



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA - UnB FCE  
CURSO DE FARMÁCIA**

**LUCAS REIS DE OLIVEIRA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS SALADAS DE FOLHAS CRUAS E  
LEGUMES PRONTOS PARA CONSUMO DE UM RESTAURANTE DE UMA  
ESCOLA DE ENSINO DO SETOR PRIVADO DE BRASÍLIA**

**BRASÍLIA, DF**

**2016**

LUCAS REIS DE OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS SALADAS DE FOLHAS CRUAS E  
LEGUMES PRONTOS PARA CONSUMO DE UM RESTAURANTE DE UMA  
ESCOLA DE ENSINO DO SETOR PRIVADO DE BRASÍLIA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF

2016

LUCAS REIS DE OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS SALADAS DE FOLHAS CRUAS E  
LEGUMES PRONTOS PARA CONSUMO DE UM RESTAURANTE DE UMA  
ESCOLA DE ENSINO DO SETOR PRIVADO DE BRASÍLIA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire  
(Faculdade LS)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o maior dos orientadores, fonte de amor, força e perseverança, que até aqui me suportou para que este momento se tornasse real.

A minha família, meus pais Adriana e Marcos, que me apoiaram desde o ingresso na universidade, e tanto contribuem até o momento a favor do meu crescimento profissional e pessoal, eternamente grato pelo amor, apoio e compreensão.

A minha namorada, Jessica Vick, que fez desta reta final um caminho mais fácil de trilhar, obrigado por todo companheirismo, incentivo e amor. A todos meus amigos que desde o início compartilham comigo a experiência da universidade, e que se fizeram presentes nos momentos em que mais precisei, os meus agradecimentos pela parceria e amizade sempre.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

As minhas queridas orientadoras Dr<sup>a</sup>. Daniela Castilho Orsi e Dr<sup>a</sup> Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por não terem medido esforços em me ajudar nesse trabalho, pela atenção, paciência, sabedoria, amizade e colaboração, por todos os ensinamentos, muito obrigado.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Francisco Cândido Xavier

## RESUMO

Neste trabalho, foi realizada a avaliação microbiológica de seis amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para consumo de um restaurante de uma escola de ensino do setor privado de Brasília. Os resultados mostraram que uma amostra (vinagrete) estava imprópria para o consumo, devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. (confirmada por genotipagem). As amostras apresentaram contagens aceitáveis de bactérias aeróbias mesófilas variando de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/g (com exceção da amostra de cenoura fatiada que apresentou contagem elevada de  $10^7$  UFC/g). Todas as amostras apresentaram baixa enumeração de coliformes totais variando de  $10^1$  a  $10^2$  NMP/g e enumeração de coliformes termotolerantes menor que  $10^2$  NMP/g, estando de acordo com a legislação brasileira. Apesar do número aceitável de bactérias *Staphylococcus aureus* nas saladas de repolho e alface, salada de alface e vinagrete, a presença dessas mostrou condições higiênicas insatisfatórias por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana. E a região gênica *nuc* que foi identificada através de PCR indicou que as bactérias *S. aureus* eram produtoras de enterotoxinas. De forma geral, as amostras de saladas e legumes mostraram boas condições microbiológicas, mas a contaminação das amostras com cepas de *S. aureus* através de manipulação e a contaminação cruzada que ocorreu com a beterraba cozida podem ser evitadas através da revisão das Boas Práticas de Fabricação na cozinha.

**Palavras chave:** vegetais frescos, alimentos prontos para o consumo, Doenças Transmitidas por Alimentos, segurança microbiológica, PCR.

## ABSTRACT

In this work, it was carried out the microbiological evaluation of six raw salad leaves and vegetables ready-to-eat in a restaurant of a teaching school of the private sector of Brasilia. The results showed that the sample “vinagrete” was unfit for consumption due to the presence of *Salmonella* spp. (genotyping confirmed). The samples showed acceptable mesophilic aerobic bacteria counts ranging from  $10^4$  to  $10^5$  CFU / g (with the exception of the sample sliced carrot that showed high count of  $10^7$  CFU / g). All samples showed low enumeration of total coliforms ranging from  $10^1$  to  $10^2$  NMP / g and enumeration of thermotolerant coliforms less than  $10^2$  MPN / g and they were in accordance with Brazilian law. Despite the acceptable number of bacteria *Staphylococcus aureus* in cabbage and lettuce salad, lettuce salad and “vinagrete”, the presence of *S. aureus* showed unsatisfactory hygienic conditions because it is a coming bacterium of human manipulation. And the *nuc* gene region which was identified by PCR indicated that the bacteria *S. aureus* were enterotoxin producers. In general, samples of salads and vegetables showed good microbiological conditions, but contamination of samples with strains of *S. aureus* through manipulation and cross-contamination that occurred with the cooked beets can be avoided by revising the Good Manufacturing Practices in the kitchen.

**Key words:** fresh vegetables, ready-to-eat foods, foodborne diseases, microbiological safety, PCR.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	26
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos .....	30
<b>Tabela 3.</b> Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	31
<b>Tabela 4.</b> Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo.....	33
<b>Tabela 5.</b> Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo.....	35
<b>Tabela 6.</b> Detecção de <i>Salmonella spp.</i> e confirmação por PCR nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo.....	37
<b>Tabela 7.</b> Contagem das colônias no <i>Staphylococcus sp.</i> nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram).....	38
<b>Tabela 8.</b> Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo .....	40



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI..... 28
- Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*, *nuc* de *S. aureus* e *invA* de *Salmonella enterica*..... 42

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....</b>	<b>52</b>
---	-----------

## LISTA DE SIGLAS

DTA – Doença Transmitida por Alimento

BPF – Boas Práticas de Fabricação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

PCR – *Polymerese Chain Reaction*

NMP – Número Mais Provável

UFC – Unidade Formadora de Colônias

TSI – *Triple Sugar Iron*

PCA – *Plate Count Agar*

LB – Luria-Bertani

RPM – Rotação por Minuto

TBE – Tris-Ácido Bórico

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

## SUMÁRIO

1. Introdução com revisão de literatura.....	14
1.1. Refeições preparadas fora do domicílio e ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos.....	14
1.2. Prevenção de DTA associadas aos serviços de alimentação.....	15
1.3. Cuidados no preparo de saladas de folhas cruas e legumes nos serviços de alimentação.....	17
1.4. Principais bactérias envolvidas em doenças transmitidas por alimentos.....	18
1.5. Uso da biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos.....	20
Objetivo geral.....	22
2.1. Objetivos específicos.....	22
3. Justificativa.....	23
4. Materiais e métodos.....	24
4.1. Coleta das amostras.....	24
4.2. Análises microbiológicas.....	24
4.3. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano.....	28

4.4. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR.....	30
4.5. PCR qualitativo.....	31
4.6. Eletroforese em gel de agarose.....	32
5. Resultados e discussão.....	33
5.1. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas.....	33
5.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes ( <i>E. coli</i> ).....	34
5.3. Determinação da presença de <i>Salmonella</i> sp.....	36
5.4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp.....	37
5.5. Análises moleculares.....	39
6. Conclusões.....	43
7. Referencias bibliográficas.....	44

## 1. Introdução com revisão de literatura

### 1.1. Refeições preparadas fora do domicílio e ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos

Na segunda metade do século XX, houve uma intensa modificação no estilo de vida da população, movida por fatores como: urbanização e industrialização, melhora do nível econômico, aumento na participação da mulher no mercado de trabalho, aumento da distância entre o local de trabalho e a moradia e demanda elevada por alimentos prontos. Esses fatores aumentaram a necessidade da população por refeições preparadas fora do domicílio e incentivaram o crescimento do mercado de *food service*, termo utilizado para designar refeições preparadas fora do lar e que abrange cozinhas industriais, redes de *fast-food*, bares, restaurantes e similares, padarias e vendedores ambulantes (LAMBERT *et al.*, 2005; LEAL, 2010, SILVA JUNIOR, 2005).

A importância do mercado de *food service* na economia brasileira é enorme. No ano de 2012, esse mercado forneceu 11 milhões de refeições por dia, o volume diário de alimentos consumidos foi de 5,2 mil toneladas, com responsabilidade desse setor de gerar 195 mil empregos diretos (ABERC, 2013). Entre os anos de 2001 e 2010, esse mercado teve uma expansão de 235%, atingindo em 2012, um faturamento de R\$ 238 bilhões (ABRASEL, 2012).

Devido ao crescimento desse setor, observou-se uma maior preocupação com a ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), que frequentemente são associadas ao uso de serviços de alimentação. Segundo Germano e Germano (2008), esses serviços representam locais que têm se destacado na epidemiologia das DTA e que, embora, subestimadas em países como o Brasil, apresentam prevalência elevada. Dados do Ministério da Saúde (2012) apontam que em 2011, foram detectados 700 casos de DTA e que as residências foram os locais com a maior incidência (44,3%), seguido de restaurantes (15,3%) e creches/escolas (7,7%).

O termo Doença Transmitida por Alimento (DTA) é utilizado para designar doença causada pela ingestão de um alimento ou água contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, em quantidade suficiente

para o desenvolvimento de quadro patológico, tendo como principal porta de entrada a via oral. A sintomatologia é caracterizada por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreia, febre e dores abdominais (AGOSTINHO, 2013; BRASIL, 2001).

As DTAs são reconhecidas como um problema mundial de saúde pública, sendo que seus efeitos deletérios afetam a saúde e bem estar de um indivíduo ou de um coletivo e também trazem prejuízos econômicos. Assim, ocorrem danos à reputação da empresa, além de perdas econômicas ocasionadas por alimentos condenados ou deteriorados (AGOSTINHO, 2013; GERMANO e GERMANO, 2008).

A prevenção de DTA associada aos serviços de alimentação configura importante tarefa, sendo a busca de qualidade higiênico-sanitária uma ferramenta imprescindível para diminuir o risco de contaminação microbiológica e consequentemente, assegurar a saúde dos consumidores (PARK *et al.* , 2010).

