

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE UNIDADES ALIMENTAÇÃO E
NUTRIÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DE *Staphylococcus* sp.**

JOZI FAGUNDES DE MELLO

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Agosto de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE UNIDADES ALIMENTAÇÃO E
NUTRIÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DOS *Staphylococcus* sp.**

Jozi Fagundes de Mello
Nutricionista – Instituto Metodista de Educação e Cultura (IMEC)
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Agosto de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Mello, Jozi
AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE UNIDADES
ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DE
Staphylococcus sp. / Jozi Mello. -- 2012.
101f.

Orientadora: Marisa Costa.
Coorientadora: Jeverson Frazzon.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Staphylococcus sp.. 2. Enterotoxina
estafilocócica. 3. Avaliação higiênico-sanitária. I.
Costa, Marisa, orient. II. Frazzon, Jeverson,
coorient. III. Título.

Dedico este trabalho, à minha mãe Sandra e ao meu esposo Sandro.

**Devo a vocês: minhas conquistas,
o meu equilíbrio e toda a minha felicidade.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a toda espiritualidade que me orienta.

Dedico um agradecimento muito especial a minha mãe, minha maior incentivadora, por todo amor, cuidado e carinho com que me cuida e também por todos os ensinamentos de vida.

Agradeço a meu esposo pelo amor, compreensão, paciência e estímulo.

A minha prima Mary e meu irmão Bê pelo carinho e pensamentos positivos e à toda minha família por todos os incentivos.

Agradeço aos colegas de mestrado da turma de 2005/2007 do ICTA/UFRGS e também aos mestres que me orientaram. Vocês foram imprescindíveis nos meus passos iniciais. Obrigada em especial a Cristina Zaffari Grecelle, Patrícia Malheiros, Flávia Pinto, Ana Beatriz de Oliveira, professora Erna de Jong, professor Plinho Hertz e a professora Marisa Cardoso.

Agradeço de forma muito especial ao sempre orientador e amigo Jeverson Frazzon por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. E registro aqui minha grande admiração pelo professor e amigo. Agradeço a Ana Frazzon, simplesmente por fazer parte da minha vida. Me espelho em ti Aninha! Vocês dois são especiais!

Também agradeço com carinho e de forma muito especial à professora Marisa da Costa por ter me dado a primeira oportunidade de trabalho em laboratório a qual foi o primeiro passo para todas as demais conquistas.

Aos meus orientadores, Jeverson e Marisa, meu obrigada pelos ensinamentos, confiança, respeito e amizade.

Agradeço às colegas dos laboratórios 264 e 266 do ICBS pelo companheirismo e alegria na rotina diária de trabalho. Agradeço a todos que convivi no lab. 165, em especial a Ester Lopes, Laura Rocha, Nicolas Alcortra e Vanessa dos Santos pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada a Sibeles Schneider pelo auxílio na realização da primeira fase da pesquisa.

Às amigas Ester Lopes, Marjo Bessa e Amanda Motta, que foram importantíssimas para manter meu equilíbrio em vários momentos desta jornada, meu muito obrigada.

Obrigada aos professores e aos técnicos do PPGMAA. Em especial à técnica Leila Ribeiro e às professoras Getrudes Corção e Sueli Van Der Sand.

Aos colegas da Faculdade de Nutrição/UFPel pela colaboração e incentivo. Em especial a Letícia Barbosa, “Mimiane” e Kelly Lameiro.

Também agradeço a todas as pessoas, mesmo que não as tenha mencionado, que participaram direta ou indiretamente, comigo desta conquista.

Aos professores membros da banca pela disposição e pela importante contribuição neste trabalho.

AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE UNIDADES ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DOS *Staphylococcus* sp.

Autor: Jozi Fagundes de Mello

Orientador: Profa. Dra. Marisa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon.

1Resumo

Nas últimas décadas ocorreu um aumento na atuação de estabelecimentos que produzem refeições para trabalhadores, como as Unidades de Alimentação e Nutrição (UANs). No Brasil, este segmento de mercado é reconhecido como um local de grande ocorrência de surtos alimentares, sendo o micro-organismo *Staphylococcus aureus* o segundo maior agente causal. O objetivo deste estudo foi avaliar as condições higiênico-sanitárias e a presença de *Staphylococcus* sp. em UANs de grande porte e atuantes na cidade de Porto Alegre. Participaram desta pesquisa 7 UANs de grande porte (≥ 500 refeições/dia). A aplicação da Lista de Verificação das Boas Práticas constatou que todas as UANs tiveram atendimento insatisfatório a este quesito. Foi realizada análise para potabilidade da água, contagem e isolamento de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. em equipamentos, ambientes e alimentos produzidos pelas UANs. Manipuladores de alimentos também foram analisados para presença de *Staphylococcus* sp. nas mãos e na cavidade nasal. A água se mostrou adequada para produção de alimento em todas as UANs. A qualidade higiênico-sanitária foi inadequada na maioria dos pontos analisados, sendo constatada a presença de *E. coli* no processador de legumes apenas de uma UANs. Nas sete UANs foi observado ausência de *Listeria* sp. Todos os alimentos, equipamentos e ambiente de manipulação foram ausentes para Estafilococos coagulase-positiva. Foram isolados 121 cepas de 26 diferentes espécies de *Staphylococcus* sp. Dentre os 21 manipuladores analisados, observou-se a presença de 16 diferentes espécies de *Staphylococcus* sp. onde predominou *Staphylococcus epidermidis*. O gene da enterotoxina B foi o mais prevalente, sendo encontrado em 70,8% dos Estafilococos coagulase-negativo. Foram encontrados doze genótipos para a presença de genes das enterotoxinas clássicas, sendo que oito genótipos apresentaram combinação de mais de um gene. Estes resultados mostram que os padrões de higiene são inadequados e que *Staphylococcus* sp. portadores de genes que codificam enterotoxinas clássicas estão disseminados nas UANs estudadas. Assim, é clara a necessidade de implementação de Boas Práticas para o controle da disseminação de patógenos, produção de alimento seguro e promoção da saúde da população atendida pelas UANs.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.) Agosto, 2012.

Assessment of the hygienic and sanitary conditions in Food and Nutrition Units, and genotypic analysis of *Staphylococcus* sp.

Author: Jozi Fagundes de Mello

Advisor: Profa. Dra. Marisa da Costa

Co-advisor: Prof. Dr. Jeverson Frazzon.

²Abstract

In recent decades, there has been an increase of establishments that provide meals for workers, such as the Nutrition and Food Units (NFU). In Brazil, this market segment is recognized as a place of food outbreaks, and the microorganism *Staphylococcus aureus* is the second largest causative agent. The objective of this research is to evaluate the hygienic and sanitary conditions and the presence of *Staphylococcus* sp. in NFU that act in the city of Porto Alegre. Seven large foodservices participated in this research (≥ 500 meals / day). The application of Good Practice Checklist found that all food services had a poor attendance on this item. Analysis was performed for drinking water, counts and isolation of thermotolerant coliform, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus* sp. in equipments, environments and foods produced by foodservices. Food handlers were also analyzed for presence of *Staphylococcus* sp. on the hands and nasal cavity. The water proved to be suitable for food production in all food services. The sanitary quality was inadequate in most of the points analyzed. The presence of *E. coli* in the vegetables processor was confirmed in only one foodservice. In seven foodservices was observed the absence of *Listeria* sp. All food, equipment and environment of manipulation were found clear of coagulase-positive staphylococci. 121 strains of *Staphylococcus* sp. of 26 different species were isolated. It was observed the presence of 16 different species of *Staphylococcus* sp. between 21 handlers analysed, being the microorganism *Staphylococcus epidermidis* the predominated specie. The enterotoxin B gene was the most prevalent, being found in 70.8% of coagulase-negative staphylococci. Twelve genotypes were found for presence of gene encoding classical enterotoxins and eight genotypes with combination of more than one gene. These results show that hygiene standards are inadequate and *Staphylococcus* sp. that carry genes encoding classical enterotoxins are dispersed in the NFU studied. Thus, there is a clear need to implement Good Practice for controlling the spread of pathogens, production of safe food and promote the health of the population served by the NFU.

²Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Health Basic Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. (p 101). August, 2012.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A produção de alimentos e refeições	17
2.2 Micro-organismos indicadores de segurança de alimentos	20
2.3 Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	22
2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.5 <i>Staphylococcus</i> sp.	27
2.5.1 Enterotoxinas estafilocócicas	29
2.5.2. <i>Staphylococcus</i> sp. e a produção de refeições	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Artigo 1	37
5.1.1 Avaliação das condições de higiene e da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição em Porto Alegre – RS	37
5.2 Artigo 2	46
5.2.1 Sanitary quality, occurrence and identification of <i>Staphylococcus</i> sp. in food services	46
6 DISCUSSÃO GERAL	65
7 CONCLUSÕES	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

9 ANEXOS	83
9.1 Gene <i>femA</i>	84
9.2 Análise do gene <i>femA</i>	87
9.3 Eletroforese da amplificação dos genes das enterotoxinas e <i>femA</i>	90
9.4 Quantificação de coliformes e <i>Escherichia coli</i> e adequação aos limites microbiológicos	91
9.5 Espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de alimentos	92
9.6 Espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de equipamentos e ambientes	93
9.7 Espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de manipuladores de alimentos	94
9.8 Lista de Verificação em Boas Práticas para serviços de alimentação portaria nº 78/2009	95
10 APÊNDICES	98
10.1 Termo de adesão à pesquisa para as Empresas de Refeições Coletivas.....	99
10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para manipuladores de alimentos	101

LISTA DE TABELAS

5.1.1 Avaliação das condições de higiene e da adequação às Boas Práticas em Unidades de Alimentação e Nutrição no município de Porto Alegre – RS

Tabela 1 – Avaliação de ATP-bioluminescência nos equipamentos e superfícies das unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS, 2012 40

Tabela 2 – Distribuição das unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS (2012), quanto aos grupos de verificação que compõem a Portaria 78/09-RS 41

5.2.1 Qualidade sanitária, ocorrência e identificação de *Staphylococcus* sp. em serviços de alimentação no sul do Brasil

Table 1. Nucleotide sequences, annealing temperature and expected size of the PCR products for *Staphylococci* enterotoxins 52

Table 2. Compliance of food services regarding the microbiological limits for thermotolerant coliforms 53

Table 3. *Staphylococcus* sp. isolated from foods, equipment, surfaces and food handlers of food services 54

Table 4. Genotypic profile of the enterotoxins genes in *Staphylococcus* sp. isolates from the food services 55

Table 5. Enterotoxin genes found in *Staphylococcus* sp. isolates from the food services 56

LISTA DE FIGURA

5.1.1 Avaliação das condições de higiene e da adequação às Boas Práticas em Unidades de Alimentação e Nutrição no município de Porto Alegre – RS

FIGURA 1 – Comparação dos percentuais de conformidade dos itens críticos e do resultado geral da lista de verificação aplicada em unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS (2012)	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

‰: Porcentagem

µL: microlitro

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP: Trifosfato de adenosina

BP: Boas Práticas

cm²: Centímetro quadrado

DNA: Ácido desoxirribunucleídeo

dNTP: Desorribonucleotídeo trifosfatado

DTA: Doença transmitida por alimento

DTAs: Doenças transmitidas por alimento

ECoN: Estafilococos Coagulase Negativo

ECoP: Estafilococos Coagulase Positivo

FDA: *Food and Drug Administration*

g: Gramas

ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IMEC: Instituto Metodista de Educação e Cultura

IN: Instrução Normativa

KDa: Quilo-Dalton

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL: Mililitro (s)

mM: Milimolar

n.: Número

NA: Não-aplicável

NaCl: Cloreto de sódio

ng: nanograma

°C: Grau Celsius

OPAS: Organização Panamericana de Saúde

pb: Pares de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

POP: Procedimento Operacional Padronizado

PPGMAA: Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

rRNA: Ácido Ribonucléico Ribossomal

RS: Rio Grande do Sul

S.A: Serviço de alimentação

SE: *Staphylococcal enterotoxin*

TBE: Tampão Tris Borato Ácido Etilenodiamino Treta-Acético

UAN: Unidade de Alimentação e Nutrição

UANs: Unidades de Alimentação e Nutrição

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônia por grama

UFC: Unidades formadoras de colônia

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

URL: Unidades relativas de luz

USDA: *United States Department of Agriculture*

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3 indoil β -D-galactopironidase

1 INTRODUÇÃO

O controle da qualidade higiênico-sanitária tem recebido muita atenção em pesquisas e debates da área da saúde, por ser um item de fundamental influência na disseminação de doenças transmitidas por alimentos. Os procedimentos de contagem de micro-organismos indicadores e isolamentos de patógenos são muito eficientes como critérios para a avaliação de higiene em produção de alimentos. Entre os micro-organismos utilizados como indicadores de higiene destacam-se os coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e a *Escherichia coli*. Outros patógenos também podem ser veiculados por alimentos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. A espécie bacteriana *Listeria monocytogenes* é um patógeno ubíquo que se destaca por apresentar características de crescimento e sintomatologia da infecção, muito particulares e causar infecção grave em pessoas com baixa imunidade. Ao gênero *Staphylococcus* sp. pertencem mais 45 espécies. Estes podem fazer parte da microbiota humana que, por intermédio de técnicas inadequadas de produção de refeições e por falhas nos processos de higiene por parte dos manipuladores, podem ser transmitidas aos alimentos. *Staphylococcus aureus* é a espécie mais recorrente em casos de surto alimentar no Brasil. Uma das características desta espécie é a capacidade de produzir toxinas. Estas toxinas podem permanecer viáveis mesmo após os alimentos serem submetidos a tratamento térmico e causam disfunções gastro-intestinais. Entre as toxinas estafilocócicas já descritas, destacam-se aquelas enterotoxinas mais frequentemente encontradas em surtos, chamadas clássicas e denominadas A, B, C, D e E. Os sintomas da intoxicação se desenvolvem após um período de

incubação de quatro a oito horas, podendo resultar em gastroenterite severa. A presença, de quaisquer dos micro-organismos citados acima, em alimentos prontos para consumo ou equipamentos de produção de refeições denota deficiência nos requisitos de Boas Práticas (BP) na produção de alimentos. Para o controle da qualidade higiênico-sanitária na produção de alimentos os estabelecimentos devem fazer uso de algumas ferramentas de auxílio. As BP são procedimentos operacionais necessários para garantir a qualidade dos alimentos produzidos, pois utilizam princípios básicos de higiene. A utilização de BP na produção de alimentos está determinada em legislação por órgãos competentes no Brasil. Este estudo pretendeu avaliar as condições higiênico-sanitárias de Unidades de Alimentação e Nutrição de grande porte, atuantes na cidade de Porto Alegre – RS. Igualmente, pretendeu isolar e identificar *Staphylococcus* sp., assim como verificar a presença de genes produtores das enterotoxinas clássicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A produção de alimentos e refeições

Os estabelecimentos produtores de refeições para coletividades são tecnicamente denominados Unidades de Alimentação e Nutrição (UANs), mas comumente conhecidos como restaurantes comerciais ou institucionais. Várias etapas fazem parte dos processos de produção de alimentos em UANs. Primeiramente, se estima a média das necessidades nutricionais dos usuários. A seguir há o planejamento do cardápio a ser servido por estes estabelecimentos, onde há considerações de alguns pontos básicos: (i) hábitos alimentares e regionais, (ii) o número de refeições que serão servidas, (iii) a logística de entrega dos gêneros perecíveis, (iv) sazonalidade de alimentos, (v) área física, contemplando a disponibilidade de equipamentos e de funcionários, (vi) além de quesitos financeiros necessários para o exercício e manutenção de todas as atividades pertinentes a este segmento de mercado. Concluída a etapa de confecção do cardápio, parte-se para o processo de compras, seguido pelo recebimento e armazenamento das mercadorias (gêneros alimentícios, descartáveis e de limpeza). Ao término destas etapas é que se pode partir para a produção de alimentos e refeições propriamente dita. Subsequente à produção tem-se o processo de distribuição do produto final que ocorre através da exposição dos alimentos prontos para consumo, aos usuários, nas linhas de distribuição de refeições, mais conhecidas como bufê. Todas essas etapas devem ser controladas a fim de minimizar a existência de pontos passíveis de contaminação, já que a transmissão de micro-organismos

aos usuários pode ocorrer através dos alimentos (Mesquita et al., 2006; Capunzo et al., 2005; Cho & Hooker, 2009).

