORJI, M. E.; NOORI, N.; POURMAND, M. R.; KHANIK, G. R. J. Microbial Evaluation of Fresh Minimally-processed Vegetables and Bagged Sprouts from Chain Supermarkets. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v.32, n.3, p.391–399, 2014.

JUNIOR, J. P.; GONTIJO, E. E. L.; SILVA, M. G. Perfil parasitológico e microbiológico de alfaces comercializadas em restaurantes *self-service* de Gurupi-TO. **Revista Científica do Araguaína**, v.5, n.1, p.Pub.2, 2012.

JUNQUEIRA, A. R.; FLEMING, L. R.; SAMPAIO, L. S.; NASCIMENTO, J. S. Estafilococos coagulase positiva em saladas de restaurantes *self-service* da cidade do Rio de Janeiro. **Revista Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.1, n.1, p.1-10, 2009.

KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J. A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; BUYSER, M. L. D. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.369-75, 2007.

KOTZEKIDOU, P. Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. **Food Microbiology**, v.34, n.2, p.337-343, 2013.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology**, v.60, n.5, p.379–386, 2010.

LEONG, D.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; JORDAN, K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. **Frontiers in Microbiology**, v.5; p.4361-4368, 2014.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v.189, p.2334–2336, 2004.

LONCAREVIC, S.; JOHANNESSEN, G. S.; RORVIK, L. M. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, n.2, p.186–189, 2005.

LYRA, D. G.; SOUSA, F. G.; BORGES, M. F.; GIVISIEZ, P. E.; QUEIROGA, R. C.; SOUZA E. L.; et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.2, p.126-130, 2013.

- MAISTRO, L. C.; MIYAA, N. T. N.; SANT'ANAB, A. S.; PEREIRA, J. L. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP – Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. **Food Control**, v.28, n.2, p.258–264, 2012.
- MANZOCCO, L.; FOSCHIA, M.; TOMASI, N.; MAIFRENI, M.; COSTA, L. D.; MARINO, M.; et al. Influence of hydroponic and soil cultivation on quality and shelf life of ready-to-eat lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.8, p.1373-1380, 2011.
- MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; VERA, A. M.; MURCIA, M. A. Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads. **International Journal of Food Control**, v.11, p. 437-445, 2000.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, p.1032-1035, 2000.
- MELLO, J. F.; ROCHA, L. B.; LOPES, E. S.; FRAZZON, J.; Costa, M. Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n.3, p.1031-1037, 2014.
- MOGHARBEL, A. D. I.; MASSON, M. L. Perigos associados ao consumo da alface, (*Lactuca sativa*), *in natura*. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n.1, p.83-88, 2005.
- MONTOYA, I. C.; MIRA, M. O.; ÁLVAREZ, I. A.; COFRE, J. G.; COHEN, J. V.; DONOSO, G. W.; et al. Resistencia inducible a clindamicina em *Staphylococcus aureus* metilino resistente. **Revista chilena de pediatria**, v.80, n.1, p.48-53, 2009.
- MOURA, T. M.; CAMPOS, F. S.; D'AZEVEDO, P. A.; SAND, S. T. V. D.; FRANCO, A. C.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n.45, v.5, p.579-585, 2012.
- NASCIMENTO, Francisco. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em pauta**, v.40, p.22-26, 2000.

- NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI A.; SANTAGADA G.; FIRINU, A.; CRISSETTI E.; CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.290-296, 2007.
- ODWAR, J. A.; KIKUVI, G.; KARIUKI, J. N.; KARIUKI, S. A cross-sectional study on the microbiological quality and safety of raw chicken meats sold in Nairobi, Kenya. **BMC Research Notes**, v.7, p.627, 2014.
- OLIVEIRA, M.; USALL, J.; VIÑAS, I.; ANGUER, A. M.; GATIUS, F.; ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**, v.27, n.5, p.679–684, 2010.
- OLIVEIRA, A. M.; MIYA, N. T.; SANT'ANA, A. S.; PEREIRA, J. L. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. **Journal of Food Science**, v.75, n.7, p.475-481, 2010.
- OLIVEIRA, A. M.; PADOVANI, C. R.; MIYA, N. T.; SANT'ANA, A. S.; PEREIRA, J. L. High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.159-163, 2011.
- OLIVEIRA, S. P; FREITAS, F. V.; MUNIZ, L. B.; PRAZERES, R. Condições higiênico-sanitárias do comércio de alimentos do município de Ouro Preto, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.136, p.26-31, 2005.
- PARK, S. H.; KIM, H. J.; KIM, J. H.; KIM, T. W.; KIM, H. Y. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.1177–1182, 2007.
- PEREIRA, E. L.; RODRIGUES, A.; RAMALHOSA, E. Influence of working conditions and practices on fresh-cut lettuce salads quality. **Food Control**, v.33, n.2, p.406–412, 2013.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotox in production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p.278-282, 2009.

- PHILLIP, S.; ANITA, E. Efficacy of theory of planned behavior model in predicting safe food handling practices. **International Journal of Food Control**, v.21, p.983-987, 2010.
- PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Genotypes, Antibiotic Resistance, and Virulence Factors of Staphylococci from Ready-to-Eat Food. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.1, p.91-93, 2012.
- PODKOWIK, M.; PARK J. Y.; SEO K. S.; BYSTRON J.; BANIA J.. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.163, p. 34-40, 2013.
- POPOLIM, W. D. Unidade Produtora de Refeições (UPR) e Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) – Definições, Diferenças e Semelhanças. **Nutrição profissional**, v.3, n.12, p.40-46, 2007.
- POURNAJAF, A.; ARDEBILI, A.; GOUDARZI, L.; KHODABANDEH, M.; NARIMANI, T.; ABBASZADEH H. PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.Suppl.1, p.293–297, 2014.
- RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; DEUS, M. F. R.; SOUSA, D. C.; CAMARGO, C. H.; GODINHO, N. C.; et al. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.9, p.1121-1123, 2010.
- RALL, V. L.; MIRANDA, E. S.; CASTILHO, I. G.; CAMARGO, C. H.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.2, p.829-837, 2014.
- REGECOVÁ, I.; PIPOVÁ, M.; JEVINOVÁ, P.; MARUŠKOVÁ, K.; KMEŤ, V.; POPELKA, P. Species Identification and Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from the Meat of Sea Fish. **Journal of Food Science**, v.79, n.5, p.898-902, 2014.
- RESCH, M.; NAGELA, V.; HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, n.1-2, p.99-104, 2008.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.373–386, 2007.

RINSKY, J. L.; NADIMPALLI, M.; WING, S.; HALL, D.; BARON, D.; PRICE, L. B.; et al. Livestock-Associated Methicillin and Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Is Present among Industrial, Not Antibiotic-Free Livestock Operation Workers in North Carolina. **PLoS One**, v.8, n.7, p.e67641, 2013.

RIZEK, C. F.; MATTÉ, M. H.; DROPA, M.; MAMIZUKA, E. M.; ALMEIDA, L. M.; LINCOPAN, N.; et al. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.4, p.561–563, 2011.

ROCHA, A. N. F.; SOARES, R.P.; BESERRA, M. L. S. Análise microbiológica de saladas cruas em restaurantes de Teresina–PI. **Revista Interdisciplinar**, v.7, n. 2, p.11-17, 2014.

RODRIGUEZ, M.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; POSADA, G.D.; ZURERA, G. Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in Southern Spanish hospitals. **Food Control**, v.22, n.6, p.874-882, 2011.

ROSA, M. S.; NEGREIROS, S. R. F.; SEABRA, L. M. J.; STAMFORD, T. L. M. Monitoramento de tempo e temperatura de distribuição de preparações à base de carne em escola municipais de Natal (RN), Brasil. **Revista de Nutrição**, v.21, n.1, p.21-28, 2008.