## **1.2. Prevenção de DTA associadas aos serviços de alimentação**

Para a prevenção de DTA associada aos estabelecimentos comerciais é fundamental que os alimentos e refeições sejam preparados com qualidade. A qualidade do alimento segundo Guimarães *et al.* (2008) é uma característica multidimensional do alimento, sendo uma combinação de atributos microbiológicos, nutricionais e sensoriais. A segurança dos alimentos é um item decisivo para que o alimento tenha qualidade, ou seja, um alimento de qualidade é necessariamente seguro. A segurança dos alimentos significa garantir a ausência de perigos químicos, físicos e microbiológicos no alimento destinado ao consumo humano.

Na elaboração de alimentos seguros, é necessário que sejam implementadas ferramentas de qualidade como o programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF), que é composto por um conjunto de princípios e regras para o correto manuseio de alimentos, que abrange desde a recepção das matérias-primas até o produto final (SMANIOTO *et al.*, 2009). Para tanto, a RDC 216 (BRASIL, 2004) define que as BPF são procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação sanitária.

Considera-se que os manipuladores de alimentos estão envolvidos em todo o processo de controle de qualidade na cadeia produtiva dos alimentos. O termo

manipulador de alimentos é utilizado para indicar qualquer pessoa que tenha entrado em contato com o alimento, seja no plantio, colheita, preparo, produção e distribuição ou comercialização do mesmo (BRASIL, 2004). A participação do manipulador na cadeia epidemiológica das toxinfecções e demais doenças de origem alimentar tem sido vista com frequência (SOUZA *et al.*, 2007). Dessa forma, este profissional tem papel fundamental na prevenção das doenças de origem alimentar para a população que se alimenta fora do domicílio (GÓES *et al.*, 2001).

A higiene adequada das mãos é um ponto crítico na redução da contaminação em alimentos preparados. Muitas bactérias adquiridas dos alimentos crus e do ambiente podem ser facilmente removidas das mãos através da lavagem correta com água e sabão, aliado à utilização de um antisséptico apropriado e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pois somente a lavagem não seria suficiente para eliminar determinados patógenos, como é o caso dos estafilococos (LUES *et al.*, 2007). A superfície das mãos pode apresentar grande número de microrganismos patogênicos e quando não há uma adequada higienização, durante a manipulação de alimentos, estes podem ser contaminados com microrganismos capazes de causar DTA (LAGAGGIO, 2002, BRASIL, 2007).

Outro ponto crítico na redução da contaminação em alimentos preparados é a higienização correta de equipamentos, utensílios e bancadas, estes, com higienização deficiente, têm sido associados como fator contribuinte para a ocorrência de surtos de DTA (QUEIROZ, 2007; MASSAUT, 2008). A limpeza reduz grande parte da carga microbiana das superfícies. Ainda assim, o processo de sanitização é indispensável, tornando a eficácia dos compostos de limpeza e de sanitização, utilizados nas superfícies, fatores determinantes do sucesso do processo de higienização (MASSAUT, 2008). O fato de que patógenos como *Salmonella*, *S. aureus* e *E. coli* encontram-se adaptados para sobreviver por muitos dias nas superfícies e equipamentos os tornam potenciais fontes de contaminação cruzada (AYÇIÇEK *et al.*, 2004).

### **1.3. Cuidados no preparo de saladas de folhas cruas e legumes nos serviços de alimentação**

Apesar dos benefícios para a saúde trazidos pelo consumo de vegetais frescos, o risco de contaminação microbiológica nesses produtos é preocupante.



Muitos surtos e doenças transmitidas por alimentos têm sido relatados e associados ao consumo de vegetais frescos contaminados (GOODBURN e WALLACE, 2013; LYNCH *et al.*, 2009; MAFFEI *et al.*, 2013).

Vegetais frescos podem ser contaminados com quaisquer microrganismos patogênicos ou deterioradores através das práticas de cultivo, manipulação e processamento. O produto é cultivado no ambiente natural e, por conseguinte, vulnerável à contaminação a partir de muitas fontes: por exemplo, a partir do solo; da água de irrigação; de animais; de pessoal e equipamentos de colheita e tratamento pós-colheita e distribuição. Como são produtos frescos, na maioria das vezes não há adição de métodos de conservação, e assim, existe um maior risco para as populações microbianas contaminarem e deteriorarem os produtos (GOODBURN e WALLACE, 2013; HANNING e RICKE, 2009; TOURNAS, 2005).

As seguintes bactérias patogênicas de interesse já foram identificadas em vegetais crus: *Salmonella* spp, *Shigella* spp., *E. coli*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., além de vírus e parasitas diversos (GOODBURN e WALLACE, 2013; HANNING e RICKE, 2009; TOURNAS, 2005).

Preconiza-se que os vegetais frescos sejam lavados em água corrente limpa e sanitizados com agentes desinfetantes antes do consumo. Entre as recomendações para higienização de vegetais folhosos, estão as seguintes operações: separar as folhas, lavar em água corrente para remoção de resíduos, deixar em imersão em solução sanitizante pelo tempo recomendado e enxaguar com água corrente limpa. Atualmente o cloro na forma de solução de hipoclorito de sódio é o agente desinfetante mais utilizado na sanitização de hortaliças frescas. Para o cloro ser eficaz, precisa de ser usado em concentrações entre 50 e 200 ppm em pH <8 e estar em contato com o produto durante pelo menos 5 a 10 minutos (BEUCHAT *et al.*, 2004 a, BEUCHAT *et al.*, 2004 b; ERICKSON, 2012; GOODBURN e WALLACE, 2013).

A ação germicida do hipoclorito de sódio se deve a sua reação com as proteínas da membrana das células microbianas, levando a lise e morte celular (ANTONIOLLI *et al.*, 2005). Dentre as vantagens do uso de compostos à base de cloro, destacam-se o seu largo espectro bacteriano e eficiência em águas duras. Como desvantagens pode-se mencionar a alteração do aroma de frutas quando em concentrações elevadas e pouca eficácia em pH >8 (BEUCHAT *et al.*, 2004).

A frequência de implicação das frutas e vegetais em surtos e DTA levantou uma série de questões sobre a eficácia dos procedimentos de desinfecção desses produtos. Existem muitos fatores que afetam a desinfecção, tais como a colonização bacteriana inicial sobre a superfície do produto, a contaminação com diferentes patógenos, o tipo de tratamento, o tipo de desinfetante e o tempo e temperatura de exposição ao desinfetante (BEUCHAT *et al.*, 2004 a, BEUCHAT *et al.*, 2004 b; ERICKSON, 2012).

#### **1.4. Principais bactérias envolvidas em doenças transmitidas por alimentos**

No Brasil, a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) que estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, determina para hortaliças in natura ausência de *Salmonella* em 25 g e limite de coliformes termotolerantes de  $1,0 \times 10^2$  NMP/g. Para saladas, estabelece-se também, limite de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g para *S. aureus*.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e bioquimicamente são lactose e sacarose negativos, porém tem a capacidade de fermentar a glicose e produzir gás (FRANCO e LANDGRAF, 2008). *Salmonella* spp. é considerada a principal bactéria que causa doença entérica de origem bacteriana no ser humano, sendo responsável por grandes surtos de origem alimentar. Esse gênero é capaz de desencadear doenças como a febre tifoide, febre paratifoide e febres entéricas (D'AOUST, 2007). Seu habitat é no trato intestinal de animais e seres humanos. Sua principal via de transmissão é pelos alimentos que podem ser contaminados direta ou indiretamente pelas fezes dos animais portadores da bactéria, pelos utensílios utilizados no preparo do alimento, equipamentos e/ou pelo contato com águas poluídas (CARVALHO, 2006).

Os coliformes termotolerantes pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são bastonetes gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose em temperaturas de 44 - 46°C em um período de 24 - 48 horas. Esse grupo de microrganismos também é conhecido como coliformes fecais, por compreender apenas as bactérias originárias do trato gastrointestinal de seres humanos e de animais de sangue quente. Deste grupo de microrganismos, a bactéria *Escherichia coli* é a representante de maior relevância em alimentos.

Algumas cepas desta espécie possuem potencial patogênico, causando DTA. Desta forma, a presença elevada de coliformes termotolerantes no alimento revela condições higiênicas insatisfatórias, com contaminação de origem fecal (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos dispostos em cachos de uva, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e catalase positivos (GERMANO; GERMANO, 2008; JAY, 2005). O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria de grande importância nos surtos de intoxicações alimentares. Habita a nasofaringe humana e assim tem grande acesso as mãos do hospedeiro para então contaminar os alimentos. A falta de higiene do manipulador infectado pode facilmente contaminar o alimento. Dessa forma, os portadores humanos, mesmo que em condições normais de saúde, sempre representam perigo quando lidam com alimentos, pois podem contaminá-los durante as diferentes etapas de preparo, através das mãos e secreções oro nasais (FRANCO e LANDGRAF, 2008; GERMANO; GERMANO, 2008).

O patógeno está presente em 30% da população humana, onde um a dois terços destes possuem cepas enterotoxigênicas produtoras de toxina proteica termoestável. As enterotoxinas estafilocócicas têm a capacidade de se manterem ativas em certos alimentos mesmo após passarem por processamento térmico, pois graças a sua termoestabilidade conseguem resistir a uma temperatura de 100°C por 30 minutos (BENNETT, 2005, FRANCO e LANDGRAF, 2008). Segundo Franco e Landgraf (2008) é necessário que a população de *Staphylococcus aureus* seja de pelo menos  $10^5$  UFC/g no alimento para que haja a formação da toxina em níveis capazes de causar intoxicação alimentar.

### **1.5. Uso da biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos**

A fundamentação das técnicas microbiológicas para alimentos baseiam-se em testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros e espécies microbianas. As técnicas microbiológicas mais comuns de diferenciação utilizam meios de cultivo seletivos complementados com testes bioquímicos e sorológicos (GANDRA *et al.*, 2008).

Testes bioquímicos podem apresentar uma grande variabilidade de resultados, visto que fatores ambientais influenciam a expressão genética dos microrganismos, aumentando o risco de interpretações errôneas. O aumento na quantidade de testes bioquímicos diminui sua variabilidade e possíveis erros, porém, eleva o custo financeiro (FARBER *et al.*, 2001).