Vários fatores inerentes à produção de alimentos influenciam diretamente na qualidade higiênico-sanitária da refeição ou alimento produzido. Problemas nas fases de recebimento, estocagem, produção e distribuição, podem resultar em alimentos não seguros para consumo. Destacam-se alguns fatores causais na produção de alimentos não seguros: o controle inadequado de temperatura durante o cozimento, os processos de resfriamento de alimentos prontos para consumo, a estocagem e a distribuição do produto final, higiene pessoal insuficiente (manipulador de alimentos), contaminação cruzada e o monitoramento inadequado de todas as etapas do processo produtivo (Akatsu et al., 2005; Bas et al., 2006). Segundo a portaria número (n.) 58 de 1993 do Ministério da Saúde do Brasil, define-se a ocorrência de contaminação cruzada quando: “objeto, materiais ou mesmo alimentos ou qualquer substância contaminada que sirva de conduto intermediário possa contaminar o alimento a ser consumido e se constituir num fator de risco à saúde” (Brasil, 1993). Dentre os principais problemas para a segurança de alimentos destacam-se o reaquecimento e refrigeração inadequados e o grande tempo de espera entre a preparação e o consumo dos alimentos (Weingold et al., 1994; Bas et al., 2006). A condição higiênica dos equipamentos, utensílios e de todas as superfícies que entram em contato com os alimentos, em quaisquer etapas da produção, também merecem grande atenção na prevenção de contaminação cruzada e na produção de alimento seguro (Vlková et al., 2008). A má higienização de superfícies pode levar ao depósito de matéria orgânica, servindo de nutrientes a micro-organismos, e proporcionando a formação de

biofilmes. Quando células microbianas se desprendem destes biofilmes, podem contaminar os alimentos causando riscos à saúde dos usuários (Gelli et al., 2005; Pires et al., 2005).

Considera-se alimento apto para o consumo humano, aquele que atende ao padrão de identidade e qualidade pré-estabelecido, quanto aos aspectos higiênico-sanitários e nutricionais (Brasil, 1997). Assim, alimentos que contemplam os quesitos higiênico-sanitários podem ser denominados “alimento seguro” (OMS, 2006). O controle microbiológico é um ponto que merece destaque na produção de alimentos, pois objetiva assegurar que os alimentos sejam veículo de saúde e não potencialmente de doenças pela presença de patógenos e toxinas. Consideram-se doenças transmitidas por alimento (DTAs), as doenças originadas pela ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos ou toxinas. São catalogados vários agentes etiológicos de DTAs. Alguns dos principais causadores de doenças alimentares são as *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Filho & Filho, 2000; Bergamini et al., 2007; Malheiros et al., 2007; Soares et al., 2008).

A fim de minimizar falhas que possam resultar em alimentos não seguros, as UANs utilizam ferramentas que assessoram o controle do processo produtivo. As Boas Práticas (BP) são os procedimentos mais básicos, eficazes e necessários para manipulação segura de alimentos. As BP são importantes, pois enfatizam procedimentos básicos de higiene e manipulação, além da fiscalização dos protocolos de execução objetivando reduzir pontos passíveis de contaminação na linha de produção de alimentos e refeições. Apesar de sua grande relevância, muitos serviços de alimentação apresentam carência na

implementação das BP, resultando em restaurantes com riscos em potencial à saúde de seus usuários (Réglier-Poupet et al., 2005).

2.2 Micro-organismos indicadores de contaminação em alimentos

Micro-organismos indicadores são rotineiramente utilizados para avaliar as condições de segurança e higiene alimentar do produto final e a higiene empregada em seu processamento (Sant'ana et al., 2003). Quando presentes em um alimento, estes micro-organismos podem indicar contaminação de origem fecal, a possível presença de patógenos ou grau de deterioração. Um micro-organismo indicador deve apresentar algumas características específicas:

- a) Ser detectável de forma fácil e rápida;
- b) Ser facilmente distinguível de outros membros da microbiota do alimento;
- c) Possuir um histórico de associações constantes com o patógeno cuja presença visa indicar;
- d) Estar presente sempre quando o patógeno de interesse estiver presente;
- e) Ser um micro-organismo cujos números sejam relacionados às quantidades do patógenos de interesse;
- f) Possuir características e taxas de crescimento equivalentes à do patógeno;

- g) Possuir uma taxa de mortalidade que seja ao menos semelhante à do patógeno e, de preferência, que persista mais tempo do que este último;
- h) Estar ausente dos alimentos que são livres de patógenos, com exceção de números mínimos.

Além de micro-organismos que indicam a segurança dos alimentos, outros fatores também podem auxiliar na avaliação das condições de higiene de um ambiente. A avaliação da presença e quantidade de material orgânico também pode ser utilizada como um indício da situação higiênica de ambientes e superfícies que entram em contato direto com alimentos (Sherlock et al., 2009). A deposição de material orgânico e outros tipos de resíduos em superfícies podem servir de fonte primária de adesão ou mesmo de nutrientes para micro-organismos, podendo abrir precedentes para formação de biofilmes (Pires et al., 2005). Ambientes e superfícies mal higienizados que entram em contato com alimentos podem caracterizar um risco em potencial para contaminação do alimento, disseminação de micro-organismos e ocorrência de DTAs. Para verificação da deposição de matéria orgânica em superfícies se emprega a técnica da luminescência, pelo uso do luminômetro, mostra-se bastante eficiente (Saquet, 2005; Aycicek et al., 2006; Sherlock et al., 2009). Este tipo de técnica usa como princípio determinar a quantidade de trifosfato de adenosina (ATP), seja de origem microbiana ou não. O ATP é encontrado em vários organismos vivos, em resíduos orgânicos e alimentares. Assim, sua presença em superfícies pode indicar a ineficiência dos processos de

higienização, onde superfícies higienizadas devem conter baixa concentração de ATP.

2.3 Coliformes e *Escherichia coli*

Os grupos coliformes, e dentro deles a espécie *Escherichia coli*, são considerados micro-organismos indicadores das condições de higiene de um alimento ou ambiente. Portanto, a verificação e quantificação da sua presença podem ser utilizadas como monitoramento dos padrões higiênico-sanitário de produção de refeições.

Este grupo é dividido em coliformes totais e coliformes termotolerantes. Coliformes totais, também conhecidos como coliformes a 35 graus Celsius (°C), compreende um grupo de micro-organismos amplamente distribuído no ambiente e no intestino de animais de sangue quente. Estas bactérias são caracterizadas como bastonetes Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, apresentam metabolismo fermentativo de glicose com produção de gás entre 24 e 48 horas, a 35°C. A enumeração deste grupo de micro-organismos é comumente realizada para determinação do padrão higiênico de ambientes e alimentos (Silva et al., 2001; Rodriguez et al., 2011). Este grupo inclui aproximadamente 20 espécies de bactérias. Algumas de origem entérica (trato intestinal de animais de sangue quente) e outras bactérias de origem não entérica. Portanto, não é o grupo mais indicado para referir contaminação fecal, mas é considerado um indicador de contaminação ambiental. A presença das bactérias deste grupo em água potável e alimentos processados indica a ocorrência de contaminação pós-processamento, o que

caracteriza práticas de higiene insatisfatórias (Leclerc et al., 2001; Gottardi et al., 2008; Sood et al., 2008).

O grupo coliformes termotolerantes, também conhecido como coliformes a 45°C, é formado por três gêneros de bactérias: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Segundo a legislação brasileira sobre padrões microbiológicos para alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que a denominação de coliformes a 45°C é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes" (Brasil, 2001). Estes fermentam lactose com produção de gás entre 24 a 48 horas, na temperatura de 45°C. A presença de quaisquer destes microorganismos em alimentos, acima do estabelecido pela legislação, indica contaminação fecal e denota despreparo do produtor sobre padrões mínimos de higiene (Silva et al., 2001).

Dentro deste grupo, *E. coli* é muito frequentemente encontrada em alimentos e sua presença é o mais claro indicador de contaminação fecal utilizado. *E. coli* é uma enterobactéria Gram negativa, catalase positiva, oxidase negativa, produtora de indol a partir do triptofano e que não hidrolisa ureia. Esta bactéria pode crescer entre 7 e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento (Scheutz & Strockbine, 1986).

Metodologias para isolamento e identificação destes microorganismos estão muito bem descritas pela legislação brasileira através da Instrução Normativa (IN) número 62/03 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2003). Porém, comercialmente, há alguns meios de cultura que utilizam os mesmos princípios descritos na legislação, tornando as análises mais rápidas, menos laboriosas e com alguma redução

nos custos financeiros. É o caso dos caldos de detecção rápida de coliformes totais, termotolerantes e de *E. coli*. Esses meios de cultura contêm substâncias cromogênicas que auxiliam na identificação dos micro-organismos. Os coliformes utilizam os compostos cromogênicos inseridos na formulação do meio de cultura resultando na mudança de coloração no tubo de ensaio. O composto cromogênico X-gal” (5-bromo-4-cloro-3 indoil β-D-galactopironidase), adicionado ao meio, é o substrato que irá proporcionar a mudança de coloração se um micro-organismo possui a enzima β-galactosidase, que é uma particularidade dos coliformes. Já um composto fluorogênico (MUG: 4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo) presente no meio, quando digerido pela enzima β-D-glicoronidase produzidas por *E. coli*, mostram um resultado positivo através da emissão de luminescência ao se visualizar o tubo sob luz ultravioleta. Este meio também é utilizado para a detecção da produção de indol a partir do triptofano. Portanto, a associação de todos esses resultados auxilia na detecção e confirmação da presença ou ausência de coliformes e *E. coli*.

2.4 *Listeria monocytogenes*

Ao gênero *Listeria* pertencem dez espécies de bactérias: *L. denitrificans*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* (Seeliger & Jones, 1986; Hain et al., 2007; Zhao, 2011; Euzéby, 2012). Destas espécies, *L. monocytogenes* está associada a patologias no homem e *L. ivanovii* está mais relacionada a patologias em animais.

Listeria sp. são micro-organismos definidos como cocobastonetes regulares, Gram positivos, que não formam endósporo, apresentam flagelos

peritríquios e são móveis em temperatura entre 20 e 25°C, aeróbio ou anaeróbio facultativo, catalase positivo e oxidase negativa. Apresentam metabolismo fermentativo para glicose e hidrolisam a esculina. O gênero *Listeria* cresce em uma faixa de pH de 4,1 até 9,6, apresentando melhor crescimento com valores de pH entre 6 e 8. São caracterizados como micro-organismos psicro-tolerantes, pois crescem em temperaturas de 1 a 7°C, apesar de a faixa ótima de crescimento ser entre 30 e 37°C. O gênero *Listeria* sp. também é discriminado por diferenças antigênicas intra e entre espécies, o qual determina 17 sorovares. Dentre os sorovares de *L. monocytogenes*, os 1/2a, 1/2b e 4b estão relacionados com mais de 90% dos casos endêmicos e esporádicos de listeriose (Seeliger & Jones, 1986; Silva et al., 2001; Hain et al., 2007).

A espécie *L. monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose e é reconhecida como um patógeno para mamíferos. Esta infecção acomete preferencialmente pessoas que estejam em um “grupo de risco”, constituído por mulheres grávidas, fetos, neonatos, crianças, idosos e indivíduos com o sistema imune comprometido. Inicialmente, apresenta sintomas semelhantes a um resfriado, com febre baixa e mal estar. Com o avanço da infecção os sintomas podem progredir para meningite, endocardite, septicemia, aborto ou parto prematuro (Hof, 2003; Al-Adnani & Sebire, 2007; Antolín et al., 2008; Goulet et al., 2008). O período de incubação e a dose infectiva não estão bem definidos. Refere-se que o período de incubação pode variar de poucos dias a 2 ou 3 meses e que pode levar a taxas de 20 a 30% de mortalidade para os indivíduos que pertencem ao grupo de risco (Giovannacci et al., 1999; Maclauchlin et al., 2004).

Todas as espécies de *Listeria* estão distribuídas no ambiente podendo ser encontradas no solo, no esgoto, em vegetação deteriorada, em fezes de animais e em silagens. Dentre os alimentos, os que mais frequentemente são encontrados com contaminação por *L. monocytogenes* são: leite cru, queijos, carnes frescas ou congeladas, frangos, frutos do mar, frutas, vegetais, além de embutidos como linguiça e presunto de peru. No Brasil há alguns relatos de isolamento de *Listeria* sp. obtidas de alimentos, de locais de processamento, de humanos e animais (Hofer et al, 1998; Araújo et al., 2002; Schwab & Edelweiss, 2003; Silva et al., 2004; Lemes-Marques et al., 2007).

Na produção de alimentos, o isolamento e a correta identificação de *Listeria* sp. mostram-se importantes para traçar rotas de contaminação nas plantas de processamento e contribuir com os dados epidemiológicos. Para tal, são muito utilizados os métodos convencionais de detecção, ou seja, técnicas de cultura bacteriana (Zaffari et al., 2007; Nalério et al., 2009). O método clássico de identificação de *Listeria* sp. em alimentos e ambientes baseia-se na pré-incubação em meio de enriquecimento, a fim de recuperar células injuriadas e no uso de meios de culturas seletivos e ou diferenciais, (Kabuki et al., 2004; Alessandria et al., 2010). Como *Listeria* sp. é um micro-organismo fastidioso, esta etapa é crucial, pois recupera células até então não cultiváveis. Toda a técnica convencional de isolamento de *Listeria* sp. (enriquecimento seletivo, isolamento em meio seletivo e testes bioquímicos) podem levar diversos dias até a emissão do resultado final (Jadhav et al., 2012). Esta técnica também apresenta algumas limitações. Entre estas, destacam-se (i) a não recuperação de células injuriadas; (ii) as condições ambientais, pois

podem influenciar a característica fenotípica das cepas; (iii) a presença de bactérias contaminantes, que são capazes de mascarar a presença do organismo alvo e (iv) a presença de cepas atípicas que podem expressar reações atípicas e então serem excluídas da seleção (Frece, et al., 2010; Jadhav et al., 2012). Alessandria, et al. (2010) usaram técnica convencional e molecular para investigar a presença de *L. monocytogenes* na planta de processamento, na salmoura para produção de queijos e também no próprio produto final. Foi observado que a técnica convencional subestimou a presença de *L. monocytogenes* em alguns pontos de análise. Diversas técnicas vêm sendo difundidas a fim de reduzir o tempo entre a coleta e o resultado final. Neste sentido, meios de cultura seletivos e diferenciais têm sido desenvolvidos, além de que técnicas moleculares e imuno-enzimáticas já estão amplamente difundidas (Jadhav et al., 2012).

2.5 *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* é composto por 46 espécies e 24 subespécies (Euzéby, 2012). A este gênero pertencem bactérias Gram-positivas, que ocorrem em pares, cadeias ou cachos. São micro-organismos anaeróbios facultativos, não formadores de endósporo. São produtores de catalase. Apresentam um bom crescimento em concentrações de cloreto de sódio de até 10% e acima deste valor, o crescimento é relativamente baixo. A maioria das cepas apresenta crescimento entre 10 a 45°C e em pH entre 4,2 e 9,3. Em sua maioria apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, tendo a capacidade de fermentar uma grande variedade de carboidratos. Não hidrolisam esculina e são redutoras de nitrato. São produtores da enzima

coagulase e termonuclease, sendo estas importantes para as rotinas de identificação de *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* sp. encontram-se amplamente distribuídos na natureza e usualmente presentes na pele, cabelo/pelo, membranas mucosas, trato respiratório e intestinal de mamíferos e aves (Neves, 2007).

Em análises microbiológicas, as espécies que compõem o gênero *Staphylococcus* sp. são classificadas de acordo com sua capacidade de produzir a enzima coagulase. Assim, são divididas em Estafilococos Coagulase Positivo (ECoP) e Estafilococos Coagulase Negativo (ECoN). Entre todas as espécies do gênero, apenas sete são ECoP: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi*, *S. schleiferi* subespécie *coagulans*, (Seeliger & Jones, 1986; MacFaddin, 2001; Euzéby, 2012). A enzima coagulase age convertendo o fibrinogênio do plasma sanguíneo em fibrina. A capacidade de *Staphylococcus* sp. de produzirem enterotoxinas (*staphylococcal enterotoxin* - SE), geralmente está associada à capacidade de produção das enzimas termonuclease e coagulase. Entretanto, há ocorrência de algumas espécies que não produzem coagulase e/ou termonuclease, mas produzem SE (Oliveira et al., 2011). Entre os ECoP *S. aureus* é a espécie responsável pela maioria das ocorrências de surtos, apesar de outras espécies coagulase positivas também possuírem potencial toxigênico (Kluytmans, 1998; Michelin et al., 2006). Veras et al. (2008) relatam o isolamento de espécies de ECoP e ECoN de produtos lácteos oriundos de surto alimentar no estado de Minas Gerais. Dentre estes isolados, há espécies de ECoN com genótipo e fenótipo positivo para produção de enterotoxinas, porém o autor não os aponta como exclusivos agentes causais do surto (Veras

et al., 2008). Apesar de ECoN não terem sido associados diretamente aos casos de intoxicação alimentar, seu potencial toxigênico é reconhecido por estarem envolvidos em uma variedade de infecções em humanos e animais (Cunha, et al., 2006; Taponen & Pyörälä, 2009; Xu, et al., 2012).

2.5.1 Enterotoxinas estafilocócicas

Entre os fatores de virulência que apresentam importante papel no mecanismo de patogenicidade de *Staphylococcus* sp., ressaltam-se as SE. As SE são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, solúveis em água, resistentes a enzimas proteolíticas e são classificadas por suas características antigênicas. Essas toxinas são altamente termoestáveis, ou seja, resistem a processos de aquecimento mesmo que a célula vegetativa bacteriana tenha sido inativada (Franco & Landgraf, 2005). Estima-se que contagens de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colônia por grama de alimento (UFC/g) sejam suficientes para a produção de quantidades necessária de SE para desencadear uma intoxicação (Novick, 2000; Ertas et al., 2010).