SANTOS, L. A.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, M. V.; PROENÇA, R. P. C.; FIATES, G. M. R.; CALVO, M. C. M. Os restaurantes por peso no contexto de alimentação saudável fora de casa. **Revista de Nutrição**, v. 24, n.4, p.641-649, 2011.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M. T.; LINDQVIST, R.; BARKER, G. C.; RÅDSTRÖM, P. The formation of *Staphylococcus aureus*

enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v.2, n.6, p.580-592, 2011.

SILVA, N. D.; et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA-JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6ed. São Paulo: Livraria Varela, 2012.

SORIANO, J. M.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. **Food Control**, v.13, p.253-261, 2002.

SOUSA, M.; SILVA, N.; IGREJAS, G.; SILVA, F.; SARGO, R.; ALEGRIA, N.; et al. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. **Veterinary Microbiology**, v.171, n.3-4, p.436-440, 2014.

SOUSA, C. The impact of food manufacturing practices on food borne. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.4, p.615-623, 2008.

SPANU, V.; SCARANO, C.; COSSU, F.; PALA, C.; SPANU, C.; DE SANTIS, E. P. Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese. **Journal of Food Science**, v.79, n.10, p.2066-2071, 2014.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NET, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciências e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

TANG, S. S.; APISARNTHANARAK, A.; HSU, L. Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.78, p.3-13, 2014.

TRESSELER, J. F. M.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MACHADO, T. F.; DELFINO, C. M.; SOUSA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1722-1727, 2009.

VIGIL, K. J.; JIANG, Z. D.; CHEN, J. J.; PALUMBO, K. L.; GALBADAGE, T.; BROWN, E. L.; et al. Coliform and *Escherichia coli* contamination of desserts served in public restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas.

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.80, n.4, p.606-608, 2009.

WANG, X.; LI, G.; XIA, X.; YANG, B.; XI, M.; MENG, J. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n.4, p.28128-28136, 2014.

WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y.; GUO, G.; USMAN, T.; HAO, D.; et al. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.58, n.6, p.527-34, 2014.

WEINGOLD, S. E., GUZEWICH, J., FUDALA, J. K. Use of foodborne disease data for HACCP risk assessment. **Journal of Food Protection**, v.57, p.820-30, 1994.

WEISBLUM, B. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.3, p.577-585, 1995.

WELKER, C. A. D; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.1, p.44-48, 2010.

XING, X., LI, G., ZHANG, W., WANG, X., XIA, X., YANG, B., et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and enterotoxin gene detection of *Staphylococcus aureus* isolates in ready-to-eat foods in Shaanxi, People's Republic of China. **Journal of Food Protection**, v.77, n.2, p.331-334, 2014.

XU, J.; SHI, C.; SONG, M.; XU, X.; YANG, P.; PAOLI, G.; et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial **resistance** traits of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai. **Journal of Food Science**, v.79, n.4, p.635-642, 2014.

XU, Y. G.; CUI, L. C.; TIAN, C. Y.; LI, S. L.; CAO, J. J.; LIU, Z. M.; et al. A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens. **Food Control**, v.25, p.778–783, 2012.

Ye, Y.; Jiang, Q.; Wu, Q.; Zhang, J.; Lu, J.; Lin, L. The Characterization and Comparison of *Staphylococcus aureus* by Antibiotic Susceptibility Testing,

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus–Polymerase Chain Reaction, and Random Amplified Polymorphic DNA–Polymerase Chain Reaction. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.2, p.168-171, 2012.

ZAHA, Arnaldo et al. **Biologia molecular básica**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, n.3, p.246-251, 2008.

ZHOU, T.; HARRISON, A. D.; MCKELLAR, R.; YOUNG, J. C.; ODUMERU, J.; PIYASENA, P. Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. **Food Research International**, v.37, p.875–881, 2004.