As técnicas tradicionais de detecção de microrganismos apesar de eficientes e confiáveis, requerem bastante tempo para a obtenção dos resultados. Além disso, a variabilidade fenotípica por onde as bactérias são identificadas e diferenciadas, pode não ser expressa, dificultando ou impossibilitando a identificação e também ocorre a chance de obter células viáveis, porém não cultiváveis (MARIN *et al.*, 2006).

Pode-se notar um aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para identificação de microrganismos nas últimas décadas, devido ao avanço nos estudos na área de biologia molecular. Essas técnicas se baseiam na caracterização de DNA cromossomal, plasmidial ou total de microrganismos (GANDRA *et al.*, 2008).

Entre as técnicas de identificação molecular, destaca-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullins em 1985. Essa técnica de identificação, altamente sensível, baseia-se em duplicações de pequenas quantidades de sequência de DNA específico presente em um conjunto complexo. As sequências de DNA são enzimaticamente amplificadas até obtenção de milhões de cópias do segmento específico por meio da enzima Taq DNA polimerase e de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) sobre um DNA molde. A técnica de PCR é realizada em equipamentos automatizados e computadorizados chamados termocicladores, que promovem a alternância de temperatura em tempos definidos, possibilitando a ocorrência de ciclos de desnaturação e síntese de DNA (KONEMAM *et al.*, 2001).

A introdução da PCR na identificação microbiológica em alimentos trouxe diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais, tais como, maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade e especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (GANDRA *et al.*, 2008).

A técnica da PCR tem aplicação direta na identificação de patógenos nos alimentos, porém quando se utiliza um elevado número de determinações microbiológicas, o custo para a utilização da técnica se torna muito elevado (MARIN *et al.*, 2006). Além disso, há alguns obstáculos que dificultam a implementação deste método na rotina laboratorial, entre eles: a complexidade do método para as análises de rotina, a incapacidade de diferenciar células vivas de células mortas, a presença de inibidores da Taq polimerase em alguns alimentos, o alto investimento em equipamentos e reagentes e ainda a falta de aprovação e regulamentação desse método por parte dos órgãos competentes (GANDRA *et al.*, 2008; MARLONY *et al.*, 2003).

## 2. Objetivo geral

O presente trabalho de pesquisa teve como principal objetivo avaliar a qualidade microbiológica das saladas de folhas cruas e legumes prontos para consumo de um restaurante de uma escola de ensino do setor privado de Brasília.

### 2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica das saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo através das análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus sp.* e pesquisa de *Salmonella sp.*.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos patogênicos.

### **3. Justificativa**

Apesar dos benefícios para a saúde trazidos pelo consumo de vegetais frescos, o risco de contaminação microbiológica nesses produtos é preocupante. Muitos surtos e doenças transmitidas por alimentos têm sido relatados e associados ao consumo de vegetais frescos contaminados. Com o estilo de vida moderno, aumentou a necessidade da população por refeições preparadas fora do domicílio, sendo parte da rotina de muitas pessoas almoçarem em restaurantes. A prevenção de doenças transmitidas por alimentos associadas aos serviços de alimentação configura importante tarefa, sendo a busca de qualidade higiênico-sanitária uma ferramenta imprescindível para diminuir o risco de contaminação microbiológica e conseqüentemente, assegurar a saúde dos consumidores. Assim, este trabalho avaliou a qualidade microbiológica das saladas de folhas cruas e legumes prontos para consumo de um restaurante de uma escola de ensino do setor privado de Brasília e verificou se esses alimentos estavam seguros para o consumo.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Coleta das amostras**

O local de estudo escolhido foi um restaurante por quilo de uma escola de ensino do setor privado de Brasília. Segundo informações coletadas no local, as amostras foram sanitizadas com hipoclorito de sódio, antes de serem picadas ou fatiadas. As amostras coletadas foram seis tipos de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo (salada de alface picada em pedaços, salada de repolho fatiado e alface picada em pedaços, tomate fatiado em rodela, cenoura fatiada em tiras finas, vinagrete de tomate e cebola cortados em cubos e beterraba cozida cortada em cubos). As amostras foram coletadas nos aparadores já prontas para servir, porém antes do restaurante estar aberto ao público. As amostras coletadas em recipientes previamente esterilizados foram acondicionadas em caixa térmica com gelo, para manter a temperatura de resfriamento. Em seguida, as amostras foram levadas ao laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, não excedendo uma hora entre o período de coleta e o início das análises das mesmas.

### **4.2. Análises microbiológicas**

Para o preparo das amostras, foram pesadas, assepticamente, 25 g de cada amostra e diluídas em 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se desta forma a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).



A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra. A determinação do NMP de microrganismos é baseada no princípio de que, numa amostra líquida as bactérias podem ser separadas por agitação, resultando numa suspensão em que as células estejam uniformemente distribuídas. A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra (FENG *et al.*, 2002).

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 ml de cada diluição em uma série de 3 tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v) ) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais (FENG *et al.*, 2002).

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG *et al.*, 2002).

**Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%**

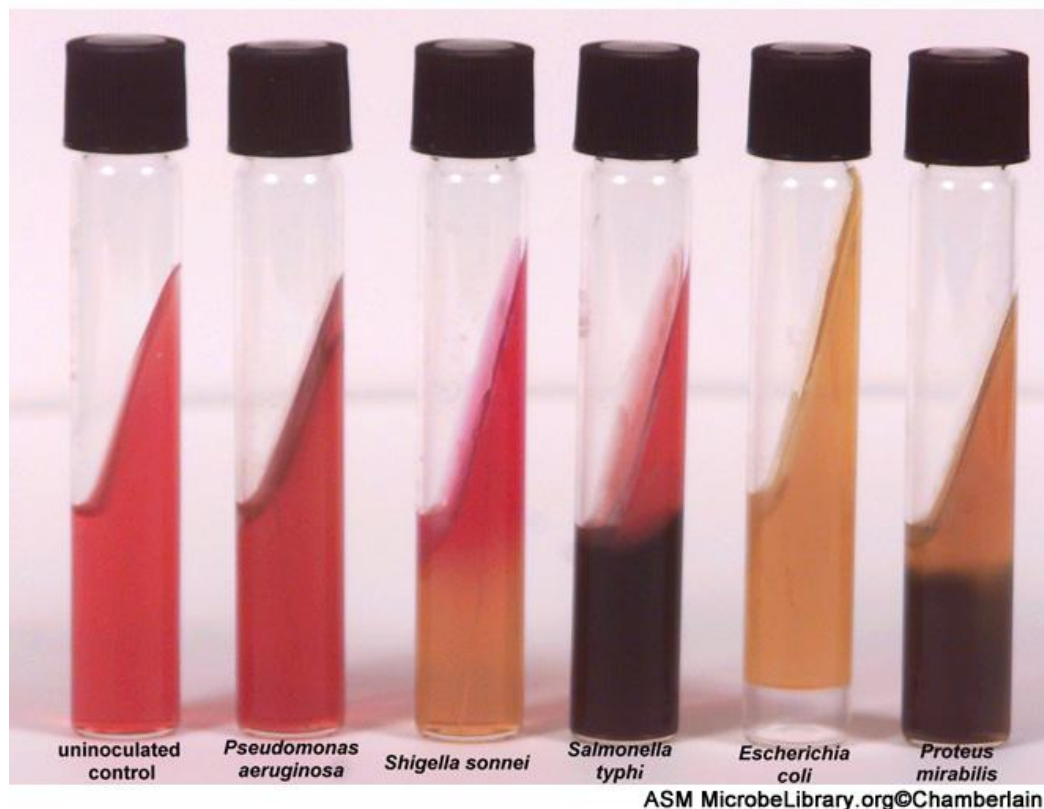
Tabela para 3 tubos, cada um com inoculo de 0.1, 0.01 e 0.001 ml, os NMPs por grama e os intervalos de confiança a 95%.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

FONTE: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>

Para a pesquisa de *Salmonella* sp., a diluição  $10^{-1}$  das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio ágar *Salmonella Shigella* (Ágar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar Salmonella Shigella para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo ágar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o microrganismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010).

No ágar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás ( $CO_2$ ) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os microrganismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 1). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de  $H_2S$  como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.



**Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).**

Para a contagem de *Staphylococcus* sp., as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em ágar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48 horas. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

#### **4.3. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano**

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de alimentos e cultivadas por 12 horas em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit *NucleoSpin Food Kit* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações.

Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão *Elution Buffer CE* pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

#### 4.4. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* ssp. foi realizada conforme busca na literatura e optou-se por três regiões gênicas específicas, para os quais os oligonucleotídeos foram desenhados no presente estudo.

Para identificar *E. coli* optou-se pela região gênica específica *EutC* (anotação descrita para região gênica que codifica a etanolamina amônia liase em *E. coli*). Para identificar *S. aureus* optou-se pela região gênica específica *nuc* (anotação descrita para região gênica que codifica uma nuclease termostável do *S. aureus*). E para identificar *Salmonella* sp. optou-se pela região gênica específica *invA* (anotação descrita para região gênica que codifica proteínas relacionadas com invasão celular).

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ANEXO 2), foram desenhados os oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos *primers* estão listados na Tabela 3.

**Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos**

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
T <sub>m</sub> do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a

formação de dímeros, dobramento (hairpin) e  $\Delta G$  de formação de híbridos. Os *primers* específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo**

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Produto estimado	Espécie
nuc_F	TGTTTGTGATGCATTTGCTG	105 pb	<i>S. aureus</i>
nuc_R	AAAGGGCAATACGCAAAGAG		
invA_F	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>Salmonella*</i>
invA_R	CGACAAGACCATCACCAATG		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		

\**Salmonella enterica subsp. enterica*

#### 4.5. PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne<sup>®</sup> modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA<sup>®</sup>).

#### **4.6. Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início usou-se a voltagem de 50 V, após começar a correr o gel, aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pB (pares de bases). Foi adicionado 3  $\mu$ L de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7  $\mu$ L de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (sua função é de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).



## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas

Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas em Alimentos – ICMSF (2016), o indicador microbiológico mais comumente utilizado para certificar a qualidade dos alimentos é o número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados nos mesmos, pois esse indica se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados adequadamente.

A tabela 4 apresenta as contagens totais de bactérias aeróbias mesófilas nas seis amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo analisadas neste estudo. Os resultados foram expressos como médias de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) e como log de UFC/g com o desvio padrão.