Até o momento, já foram descritas 21 SE, identificadas de A à V (Schelin et al., 2011). Entre estas, as toxinas A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) e E (SEE) são as mais frequentemente relacionadas com surtos alimentares (Letertre et al., 2003). As SE foram subdivididas de acordo com propriedades físico-químicas e imunológicas e classificadas como, SEA (SEA1 e SEA2), SEC (SEC1, SEC2, SEC3, SEC_{bov}, SEC_{sheep}^c), SEG (SEG₂ e SEG_v), SEI (SEI_v), SEK (SEK₂), SEU (SEIU_v) (Cremonesi et al., 2005; Schelin et al., 2011). Em torno de 95% dos surtos são atribuídos as SE clássicas: A, B, C, D e E (Cremonesi et al., 2005).

Dentro do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* é a espécie mais relacionada aos casos de intoxicação alimentar devido à sua capacidade de produzir SE. Porém, outras espécies como *S. intermedius* e *S. hyicus*, também já demonstraram ter esta habilidade (Sena, 2000). Em indivíduos susceptíveis, a intoxicação pode ocorrer após a ingestão de alimento contendo entre 100 a 1000 nanogramas de SE (Bergdool, 1990). Estas não agem somente como potentes toxinas gastrintestinais, são toxinas pirogênicas e classificadas como superantígenos. Estas duas funções estão localizadas em diferentes domínios da proteína (Balaban & Rassoly, 2000). Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem em até 8 horas após a ingestão de alimentos contaminados, caracterizando-se por náuseas, vômito, mal-estar, dor abdominal e alguns casos podem apresentar diarreia com ou sem sangue (Loir, et al., 2003; Normanno et al., 2007). Os sintomas perduram de 24 a 48 horas e a taxa de mortalidade é baixa (Franco & Landgraf, 2005).

Os genes que codificam as SE geralmente são cromossomais, mas podem estar presentes em outros elementos genéticos (Kuroda et al., 2001). As SEA, SEB, SEC, SED e SEE já tiveram seus genes sequenciados e caracterizados e estudos têm observado que algumas cepas de *Staphylococcus* sp. podem produzir mais de uma SE (Cohen et al., 1986; Rosec & Gigaud, 2002; Normanno et al., 2005).

A expressão das SE B, C e D é mediada por um sistema regulatório (*agr*) (Schelin et al., 2011). A expressão do gene *agr* está associada à densidade de células vegetativas, por isso altas contagens (acima de 10^5 Unidade Formadora de Colônia - UFC) são determinantes para a produção de SE (Novick, 2000).

A enterotoxina A é considerada a toxina mais comum na ocorrência de intoxicações. O gene *sea* é composto por 771 pares de base (pb), que codifica uma proteína de 257 aminoácidos com peso molecular de 27.1 Quilo-Dalton (KDa). Esta toxina é expressa na fase estacionária e não é modulada pelo gene regulador *agr* (Balaban & Rassoly, 2000). A enterotoxina B é codificada pelo gene cromossomal *seb* de 798 pb que codifica uma proteína de 266 aminoácidos com 31.4 KDa (Betley & Mekalanos, 1998). SEB é considerada uma arma biológica em potencial, pois induz a uma resposta imune muito severa (Shylaja et al., 2010). A enterotoxina C compreende um grupo de proteínas altamente conservadas, distintas por seus antígenos. O gene *sec* é cromossomal. Hu et al. (2005) referem que a maioria dos *S. aureus* isolados de mastite bovina, são produtores de grandes quantidades de SEC. O gene *sed*, que codifica a enterotoxina D, foi localizado em um plasmídeo que possui o gene da penicilase também. SED é uma toxina bastante agressiva, onde 100 a 200 nanogramas são suficientes para desencadear a doença em indivíduos imunocomprometidos (Kokan & Bergdool, 1987). A sequência genética da SEE apresenta alta homologia com SEA (90%) (Balaban & Rassoly, 2000; Schelin et al., 2011).

2.5.2. *Staphylococcus* sp. e a produção de refeições

A produção de refeições é constituída pela utilização de três fatores que podem ser fonte de contaminação por *Staphylococcus* sp.: (i) insumos orgânicos; (ii) planta de processamento, ou seja, área física representada por equipamentos e ambientes que entram em contato com os alimentos; (iii) manipuladores de alimentos. O controle destes três fatores deve fazer parte

das atividades diárias das Unidades de Alimentação e Nutrição para garantir a produção de alimento seguro.

Os alimentos mistos, ovos e produtos a base de ovos, doces e sobremesas compõem os grupos de alimentos que estiveram mais relacionados com os surtos neste mesmo período. Em relação aos locais de maior ocorrência dos surtos, os restaurantes e as padarias ocuparam a segunda colocação. Só perdendo para os episódios ocorridos em residências. Entretanto, os casos de intoxicação estafilocócica, no Brasil são subestimados, pois não é uma doença de notificação compulsória (Brasil, 2006).

No Brasil, entre os anos de 2000 e 2011, *S. aureus* destacou-se como o segundo maior agente etiológico de surto alimentar (Brasil, 2011). Uma grande atenção merece ser dada à presença estafilococos nas linhas de processamento de alimentos, pois pode estar associada a manipuladores de alimentos. Estes podem ser portadores assintomáticos de estafilococos enterotoxigênicos. Na África do Sul 88% dos manipuladores analisados em uma “delicatessen”, eram portadores de *S. aureus* nas mãos e 44% nos aventais de trabalho (Lues & Tonder, 2007). Manipuladores de alimentos também foram analisados em cozinhas industriais da cidade de Botucatu/ São Paulo, onde 75,6% apresentaram ECoN e 24,4% ECoP. Ainda, 46,8% dos isolados ECoN apresentaram genes para enterotoxinas (Rall et al., 2010a). Carmo et al. (2003) relataram um surto ocorrido na cidade de Passos/ Minas Gerais. Foram detectados 2×10^8 UFC de estafilococos produtores de SEA, SEB, SED por grama de alimento analisado. Os manipuladores de alimentos também foram analisados e foi observado que estes eram portadores de estafilococos produtores das referidas toxinas, indicando os mesmos como

prováveis fontes de contaminação do alimento. Assim, a deficiência de procedimentos e hábitos de higiene pessoal e o não cumprimento das BP podem fazer do manipulador de alimentos, um veículo de disseminação deste patógeno aos alimentos (Raddi et al., 1988; Lues & Tonder, 2007; Normanno et al., 2007).

A identificação e/a quantificação da presença de *Staphylococcus* sp. nos alimentos é um indício dos padrões de higiene. No Brasil, o Ministério da Saúde e a ANVISA definem limites máximos para a presença de ECoP em alimentos (Brasil, 2001). Onde os que apresentam contagem acima do definido são potencialmente capazes de causar intoxicação. Portanto, a legislação brasileira não preconiza a necessidade de identificação em nível de espécie. No Anexo I da Resolução 12/2001, consta a determinação dos valores máximos para diversos grupos de alimentos (Brasil, 2001). O item 22 do Anexo I traz os padrões aceitos pela legislação brasileira para contagem de ECoP em refeições preparadas por Unidades de Alimentação e Refeição e demais estabelecimentos. A definição desta legislação merece grande atenção uma vez que se tem conhecimento de ECoN produtoras de enterotoxina, ou seja, potencialmente patogênicas (Rall et al., 2010b; Park et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as condições higiênico-sanitárias e a presença de *Staphylococcus* sp. em Unidades de Alimentação e Nutrição de grande porte e atuantes na cidade de Porto Alegre.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a adequação das Unidades de Alimentação e Nutrição às Boas Práticas e à regulamentação técnica vigente;
- Verificar e quantificar a presença de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em Unidades de Alimentação e Nutrição;
- Verificar a qualidade da água utilizada para produção de alimentos;
- Verificar e quantificar a presença de *Listeria monocytogenes* em Unidades de Alimentação e Nutrição;
- Verificar, quantificar a presença e identificar as espécies de *Staphylococcus* sp. em Unidades de Alimentação e Nutrição;
- Examinar a presença de genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E nas cepas de *Staphylococcus* sp. isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e a metodologia específicos para cada um dos experimentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa estão apresentados nos respectivos artigos que constam no capítulo 5 (RESULTADOS).

Este estudo foi realizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. As coletas de dados e dos materiais para análise ocorreram no período entre julho de 2009 e fevereiro de 2010.

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os subtítulos deste capítulo correspondem aos artigos científicos formatados de acordo com as normas das respectivas revistas, às quais, foram submetidos ao exame de publicação.

Também foram desenvolvidos relatórios técnicos individuais para cada uma das UANs que participaram deste estudo. Os relatórios contemplaram os resultados da Lista de Verificação com sugestão de adequação quando necessário, os resultados das análises microbiológicas e moleculares. Estes relatórios foram entregues às Concessionárias de Alimentos, às quais são administradoras responsáveis pelas UANs. A redação dos relatórios teve como objetivo auxiliar os estabelecimentos na promoção da qualidade dos serviços prestados à população.

5.1 Artigo 1

5.1.1 Avaliação das condições de higiene e da adequação às Boas Práticas em Unidades de Alimentação e Nutrição no município de Porto Alegre - RS

Artigo publicado na Revista Alimentos e Nutrição – *Brazilian Journal of Food and Nutrition* – Araraquara.



AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIGIENE E DA ADEQUAÇÃO ÀS BOAS PRÁTICAS EM UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO NO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE – RS*

Josi Fagundes de MELLO**
Sibele SCHNEIDER***
Mateus Silva de LIMA****
Jeverson FRAZZON*****
Marisa da COSTA*****

RESUMO: As unidades de alimentação e nutrição (UANs) vêm aumentando sua atuação no mercado de refeições coletivas e são classificadas como o terceiro maior local de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. O fator primordial para diminuir a ocorrência destas doenças é o uso contínuo das boas práticas, que são procedimentos que contribuem para a produção de um alimento seguro e de qualidade. Neste estudo foi avaliada a adequação de sete UANs, de grande porte, as boas práticas e verificada a higiene de superfícies. A avaliação da adequação as boas práticas ocorreu por meio da aplicação da lista de verificação com base na Portaria 78/09-RS. A avaliação da higiene das superfícies, por meio da técnica de Trifosfato de Adenosina bioluminescência, apontou que 13 entre as 39 superfícies analisadas foram classificadas como insatisfatórias. Todas as UANs apresentaram menos de 50% de conformidade frente à lista de verificação. Destacam-se os itens Higienização, Preparação do alimento, Armazenagem e transporte do alimento preparado, como os itens com maiores percentuais de não-conformidades. Os itens Abastecimento de água e Controle de pragas foram 100% conformes em todas as UANs. Os resultados demonstram que é imprescindível que estas UANs revejam os procedimentos de higiene e executem de forma efetiva as boas práticas nas rotinas de produção e distribuição de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Avaliação higiênico-sanitária; lista de verificação; serviço de alimentação.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial ocorrido no Brasil a partir de meados do século XX provocou mudanças sociais e nos hábitos alimentares da população brasileira e também na expansão da atuação dos serviços de alimentação (AKUTSU et al., 2005). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) todo estabelecimento onde o alimento é manipulado, preparado, armazenado e/ou exposto à venda, é considerado um serviço de alimentação (AYCICEK et al., 2006). Fazem parte desse segmento, as Empresas de Alimentação Coletiva, que são administradoras de restaurantes comerciais e institucionais. As unidades de trabalho onde são desenvolvidas as atividades de produção e distribuição de refeições para coletividades sadias ou enfermas são denominadas unidades de alimentação e nutrição (UANs) (CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS, 2005). O objetivo principal das UANs é o de fornecer alimentação nutricionalmente equilibrada a fim de preservar ou recuperar a saúde dos seus consumidores. Desta forma, é intrínseco as atividades das UANs o conceito de inocuidade dos alimentos, representado pela qualidade higiênico-sanitária e produção de alimento seguro.

A Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas estima que para o ano de 2013, esse segmento sirva 11,7 milhões de refeições/dia no país (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS, 2013). Assim, observa-se a abrangência populacional desse segmento e o impacto que a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos poderia acarretar à saúde pública (BRASIL, 2011; NUNES et al., 2010; OLI-

*Trabalho elaborado com apoio do Programa Federal REUNI e da CAPES.

**Departamento de Nutrição – Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas – 96010-610 – Pelotas – RS – Brasil. E-mail: josimello@gmail.com.

***Nutricionista – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 90040-060 – Porto Alegre – RS – Brasil.

****Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Curso de Doutorado – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil.

*****Departamento de Ciência dos Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil.

*****Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 90040-060 – Porto Alegre – RS – Brasil.

VEIRA et al., 2010). Neste sentido, os órgãos de vigilância sanitária exercem papel importante na regulamentação da produção de alimentos (SÃO PAULO, 2013; RIO GRANDE DO SUL, 2009; BRASIL, 2004; 2002).

As obrigações legais, bem como a competitividade do mercado de alimentação e as exigências dos consumidores, impulsionaram os serviços de alimentação na busca de ferramentas que auxiliassem na implantação e controle de inocuidade de seus produtos (SACCOL et al., 2009). A ANVISA define boas práticas como todos os procedimentos que visam garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e a conformidade com a legislação sanitária (BRASIL, 2004). Para diagnosticar preliminarmente a adesão às boas práticas, a legislação brasileira indica a aplicação de lista de verificação, onde seus resultados permitam identificar pontos de não conformidade e mediante isso, traçar ações corretivas (GENTA et al., 2005; RIO GRANDE DO SUL, 2009). A identificação de itens de verificação críticos pode servir de complemento ao diagnóstico da adequação às boas práticas em UANs, pois esses itens podem auxiliar na prevenção da ocorrência de surtos (ALMEIDA et al., 2009; GENTA et al., 2005).

A correta higiene de quaisquer superfícies que entram em contato com os alimentos é um ponto chave na produção de alimento seguro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Falhas nos processos de higiene provocam o acúmulo de resíduos orgânicos que podem servir de substrato para o crescimento microbiano e a consequente formação de biofilmes (SILVA et al., 2010; TEBBUTT et al., 2007). Estes são microcolônias bacterianas envolvidas por uma matriz exopolissacarídica e aderidas a uma superfície, de onde uma vez estabelecidos tornam-se resistentes a detergentes e sanitizantes (SANDASI et al., 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A quantificação de matéria orgânica pode servir de complemento a lista de verificação na avaliação das condições de higiene dos serviços de alimentação. A técnica ATP bioluminescência detecta a quantidade de Trifosfato de Adenosina (ATP) que pode ser oriundo de matéria orgânica de micro-organismos, alimentos ou sujidades presentes em superfícies (BARROS et al., 2007). Portanto, essa técnica pode ser utilizada para avaliar a qualidade higiênica de superfícies em indústrias e serviços de alimentação (SDMM et al., 2008; AYCICEK et al., 2006).

Com base no exposto, esse estudo teve como objetivo verificar a quantidade de ATP presente em superfície de ambientes e equipamentos utilizados para produção de refeições, além de avaliar a adequação de UANs às boas práticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Participaram do estudo duas empresas de grande porte, prestadoras de serviços no ramo de alimentação para coletividades, atuantes em várias unidades federativas do Brasil. Foram submetidas à avaliação higiênico-sanitária

todas as UANs administradas por essas duas empresas, que produziam mais de 500 refeições por dia cada e que estavam no município de Porto Alegre (RS), perfazendo um total de sete estabelecimentos.

Avaliação do ATP-bioluminescência

Para verificar a quantidade de matéria orgânica presente em superfícies foi utilizado o aparelho "ATP Luminometer" (Hygiene®, SistemaSURE II, Camarillo, United States) (HYGIENA, 2009). Foram realizadas coletas em sete equipamentos/superfícies. Esses equipamentos/superfícies foram categorizados entre: (i) aqueles que fazem parte da cadeia de produção de alimentos (cortador e processador de legumes, placa de corte de carnes e bancada de preparo de carnes) e (ii) aqueles que fazem parte da cadeia de distribuição e por isso podem entrar em contato com o alimento pronto para consumo (bancada de montagem de pratos, parte interna do equipamento de refrigeração da sobremesa e da cuba de distribuição de alimentos).

A coleta de material para esta análise consistiu na fricção de swab próprio para o "ATP Luminometer" e umedecido em solução salina a 0,85%. Foi coletado material em 50cm² de superfície limpa e desinfetada, de acordo com os protocolos das UANs, para cada ambiente ou equipamento analisado (MENDES et al., 2011). Após a fricção, o swab foi introduzido no aparelho "ATP Luminometer" que emite resultado imediato. Os resultados são expressos em unidades relativas de luz (URL) resultante da quantidade de ATP presente no local de coleta. Resultados de até 150 URL configuram condições satisfatórias de higiene; de 151 a 300 URL indicam condições de alerta em relação à higiene das superfícies e acima de 301 a higiene é considerada insatisfatória (COSTA, 2006).