**Tabela 4. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo**

Amostras	Bactérias mesófilas	
	UFC/g	log UFC/g ± DP
Salada de alface	2,0x10 <sup>5</sup>	5,23 ± 0,35
Salada de repolho e alface	8,5x10 <sup>5</sup>	5,88 ± 0,28
Tomate fatiado	2,3x10 <sup>4</sup>	4,17 ± 0,42
Cenoura fatiada	1,0x10 <sup>7</sup>	7,00 ± 0,00
Vinagrete	4,7x10 <sup>5</sup>	5,47 ± 0,49
Beterraba cozida em cubos*	3,0x10 <sup>5</sup>	----

\* somente uma placa apresentou colônias; os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

Embora a legislação brasileira não estabeleça limites para a contagem total de microrganismos aeróbios nos alimentos, pelos padrões estabelecidos pela ICMSF (2016) a quantidade máxima para contagem de microrganismos totais para alimentos em geral é de 1,0x10<sup>7</sup>UFC/g. Segundo Silva *et al.* (2007) uma contagem

aceitável para mesófilos aeróbios em vegetais frescos sanitizados é de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, pois de acordo com a ICMSF (2016) a sanitização dos vegetais frescos deve remover parte da microbiota inicial, diminuindo sua contagem para cerca de  $10^5$  UFC/g. Ao analisar os dados obtidos na tabela 2, as amostras apresentaram contagens aceitáveis de bactérias aeróbias mesófilas variando de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/g (com exceção da amostra de cenoura fatiada que apresentou contagem elevada de  $10^7$  UFC/g).

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por Nguz *et al.* (2005), onde 75% dos vegetais orgânicos frescos recém cortados e sanitizados apresentaram contagem de bactérias mesófilas entre  $10^3$  a  $10^5$  UFC/g. No trabalho de Rodriguez *et al.* (2011) as saladas de alface prontas para o consumo coletadas de restaurantes situados dentro de hospitais na Espanha também apresentaram contagem de bactérias aeróbias mesófilas menores que  $10^5$  UFC/g.

A beterraba cozida em cubos apresentou crescimento bacteriano em apenas uma placa. O processo de cozimento pelo qual a beterraba foi submetida eliminou a carga bacteriana inicial e isso se deve a instabilidade que a alta temperatura e pressão causam na parede bacteriana levando a lise e morte celular (FLEURI e SATO, 2005; PEREIRA *et al.*, 2004). Essa única amostra de beterraba com crescimento bacteriano sugere contaminação cruzada, onde essa amostra deve ter tido contato com algum utensílio ou local utilizado para o preparo de outro vegetal no momento do preparo das saladas.

## **5.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes (*E. coli*)**

Coliformes totais são pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e tem como características serem bacilos gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, capazes de crescer na presença de sais biliares e que, a partir da fermentação da lactose, produzem gás e ácidos a  $35^\circ\text{C}$ , em 24 a 48 horas. Altas contagens de coliformes totais em alimentos são fatores negativos de qualidade indicando falhas na higiene ao longo do processamento, aumentando a possibilidade de ocorrência de microrganismos patogênicos entéricos (FRANCO & LANDGRAF, 2008; SANTOS 2008).

Os coliformes termotolerantes são pertencentes à microbiota intestinal tanto humana quanto de outros animais homeotérmicos e atuam como indicadores de poluição fecal. Os coliformes termotolerantes são capazes de fermentar lactose e produzir gás quando incubados em temperaturas mais elevadas ( $45\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) e esse grupo é constituído majoritariamente por *E. coli* (90%). A presença de coliformes termotolerantes evidencia o risco da presença de microrganismos patogênicos de origem fecal (FRANCO & LANGRAF, 2008; SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2007).

A tabela 5 apresenta a determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de saladas de folhas cruas e legumes analisados nesse estudo.

**Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo**

Amostras	Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g $\pm$ DP	NMP/g	Log NMP/g $\pm$ DP
Salada de alface	$5,6 \times 10^2$	$2,24 \pm 0,83$	ND	ND
Salada de repolho e alface	$4,2 \times 10^2$	$2,22 \pm 0,75$	$2,5 \times 10^1$	$1,39 \pm 0,07$
Tomate fatiado	$2,3 \times 10^1$	$1,32 \pm 0,26$	$2,1 \times 10^1$	$1,28 \pm 0,21$
Cenoura fatiada	$8,1 \times 10^2$	$2,82 \pm 0,38$	$1,9 \times 10^1$	$1,21 \pm 0,30$
Vinagrete	$7,4 \times 10^2$	$2,54 \pm 0,86$	ND	ND
Beterraba cozida em cubos	$1,3 \times 10^1$	$0,95 \pm 0,46$	$1,3 \times 10^1$	$0,95 \pm 0,57$

**ND = não detectado; os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.**

Os resultados deste estudo mostraram que todas as amostras apresentaram baixa enumeração de coliformes totais variando de  $10^1$  a  $10^2$  NMP/g e enumeração de coliformes termotolerantes menor que  $10^2$  NMP/g. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece o valor limite de  $1,0 \times 10^2$  NMP/g para enumeração de coliformes termotolerantes nas saladas prontas para o consumo em restaurantes.

Neste estudo, quatro amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo, ou seja, 67% das amostras apresentaram coliformes termotolerantes, porém em pouca quantidade. No estudo posterior de biologia

molecular, algumas amostras tiveram a presença confirmada de *E. coli*. Resultados similares foram obtidos no estudo de Nguz *et al.* (2005), onde analisaram-se 60 amostras de vegetais orgânicos frescos e sanitizados e 24 amostras (40%) apresentaram *E. coli*, porém essa contagem foi baixa (média de 1,3 log UFC/g). No estudo de Maffei *et al.* (2013), 40% dos vegetais frescos analisados apresentaram contagens de *E. coli* entre  $10^1$  a  $10^2$  UFC/g. No trabalho de Rodriguez *et al.* (2011), das 15 amostras de saladas de alface prontas para o consumo coletadas em restaurantes situados dentro de hospitais na Espanha, somente 5 amostras (3%) apresentaram *E. coli* e as contagens foram menores que  $10^1$  UFC/g.

### **5.3. Determinação da presença de *Salmonella sp.***

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae* e as bactérias são bacilos gram-negativos, não fermentadores de lactose (em geral são sacarose e lactose negativos), porém fermentadores de glicose com produção de gás. Essas bactérias são colonizadoras do trato intestinal humano e de outros mamíferos. A contaminação dos alimentos por *Salmonella* é proveniente de contaminação fecal do alimento, da água que entra em contato com o alimento ou por condições higiênicas não satisfatórias de preparo e manuseio do alimento (GUIMARÃES *et al.*, 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2008). Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2001) o resultado da determinação de *Salmonella sp.* nos alimentos deve ser expresso como Presença ou Ausência na amostra analisada.

A Tabela 6 apresenta os resultados deste estudo para a pesquisa de *Salmonella spp.* nas amostras de saladas de folhas cruas e legumes analisadas.

**Tabela 6. Detecção de *Salmonella spp.* e confirmação por PCR nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo**

<b>Amostras</b>	<b>Ágar TSI*</b>	<b>Resultados do PCR</b>
	<b>Suspeita de <i>Salmonella spp.</i></b>	
<b>Salada de alface</b>	AUSENTE	-----
<b>Salada de repolho e alface</b>	AUSENTE	-----
<b>Tomate fatiado</b>	AUSENTE	-----
<b>Cenoura fatiada</b>	AUSENTE	-----
<b>Vinagrete</b>	PRESENTE	<i>Salmonella spp.</i>
<b>Beterraba cozida em cubos</b>	AUSENTE	-----

\* **Ágar TSI (Três Açúcares e Ferro) = Superfície de meio vermelho e base amarela ou com pigmento preto.**

Dos seis tipos de amostras analisadas nesse presente estudo, apenas o vinagrete estava contaminado com *Salmonella spp.* e portanto estava impróprio para o consumo humano. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece que hortaliças, legumes e similares estejam livres de contaminação por *Salmonella spp.* Resultados similares foram obtidos no estudo de Christison *et al.* (2008), onde foram analisadas 35 amostras de saladas variadas prontas para o consumo em restaurantes tipo “delicatessen” na cidade de Joanesburgo, África do Sul, e obteve-se 4 amostras (16%) contaminadas com *Salmonella spp.* No estudo de Nguz *et al.* (2005), de 60 amostras dos vegetais orgânicos frescos e sanitizados analisados, 8 amostras (13%) apresentaram *Salmonella spp.*

#### **5.4. Contagem de *Staphylococcus sp.***

A Tabela 7 apresenta os resultados da contagem de bactérias *Staphylococcus sp.* nas amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo analisadas neste estudo. Os resultados foram expressos como médias de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) e como log de UFC/g com o desvio padrão.

**Tabela 7. Contagem das colônias no *Staphylococcus sp.* nas saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram)**

Amostras	<i>Staphylococcus sp.</i>	
	UFC/g	log UFC/g ± DP
Salada de alface	6,5x10 <sup>2</sup>	2,81± 0,52
Salada de repolho e alface	8,0x10 <sup>2</sup>	2,90 ± 0,57
Tomate fatiado	ND	----
Cenoura fatiada*	4,0x10 <sup>2</sup>	----
Vinagrete	4,7x10 <sup>2</sup>	2,67 ± 0,50
Beterraba cozida em cubos*	1,0x10 <sup>2</sup>	----

\* Somente uma placa apresentou colônias; ND = não detectado.

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece o valor limite de 1,0x10<sup>3</sup> UFC/g para contagem de *Staphylococcus aureus* nas saladas prontas para o consumo em restaurantes. A contagem de *S. aureus* em números inferiores a 1,0x10<sup>3</sup> UFC/g, normalmente, indica condições higiênicas inapropriadas e/ou processamento deficiente, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada (SIMON e SANJEEV, 2007).

Os resultados deste estudo mostraram que cinco amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo, ou seja, 84% das amostras apresentaram cepas de *S. aureus*. Porém todas as amostras estavam de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), com contagem de colônias de *S. aureus* inferiores a 1,0x10<sup>3</sup>UFC/g. No estudo posterior de biologia molecular, algumas amostras foram testadas e foram geneticamente confirmadas como *S. aureus*.