Adequação das UANs às boas práticas

As UANs foram avaliadas quanto à adequação às boas práticas por meio da aplicação da lista de verificação, que é parte integrante da Portaria Estadual n° 78/09- RS, com modificações (RIO GRANDE DO SUL, 2009). Algumas perguntas da lista de verificação foram suprimidas e outras foram re-estruturadas, de modo a priorizar itens críticos para o controle da inocuidade dos alimentos. A lista de verificação aplicada no presente estudo contempla 86 itens de questionamentos categorizados em 12 grupos de avaliação: (1) Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios; (2) Higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios; (3) Controle integrado de pragas; (4) Abastecimento de água; (5) Manejo de resíduos; (6) Manipuladores; (7) Matérias-primas, ingredientes e embalagens; (8) Preparação do alimento; (9) Armazenamento e transporte do alimento preparado; (10) Exposição ao consumo do alimento preparado; (11) Documentação e registro; (12) Responsabilidade técnica. Os itens em conformidade com a lista de verificação foram registrados como conformes, os itens que não atendiam aos questionamentos foram re-

gistrados como não conformes e os itens não pertinentes a realidade da UAN foram registrados como não aplicáveis.

As visitas ocorreram nos horários de maior demanda, com prévio conhecimento de toda a equipe das UANs, permitindo assim a constatação dos procedimentos e práticas adotados em cada estabelecimento. O preenchimento da lista de verificação ocorreu na própria UAN por meio da observação direta do funcionamento, observação das instalações físicas, relatos de funcionários, aferição de temperaturas (termômetro digital Instrutherm – TE-300) e análise documental.

Avaliação da lista de verificação

Concomitante à avaliação das boas práticas, os mesmos itens da lista de verificação da Portaria 78/09-RS foram classificados como críticos de acordo com o grau de risco que representam à segurança dos alimentos, segundo Almeida et al. (2009). Itens imprescindíveis para produção de alimento seguro, por auxiliarem na proteção contra a ocorrência de surto, foram considerados críticos. Desta forma, dentre os 86 itens pertinentes à lista de verificação utilizada neste estudo, 50 deles foram classificados como críticos. Os demais itens foram considerados não críticos ou não aplicáveis à realidade da UAN.

Avaliação dos itens críticos

Os estabelecimentos foram avaliados individualmente quanto ao percentual de atendimento à lista de verificação (atendimento às boas práticas) e aos itens críticos. Realizou-se a divisão do total de itens conformes pelo total de itens questionados (conformes e não conformes), desconsiderando-se os itens não aplicáveis (GENTA et al., 2005). Mediante os percentuais de adequação encontrados, cada UAN foi classificada como Grupo 1 (de 76 a 100% de adequação), Grupo 2 (entre 51 e 75% de adequação) ou Grupo 3 (até 50% de adequação) (BRASIL, 2002).

RESULTADOS

Todas as UANs que participaram deste estudo apresentaram pelo menos um profissional nutricionista e número de manipuladores de alimentos adequadamente dimensionados ao número de refeições servidas (Quadro 1) (CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS, 2005).

Os resultados da avaliação de ATP em superfícies estão apresentados na Tabela 1.

O resultado global da aplicação da lista de verificação mostra que as UANs analisadas apresentaram valores que variaram de 31,7 a 47,4% de atendimento dos quesitos avaliados. Assim, todas as UANs foram classificadas no

Quadro 1 – Número de refeições produzidas e quadro profissional das unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS, 2012.

UAN	Refeições por dia	Manipuladores	Nutricionista	Técnico em nutrição
1	550	15	1	-
2	605	15	1	1
3	1505	31	1	2
4	529	15	1	1
5	510	13	1	-
6	2270	41	2	1
7	723	16	1	-

Legenda: UAN: Unidade de Alimentação e Nutrição; -: ausente.

Tabela 1 – Avaliação de ATP-bioluminescência nos equipamentos e superfícies das unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS, 2012.

Itens avaliados	Classificação das condições de higiene das superfícies			
	Satisfatório	Alerta	Insatisfatório	Não possui equipamento / utensílio
Cortador de legumes ^a	-	1	5	1
Placa de corte de carnes ^a	4	1	2	-
Processador de legumes ^a	-	-	2	5
Bancada de preparo de carnes ^a	-	-	7	-
Bancada de montagem de pratos ^b	-	-	3	4
Equipamento de refrigeração-sobremesa ^b	3	-	4	-
Cuba de distribuição de alimentos ^b	4	-	3	-

Legenda: ^a: equipamento/ superfície que não entram em contato com alimento pronto para consumo; ^b: equipamento/ superfície que podem entrar em contato com alimento pronto para consumo; -: nenhuma superfície classificada neste quesito.

Grupo 3, apresentando um atendimento deficiente as boas prática e a legislação vigente. Analisando individualmente os doze grupos de avaliação que compõe a lista de verificação (Tabela 2), observa-se que a maioria foi classificado no Grupo 3.

Em todas as UANs observou-se que o percentual de conformidade para os itens críticos é mais elevado que o da lista de verificação (Figura 1). Na avaliação dos itens críticos para produção de alimento seguro observou-se que seis UANs apresentaram menos de 50% de adequação, sendo classificadas no Grupo 3.

DISCUSSÃO

A higiene do ambiente, equipamentos e utensílios tem relação direta com a qualidade sanitária das UANs e influencia a inocuidade dos alimentos produzidos e a saúde dos consumidores (MENDES et al., 2011; BARROS et al., 2007). Os altos índices de URL (Tabela 1) encontrados nas diversas superfícies analisadas neste estudo, estão de acordo com a classificação (Grupo 3) do item Higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios na maioria das UANs.

Tabela 2 – Distribuição das unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS (2012), quanto aos grupos de verificação que compõem a Portaria 78/09-RS.

Grupo de verificação	Número de UANs ^a por grupo de verificação segundo classificação da ANVISA ^b		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios	1	2	4
Higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios	-	-	7
Controle integrado de pragas	7	-	-
Abastecimento de água	7	-	-
Manejo de resíduos	1	-	6
Manipuladores	-	-	7
Matérias-primas, ingredientes e embalagens	-	-	7
Preparação do alimento	-	-	7
Armazenamento e transporte do alimento preparado	-	-	7
Exposição ao consumo do alimento preparado	1	2	4
Documentação e registro	3	4	-
Responsabilidade	-	4	3

Legenda: ^a Unidades de Alimentação e Nutrição; ^b Agência Nacional de Vigilância Sanitária; -: nenhuma UAN classificada neste quesito.

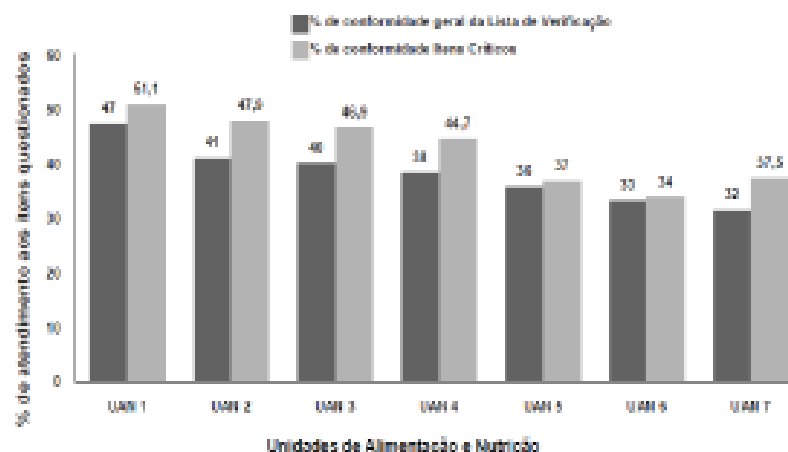


FIGURA 1 – Comparação dos percentuais de conformidade dos itens críticos e do resultado geral da lista de verificação aplicada em unidades de alimentação e nutrição avaliadas em Porto Alegre-RS (2012).

Destacam-se os altos valores de URL nas bancadas de manipulação de carnes. Este grupo de alimentos contém naturalmente grande quantidade de ATP oriundo de matéria orgânica e/ou de micro-organismos (BARROS et al., 2007). Independente da origem do ATP, o resultado mostrou-se insatisfatório para ambientes de manipulação de alimentos. Em contrapartida, a maioria das UANs apresentou condições satisfatórias para higiene nas placas de carnes. É recomendado que seja garantida a adequada higiene de superfícies a fim de evitar a multiplicação e disseminação microbiana (SILVA; OLIVEIRA, 2009). A bancada de montagem de pratos prontos para consumo e a prateleira do equipamento refrigerado de armazenamento de sobremesas fazem parte da cadeia de distribuição de alimento pronto para consumo, mas não entram diretamente em contato com os alimentos. Independente disso é imprescindível que apresentem condições adequadas de higiene, pois esses ambientes podem ser fonte de contaminação cruzada (LEHTO et al., 2011). Algumas UANs utilizavam bancadas de montagem de pratos. Nestes casos, o cliente não usava a linha de auto-serviço e recebia um prato previamente montado pelos manipuladores. Estes pratos permaneciam descobertos sobre as bancadas e em temperatura ambiente até sua montagem completa, onde o período de tempo era variável de acordo com a composição do cardápio. Estes fatores aliados às más condições de higiene tornaram esta atividade crítica para inocuidade da refeição servida. Em entrevista com responsáveis por restaurantes comerciais, Silva & Oliveira (2009) observaram que 20% desconheciam o termo contaminação cruzada.

Um ponto a ser considerado para explicar o resultado global da lista de verificação (Grupo 3) apresentados por todas as UANs, é a questão gerencial das empresas de refeições coletivas. Com base em relatos empíricos durante a visita técnica a algumas UANs, observou-se a presença de dificuldades decorrentes de restrições orçamentárias, o que limitou a implantação de melhorias e reparos estruturais e manutenções periódicas ou corretivas de equipamentos. Também foi percebida uma grande preocupação por parte de toda equipe das UANs em atingir metas organizacionais financeiras. Este é um fator importante para a sobrevivência e competitividade das empresas, desde que não comprometa o foco na produção de alimento seguro. Analisar individualmente os grupos de verificação que compõem a lista de verificação (Tabela 2) propicia uma melhor compreensão dos pontos que necessitam de maior atenção para que as UANs possam se adequar às boas práticas e a legislação sanitária.

Dentre as UANs analisadas, 57,1% não estavam adequadas quanto ao grupo Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios. Resultado diferente dos apresentados por Couto et al. (2005) e São José et al. (2011) que encontraram 78% e 76% de adequação para estes itens em unidade hoteleira e UANs, respectivamente. No presente estado, uma única unidade apresentou proteção nas luminárias da área de produção de alimentos. Acidentes com luminárias podem resultar em risco físico aos alimentos,

como resíduos de vidro e metal, e riscos de acidentes de trabalho.

Todas as UANs tiveram um mau desempenho quanto ao grupo de verificação Higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios. Nenhuma UAN apresentou mais de 10% de adequação dos quesitos que compõem este grupo, onde se destacou uma grande dificuldade por parte das UANs em adaptar o uso de esponjas, panos de limpeza descartáveis e não descartáveis, bem como o armazenamento correto de produtos saneantes às boas práticas. O processo de higienização é de extrema importância para controle de matéria orgânica dos panos de limpeza, pois esses podem disseminar micro-organismos ao ambiente e aos alimentos (LEHTO et al., 2011; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

Apenas os grupos de verificação Controle integrado de pragas e Abastecimento de água apresentaram 100% de adequação em todas as UANs. O controle de pragas e vetores é um item importante em serviços de alimentação. A presença destes representa risco de transmissão de doenças, foco de disseminação de micro-organismos e sujidades. Outros estudos também encontraram elevada conformidade neste item (MARIANO; MOURA, 2008; AKUTSU et al., 2005; GENTA et al., 2005). Provavelmente a maior facilidade de execução e terceirização do serviço sejam fatores que contribuam para adequação das UANs neste quesito (GENTA et al., 2005). O abastecimento de água era realizado pelo Departamento Municipal de Água e Esgoto e as UANs possuíam registro de higienização periódica do reservatório de água. Nenhuma unidade apresentou uso de fonte alternativa de água.

Na avaliação do Manejo de resíduos, apenas uma UAN possuía todos os coletores de resíduos das áreas de preparação e armazenamento de alimentos dotados de tampas acionadas sem contato manual, identificados, íntegros, em número suficiente e com uso adequado. Apenas uma UAN apresentou instalações sanitárias dotadas de lavatórios e supridas de produtos destinados à higiene pessoal e nenhuma outra possuía torneira com acionamento automático para higiene das mãos nas áreas de manipulação de alimentos (RIO GRANDE DO SUL, 2009). A inadequação destes fatores refletiu no alto percentual (100%) de não conformidade de alguns procedimentos de higiene dos manipuladores de alimentos avaliados pelo grupo de verificação Manipuladores. Quintiliano et al. (2008) e São José et al. (2011) também pontuaram inadequação neste sentido, como falhas na estrutura física e nas instalações sanitárias.

Foram verificadas falhas nos procedimentos e na periodicidade de higiene das mãos e descuido com o asseio pessoal. Uma dificuldade comum às UANs foi a falta de disponibilidade de afastar da manipulação de alimentos, os funcionários que apresentavam doenças ou lesões de pele e nas unhas. Essa prática é uma atitude de risco uma vez que as mãos dos manipuladores podem ser foco de disseminação de doenças (LUES; TONDER, 2007). O controle da saúde dos manipuladores de alimentos foi inadequado em duas UANs sob responsabilidade da mesma empresa de ali-

mentação coletiva. Nestas não havia registros de realização de exames admissionais e periódicos. O Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional, regulamentado pelo Ministério do Trabalho e Emprego, determina que a requisição de exames complementares à avaliação da saúde do manipulador fique a critério do médico do trabalho (SÃO PAULO, 2013). Ainda dentro do grupo de avaliação de Manipuladores, observou-se que todas as UANs apresentaram carência de capacitação periódica sobre temas pertinentes exigidos pela legislação sanitária.

A avaliação dos grupos Matérias-primas, ingredientes e embalagens; Preparação do alimento; e Armazenamento e transporte do alimento preparado, resultou na classificação, de todas as UANs, no Grupo 3. Foi observada uma grande inconformidade nos procedimentos e temperatura de armazenamento de matéria-prima e nos alimentos prontos para consumo. Nos momentos de maior produção de alimentos, possivelmente os equipamentos não conseguiram manter as temperaturas ideais de armazenamento. A manutenção periódica destes equipamentos pode auxiliar a minimizar estes problemas. O armazenamento de matéria-prima e alimentos prontos para consumo em um mesmo equipamento se mostrou crítico em algumas UANs. Ocorrências como armazenamento de sobremesas sob cubas com carne crua e alimentos prontos em recipientes abertos e sem proteção denotam descuido neste processo. Outro quesito crítico para controle microbiano em alimentos prontos para consumo é o resfriamento, de 60°C a 10°C, em no máximo 2 horas. Porém, quando se trata de produção de alimentos em grande escala esse controle se mostra complexo. Em muitas UANs esta dificuldade era aumentada pela falta de espaço físico e equipamentos adequados para este fim.

Nos procedimentos de higienização de hortifrutigranjeiros percebeu-se discrepância entre a descrição do Manual de Boas Práticas, o relato dos manipuladores e a observação *in loco*. Em todas as UANs, este Manual continha a descrição dos procedimentos de acordo com a legislação. No relato dos manipuladores percebeu-se insegurança em afirmar a quantidade de cloro e volume de água utilizados. A observação do procedimento mostrou falhas no processo de higienização dos alimentos, no controle da concentração de cloro livre e na reutilização da solução de desinfecção. Em todas UANs visitadas, a utilização de ovos obedecia aos critérios descritos na Portaria 78/09-RS (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

O grupo de avaliação Armazenamento e transporte do alimento preparado, verificou as condições de armazenamento da refeição preparada e do sistema de refeição transportada, ou seja, refeição produzida em uma cozinha central e distribuída em outro estabelecimento. Dentre os estabelecimentos visitados, apenas quatro UANs serviam refeições transportadas. Todas apresentaram falhas no processo de armazenamento dos alimentos preparados. Em apenas uma UAN os alimentos que aguardavam transporte estavam corretamente identificados com designação do produto, data de preparo e prazo de validade.

Na avaliação da Exposição ao consumo do alimento, todas UANs estavam adequadas quanto a área de distribuição das refeições. Estas apresentavam boas condições de higiene e ausência de ornamentos que configurassem fontes de contaminação aos alimentos. Porém, uma observação comum à várias UANs foi a ausência de equipamento de distribuição de alimentos com temperatura de refrigeração. As saladas e sobremesas eram distribuídas em balcões a temperatura ambiente. A temperatura e o tempo de exposição dos alimentos são importantes fatores de controle da multiplicação microbiana (BAS et al., 2006).

Concomitante com os maus resultados de higienização, observou-se que no grupo de verificação Documentação e registro, apesar de todas as UANs possuírem Manual de Boas Práticas, nenhuma possuía Procedimento Operacional Padronizado (POP) para higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios. Em adição, duas UANs não apresentaram POP sobre higiene e saúde dos manipuladores e outras duas UANs sobre controle integrado de vetores e pragas urbanas, apesar de possuírem registro da realização deste controle. Silva & Oliveira (2009) também observaram que 40% dos restaurantes analisados, não possuíam POP documentados, configurando descaso com as boas práticas. A legislação brasileira e a Portaria 78/09-RS tornam obrigatório, para os serviços de alimentação, a existência destes três procedimentos referidos, além do POP de higienização do reservatório de água (RIO GRANDE DO SUL, 2009; BRASIL, 2004).

Quanto ao quesito Responsabilidade, constatou-se que em 100% das UANs, o responsável técnico pelas atividades de manipulação dos alimentos era o nutricionista. Esses profissionais também possuíam comprovação de atualização sobre boas práticas para serviços de alimentação, estando desta forma de acordo com a exigência da Portaria 78/09-RS. Outro fato comum a todas as unidades foi a atitude frente a possíveis ocorrências de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Os responsáveis técnicos adotavam a prática de comunicar apenas as empresas de refeições coletivas e não de realizar notificação diretamente aos órgãos oficiais de Vigilância Sanitária, como o recomendado pela Secretaria de Saúde do estado do Rio Grande do Sul. Essa prática pode implicar em falhas no sistema de notificação de surtos e avaliação de dados epidemiológicos (BRASIL, 2011).

Em todas as UANs observa-se que o percentual de conformidade para os itens críticos é mais elevado do que os itens que compõem a lista de verificação da Portaria 78/09-RS (Figura 1). Isso provavelmente se deve a esta Portaria requerer diversos registros de execução de atividades, orientações sobre procedimentos e monitoramento de processos (14 itens), os quais englobam atividades administrativas e de capacitação. Por si só, a existência de um impresso que representa o registro de tais atividades não é considerada crítica para a segurança dos alimentos porque a existência ou não deste impresso não coloca em risco a saúde do consumidor. Porém, o que realmente é considerado crítico é a realização efetiva da atividade relatada em tal re-

gistro. Os registros são requisitos importantes para controle e comprovação dos processos e rotinas das UANs, além de serem quesitos para implantação de programas de gestão da qualidade como a Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

CONCLUSÃO

A inocuidade dos alimentos e as condições higiênicossanitárias dos estabelecimentos produtores de refeições estão diretamente relacionadas com a forma de execução e de controle dos processos de produção. Considerando-se os resultados obtidos, evidencia-se a extrema necessidade de modificações de diversos processos que englobam a produção de refeições das UANs que participaram deste estudo. Nestes estabelecimentos a adequação das práticas de higiene, da preparação e do armazenamento de matéria-prima e alimentos prontos para consumo são os itens que merecem atenção prioritária, devido aos perigos que podem representar para a saúde do consumidor. A capacitação e o treinamento dos manipuladores, assim como a realização de controles e registros dos processos somam atividades imprescindíveis aos serviços de alimentação, porém ausentes nas UANs que participaram deste estudo. A adesão dos serviços de alimentação às boas práticas é imprescindível para garantir métodos seguros de produção de alimentos e, por consequência, a qualidade do produto final.

AGRADECIMENTOS

As empresas de refeições coletivas que participaram desta pesquisa.

MELLO, J. F.; SCHNEIDER, S.; LIMA, M. S.; FRAZZON, J.; COSTA, M. Evaluation of good practices and hygiene in food and nutrition units in Porto Alegre – RS. *Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.*, v.24, n.2, p. xx-xx, abr./jun. 2013.

■**ABSTRACT:** The food and nutrition units have increased their operation in the collective meals market, and are classified as the third largest site of food transmitted diseases in Brazil. The primary factor to reduce the occurrence of these diseases is the continued use of good practices, which are procedures that contribute to the production of a safe and a high quality meal. This study evaluated the adequacy of good practices in seven large sized food and nutrition units and verified the hygiene of surfaces. The assessment of compliance of good practices occurred through the use of a checklist based on a local law “Portaria 78/09-RS”. The evaluation of surfaces, by adenosine triphosphate bioluminescence technique, showed that 13 of 39 surfaces analyzed were rated unsatisfactory. All units had less than 50% of compliance with the checklist. Noteworthy are Sanitization, Food preparation, Storage and transportation

of prepared food as items with higher percentages of non-compliance. Items Water supply and Pest control were 100% compliant for all units. The results show that it is essential that these units review the hygiene procedures and effectively implement the good practices in their routines of production and distribution of food.

■**KEYWORDS:** Sanitary inspections; checklist; food and nutrition units.

REFERÊNCIAS

- AKUTSU, R.C. et al. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. *Rev. Nutr. PUCCAMP*, v.18, n. 3, p.419-427, 2005.
- ALMEIDA, J.A. et al. Guia de verificação: boas práticas e APPCC: mesa. 2.ed. Brasília, DF: SENAI/DN, 2009. 70p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS. Mercado real. Disponível em: <http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp?IDMenu=21>. Acesso em: 17 maio 2013.
- AYCICEK, H.; OGUZ, U.; KARCI, K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, v.209, p.203-206, 2006.
- BARROS, M.A.F. et al. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v.4, n. 27, p.856-862, 2007.
- BAS, M.; ERSUM, A.S.; KIVANÇ, G. The evaluation of food hygiene, knowledge, attitudes and practices of handlers in food businesses in Turkey. *Food Control*, v.17, n.4, p.317-322, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 06 nov. 2002. p. 55.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 16 set. 2004. p. 25.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados epidemiológicos: DTA período de 2000 a 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_sita.pdf. Acesso em: 13 jul. 2012.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. Resolução n. 380, de 2005. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições, estabelece parâmetros numéricos de refertácia, por área de atuação, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2006. p. 66.

COSTA, P.D. et al. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, n.3, p.345-349, 2006.

COUTO, S.R.M. et al. Diagnóstico higiênico-sanitário de uma unidade hoteleira de produção de refeições coletivas. *Hig. Aliment.*, v.19, n.31, p.15-18, 2003.

GENTA, T.M.S.; MAURICIO, A.A.; MATIOLI, G. Avaliação das boas práticas através de *check-list* aplicado em restaurantes self-service da região central de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.*, v.27, n.2, p.151-156, 2005.

HYGIENA. Hygiene monitoring products. 2009. Disponível em: http://www.hygiene.net/all_products-hyg_mon.html. Acesso em: 10 jan. 2009.

KUSUMANINGRUM, H.D. et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.85, n.3, p.227-236, 2003.

LEHTO, M. et al. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. *Food Control*, v.22, n.3-4, p.469-475, 2011.

LUES, J.F.R.; TONDER, I.V. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, v.18, n.4, p. 326-332, 2007.

MARIANO, C.G.; MOURA, P.N. Avaliação das boas práticas de fabricação em unidade produtora de refeições (UPR) auto-gestão do interior do Estado de São Paulo. *Rev. Saude-Guarapuava*, v.2, n.2, p.73-81, 2008.

MENDES, R.A.; COELHO, A.I.M.; AZEREDO, R.M.C. Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição. *Ciênc. Saude Coletiva*, v. 16, n.9, p.3933-3938, 2011.

NUNES, B. N. et al. A survey on the sanitary condition of commercial foods of plant origin sold in Brazil. *Food Control*, v.21, n.1, p.50-54, 2010.

OLIVEIRA, A.B.A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Rev. HCPA*, v.30, n.3, p.179-285, 2010.

QUINTILIANO, C.R. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias em restaurantes, com aplicação de ficha de inspeção baseada na legislação federal, RDC 216/2004. *Hig. Aliment.*, v.22, n.160, p.25-30, 2008.

RIBEIRO-FURTINI, L.L.; ABREU, L.R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. *Ciênc. Agrotec.*, v.30, n.2, p.358-363, 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Portaria n. 78 de 28 de janeiro de 2009. Aprova a lista de verificação em boas práticas para serviços de alimentação, aprova normas para cursos de capacitação em boas práticas para serviços de alimentação e dá outras providências. *Diário Oficial [de] Estado do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, 30 jan. 2009. p. 35.

SACCOL, A.L.F. et al. Avaliação das boas práticas em duas visões: técnica e da empresa. *Braz. J. Food Technol.*, v. 21, p.19-23, 2009.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, v.19, n.11, p.1070-1075, 2008.

SÃO JOSÉ, J.F.B.; COELHO, A.I.M.; FERREIRA, K.R. Avaliação das boas práticas em unidade de alimentação e nutrição no município de Contagem-MG. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.22, n.3, p.479-487, 2011.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saúde. Portaria CVS n. 05, de 19 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. *Diário Oficial [de] Estado de São Paulo*, São Paulo, 19 abr. 2013. p. 32.

SILVA, C.B.; OLIVEIRA, A.B.A. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária em restaurantes indicados por guia de estabelecimentos da cidade de Porto Alegre. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, v.34, n.3, p.109-123, 2009.

SILVA, I.D. et al. Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis, and *Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.30, n.1, p.231-236, 2010.

SIMM, E.M. et al. Interference of some organic substances and microorganisms adhered to stainless steel in ATP-bioluminescence measurement. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.51, n.3, p.587-593, 2008.

TEBBUTT, G.; BELL, V.; AISLABIE, J. Verification of cleaning efficiency and its possible role in programmed hygiene inspections of food businesses undertaken by local authority officers. *J. App. Microbiol.*, v.102, n.4, p.1010-1017, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety: prevention of foodborne disease: five keys to safer food. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys/en/index2.html>. Acesso em: 15 jun. 2011.

Recebido em: 03/02/2012

Aprovado em: 14/05/2013

5.2 Artigo 2

5.2.1 Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services

- Artigo aceito para publicação no *Brazilian journal of Microbiology* em 03 de setembro de 2013.

Title: Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services

Running head: *Staphylococcus* sp. in food services

Authors and affiliations:

Jozi Fagundes de Mello¹; Laura Braga da Rocha²; Ester Souza Lopes³; Jeverson Frazzon⁴; Marisa da Costa⁵

¹ Federal University of Pelotas, School of Nutrition; ² Federal University of Rio Grande do Sul, School of Nursing; ³ Federal University of Rio Grande do Sul, Program of Post-Graduation in Agricultural Microbiology and Environment; ⁴ Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Food Science; ⁵ Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Microbiology and Parasitology.

Abstract

Sanitary conditions are essential for the production of meals and control of the presence of pathogens is important to guarantee the health of customers. The aim of this study was to evaluate the sanitary quality of food services by checking the presence of thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* sp. and evaluate the toxigenic potential from the latter. The analysis was performed on water, surfaces, equipment, ready-to-eat foods, hands and nasal cavity of handlers in seven food services. The water used in food services proved to be suitable for the production of meals. Most food, equipment and surfaces showed poor sanitary conditions due to the presence of thermotolerant coliforms (60.6%). Twenty-six *Staphylococcus* species were identified from the 121 *Staphylococcus* isolates tested. *Staphylococci* coagulase-negative species were

predominant in the foods, equipment and surfaces. In food handlers and foods, the predominant species was *Staphylococcus epidermidis*. Twelve different genotypes were found after PCR for the classical enterotoxin genes. The *seb* gene (19.8%) was the most prevalent among all *Staphylococcus* sp. Both coagulase-positive and coagulase-negative *Staphylococci* showed some of the genes of the enterotoxins tested. We conclude that there are hygienic and sanitary deficiencies in the food services analyzed. Although coagulase-positive *Staphylococci* have not been present in foods there is a wide dispersion of enterotoxigenic coagulase-negative *Staphylococci* in the environment and in the foods analyzed, indicating a risk to consumer health.

Keywords: food service; sanitary quality, *Staphylococcus* sp.; Staphylococcal enterotoxin.

Introduction

The major objectives of food services are the production and distribution of foods with nutritional and sanitary quality. To achieve this quality, the World Health Organization recommends the adoption of good hygienic practices (31, 38). Most outbreaks are caused by the ingestion of contaminated food after inadequate hygiene practices, production, storage and/or distribution (17). The food services occupy the second position as a source of food intoxications/infections in Brazil, with *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* being the main causative agents (11, 14).

Outbreaks of *Staphylococcus* sp. are related to the production of one or more enterotoxins (SE), and SEA, SEB, SEC, SED and SEE are together responsible for 95% of the cases (4, 25). Among these, SEB is the SE which has the highest thermostability and toxicity (5). Although *Staphylococcus aureus* is the most evident species in food-

borne outbreaks, coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) can also be producers of SE (3, 23, 27, 35).

Knowing and controlling the factors that can lead to the contamination of foods produced in a food service can minimize risks to the health of customers. This study aimed to evaluate the sanitary quality of food services, verify the presence of thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* sp. and assessing the toxigenic potential from the latter.

Materials and methods

Food services and samples

This study was conducted in seven large-scale food services (500 or more meals per day) and active in the city of Porto Alegre/Rio Grande do Sul - Brazil. Analyses were performed for thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* sp. in: (I) ready-to-eat foods (raw salad, processed salad produced by processing or cooking, hot meal and dessert - total of 26 samples); (II) equipment (refrigerator, cutting board, gastronomical tank, blender, cutter and vegetable processor - total of 33 samples); and (III) surfaces (stainless steel bench - total of 7 samples). Before distribution of lunch in each food service, we collected aseptically 25 grams of each food in sterile plastic bag and stored under refrigeration until the time of analysis. Samples of equipment and surfaces were collected by swab smearing (50 cm²), moistened in saline (0.85%). At the time of sampling, all points had been cleaned/sanitized in accordance with the parameters of each food service. In the absence of any of these items, the collection point was deleted. Material from the hands and nasal cavities of 21 food handlers (3 handlers from each food service) was collected using a swab that was moistened with saline (0.85%), transported in Stuart medium (Laborclin) and used for *Staphylococcus* sp. enumeration.

We analyzed the drinkability of the water used for the sanitization of salads. This research was conducted according to ethical principles and was approved by the Ethics Council from the Federal University of Rio Grande do Sul (8).

Microbiological analyses

The dilution and homogenization of the samples as well as the analysis and identification of thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* sp. were performed according to the Food and Drug Administration guidelines (13). The species of *Staphylococcus* isolates were identified by Gram staining, catalase testing, coagulase testing, growth on mannitol salt agar, anaerobic growth on mannitol, hemolysis, pigment, Voges-Proskauer test, nitrate, fermentation of maltose and mannitol, urease, oxidase, growth at 15°C, 45°C and in the presence of 15% NaCl (12, 18). Water (100mL) was analyzed by cultivation in Hicoliforme broth (Himedia), with prior inactivation of chlorine by adding sodium thiosulfate (10%). All isolates were maintained in brain heart infusion broth (Himedia) with 25% glycerol and stored at -20°C.

Parameters for the microbiological analysis

The results of the analyses were compared to the criteria described in the Technical Regulation on Microbiological Standards for Foods of the National Agency for Sanitary Vigilance Committee (9). The study considered item 22, specific to ready-to-eat meals, produced by food services or similar, where the presence of coagulase-positive *Staphylococci* (CoPS) is considered non-compliant. The evaluation of water quality was guided by Ordinance No. 2914/11 of the Brazilian Ministry of Health that determines the absence of thermotolerant coliforms and *E. coli* in 100 mL of water (10).

For the analysis of surfaces and equipment, the standards of the Pan American Health Organization (PAHO) were considered, which state that up to 49 colony-forming units per square centimeter is considered as a regular hygiene condition (22).

Detection of enterotoxin genes in the *Staphylococcus* sp. strains

All strains of *Staphylococcus* sp. were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for the presence of genes encoding the classical SE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *see*). PCR reactions were performed in a final volume of 25 μ L: 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.2 mM of each primer, 1U Taq polymerase (Promega), 10 ng of DNA in a thermocycler Master Cycler Personal. The reaction was incubated for: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at the annealing temperature according to Table 1, 1 min at 72°C and a final cycle of 5 min at 72°C. To confirm the absence of inhibitors in the PCR reaction, all negative reactions for some SE genes were subjected to a new PCR reaction with primers detecting the 16S rRNA-prokaryote gene (8f and 925r) described by Liu *et al.* (1997) (16). The PCR products were visualized as described elsewhere (31). Sterile ultrapure water (Milli-Q) was used instead of DNA as a negative control. *S. aureus* ATCCs 13565 (*sea*), 14458 (*seb*), 19095 (*sec*), 23235 (*sed*) and 21664 (*see*) were used as positive controls.

Table 1. Nucleotide sequences, annealing temperature and expected size of the PCR products for *Staphylococci* enterotoxins.

Gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')*	Annealing temperature (°C)	Amplicon (bp)
<i>sea</i>	<i>sea</i> ₁	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	56	102
	<i>sea</i> ₂	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG		
<i>seb</i>	<i>seb</i> ₁	GTATGGTGGTGTAAGTGAAGC	54	164
	<i>seb</i> ₂	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
<i>sec</i>	<i>sec</i> ₁	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	58.5	451
	<i>sec</i> ₂	CACACTTTTAGAATCAACCG		
<i>sed</i>	<i>sed</i> ₁	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	49	278
	<i>sed</i> ₂	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC		
<i>see</i>	<i>see</i> ₁	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	53	209
	<i>see</i> ₂	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC		

Legend: 1, primer forward; 2, primer reverse; bp, base pairs; °C, Celsius degrees; *, nucleotide sequences described by Mehrotra *et al.* (2000) (19).