Resultados similares foram obtidos no estudo de Christison *et al.* (2008), onde foram analisadas 35 amostras de saladas variadas prontas para o consumo em restaurantes tipo “delicatessen” na cidade de Joanesburgo, África do Sul, e todas as amostras estavam contaminadas com cepas de *S. aureus*, com contagem média de colônias 2 log UFC/g.

Resultados mais preocupantes foram encontrados no estudo de Dolinger *et al.* (2010), onde três amostras de saladas comercializadas em restaurantes *self-*

*service* do estado de Goiás apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira. No estudo de Junqueira *et al.* (2009), das 31 amostras de saladas coletadas de restaurantes *self-service* na cidade do Rio de Janeiro, 10 amostras (32,2%) apresentaram contagens de *S. aureus* acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g e esses resultados indicaram precárias condições de manipulação.

A contaminação dos alimentos por *Staphylococcus aureus* ocorre muito provavelmente devido à transferência deste microrganismo para os alimentos através dos manipuladores, como exposto por Machado *et al.* (2009) que isolaram *S. aureus* das mãos e cavidades nasais de manipuladores de alimentos.

## 5.5. Análises moleculares

No presente estudo, as colônias isoladas suspeitas de serem *Escherichia coli* provenientes das amostras de saladas e legumes foram testadas, sendo que após as análises moleculares algumas colônias foram geneticamente confirmadas como *E. coli* e estavam presentes na salada de repolho e alface, beterraba e cenoura (Figura 2). Algumas colônias suspeitas de serem *S. aureus* provenientes das amostras de saladas e legumes foram analisadas e após as análises moleculares algumas colônias foram geneticamente confirmadas como *S. aureus* e estavam presentes nas amostras de salada de repolho e alface, vinagrete e salada de alface. E por fim, a colônia de bactéria isolada suspeita de ser *Salmonella* proveniente da amostra vinagrete foi testada e após análise molecular foi geneticamente confirmada como *Salmonella enterica subsp. enterica* (Figura 2, banda apontada por uma seta).

A Tabela 8 apresenta a identificação das colônias através da técnica de PCR e as amostras de onde essas bactérias foram isoladas. É digno de nota que há resultados que precisam ser reavaliados, identificados por não confirmado e que a amplificação da amostra de *Salmonella* pode ser ajustada para uma banda com melhor visualização em gel de agarose.

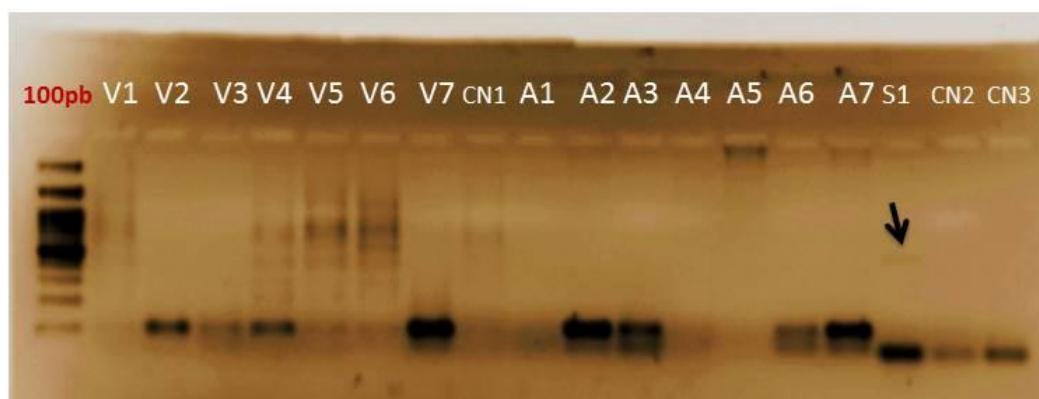
**Tabela 8. Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para o consumo.**

<b>Número da colônia</b>	<b>Amostra</b>	<b>Resultado molecular</b>
V1	Tomate fatiado	Não era <i>E. coli</i>
V2	Salada de repolho e alface	<i>Escherichia coli</i>
V3	Beterraba cozida em cubos	Não era <i>E. coli</i>
V4	Beterraba cozida em cubos	<i>Escherichia coli</i>
V5	Cenoura fatiada	Não era <i>E. coli</i>
V6	Cenoura fatiada	Não era <i>E. coli</i>
V7	Cenoura fatiada	<i>Escherichia coli</i>
CN1	Controle negativo <i>E. coli</i>	----
A1	Salada de repolho e alface	Não era <i>S. aureus</i>
A2	Salada de repolho e alface	<i>S. aureus</i>
A3	Vinagrete	<i>S. aureus</i>
A4	Vinagrete	Não era <i>S. aureus</i>
A5	Beterraba cozida em cubos	Não era <i>S. aureus</i>
A6	Salada de alface	<i>S. aureus</i>
A7	Salada de alface	<i>S. aureus</i>
S1	Vinagrete	<i>Salmonella enterica</i>
CN2	Controle negativo <i>S. aureus</i>	-----
CN3	Controle negativo <i>Salmonella</i>	-----

Fonte: próprio autor, 2016.



**Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*, *nuc* de *S. aureus* e *invA* de *Salmonella enterica*. Marcador de 100 pb; V1 a V7 = amostras deste estudo testadas para amplicons de *EutC* (113 pb); A1 a A7 = amostras deste estudo testadas para amplicons de *nuc* (105 pb); S1= amostra deste estudo com amplicons de *invA* (445 pb) e CN 1 a 3 = Controle Negativo.**



Foi possível observar na Figura 2 que houve amplificação da região gênica *EutC* em algumas colônias suspeitas de serem *E. coli*. Essa é a região que codifica a enzima etanolamina amônia liase em *E. coli*. A sequência utilizada nesse estudo é específica para detecção de *E. coli* e referenciada na literatura por Wang *et al.* (1997) como uma região promotora do gene *malB* (sistema de maltose) e pode ser adotada para identificar qualquer sorotipo desta espécie.

A etanolamina amônia liase é uma enzima que pertence às vias dependentes de vitamina B12 em bactérias. A utilização de etanolamina como fonte única de carbono e energia requer vitamina B12 para as funções de indutor da via catabólica e cofator da enzima etanolamina amônia liase. Etanolamina amônia liase é a primeira enzima da via que converte etanolamina a acetaldeído e amônia, sendo que acetaldeído serve como fonte de carbono e energia ao ser convertido em acetil-coA e a amônia serve como fonte de nitrogênio. A etanolamina é facilmente encontrada na natureza, pois está presente nos fosfolipídios das membranas celulares como a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina (PAIVA, 2010).

Apesar do número aceitável de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de salada de repolho e alface, salada de alface e vinagrete, a região *nuc*

foi identificada através de PCR nas amostras. A região gênica *nuc* mostra forte correlação com a produção de enterotoxinas e no estudo de Tamarapu *et al.* (2001) foi proposto usar a região gênica *nuc* para identificar *S. aureus* produtora de enterotoxinas. Assim, a presença de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras mostrou condições higiênicas insatisfatórias por se tratar de uma bactéria relacionada com manipulação errada. E o gene *nuc* indicou que as bactérias *Staphylococcus aureus* eram produtoras de enterotoxinas.

A região gênica *invA* foi amplificada na colônia suspeita de ser *Salmonella* spp. As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* sp. (*Salmonella* Patogenicity Island, SPI) são grandes regiões do cromossomo (10 a mais de 100 Kb) que codificam vários fatores de virulência. Estas ilhas estão ausentes em estirpes não patogênicas da mesma espécie, apresentam conteúdo de guanidina e citosina (G e C) diferente do restante do cromossomo e frequentemente estão localizadas adjacentes a genes que codificam RNA transportador (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Ao todo já foram descritas 17 SPIs, algumas são conservadas para o gênero, enquanto outras são específicas para determinados sorotipos, como exemplo, SPI-1 está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies e sorotipos de *Salmonella enterica*. Já a ilha SPI-7 é específica para os sorotipos *Typhi*, *Dublin* e *Paratyphi C*. Na SPI-1 estão localizados genes necessários para invasão, característica importante para virulência de *Salmonella enterica*. Dentre as ilhas de patogenicidade SPI – 1 é a melhor caracterizada. O operon *Inv* (*invasibility*) presente na SPI-1 é composto de sete genes *invABCDEFG*. O gene *invA* é o primeiro no operon, e desempenha função importante na invasão de células epiteliais. Sorotipos de *Salmonella enterica* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invABC*, tornando-os impossibilitados de invadir células de mamíferos. Por isso, o gene *invA* parece ser bastante conservado em todos os sorotipos de *Salmonella*, sendo o gene utilizado para sua detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

## 6. Conclusões

Neste trabalho, os resultados da avaliação microbiológica de seis amostras de saladas de folhas cruas e legumes prontos para consumo de um restaurante de uma escola de ensino do setor privado de Brasília, mostraram que uma amostra (vinagrete) estava imprópria para o consumo, devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente). De forma geral, as amostras de saladas e legumes mostraram boas condições microbiológicas, mas o cuidado em não contaminar as amostras com cepas de *S. aureus* através de manipulação errada e também evitar contaminação cruzada como ocorreu com a beterraba cozida e cortada em cubos pode ser melhorado através da revisão das Boas Práticas de Fabricação na cozinha.

## Referencias bibliográficas

ABERC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE REFEIÇÕES COLETIVAS, **História e mercado**. Disponível em: <<http://www.aberc.com.br>>. Acesso em: 06 maio 2016.

ABRASEL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BARES E RESTAURANTES, Disponível em: <http://www.abrasel.com.br/noticias/1612-230812-alimentacao-fora-do-lar-deve-crescer-mais-de-seis-vezes-acima-do-pib.html>, Acesso em: 23/05/16.

AGOSTINHO, T. M. S. **Perfil do risco sanitário de alimentos comercializados em feiras especiais de Goiânia-GO**, Tese (Mestrado), UFG, 116 p., 2013.

ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. S. M.; BORGES, M. F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 157 - 160, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde**, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

AYÇIÇEK, H.; AYDOGAN, H.; KUÇUKKARAASLAN, A.; BAYSALLAR, M.; BASUSTAOGLU, A. C. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. **Food Control**, v.15, p.253-259, 2004.

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1264-1270, 2005.

BEUCHAT, L. R.; ADLER, B. A.; LANG, M. M. Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1238-1242, 2004 a.

BEUCHAT, L. R.; PETTIGREW, C. A.; TREMBLAY, M. E.; ROSELLE, B. J.; SCOUTEN, A. J. Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial fruit and vegetable sanitizer to vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1702-1708, 2004 b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Higienização das mãos em serviços de saúde/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 52, Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água pra consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário oficial. Brasília, 26 de março de 2004, p. 266-270.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o '**Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**'. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) =>. Acesso em: 15 de maio de 2016

CARVALHO, V. M. **Colibacilose e salmonelose**. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Orgs.). Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, p. 742-750, 2006.

CHRISTISON, C.A.; LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa, **Food Control**, v. 19, p. 727–733, 2008.

D' Aoust, J. Y. Current foodborne pathogens: *Salmonella*. Food Safety Handbook: **Microbiological Challenges**, p. 128-141, 2007.

DOLINGER, E. J. O. et al. Contaminação microbiológica de alimentos comercializados em restaurantes de auto-serviço de Itumbiara-GO, **Biotemas**, v. 23, n. 4, p. 129-133, 2010.

ERICKSON, M. C. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 283-319, 2012.

FARBER, J. M. et al. **Molecular typing and differentiation**. In: FARBER, J. M. et al. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C.: APHA, 2001. cap. 11, p. 127-158.

FENG, P.; WEAGENT, S. D; GRANT, M. A. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: <[www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web\\_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf](http://www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf)>. Acesso em 10 de março de 2016.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1 ed, Porto Alegre: Artmed, 2002, 424 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. 182p.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. G. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2008. 986p.

GÓES, J. A. W.; FURTUNATO, D. M. N.; VELOSO, I. S.; SANTOS, J. M. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, 2001.

GOODBURN, C.; WALLACE C. A. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review, **Food Control**, v. 32, p. 418-427, 2013.

GUIMARÃES, A. G. et al. Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2001.

HANNING, I. B.; RICKE, S. C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n.6, p. 635-648, 2009.

ICMSF - Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos. Disponível em: < <http://www.icmsf.org/>>. Acessado em 18 de maio de 2016.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 711p., 2005.

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. 2-10, 2009.

KONEMAM, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001.

LAGAGGIO, V. R. A. et. al. Avaliação microbiológica da superfície de mãos dos funcionários do restaurante universitário, da Universidade Federal de Santa Maria, RS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n.100, p. 107-110, 2002.

LYNCH, M. F.; TAUXE, R. V.; HEDBERG, C.W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**, v. 137, 307-315, 2009.

LAMBERT, J. L.; BATALHA, M. O.; SPROESSER, R. L.; SILVA, A. L.; LUCCHESI, T. As principais evoluções dos comportamentos alimentares: o caso da França. **Revista de Nutrição**, v.18, n.5, p.577-591, 2005.

LEAL, D. Crescimento da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.17, n.1, p.123-132, 2010.

LUES, J. F.R.; TONDER, I. VAN. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, v.18, p.326-332, 2007.

MACHADO, J. R; MARSON, J. M; OLIVEIRA, A. C. S; SILVA, P.R; TERRA, A. P. S. Avaliação microbiológica das mãos e fossas nasais de manipuladores de alimentos da unidade de alimentação e nutrição de um hospital universitário. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto - USP, v. 42, n.4, p. 461-465, 2009.

MAFFEI et al. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil, **Food Control**, v. 29, p. 226-230, 2013.

MARIN, V. A., et al. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

MARLONY B., TASSIOS P.T., RÅDSTRÖM P., COOK N., WAGNER M., HOORFAR J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MASSAUT, K. B. et. al. **Validação de procedimentos de higienização de uma unidade de alimentação e nutrição da cidade de Pelotas/RS**. XVII Congresso de Iniciação Científica, X Encontro de Pós-Graduação. Faculdade de Nutrição – UFPel., 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012). **Dados Epidemiológicos – DTA - período de 2000 a 2011**. Disponível em:

<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_dta\\_periodo\\_2000\\_2011\\_site.pd](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pd)  
d. Acesso em: 25 mar. 2016.



NGUZ, K. et al. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. **Food Control**, v. 16, p. 623-628, 2005.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Salmonella* entérica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

PAIVA, J. B. **Infecção de aves por mutantes de *Salmonella* sorotipos *gallinarum*, *pullorum* e *enteritidis* com deleção nos genes *cobS* e *cbiA*. 2010.** 96 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

PARK, S.H.; KWAK, T.K.; CHANG, H. Evaluation of the food safety for food handlers in restaurant operations. **Nutrition Research and Practice**, v.4, n.1, p. 58-68, 2010.

PEREIRA, C. S. et al. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 562-566, 2004.

POZZI, A. **Estudo dos hábitos alimentares dos usuários dos Restaurantes Comunitários do Distrito Federal.** SEDEST, 2009. Disponível em: [www.sedest.df.gov.br](http://www.sedest.df.gov.br). Acesso em: 23/05/16.

QUEIROZ, ALM et al. Qualidade higiênico-sanitário de equipamentos e utensílios em algumas indústrias de alimentos do município de João Pessoa–PB. **ENCONTRO DE INICIAÇÃO A DOCÊNCIA**, v. 10, 2007.

RODRIGUEZ, M. et al. Hygienic conditions and microbiological status of chilled Ready-To-Eat products served in Southern Spanish hospitals, **Food Control**, v. 22, p. 874-882, 2011.

SANTOS, A. P. **Conformação da qualidade microbiológica em couve minimamente processada no Distrito Federal: o caso da agroindústria**

**Machadinho.** 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade de Brasília, 2008.

SILVA JUNIOR, J. H. Food service: serviço requer profissionais do futuro. **Food Service New**, 15 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.foodservicenews.com.br/artigos.php?id=6>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 3ª edição, Editora Varela, Campinas, São Paulo, p. 544, 2007.

SILVA, S. R. P.; VERDIN, S. E. F., PEREIRA, D. C.; SCHATKOSKI, A. M.; ROTT, M. B.; CORÇÃO, G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 594-598, 2007.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, n. 12, p. 1565-1568, 2007.

SMANIOTO, T. F., et al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 150-154, 2009.

SOUZA, J. G. et al, Pesquisa de estafilococos coagulase positiva em manipuladores de uma unidade de alimentação, na cidade de São Luís, MA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21 n. 152, p. 69-75, 2007.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p.71-77, 2005.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727-736, 1997.

## ANEXO 1. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

### *Escherichia coli* strain Ecol\_732, complete genome

#### GenBank: CP015138.1

Go to: LOCUS CP015138 308 bp DNA linear BCT 08-APR-2016

DEFINITION *Escherichia coli* strain Ecol\_732, complete genome.

ACCESSION CP015138 REGION: 3347690..3347997

VERSION CP015138.1 GI: 1016298593

DBLINK BioProject: PRJNA316786

BioSample: SAMN04621897

ORGANISM *Escherichia coli*

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Escherichia*.

#### REFERENCE 1 (bases 1 to 308)

AUTHORS: STOESSER, N., SHEPPARD, A., PEIRANO, G., SEBRA, R., LYNCH, T., ANSON, L., KASARSKIS, A., MOTYL, M., KAZMIERCZAK, K., CROOK, D. and PITOUT, J.

Department of Microbiology (Research), John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Headley Way, Oxford OX3 9DU, United Kingdom.

COMMENT: Bacteria available from Johann Pitout, University of Calgary Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada, or Nicole Stoesser, Department of Microbiology, John Radcliffe Hospital, Headley Way, Oxford, UK.

Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be found here: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)

##Genome-Assembly-Data-START##

Assembly Method: HGAP v. 2.2.0

Genome Coverage: 1x

Sequencing Technology: PacBio

##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##

Annotation Provider: NCBI

Annotation Date: 04/08/2016 11:05:46

Annotation Pipeline: NCBI Prokaryotic Genome

Annotation Method: Best-placed reference protein set; GeneMarkS+

Annotation Software revision: 3.1

Features Annotated: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA; repeat region

Genes (total): 5,476

CDS (total): 5,363

Genes (coding): 5,243

CDS (coding): 5,243

Genes (RNA): 113

rRNAs: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)

complete rRNAs: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)

tRNAs: 86

ncRNAs: 5

Pseudo Genes (total): 120

Pseudo Genes (ambiguous residues): 0 of 120

Pseudo Genes (frameshifted): 52 of 120

Pseudo Genes (incomplete): 63 of 120

Pseudo Genes (internal stop): 19 of 120  
 Pseudo Genes (multiple problems): 12 of 120  
 ##Genome-Annotation-Data-END##

**GenBank - Showing 308 bp region from base 3347690 to 3347997.Nucleotide**

FEATURES Location/Qualifiers Source 1.308 /organism = "**Escherichia coli**" / mol type = "genomic DNA" / strain = "Ecol 732" / host = "Homo sapiens" / db xref = "taxon:562" / country = "Thailand: Bangkok" / lat and lon = "13.76 N 100.50 E" / collection date = "2012" / collected\_by = "Merck Study for Monitoring of Antimicrobial Resistance Trends (SMART)" gene <1.>308 / locus tag = "A4X18\_16425" CDS <1.>308 / locus tag = "A4X18\_16425" / inference = "EXISTENCE: similar to AA sequence: RefSeq:WP\_000769998.1" / note = "**with EutC catalyzes the formation of acetaldehyde and ammonia from ethanolamine**"; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology."  
 /codon start = 1 /transl table = 11 /product = "**ethanolamine ammonia-lyase**" /protein id = "AMX14968.1" /db xref="GI:1016301601".