Results

Water analysis

The water samples showed no thermotolerant coliforms or *E. coli*. The seven food services evaluated in this study used only water that was treated and distributed by the Municipal Water and Sewer Systems of Porto Alegre.

Analysis of thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* sp.

In an overall evaluation of foods, equipment and surfaces, it was observed that 60.6% of the points analyzed showed thermotolerant coliforms counts above the recommended (Table 2).

Table 2. Compliance of food services regarding the microbiological limits for thermotolerant coliforms.

FS	Salad		Hot meal	Dessert	S. bench	V. cutter	Blender	G.T.	C. board	V. processor	Refrig.
	A	B									
1	n	+	-	+	-	-	-	n	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	n	-	-	+
3	+	+	+	+	-	n	-	+	-	+	-
4	-	-	+	-	-	-	n	-	-	n	+
5	+	-	+	n	-	n	n	+	+	-	+
6	-	+	-	+	+	+	n	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-	-	n	-	-	+

Legend: FS, food service; Salad A, raw salad; Salad B, processed salad; S. bench, stainless steel bench; V. cutter, vegetable cutter; G.T., gastronomic tank; C. board, cutting board; V. processor, vegetable processor; Refrig., refrigerator; n, inexistent equipment or food in food service; +, compliant; -, non-compliant.

All foods analyzed showed minimum number of CoPs, and these parameters are within of the standards set by Brazilian legislation. Of the 108 sampling points analyzed, 121 strains were distributed between 26 different species of *Staphylococcus* sp. (15 strains from foods, 36 from equipment/surfaces, 37 and 33 from hands and nasal cavities of handlers, respectively). Among these strains, 105 were CoNS and 16 were CoPS. All of the CoPS were isolated from food handlers. All species isolated from foods (Table 3) were identified as CoNS. *S. epidermidis* was the most common species in foods, although it was not found in any of the equipment or surfaces analyzed. Thirty-six CoNS were isolated from equipment and surfaces, and 13 different species were identified. The species that was most frequently isolated from hands (9 of 37 isolates) and from the nasal cavities (14 of 33) was also *S. epidermidis*. Among all of the isolates from hands, only four were CoPS, represented by *Staphylococcus hyicus* (1 strain), *S. lutrae* (1 strain) and *S. schleiferi* (2 strains). Among the *Staphylococcus* sp. isolated from the nasal cavities, 17 were CoPS, and the second most common species

was *S. schleiferi* (10 out of 33 isolates). Among all handlers analyzed, nine were carriers of *Staphylococcus* sp. on their hands, and six harbored two or three different species. While twelve of the handlers showed *Staphylococcus* sp. in the nasal cavity, only three handlers were carriers of two different species in the same sampling.

Table 3. *Staphylococcus* sp. isolated from foods, equipment, surfaces and food handlers of food services.

Species	Coag. ¹	Source (n. of isolates)	n. of isolates
<i>S. arlattae</i>	-	Food (3); Food handler - hand (2)	5
<i>S. aureus</i>	+	Food handler - nose (1)	1
<i>S. auricularis</i>	-	Food (1); Food handler - hand (2), nose (1)	4
<i>S. capitis</i>	-	Equipment (1)	1
<i>S. caprae</i>	-	Food handler - hand (5)	5
<i>S. carnosus</i>	-	Food (1); Equipment (1); Food handler - hand (1)	3
<i>S. caseolyticus</i>	-	Equipment/surface (4)	4
<i>S. chromogenes</i>	-	Food (1); Equipment (2)	3
<i>S. cohnii</i> sub. <i>urealyticus</i>	-	Food handler - hand (1)	1
<i>S. epidermidis</i>	-	Food (5); Food handler - hand (9), nose (14)	28
<i>S. equorum</i> sub. <i>equorum</i>	-	Equipment (1)	1
<i>S. gallinarum</i>	-	Food (1); Food handler - hand (1)	2
<i>S. haemolyticus</i>	-	Food (1); Equipment/surface (5)	6
<i>S. hominis</i>	-	Equipment (5); Food handler - hand (4)	9
<i>S. hyicus</i>	-	Food handler - hand (1), nose (4)	5
<i>S. hyicus</i> - <i>chromogenes</i>	-	Food handler - hand (1)	1
<i>S. intermedius</i>	+	Food handler - nose (2)	2
<i>S. lutrae</i>	+	Food handler - hand (1)	1
<i>S. pasteurii</i>	-	Food (1); Equipment (1); Food handler - hand (2), nose (1)	5
<i>S. saccharolyticus</i>	-	Equipment (5)	5
<i>S. saprophyticus</i>	-	Equipment/ surface (3); Food handler - hand (4)	7
<i>S. schleiferi</i>	+	Food handler - hand (2), nose (10)	12
<i>S. simiae</i>	-	Food handler - hand (1)	1
<i>S. simulans</i>	-	Food (1); Equipment (4)	5
<i>S. vitulinus</i>	-	Equipment (3)	3
<i>S. warneri</i>	-	Equipment (1)	1
Total			121

Legend: 1, coagulase; -, coagulase-negative *Staphylococci*; +, coagulase-positive *Staphylococci*; n., number.

Analysis of Staphylococcal enterotoxin

The gene *seb* was the most prevalent, either alone (19.8%) or concomitant with other toxin(s) gene(s) (Table 4).

Table 4. Genotypic profile of the enterotoxins genes in *Staphylococcus* sp. isolates from the food services.

Genotype	Number of isolates positive for genotypes (%)
<i>sea</i>	4 (7.0%)
<i>seb</i>	24 (42.1%)
<i>sec</i>	1 (1.7%)
<i>sed</i>	6 (10.5%)
<i>sea+seb</i>	5 (8.8%)
<i>sea+sec</i>	2 (3.5%)
<i>seb+sec</i>	5 (8.8%)
<i>seb+sed</i>	4 (7.0%)
<i>seb+see</i>	1 (1.7%)
<i>sed+see</i>	1 (1.7%)
<i>sea+seb+sed</i>	1 (1.7%)
<i>seb+sec+sed</i>	3 (5.3%)
Total	57 (100%)

Legend: (%) percentage; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, gene of *Staphylococci* enterotoxin A, B, C, D and E, respectively.

The gene encoding *seb* was commonly found in both CoPS (29.2%) and CoNS (70.8%). This study revealed twelve different genotypes, consisting of four genotypes with single genes (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*), six genotypes with combinations of two genes (*sea+seb*; *sea+sec*; *seb+sec*; *seb+sed*; *seb+see*; *sed+see*) and two genotypes with three genes (*sea+seb+sed*; *seb+sec+sed*). The enterotoxin E gene was present only in combination with another enterotoxin, rather than forming an individual genotype.

Among the 121 *Staphylococcus* sp. tested in this study, 57 (47.1%) were positive for any of the classical SE genes. Eighteen of the 26 species identified were positive for any of the SE genes. The species *S. aureus* (1), *S. capitis* (1), *S. cohnii* subspecies *urealyticus* (1), *S. equorum* subspecies *equorum* (1), *S. lutrae* (1), *S. intermedius* (2), *S. simiae* (1) and *S. vitulinus* (3) were negative for the presence of the genes tested. The genotype *sea+seb* are present in two strains of *Staphylococcus* sp. isolated from foods (Table 5). In contrast, among isolates of equipment, surfaces and handlers, the *seb* genotype was predominant.

Table 5. Enterotoxin genes found in *Staphylococcus* sp. isolates from the food services.

Gene of enterotoxins ¹	Source			
	Food (26) ²	Equipment/surface (40) ²	Hand	Food handler (21) ² Nasal cavity
<i>sea</i>	-	2 (5%)	1 (4.8%)	1 (4.8%)
<i>seb</i>	1 (3.8%)	5 (12.5%)	5 (23%)	13 (62%)
<i>sec</i>	1 (3.8%)	-	-	-
<i>sed</i>	-	2 (5%)	4 (19%)	-
<i>see</i>	-	-	-	-
<i>sea+seb</i>	2 (7.7%)	2 (5%)	1 (4.8%)	-
<i>sea+sec</i>	-	1 (2.5%)	1 (4.8%)	-
<i>seb+sec</i>	1 (3.8%)	1 (2.5%)	3 (14%)	-
<i>seb+sed</i>	-	1 (2.5%)	3 (14%)	-
<i>seb+see</i>	-	1 (2.5%)	-	-
<i>sed+see</i>	-	1 (2.5%)	-	-
<i>sea+seb+sed</i>	-	1 (2.5%)	-	-
<i>seb+sec+sed</i>	-	-	2 (9.5%)	1 (4.8%)

Legend: 1, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, gene of Staphylococcal enterotoxin A, B, C, D and E, respectively; 2, Number of samples; (), percentage of presence of the gene; -: absence.

Discussion

As no thermotolerant coliforms were found after the microbiological analysis of the water used by the food services, it was classified as satisfactory. This is a very important point since it can act as a vehicle for the transmission of pathogens and spoilage agents (37). Foods that presented results from non-compliance due to high count thermotolerant coliforms were those who had added some ingredients after cooking, suggesting post-processing contamination. This suggests a failure in the use of good hygienic practices and in the quality control of raw materials. The high percentage of poor sanitary conditions of the surfaces and equipment of food services is alarming. It is known that equipment and countertops can provide conditions for the growth of microorganisms on their surfaces forming biofilms, as well as the possibility for further cross contamination (15, 20, 34). In addition, the cross-contamination, post-processing, could be the explanation for at least 30% of the food analyzed in this study having levels of thermotolerant coliforms above the acceptable levels.

Considering only the analysis of *Staphylococcus* sp. and the Brazilian legislation, the results of this study showed that all foods produced by food services were in agreement with that legislation (11). This legislation determines only the investigation of CoPS in foods because they are producers of toxins that are of considerable risk for human health. CoNS possessing SE genes have been isolated from foods by other authors, although they have not yet been identified as causative agents of food poisoning (29, 39). So far, in Brazil, studies searching for the presence of *Staphylococcus* sp. in foods produced by food services were not described. However, some studies showed the presence of *Staphylococcus* sp. in many foods (3, 4, 7, 23, 27, 28).

Equipment and surfaces can accommodate a diverse microbiota. In the food services this can be influenced by contact with food (raw or processed), food handlers

and by the processes of cleaning. Equipment and poorly sanitized environments may contain organic matter, which, combined with convenient extrinsic factors, can provide favorable conditions for the growth of microorganisms (29). Also, the contaminated equipment could be the source of microorganisms for foods prepared with them (20, 21). With regard to the *Staphylococcus* sp. isolated in this study, except for *S. caseolitycus*, which is commonly found in dairy products, all other isolated species from equipment and surfaces may be part of human microbiota (6, 12). The handlers' hands can be vehicles of contamination, so care with personal hygiene is essential in the production of meals (30, 32). In this study it was also observed that the same handler could accommodate more than one species in their microbiota, as was also observed by other authors (1, 3).

The most common gene in *Staphylococcus* sp. identified from food services and foods was *seb*. SEB is one of the most potent toxins and the expression of that gene in food can be a danger to the health of the customers (2, 33). The prevalence of SE genes in foods varies and depends on regional and human factors. Their frequency in foods has been described in other studies and the rate was variable between them (7, 24, 26, 28, 36). In this study, 33% of the *Staphylococcus* sp. isolated from foods harbored one or two SE genes.

Thus, it was observed that 61.5% and 100% of the food produced by food services in Porto Alegre showed counts of thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* sp., respectively, which are within the limits defined by Brazilian legislation (9). This result of compliance does not consider the wider dissemination of CoNS in food services, or the toxigenic potential of these isolates. It was observed that the sanitary conditions of equipment and surfaces were inadequate (75%) for the production of meals; the enterotoxin B gene was the most prevalent among the *Staphylococcus* sp.

evaluated. These results showed a risk to the customers of food services when exposed to food produced with inadequate hygiene practices and possessing thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* sp. isolates with toxigenic potential. Thus, it is evident the necessity of the implementation and constant monitoring of programs of quality control in food services.

Acknowledgments

The authors thank the food services who participated in this research. We also thank the Federal Project REUNI and to CAPES / PROF for the financial resources.

References

1-Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC (2003) Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. Food Microbiol 20:489-493.

2-Ahanotu E, Alvelo-Ceron D, Ravita T, Gaunt E (2006) Staphylococcal enterotoxin B as a biological weapon: recognition, management, and surveillance of Staphylococcal enterotoxin. Appl Biosaf 11:120-126.

3-André MCDPB, Campos MRH, Borges LJ, Kipnis A, Pimenta FC, Serafini AB (2008) Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *SmaI* digestion. Food Control 19:200-207.

4-Aragon-Alegro LC, Konta EM, Suzuki K, Silva MG, Júnior AF, Rall R, Rall VLM (2007) Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. Food Control 18:630-634.

5-Balaban N, Rasooly A (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61:1-10.

6-Bes M, Brun Y (2002) *Staphylococcus*: actualites taxonomiques et identification. *Rev Fr Lab* 343:23-30.

7-Borelli BM, Lacerda ICA, Brandão LR, Vianna CR, Ferreira MC, Gomes FCO, Carmo LS, Heneine LGD, Rosa CA (2011) Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arq Bras Med Vet Zootec* 63:481-487.

8-Brasil (1996) Resolution No. 196. Guidelines and Standards for Research Involving Humans. *National Health Council*.
<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>.

9-Brasil (2001) Resolution No 12 of 02 january 2001. Technical Regulation on microbiological standards for food. *National Agency for Sanitary Vigilance*.
http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm.

10-Brasil (2011) Ordinance No. 2914 of 12 december 2011. Sets forth the procedures for control and surveillance of water quality for human consumption and its potability standards. *National Agency for Sanitary Vigilance*.
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html.

11-Brasil (2011) Dados epidemiológicos-DTA período de 2010 a 2011. *Ministério da Saúde*.
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf

12-Cohen JO, (1986) Differentiation of the genus *Staphylococcus* from other genera. *In*: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G.(eds.). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. New York, USA, 1015-1035.

13-U.S. Food and Drug Administration. 2012. *Staphylococcus aureus*. Available at:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>.

Accessed 05 July 2010.

14-U.S. Food and Drug Administration. 2004. Produce safety from production to consumption: 2004 action plan to minimize foodborne illness associated with fresh produce consumption. Available at:

<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/BuyStoreServeSafeFood/ucm129487.htm>. Accessed 05 July 2010.

15-Legnani P, Leoni E, Berveglieri M, Mirolo G, Alvaro N (2004) Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food control* 15:205-211.

16-Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.

17-Losasso C, Cibin V, Cappa V, Roccatò A, Vanzo A, Andrighetto I, Ricci A (2012) Food safety and nutrition: Improving consumer behavior. *Food Control* 26: 252-258.

18-Macfaddin JF (2000) Biochemical testes for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

19-Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 38:1032-1035.

20-Meira QGS, Barbosa IM, Athayde AJAA, Siqueira-Júnior JP, Souza EL (2012) Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by

Staphylococcus aureus from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. Food Control 25:469-475.

21-Meldrum RJ, Little CL, Sagoo S, Mithani V, McLauchlin J, Pinna E (2009) Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. Food Microbiol 26:573-577.

22-Moreno LS (1982) Higiene de lá alimentación. Adeos, Barcelona.

23-Oliveira AM, Padovani CR, Miya NTN, Sant'Ana AS, Pereira JL (2011) High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. Foodborne Pathog Dis 8:159-163.

24-Pelisser MR, Klein CL, Ascoli KR, Zotti TR, Arisi ACM (2009) Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. Braz J Microbiol 40:145-148.

25-Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P (2009) Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol 26:278-282.

26-Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes Jr. A, Rall R, Silva MG, Araújo Jr JP (2010) Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp. isolated from nasal cavities and hands of food handlers. Braz J Microbiol 41:59-65.

27-Rall VLM, Sforcin JM, Deus MFR, Sousa DC, Camargo CH, Godinho NC, Galindo LA, Soares TCS, Araújo Jr. JP (2010) Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. Foodborne Pathog Dis 7:1121-1123.

28-Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr A, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araújo Jr. JP (2008) PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol* 132:408-413.

29-Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretrø T (2007) Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol* 116:372-383.

30-Rodriguez M, Valero A, Carrasco E, Pérez-Rodríguez F, Posada GD, Zurera G (2011) Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in southern Spanish hospitals. *Food Control* 22:874-882.

31-Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

32-Shojaei H, Shooshtaripoor J, Amiri M (2006) Efficacy of simple hand-washing in reduction of microbial hand contamination of Iranian food handlers. *Food Res Int* 39:525-529.

33-Sospedra I, Marín R, Mañes J, Soriano JM (2012) Rapid whole protein quantification of staphylococcal enterotoxin B by liquid chromatography. *Food Chem* 133:163-166.

34-Trinetta V, Vaid R, Xu Q, Linton R, Morgan M (2012) Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat food processing equipment by chlorine dioxide gas. *Food Control* 26:357-362.

35-Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Santos DA, Cerqueira MMOP, Cantini A, Nicoli JC, Jett M (2008) A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais. *Brazil Int J Infect Dis* 12:410-415.

36- Wang X, Tao X, Xia X, Yang B, Xi M, Meng J, Zhang J, Xu B (2013) *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. Food Control 29:103-106.

37-World Health Organization (2005) Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. World Health Organization. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241592330.pdf>.

38-World Health Organization (2012) Prevention of foodborne disease: Five keys to safer food manual. World Health Organization. http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/flyer_keys_en.pdf

39-Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Götz F (2008) Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. Int J Food Microbiol 127:246-251.

6 DISCUSSÃO GERAL

O monitoramento da qualidade higiênico-sanitária em UANs é de suma importância, tendo em vista a grande quantidade de pessoas que utilizam estes serviços. Diversas entidades têm dedicado atenção específica para difundir informações e conhecimentos a todos os locais que exercem atividades de produção e comercialização de alimentos. No Brasil estas entidades são representadas pelo Ministério da Saúde, ANVISA, *Codex Alimentarius* do Brasil, além das secretarias estaduais e municipais de saúde (Brasil, 2001; Brasil 2004; OMS, 2006, Rio Grande do Sul, 2009). A partir da promulgação da Resolução de Diretoria Colegiada n. 216/04, pela ANVISA, as UANs tiveram mais subsídios para nortear suas atividades embasadas nas BP (Brasil, 2004). A Portaria 78/09 do estado do Rio Grande do Sul também auxiliou na difusão de informações e elucidação de alguns pontos específicos para produção de alimento seguro (Rio Grande do Sul, 2009). Procedimentos de avaliação do cumprimento e da adesão às BP se fazem relevante para monitorar o padrão de higiene na produção/ distribuição de refeições em UANs. A avaliação geral mostrou que todas as UANs que participaram deste estudo foram classificadas como *ruins* em relação à adequação às BP. Para saúde pública, este resultado é bastante grave uma vez que cada uma destas UANs serve no mínimo 500 refeições por dia. Os quesitos: *higienização, manipuladores, matéria-prima, preparação do alimento e armazenagem do alimento preparado* apresentaram 100% de não conformidade. Diversas questões que compõem estes itens são consideradas críticas para a produção de alimento seguro (Almeida et al., 2009). Os resultados da avaliação da presença de matéria orgânica nas

superfícies vêm corroborar com o alto percentual de não adequação ao quesito higienização. Desta forma é evidente a necessidade de reorganização de diversos processos para que as UANs estejam em adequação à legislação sanitária.

A água utilizada pelas UAN para o preparo de alimentos se mostrou potável e adequada para este fim. Todos os quesitos para abastecimento de água nas UANs estavam totalmente conformes com a determinação legal. Isso evidencia a efetividade do tratamento de água do Sistema Municipal de Água e Esgoto da cidade de Porto Alegre e também a adoção de BP no cuidado com a rede de abastecimento interna das UANs.

Dentre os 26 alimentos analisados para a presença de coliformes foi observado que 61,5% estavam com condições ideais de consumo. Os alimentos que apresentaram contagens de coliformes acima do permitido foram, em sua maioria, os alimentos mistos e aqueles que tiveram manipulação após a cocção. Estes resultados estão em concordância com os dados divulgados pelo Ministério da Saúde – Brasil, onde os alimentos mistos são a classe de alimentos mais envolvida em DTA entre os anos de 2000 e 2011 (Brasil, 2011). Assim, torna-se evidente a importância das BP para manipulação de alimentos que já passaram por algum processo de redução de micro-organismos (OMS, 2006; Egan et al., 2007). A análise de coliformes das superfícies e equipamentos mostrou que os procedimentos de higiene utilizados pelas UANs não são efetivos para garantir a higiene, mesmo que a ocorrência de *E. coli* não tenha sido comum a todas as UANs.

Todos os pontos analisados neste estudo apresentaram ausência de *Listeria* sp.. Este é um ótimo resultado para as UANs analisadas, uma vez que

L. monocytogenes é um importante patógeno humano. A técnica utilizada para análise de *Listeria* sp. foi a descrita pela *Food and Drug Administration* (FDA). Esta técnica prevê apenas uma fase de enriquecimento seletivo antes do plaqueamento diferencial. Já a técnica descrita pela *United States Department of Agriculture* (USDA) prevê um enriquecimento seletivo primário e outro secundário antes da etapa de plaqueamento (Silva et al., 2001). Zaffari et al., (2007), utilizando a técnica da FDA, analisaram queijos artesanais e encontraram *Listeria* sp. em 16% das amostras, onde 3.7% eram *L. monocytogenes*. *Listeria* sp. é um gênero ubíquo, porém ambientes hostis podem tornar as bactérias injuriadas. Em UANs este fato pode ocorrer devido ao uso constante de produtos químicos em ambientes e equipamentos, além de mudanças bruscas de umidade e temperatura. Tendo em vista esta situação, provavelmente a técnica de isolamento de *Listeria* sp. em UANs deva ser aquela que contemple mais de uma etapa de enriquecimento em meio seletivo.

Dentre os 108 pontos analisados neste estudo, foi possível isolar 121 cepas de *Staphylococcus* sp. Dentre estes, observa-se a ocorrência de uma grande diversidade de espécies (26). Nos alimentos, nas mãos e na cavidade nasal dos manipuladores, a espécie mais comum foi *S. epidermidis*. A segunda espécie mais comum na cavidade nasal dos manipuladores foi a espécie coagulase positiva *S. schleiferi* (30,3%). Já entre os equipamentos e ambiente, as espécies mais comuns foram *S. haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* e *S. saccharolyticus* (13,9% cada), seguido de *S. simulans*, *S. caseolyticus* (11,1%, cada). A não ser *S. caseolyticus* que é comumente encontrado em laticínios, todas as demais espécies citadas, fazem parte da

microbiota humana (Seeliger & Jones, 1986; Bes & Brun, 2002). Assim, levanta-se a possibilidade de disseminação desta bactéria do manipulador ao alimento. Em serviços de alimentação os manipuladores assumem responsabilidade redobrada uma vez que podem ser veículos de patógenos aos alimentos (Lues & Tonder, 2007; Sospedra, et al., 2012). Desta forma, destaca-se ainda mais a necessidade das BP nas práticas de higiene pessoal do manipulador, assim como nos procedimentos de manipulação de alimentos.

A análise da presença das enterotoxinas clássicas evidenciou doze genótipos diferentes nos *Staphylococcus* sp. isolados. A metade destes genótipos ocorreu pela combinação de dois ou mais genes. O mesmo percentual de genótipos foi encontrado por Rall et al. (2008) quando analisou a presença de SE (A – J) em *S. aureus* isolados de leite cru e pasteurizado. Oliveira et al. (2011) analisando *Staphylococcus* sp. isolados de leite cru também observaram a ocorrência de mais de um tipo de SE pela mesma cepa. Um estudo conduzido com ECoP e ECoN isolados de manipuladores de alimentos verificou que 19 dos 20 isolados foram positivo para pelo menos uma SE (Rall et al., 2010b). É comum *Staphylococcus* sp. apresentarem a ocorrência de mais de um gene que codifica as SE (Balaban & Rasooly, 2000; Rall et al., 2010b).

Há referências de que SEA é a SE mais frequente entre *Staphylococcus* sp. e justamente a maior causadora de DTA (Balaban & Rasooly, 2000). Neste estudo observou-se uma realidade diferente, onde SEB foi a SE mais comum entre as cepas isoladas das UANs. SEB é altamente resistente ao calor e relacionada com surtos decorrentes de alimentos que requerem manuseio, como por exemplo, refeições (Le Loir et al., 2003; Khreich

et al., 2008). Atualmente a SEB tem sido estudada por seu uso potencial como arma biológica devido a sua rápida capacidade de dispersão (Pinchuk et al., 2010). Este interesse se origina pela baixa dose infectante. Apenas 0.004 microgramas/ quilo são suficientes para desencadear intoxicação. Enquanto que 0,02 microgramas/ quilo podem ser letal (Gill, 1982). Os sintomas da ingestão da toxina são náuseas, vômito, diarreia e choque anafilático. Já a exposição a aerossóis pode causar febre, calafrios, dor de cabeça e tosse, enquanto níveis elevados de exposição podem levar a edema pulmonar (Naimushin et al., 2002).

Dentre todos os isolados obtidos neste estudo, tanto ECoN e ECoP apresentaram genes que codificam alguma das enterotoxinas testadas. Resultado semelhante foi encontrado por Rall et al. (2010b) que analisaram ECoN isolados de queijo Minas. Estes autores verificaram que 26,2% dos ECoN tinham genes das enterotoxinas, sendo SEA a mais frequente. Outro estudo realizado com ECoP e ECoN isolados de um surto com queijo Minas mostrou que ECoN também possuíam genes das enterotoxinas. As mais comuns foram SEA e SEB, respectivamente (Veras et al., 2008). Zell et al. (2008) conduziram um estudo com ECoN isolados de alimentos e de cultura *starter*. Foi observado que 18 dos 35 isolados produziram pelo menos uma das toxinas testadas e que os genes de SED e SEH foram as mais comuns. Portanto, pesquisas referem que ECoN são produtores de SE. Mais estudos a fim de elucidar esta relação são necessários. A legislação brasileira prevê apenas contagem de ECoP em alimentos (Brasil, 2001). Então, segundo esta mesma legislação, os alimentos analisados neste estudo estavam aptos para consumo, pois estavam ausentes de ECoP. Entretanto, diversos ECoN

encontrados nos alimentos foram positivos para reação que evidenciou a presença de genes produtores de SE.

Desta forma, foram desenvolvidas diversas análises nas sete UANs que participaram desta pesquisa, bem como nos *Staphylococcus* sp. isolados. Porém, é notório que as possibilidades de desenvolvimento de outros estudos neste campo não se esgotaram. Baseado nos resultados observados neste estudo, conclui-se que é evidente a onipresença de *Staphylococcus* sp. em alimentos, ambientes e equipamentos das UANs, que há presença de genes das enterotoxinas clássicas em ECoP e ECoN, assim como é evidente a necessidade de real implementação das BP em todas as UANS analisadas.

7 CONCLUSÕES

– Todas as UANs avaliadas foram classificadas como *ruim* em relação à adequação às BP prevista na legislação sanitária para serviços de alimentação do estado do Rio Grande do Sul. Os itens *Higienização, Manipuladores, Matéria-prima, Preparação do alimento e Armazenagem do alimento preparado* foram os itens de maior inadequação em todas as UANs.

– A avaliação higiênico-sanitária das UANs mostrou que 61,5% dos alimentos estavam adequados para consumo humano e que 75% das superfícies e equipamentos apresentaram condições de higiene insatisfatórias.

– A água utilizada pelas UANs estava de acordo com a qualidade sanitária necessária para produção de refeições.

– As UANs analisadas apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes*. Contudo, pode-se aconselhar a repetição das análises com o emprego de técnica que contemple mais de uma etapa de enriquecimento seletivo para então confirmação do resultado.

– Foram isolados 121 *Staphylococcus* sp. distribuídos em 26 diferentes espécies;

– Os *Staphylococcus* sp. isolados neste estudo apresentaram doze genótipos diferentes para a presença dos genes das enterotoxinas clássicas, onde o gene que codifica a enterotoxina B foi o mais frequente entre os *Staphylococcus* sp. isoladas das UANs. Tanto os ECoP quanto os

ECoN testados apresentaram genes que codificam alguma das enterotoxinas clássicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKATSU et al. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**. v. 18, n. 3, p. 419 - 427, 2005.
- AL-ADNANI, M. & SEBIRE, N.J. The role of perinatal pathological examination in subclinical infection in obstetrics. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.** v. 21, n. 3, p. 505 - 521, 2007.
- ALBORN, W. E., et al. Cloning and characterization of *femA* and *femB* from *Staphylococcus epidermidis*. **Gene**. v.180, p. 177 – 181, 1996.
- ALESSANDRIA, V., et al. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **Int J Food Microbiol.** v. 141, p. 156 – 162, 2010.
- ALMEIDA, J. A. et al. **Guia de Verificação: Boas Práticas e APPCC: Mesa**. 2.ed. Brasília: SENAI/DN, 2009. 70p.
- ANDRADE, A.P.C. Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. isolados de queijo coalho. Fortaleza: Universidade federal do Ceará, 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFC, Fortaleza, 2009.
- ANTOLÍN, J. et al. Endocarditis due to *Listeria* Description of two cases and review of the literature. **Eur. J. Intern. Méd.** v.19, p.295-296, 2008.
- ARAÚJO, P.C.C. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói, RJ, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.30, n.1, p.19-28, 2002.
- AYCICEK, H.; KARCI, U. O. K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v.209, p. 203-206, 2006.
- BALABAN, N. & RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins (Review). **Int. J. Food Microbiol.** v. 61, p. 1 – 10, 2000.
- BAS, M.; ERSUM, A.S.; KIVANÇ, G. The evaluation of food hygiene, knowledge, attitudes and practices of handlers in food businesses in Turkey. **Food Control**. v.17, p.317-322, 2006.
- BENSON, T. E., et al. X-ray crystal structure of *Staphylococcus aureus femA*. **Structure**. v. 10, p. 1107 – 1115, 2002.

BERGAMINI, A.M.M, et al. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.38, p.553-556, 2007.

BERGDOOL, B. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.** Netherlands, v. 10, p. 91 – 100, 1990.

BERGER-BÄCHI, B. & TSCHERSKE, M. Role of Fem factors in methicillin resistance. **Drug Resist Updat.** v. 1, p.325 – 335, 1998.

BES, M. & BRUN, Y. *Staphylococcus*: actualites taxonomiques et identification. **Rev. Fr. Lab.** n. 343, 2002.

BETLEY, M.J & MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **J. Bacteriol.** v.179, p. 34 – 41, 1998.

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência.** São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2006. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos. em Tecnologia de Alimentos), UNICAMP, São Paulo, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova na forma dos textos anexos, o "Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos", as "Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos" e o "Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos". Determina que os estabelecimentos relacionados à área de alimentos adotem, sob responsabilidade técnica, as suas próprias Boas Práticas de Produção e/ou Prestação de Serviços, seus Programas de Qualidade, e atendam aos PIQ's para Produtos e Serviços na Área de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 dez. 1993. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/>>. Acesso em: 11 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 01 ago. 1997. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/>>. Acesso em: 11 mar. 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 jan. 2001. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em 21 de out. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Access em: 11 de maio 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 set. 2004. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/>> Acesso em: 11 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 5, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 fev. 2006. Disponível em: <http://bvsm.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2006/prt0005_21_02_2006.htm>. Acesso em 10 de maio de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf>. Acesso: 06 de maio 2012.

CAPUNZO, M. et al. Food hygiene on merchant ships: the importance of food handler's training. **Food Control**. v.16, p.183-188, 2005.

CARMO, L. M., et al. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol**. Vol.46, n. 4, p. 581-586, 2003.

CHO, B-H.; HOOKER, N.H. Comparing food safety standards. **Food Control**. v.20, p.40-47, 2009.

COHEN, J.O., et al. Differentiation of the genus *Staphylococcus* from other genera. 1972. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.). **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, c1986. v.2, p. 1015-1035.

CREMONESI, P., et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol. Cell. Probes**. v. 19, p. 299 – 305, 2005.

CUNHA, M. L. R. S, et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Braz. J. Microbiol**. v. 37, p. 70 – 74, 2006.

EGAN, M. B., et al. A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. **Food Control**. v. 18, p. 1180 – 1190, 2007.

ERTAS, N., et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int. J. Food Microbiol.* v. 142, p. 74 – 77, 2010.

EUZEBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 de maio. 2012.

FILHO, E.S.A., FILHO, A.N. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Rev. Saúde Pública**. v.34, n. 6, p.578-580, 2000.

FRANCO, D. B. G. M. & LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 196p.

FRECE, J., et al. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **J. Dairy Res.** v.77, p. 112 – 116, 2010.

GELLI, I. A. et al., Condições higiênic-sanitárias no pré-preparo de carne bovina em restaurante universitário de Uberlândia, MG. **Higiene Alimentar**. vol.19, p. 27-30, 2005.

GILL, D.M. Bacterial Toxins: a Table of Lethal Amounts. **Microbiol. Rev.** v.46, p. 86 – 94, 1982.

GIOVANNACCI, C., et al. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **Int. J. Food Microbiol.** v.53, p.127-140, 1999.

GOTTARDI, C.P.T. et al. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. **Cienc. Rural**. v.38, n.3, p.743-748, 2008.

GOULET, V. et al. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerg. Infect. Dis.** v.14, n.5, p.734-740, 2008.

GÜNAYDIN, B.; ASLANTAS, Ö; DEMIR, C. Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 43, p. 1633 – 1637, 2011.

HAIN, T. et al. Pathogenomics of *Listeria* spp. **Int. J. Med. Microbiol.** v.297, p.541-557, 2007.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunol. Med. Mic.** v.35, p.199–203, 2003.