/translation="MKLKTTLFGNVYQFKDVKEVLAKANELRSGDVLGVAASSQERVAAKQVLSEMTVAD  
 IRNNPVIAYEDDCVTRLIQDDVNETAYNQIKNWSISELREYVLSDETSVDDIAFTRKGLTSEVVAAVAKI  
 CSNADLIYGAKKMPVIKKANTTIGIPGTF SARLQPNDRDDVQSI AAQIYEGLSFGVGDVIGVNPVTD  
 DVENLSRVLDTIYGVIDKFNIP TQGCILAHVTTQIEAIRRGAPGGLIFQSICGSEKGLKEFGVELAMLDE  
 ARAVGAEFNRIAGENCLYFETGQGSALSAGANFGADQVTMEARNYGLARHYDPFIVNTVVGFIGPEY  
 LYNDRQIIRAGLEDHFMGKLSGISMGDCCYTNHADADQNLNENLMILLATAGCN YIMGMPLGDDIML  
 NYQTAFHDTATVRQLLNLRPSPEFERWLESMGIMANGRLTKRAGDPSLFF"

**GenBank - Showing 308 bp region from base 3347690 to 3347997 nucleotide**

ORIGIN

1 tatctctaca acgaccgcca gattatccgc gcaggcttag aagatcactt tatgggcaaa  
 61 ctgagcggca tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca accacgctga cgctgaccag  
 121 aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc gccaccgcag gctgcaacta catcatgggg  
 181 atgccgctgg gcgatgacat catgctcaac tatcagacca ccgcattcca cgacactgcc  
 241 actgtgcgtc agttactgaa tctgcgcccg tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaagc  
 301 atgggcat

Primer3Plus		<a href="#">Primer3Manager</a>	<a href="#">Help</a>
pick primers from a DNA sequence		<a href="#">About</a>	<a href="#">Source Code</a>
<b>WARNING: Numbers in input sequence were deleted.</b>			
<a href="#">&lt; Back</a>			
<b>Pair 1:</b>			
<input checked="" type="checkbox"/>	Left Primer 1:	Primer_F	
Sequence:	ctatgggctgtgactgtg		
Start: 73	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
<input checked="" type="checkbox"/>	Right Primer 1:	Primer_R	
Sequence:	ggcatccccatgatgtagtt		
Start: 185	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 113 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0	
<a href="#">Send to Primer3Manager</a>		<a href="#">Reset Form</a>	
1	tatctctaca	acgacogcca	gattatcogc gcaggcttag aagatcactt
51	tatgggcaaa	ctgagoggca	tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca
101	accacgctga	cgctgaccag	aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc
151	gccaccgcag	gctgcaacta	catcatgggg atgctgctgg gogatgacat
201	catgctcaac	tatcagacca	cgcattoca cgacactgcc actgtgogtc
251	agttactgaa	tctgogcccg	tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaagc
301	atgggcata		
<input type="radio"/> Select all Primers			
<b>Pair 2:</b>			
<input type="checkbox"/>	Left Primer 2:	Primer_1_F	
Sequence:	ctatgggctgtgactgtg		
Start: 73	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
<input type="checkbox"/>	Right Primer 2:	Primer_1_R	
Sequence:	ccccatgatgtagttgag		
Start: 181	Length: 20 bp	Tm: 59.5 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
Product Size: 109 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0	
<a href="#">Send to Primer3Manager</a>		<a href="#">Reset Form</a>	
<b>Pair 3:</b>			
<input type="checkbox"/>	Left Primer 3:	Primer_2_F	
Sequence:	gcaggcttagaagatcac		
Start: 29	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 55.0 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
<input type="checkbox"/>	Right Primer 3:	Primer_2_R	
Sequence:	ggtttcgtgagggtctgg		
Start: 136	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 50.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
Product Size: 108 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 2.0	
<a href="#">Send to Primer3Manager</a>		<a href="#">Reset Form</a>	
<b>Pair 4:</b>			
<input type="checkbox"/>	Left Primer 4:	Primer_3_F	
Sequence:	gctgtgactgctctcac		
Start: 79	Length: 20 bp	Tm: 59.7 °C	GC: 60.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
<input type="checkbox"/>	Right Primer 4:	Primer_3_R	
Sequence:	ggcatccccatgatgtagtt		
Start: 185	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 107 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 2.0	

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain USA300\_2014.C01, complete genome**

**GenBank: CP012119.1**

LOCUS CP012119 424 bp DNA linear BCT 21-JUL-2015

DEFINITION *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain USA300\_2014.C01, complete genome.

ACCESSION CP012119 REGION: 1042871.1043294

VERSION CP012119.1 GI: 899756207

DBLINK BioProject: PRJNA287576

BioSample: SAMN03787328

ORGANISM: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus.

**REFERENCE 1 (bases 1 to 424)**

AUTHORS: JOHNSON, R.C., SCHLETT, C.D., CRAWFORD, K., LANIER, J.B., MERRELL, S.D. and ELLIS, M.W.

TITLE: Recurrent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cutaneous abscesses and the selection of chlorhexidine resistance during chlorhexidine use

JOURNAL: Unpublished

**REFERENCE 2 (bases 1 to 424)**

AUTHORS: JOHNSON, R.C., SCHLETT, C.D., CRAWFORD, K., LANIER, J.B., MERRELL, S.D. and ELLIS, M.W.

Department of Microbiology and Immunology, Uniformed Services University of the Health Sciences, 4301 Jones Bridge Road, Bethesda, MD 20814, USA

COMMENT: Bacteria and source DNA is available from the Uniformed Services University of the Health Sciences; 4301 Jones Bridge Road, Microbiology and Immunology Department, Room B4137, Bethesda, MD, 20814.

##Genome-Assembly-Data-START##

Assembly Method: HGAP3 v. April 2015

Genome Coverage: 11.21x

Sequencing Technology: PacBio

##Genome-Assembly-Data-END##

**GenBank showing 424 bp region from base 1042871 to 1043294 nucleotide**

FEATURES Location/Qualifiers source 1.424/ organism = "*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*"/  
mol type="genomic DNA"/ strain = "USA 300 2014.C01"/ isolation source = "Purulent abscess"/host =  
"Homo sapiens"/ subspecies="aureus"/ db xref = "taxon:46170"/ country = "USA: Georgia"/ latl =  
"32.3661 N 84.9692 W"/ collection date = "2011"gene complement (<1..>424)/ **gene = "nuc"**/ locus  
tag = "AC807\_0990" CDS complement (<1..>424)/ EC number = "3.1.31.1"/ codon start = 1/transl  
table = 11/ **product = "thermonuclease"**/ protein id = "AKR51070.1"/ db xref = "GI:899757194"

/translation="MTEYLLSAGICMAIVSILLIGMAISNVSKGQYAKRFFFYFATSCLVLTLVVVSSLSSSANASQ  
TDNGVNRSGSEDPTVYSATSTKKLHKEPATLIKAIDGDTVKLMYKGQPMFRLLLVDTPETKHPKGGV  
EKYGPEASAFTKKMVENAKKIEVEFDKGQRTDKYGRGLAYIYADGKMNVEALVRQGLAKVAYVYKPN  
NTHEQLLRKSEAQAKKEKLNWSEDNADSGQ"

**GenBank showing 424 bp region from base 1042871 to 1043294 nucleotide**

## ORIGIN

1 ttttcttgc attttctacc attttttcg taaatgcact tgcttcagga ccatattct  
61 ctacacctt ttaggatgc ttgtttcag gtgtatcaac caataatagt ctgaatgtca  
121 ttggttgacc ttgtacatt aattaaccg tatcaccatc aatcgctta attaatgtcg  
181 caggttctt atgtaattt ttagttgaag ttgcactata tactgttgga tcttcagaac  
241 cacttctatt tacgccatta tctgtttgtg atgcatttgc tgagctactt agacttgaaa  
301 ctacaactaa agttaacact aaacaactag tagcgaaata gaaaaacctc ttgcgtatt  
361 gcccttcga aacattactg atagccatcc ctataagtaa tattgaaacg attgccatac  
421 atat



Primer3Plus		<a href="#">Primer3Manager</a>	<a href="#">Help</a>
pick primers from a DNA sequence		<a href="#">About</a>	<a href="#">Source Code</a>
<b>WARNING: Numbers in input sequence were deleted.</b>			
<a href="#">&lt; Back</a>			
<b>Pair 1:</b>			
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Left Primer 1:</b> <input type="text" value="Primer_F"/>			
Sequence: <input type="text" value="tgtttgolgcatttgcig"/>			
Start: 263	Length: 20 bp	Tm: 59.3 °C	GC: 40.0 % ANY: 6.0 SELF: 1.0
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Right Primer 1:</b> <input type="text" value="Primer_R"/>			
Sequence: <input type="text" value="aaagggcaatcgcasagag"/>			
Start: 367	Length: 20 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 45.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
Product Size: 105 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 2.0	
<a href="#">Send to Primer3Manager</a> <a href="#">Reset Form</a>			
1	ttttctttgc	atttctacc	attttttgc taaatgcact tgcttcagga
51	ccatatttct	ctacacctt	tttaggatgc tttgtttcag gtgtatcaac
101	caataatagt	ctgaatgca	ttggttgacc tttgtacatt aatthaacog
151	tatcaccatc	aatgcctta	attaatgtog caggttcttt atgtaatfff
201	ttagttgaag	ttgcactata	tactgttggg tcttcagaac cacttctatt
251	taogccatta	tctgtttgtg	atgcatttgc tgagctact agacttgaaa
301	ctacaactaa	agttaacact	aaacaactag tagcgaata gaaaaac <b>ctc</b>
351	<b>tttgctatt</b>	gccccttoga	aacattactg atagccatcc ctataagtaa
401	tattgaaacg	attgcatcac	atat
<input type="checkbox"/> Select all Primers			
<b>Pair 2:</b>			
<input type="checkbox"/> <b>Left Primer 2:</b> <input type="text" value="Primer_1_F"/>			
Sequence: <input type="text" value="tgtttgolgcatttgcig"/>			
Start: 263	Length: 20 bp	Tm: 59.3 °C	GC: 40.0 % ANY: 6.0 SELF: 1.0
<input type="checkbox"/> <b>Right Primer 2:</b> <input type="text" value="Primer_1_R"/>			
Sequence: <input type="text" value="ggcaatcgcasagaggtt"/>			
Start: 363	Length: 20 bp	Tm: 59.2 °C	GC: 45.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0
Product Size: 101 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0	
<a href="#">Send to Primer3Manager</a> <a href="#">Reset Form</a>			
<b>Pair 3:</b>			
<input type="checkbox"/> <b>Left Primer 3:</b> <input type="text" value="Primer_2_F"/>			
Sequence: <input type="text" value="cgtatcaccatcaatgcctt"/>			
Start: 149	Length: 21 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
<input type="checkbox"/> <b>Right Primer 3:</b> <input type="text" value="Primer_2_R"/>			
Sequence: <input type="text" value="agctcagcaatgcatcaca"/>			
Start: 286	Length: 20 bp	Tm: 60.6 °C	GC: 45.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
Product Size: 138 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 1.0	
<a href="#">Send to Primer3Manager</a> <a href="#">Reset Form</a>			
<b>Pair 4:</b>			
<input type="checkbox"/> <b>Left Primer 4:</b> <input type="text" value="Primer_3_F"/>			
Sequence: <input type="text" value="tgtttgolgcatttgcig"/>			
Start: 263	Length: 20 bp	Tm: 59.3 °C	GC: 40.0 % ANY: 6.0 SELF: 1.0
<input type="checkbox"/> <b>Right Primer 4:</b> <input type="text" value="Primer_3_R"/>			
Sequence: <input type="text" value="tgcttcaggaatcgcasag"/>			
Start: 374	Length: 20 bp	Tm: 61.0 °C	GC: 45.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0
Product Size: 112 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 1.0	

**Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java strain NCTC5706****GenBank: LT571437.1**

LOCUS LT571437 1000 bp DNA linear BCT 19-MAY-2016

DEFINITION *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Java strain NCTC5706 genome assembly, chromosome: 1.

ACCESSION LT571437 REGION: 1006000.1006999

VERSION LT571437.1 GI:1030305712

DBLINK BioProject: PRJEB6403

BioSample: SAMEA3468845

ORGANISM: *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Java

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella.

**REFERENCE 1: CONSRTM Pathogen Informatics**

Pathogen Informatics, Wellcome Trust Sanger Institute, CB10 1SA, United Kingdom

FEATURES: Location/Qualifiers source 1.1000 /organism = "**Salmonella enterica subsp. enterica** serovar Java" /mol type = "genomic DNA" /strain = "NCTC5706" /db xref f= "taxon:224729" /chromosome = "1" gene <1..>1000 /**gene** = "**invA**" /locus tag = "SAMEA3468845\_00989" CDS <1.>1000 /inference = "ab initio prediction:Prodigal:2.60" / inference = "similar to AA sequence: RefSeq:YP\_004731336.1" / codon start = 1 /transl table = 11 /**product** = "**virulence associated secretory protein**" /protein id = "SBL14848.1" /db xref = "GI:1030306644".

/translation="MLLSLLNSARLRPELLILVLMVMIISMVFIPLPTYLVDFLIANLIVLAILVFMGSFYIDRILSFS  
TFPAVLLITLFRLLALSISTSRLILIEADAGEIATFGQFVIGDSLAVGFVVFVSIIVVQFVITKGSERVAEV  
AARFSLDGMGPKQMSIDADLKAGIIDADAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKFIKGDIAIAGIIIFVNFVIG  
GISVGMTRHGM DLSSALSTYMLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGSDSNMGRNIMTQLLNPFV  
LVVTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVLSVLFYFKFREAKRSAAKPKTSKGEQPLSIEEKEGSSLGLIGD  
LDKVSTETVPLILLVPKSRREDLEKAQLAERLRSQFFIDYGVRLPEVLLRDGEGLDDNSIVLLINEIRVEQ  
FTVYFDLMRVVNYSDEVVSFGINPTIHQQGSSQYFWVTHEEGEKLRELGYVLRNALDELYHCLAVTLA  
RNVNEYFGIQETKHMLDQLEAKFPDLLKEVLRHATVQRRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALALWAP  
REKDVINLVEHIRGAMARYICHKFANGGELRAVMVSAEVEDVIRKQIRQTSGSTFLSLDPEASANLMDL  
ITLKLDDLLIAHKDLVLLTSVDVRRFIKKMIEGRFPDLEVLVSFGEIADSKSVNVIKTI"

**ORIGIN**

1 ttgattgaag ctgatgccgg tgaattatc gccacgttcg ggcaattcgt tattggcgat  
61 agcctggcgg tgggttttgt tgtcttctct attgtcaccg tggccagtt taccgttatt  
121 accaaagggt cagaacgcgt cgcggaagtc gcggcccgat tttctctgga tggatgccc  
181 ggtaaacaga tgagtattga tgccgatttg aaggccggtg ttattgatgc ggatgccgcg  
241 cgcgaacggc gaagcgtact ggaaagagaa agccagcttt acggttcctt tgacggtgcg  
301 atgaagtta tcaaaggtga cgctattgcc ggcatcatta tcatctttgt gaactttatt  
361 ggcggtattt cgggtgggat gaccgccat ggtatggatt tgcctccgc cctgtctact  
421 tatacatgac tgaccattgg tgatggtcct gtcgccaga tccccgatt gttgattgcg  
481 attagtgcg gttttatcgt gactcgcgta aatggcgata gcgataatat gggacggaat  
541 atcatgacgc agctgtttaa caaccattt gtattggtg ttacggctat tttgaccatt  
601 tcaatgggaa ctctgccggg attcccgtg ccggttttg ttattttatc ggtggtttta  
661 agcgtactct tctattttaa attccgtgaa gcaaacgta gtgccgcaa acctaaaacc  
721 agcaaaggcg agcagccgct cagtattgag gaaaaagaag ggtcgtcgtt aggactgatt  
781 ggcatctcg ataaagtctc tacagagacc gtaccgttga tattacttgt gccgaagagc  
841 cggcgtgaag atctggaaaa agctcaactt cgcgagcgtc tacgtagtca gttctttatt  
901 gattatggcg tgcgcctgcc ggaagtattg ttacgcgatg gcgagggcct ggacgataac  
961 agcatcgtat tgttgattaa tgagatccgt gttgaacaat

Primer3Plus		<a href="#">Primer3Manager</a>	<a href="#">Help</a>		
pick primers from a DNA sequence		<a href="#">About</a>	<a href="#">Source Code</a>		
WARNING: Numbers in input sequence were deleted.					
<a href="#">← Back</a>					
<b>Pair 1:</b>					
<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1: <input type="text" value="Primer_F"/>					
Sequence: <input type="text" value="gcctgaccgggcaattat"/>					
Start: 10	Length: 20 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 45.0% ANY: 4.0 SELF: 3.0		
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1: <input type="text" value="Primer_R"/>					
Sequence: <input type="text" value="cgacaagccatcccaatg"/>					
Start: 454	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0% ANY: 3.0 SELF: 3.0		
Product Size: 445 bp		Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0		
<a href="#">Send to Primer3Manager</a>		<a href="#">Reset Form</a>			
1	ttgattgaag	ctgatgcggg	tgaattatc	gccacgttcg	ggcaattcgt
51	tattggcgat	agcctggggg	tgggttttgt	tgtcttctct	attgtcacog
101	tggccagtt	tatogttatt	accaaaggtt	cagaacgcgt	cgcggaagtc
151	gggcccgat	tttctctgga	tggtatgccc	ggtaaacaga	tgagtattga
201	tgcogatttg	aaggccggta	ttattgatgc	ggatgccgcg	cgogaacggc
251	gaagcgtact	gaaagagaa	agccagcttt	acggttctct	tgaoggtgog
301	atgaagtta	tcaaaggtga	cgctattgoc	ggcatcatta	tcactcttgt
351	gaactttatt	ggoggtattt	cggtggggat	gacccgccat	ggtatggatt
401	tgtctccgc	octgtctact	tataccatgc	tgaccattgg	tgatggcttt
451	gtcgcccaga	tcccgcatt	gttgattgog	attagtcccg	gttttatogt
501	gactcgcgta	aatggogata	gcgataatat	gggacggaat	atcatgaocg
551	agctgttgaa	caaccattt	gtattggttg	ttacggctat	tttgaccatt
601	tcaatgggaa	ctctgcgggg	attcccgetg	coggtttttg	ttattttatc
651	ggtggtttta	agcgtactct	tctattttaa	attccgtgaa	gcaaaaogta
701	gtgcccctaa	acctaaaacc	agcaaaggog	agcagccgct	cagtattgag
751	gaaaaagaag	ggtcgtogtt	aggactgatt	ggogatctcg	ataaagtctc
801	tacagagacc	gtacogttga	tattacttgt	gcogaagagc	cgogctgaag
851	atctgaaaa	agctcaactt	gcccagcgtc	taogtagtca	gttctttatt
901	gattatggcg	tgocctgoc	ggaagtattg	ttacgcgatg	gogagggcct
951	ggacgataac	agcatogtat	tgttgattaa	tgagatccgt	gttgacaact
<input type="checkbox"/> Select all Primers					
<b>Pair 2:</b>					
<input type="checkbox"/> Left Primer 2: <input type="text" value="Primer_1_F"/>					
Sequence: <input type="text" value="gcgaagcgtactgaaagag"/>					
Start: 249	Length: 20 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 55.0% ANY: 4.0 SELF: 0.0		
<input type="checkbox"/> Right Primer 2: <input type="text" value="Primer_1_R"/>					
Sequence: <input type="text" value="ctcgccttgcctggtttag"/>					
Start: 732	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0% ANY: 2.0 SELF: 0.0		
Product Size: 484 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0		
<a href="#">Send to Primer3Manager</a>		<a href="#">Reset Form</a>			
<b>Pair 3:</b>					
<input type="checkbox"/> Left Primer 3: <input type="text" value="Primer_2_F"/>					
Sequence: <input type="text" value="gggcaattatgccacggt"/>					
Start: 19	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 45.0% ANY: 6.0 SELF: 2.0		
<input type="checkbox"/> Right Primer 3: <input type="text" value="Primer_2_R"/>					
Sequence: <input type="text" value="gtcacgataaacccgacct"/>					
Start: 503	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0% ANY: 4.0 SELF: 1.0		
Product Size: 485 bp		Pair Any: 6.0	Pair End: 2.0		
<a href="#">Send to Primer3Manager</a>		<a href="#">Reset Form</a>			