HOFER, E., NASCIMENTO, R.S., OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HU, D-L., et al. A mutant of Staphylococcal Enterotoxin C devoid of bacterial superantigenic activity elicits a Th2 immune response for protection against *Staphylococcus aureus* infection. **Infect. Immun.** v. 73, n. 1, p. 174 – 180, 2005.

JADHAV, S.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. **J. Microbiol. Methods.** v. 88, p. 327 – 341, 2012.

KABUKI, D. Y., et al. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **J. Dairy Sci.** v.87, p. 2803 – 2812, 2004.

KHREICH, N., et al. Detection of *Staphylococcus* enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. **Anal. Biochem.** v. 377, p. 182 – 188, 2008.

KOKAN, N.P. & BERGDOL, M.S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 53, n. 11, p. 2675 – 2676, 1987.

KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet.** London. v. 357, n. 9264, p. 1225 – 1240, 2001.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** v.2, n.1, p.63 – 76, 2003.

LECRERC, H. et al. Advances in the bacteriology of the Coliform group: their suitability as marker of microbial water safety. **Annu. Rev. Microbiol.** v.55, p.201-234, 2001.

LEMES-MARQUES, E.G.L., CRUZ, C.D., DESTRO, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v:38, p.287-292, 2007.

LETERTRE, C. et al. Detection and genotyping by real-time PRC of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Mol. Cell. Probes.** v.17, p.686-688, 2003.

LOIR, Y.L., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LUES, J.F.R., TONDER, I.V. The occurrence of indicator bacteria o hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**. v.18, p. 326-336, 2007.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical testes for identification of medical bacteria**. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 2001. 652p

MACLAUHLIN, J. et al. *L. monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **Int. J. Food Microbiol.** v.92, p.15-33, 2004.

MALHEIROS, P.S., DE PAULA, CM.D., TONDO, E.C. Cinética de crescimento de *Salmonella Enteretidis* envolvidas em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. **Cien. Technol. Aliment.** v.27, n.4, p.751-755, 2007.

MEHROTRA, M., WANG, G., JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 3, p. 1032 -1035, 2000.

MESQUITA, M.O. et al. Qualidade microbiológica no processamento de frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Cien. Technol. Aliment.** v.26, n.1, p.198-203, 2006.

MICHELIN, A. F., CARMP, L. M., CARLOS, I. Z. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 65, n. 1, p. 46 - 49, 2006.

NAIMUSHIN, A. N., et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. **Biosens. Bioelectron.** v. 17, p. 573 - /584, 2002.

NALÉRIO, E. S., et al. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciênc. Technol. Aliment.** v.29, n.3, p. 626 - 630, 2009.

NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arq. Inst. Biol.** v. 74, n. 3, p. 207 - 213, 2007.

NORMANNO, G. et al. Coagulase positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **Int. J. Food Microbiol.** v.98, p.73-79, 2005.

NORMANNO, G. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Int. J. Food Microbiol.** v.115, p.290-296, 2007.

NOVICK, R.P. Pathogenicity factors and their regulation. **In: Gram Positive Pathogens.** (Fischetti, V.A.; Novick, R. P.; Feretti, J.J.; portnoy, D.A. and ROOD, J.I., eds) AMS Press, Washington, D.C. USA, p. 392 – 407, 2000.

OLIVEIRA, A.M., et al. High Incidence of Enterotoxin D Producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian Cow's Raw Milk and Its Relation with Coagulase and Thermonuclease Enzymes. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 8, n.1, p. 159 – 163, 2011.

OMS-WHO - World Health Organization, 2006. Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases. Geneva, Switzerland. **Five keys to safer food manual.** Available: <http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf>. Accessed in 33 May 2008.

PARK, J. Y., et al. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Vet. Microbiol.** v. 147, p. 149 – 154, 2011.

PINCHUK, I. V., et al. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins.** v.2, p. 2177 – 2197, 2010.

PINHO, M. G., et al. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding Protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v. 183, n. 22, p. 6525 – 6531, 2001.

PIRES, A. C. S., et al. Condições higiênicas de fatiadores de frios avaliadas por atp- bioluminescência e contagem microbiana: sugestão de higienização conforme RDC 275 da ANVISA. **Alim. Nutri.**, v. 16, n. 2, p. 123-129, 2005.

RADDI, M.G.S., LEITE, C.Q.F., MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Rev. Saúde Públ. S. Paulo** v.22, n.1, p.36-40, 1988.

RALL, V. L. M., et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology.** v. 132, p. 408 – 413, 2008.

RALL, V. L. M., et al. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp. isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 41, p. 59 – 65, 2010a.

RALL, V. L. M., et al. Polymerase Chain Reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE.** v. 7, n. 9, p. 1121 – 1123, 2010b.

RÉGLIER-POUPET, H., et al. Evaluation of the quality of hospital food from the kitchen to the patient. **J. Hosp. Infect.** 59:131-137. 2005.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Portaria nº 78 de 28 de janeiro de 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. **Diário Oficial [do] Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 30 jan 2009. Disponível em: <http://www.sinurgs.org.br/port_78.php>. Acesso em: 25 maio 2009.

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.

ROSEC, J. P. & GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **Int. J. Food Microbiol.** v. 77, p. 61 – 70, 2002.

SANT'ANA, A.S., et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v.23, p.190-194, 2003.

SAQUET, A. A. Use of Bioluminescence for the Analysis of ATP, ADP and AMP in Fruits. **Braz. J. Food Technol.**, v.8, n.4, p. 326-34, 2005.

SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**. v. 2, n. 6, p. 580 – 592, 2011.

SCHEUTZ, F; STROCKBINE, N. Genus I. *Escherichia Castellani* and Chalmers. 1919, 941TAL. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.). **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, c1986. v. 2, p. 607-624.

SCHWAB, J. P., EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.39, n.2, 2003.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie. 1940, 383AL. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.). **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, c1986. v. 2, section 14, p. 1235-1245.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo coalho isolados em Recife (PE)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMG, Belo Horizonte, 2000.

SHARIF, S., et al. Characterization of peptidoglycan in *fem*-deletion mutants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by solid-state NMR. **Biochemistry**. v. 48,p. 3100 – 3108, 2009.

SHERLOCK, O. et al. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness. **J Hosp Infect**, v. 72, n. 2, p. 140-6, 2009.

SHYLAJA, R. et al. A novel multiplex PCR system for the detection of *staphylococcal enterotoxin b*, *tsst*, *nuc* and *fem* genes of *Staphylococcus aureus* in food system. **J.Food Safety**. v. 30, p. 443 – 454, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. A. C.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001, 173 p.

SILVA, W.P. et al. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Cienc. Rural**. v.34, n.3, p.911-916, 2004.

SOARES, C.M. et al. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. **Cienc. Rural**. v.38, n.2, p.504-510, 2008.

SOOD, A. et al. Assessment of bacterial indicators and physicochemical parameters to investigate pollution status of Gangetic river system Uttarakhand. **Ecological Indicators**. v.8, p.709-717, 2008.

SOSPEDRA, I., et al. Report of toxic shock syndrome toxin 1(TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from food service establishments. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** (2012). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.011>. Acesso: 02 março 2012.

TAPONEN, S. & PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Vet. Microbiol.** v. 134, p. 29 – 36, 2009.

TSCHIERSKE, M., et al. Identification of three additional *femAB*-like open reading frames in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 171, p. 97 – 102, 1999.

VANNUFFEL, P., et al. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. **Res. Microbiol.** v.150, p. 129 – 141, 1999.

VERAS, J.F., et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **Int. J. Infect. Dis.** v. 12, p. 410 – 415, 2008.

VLKOVÁ, et al. Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms – a Review. **Czech J. Food Sci.** Vol. 26, No. 5: 309–323, 2008.

WEINGOLD, S.E., GUZEWICH, J.J, FUDALA, J.K. Use of foodborne disease data for HACCP risk assessment. **J. Food Protect.** v.57, n.9, p.820-830, 1994.

XU, J., et al. Changes of antimicrobial resistance among coagulase-negative *Staphylococci* Isolated in 8 consecutive years in the First Bethune Hospital. **Phys Procedia**. v. 33, p. 1190 – 1193, 2012.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc. Rural**. v.37, n.3, p. 862 – 867, 2007.

ZELL, C., et al. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **Int. J. Food Microbiol.** v. 127, p. 246 – 251, 2008.

ZHAO, H. et al. Deciphering the biodiversity of *Listeria monocytogenes* lineage III strains by polyphasic approaches. **J. Microbiol.** v.49, n.5, p.759 – 767, 2011.

ZOCHE, F., et al. Enterotoxigênicos em queijo tipo Minas Frescal: detecção por PCR. **Anais. IXI Congresso de Iniciação Científica**. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

9 ANEXOS

9.1 Gene *femA*

Com o passar dos anos muitas cepas de *S. aureus* foram selecionadas para o fenótipo de resistência a antimicrobianos. A resistência a meticilina e a outros β -lactâmicos é decorrente da aquisição do gene *mecA*, de origem não estafilocócica, que codifica uma proteína conhecida como proteína ligadora de penicilina, ou do inglês *penicillin binding protein* (PBP2a) (Mehrota et al., 2000). Esta proteína tem baixa afinidade por β -lactâmicos, assim, mesmo na presença deste antimicrobiano a PBP2a assume as funções para garantia da biossíntese da parede celular e consequente manutenção da estrutura bacteriana (Pinho, et al., 2001). Entretanto, a expressão da resistência a meticilina não está relacionada com a quantidade de PBP2a, sugerindo a ação de outros fatores neste mecanismo de resistência (Alborn, et al., 1996). Portanto, além deste, outros genes também estão relacionados com a resistência à meticilina. Destacam-se os genes cromossomais *fem* (*factor essentials for methicillin resistance*) ou gene *aux* (*auxiliary*) (Berger-Bächli & Tschierske, 1998). Três destes genes *femX*, *femA* e *femB* têm papel importante na formação da estrutura do peptídeoglicano na parede celular. Por este motivo são frequentemente, alvos da ação de antimicrobianos.

Em relação à estrutura celular, os produtos dos genes *fem* promovem a união das ligações interpeptídicas através de composição de filamentos de pentaglicinas. O produto do gene *femX* é o responsável pela adição da primeira glicina no grupo amino ao lado da cadeia de lisina. Em seguida ocorre a adição dos 2º e 3º resíduos de glicina, devido a ação do produto do gene *femA*. Por fim há a adição do 4º e 5º resíduo de glicina, é realizada pelo produto do gene *femB* (Tschierske, et al., 1999). Esta ligação interpeptídica é fundamental para

conferir a estabilidade da parede celular em situações de variação osmótica (Benson, et al., 2002). A deleção dos genes *fem* é letal para a célula bacteriana (Tschierske, et al., 1999). Cepas com mutações nos genes *femA* e *femB* apresentam modificação na estrutura do peptidoglicano. Isso, como consequência pode levar a uma leve redução no crescimento, diminuição na autólise, hipersuscetibilidade à metilicina e menor sensibilidade a lisostafina por apresentar menor cadeia de glicinas (Berger-Bächli e Tschierske, 1998; Sharif, et al., 2009).

O gene *femA* é essencial para a resistência a metilicina e presente em todos os *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA – ou Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Günaydın; Aslantas; Demir, 2011). Por esta razão este gene tem sido usado como um marcador molecular específico de *S. aureus* MRSA. Mehrota et al. (2000) utilizaram a técnica da reação em cadeia da polimerase multiplex para avaliar o potencial enterotoxigênico de *S. aureus* MRSA e observaram que 100% das cepas apresentavam o gene *femA*. Estudo desenvolvido por Borges (2006) constatou que 76% dos *S. aureus* isolados de leite cru também eram portadores do *femA*. Todos os *S. aureus* isolados de queijo Minas Frescal, comercializados em Pelotas – RS, também apresentaram o mesmo gene (Zocche et al., 2007).

A caracterização molecular de cepas coagulase negativa também mostra a existência do gene *femA* nestas espécies. Vannuffel et al. (1999) verificaram a presença do gene *femA* em *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus saprophyticus*, concluindo que o gene *femA* pode ser uma região conservada no gênero *Staphylococcus*. Estafilococos coagulase positivos e negativos, isolados de produtos lácteos responsáveis por 16 surtos

alimentares em Minas Gerais – Brasil, foram analisados quanto a presença de genes enterotoxigênicos e dos genes *coa* (coagulase) e *femA* (Veras et al., 2008). Todos ECoP e 3 ECoN apresentaram o gene *femA* e uma cepa foi positiva para os genes *coa* e *femA*. Andrade (2009) observou a presença do gene *femA* em 16,4% das espécies de ECoN isolados de queijo coalho artesanal e industrial. Este autor indica que este gene é comum ao gênero *Staphylococcus* sp. não sendo indicado como marcador específico e universal para a espécie *S. aureus*.

9.2 Análise do gene *femA*

Este estudo realizou análise molecular para verificar a presença do gene *femA* nas 121 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas nas UANs. Foi utilizado um *kit* comercial para a extração do DNA total, *PureLink Genomic DNA* – K1820-01, Invitrogen.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, *forward* - AAAAAAGCACATAACAAGCG e *reverse* – GATAAAGAAGAAACCAGCAG, foram os descritos por Mehrotra, Gehua, Johnson (2000). Realizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase em um volume final de 25 µL: 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq polimerase (Promega), 10 ng de DNA em termociclador (Master Cycler Personal). A reação foi incubada por: e 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min com a temperatura de anelamento de 50°C, 1 min a 72°C e um ciclo final de 5 min a 72°C. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1.5% (Invitrogen), corados com brometo de etídeo (Promega) em tampão TBE 0.5X, observadas sob luz ultravioleta e fotografadas (Kodak Digital Science™ DC120). O controle negativo de cada grupo de reações consistiu da mesma composição de reação de PCR, porém com adição de água Milli-Q estéril no lugar do DNA. Foram usados como controles positivos *S. aureus* ATCCs 13565 (*sea*), 14458 (*seb*), 19095 (*sec*), 23235 (*sed*) e 21664 (*see*).

Os resultados destas análises mostram que ocorreram amplificação do gene *femA* tanto para ECoP como para ECoN. Vinte e sete (22,1%) dos *Staphylococcus* sp. investigados foram positivos para amplificação deste gene (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil genotípico do gene *femA* de *Staphylococcus* sp. isolados dos serviços de alimentação.

Espécies (n. isolados)	Isolados que amplificaram com o gene <i>femA</i> (%)
<i>S. arlatae</i> (5)	1
<i>S. epidermidis</i> (28)	7
<i>S. gallinarum</i> (2)	1
<i>S. haemolyticus</i> (6)	3
<i>S. hyicus</i> (5)	1
<i>S. intermedius</i> (2)	2
<i>S. pasteurii</i> (5)	3
<i>S. saccharolyticus</i> (5)	1
<i>S. schleiferi</i> (12)	8
Total*	27 (22,1%)

Legenda: n., número; *, espécies que não amplificaram a sequência do gene *femA* testada: *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. caseolyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii* subespécie *urealyticus*, *S. equorum* subespécie *equorum*, *S. hominis*, *S. hyicus-chromogenes*, *S. lutrae*, *S. saprophyticus*, *S. simiae*, *S. simulans*, *S. vitulinus*, *S. warneri*.

A única cepa isolada de *S. aureus*, negativa para todas as SE testadas, também foi negativa para o gene *femA*, indicando não ser uma cepa resistente a meticilina. Resultado similar foi encontrado por Costa et al. (2010) quando testaram uma chave de identificação de *S. aureus* empregando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores para *femA*, utilizados no presente estudo.

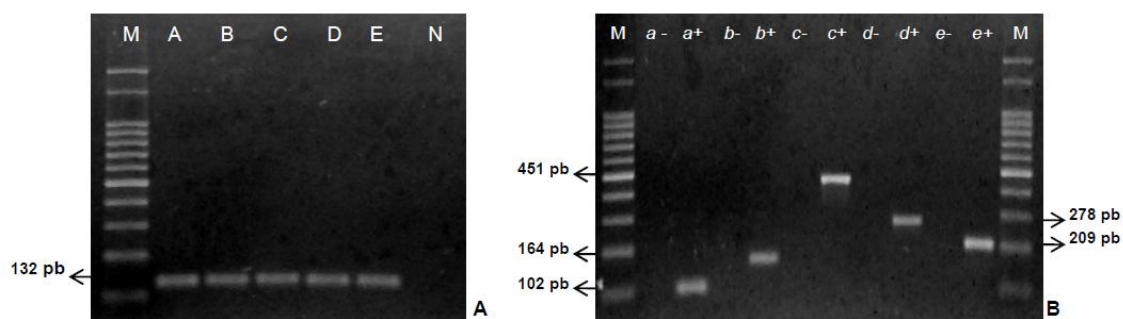
A sequência de oligonucleotídeos do gene *femA* usada neste estudo foi descrita como marcador para *S. aureus* MRSA (Mehrotra, Gehua, Johnson, 2000). Entretanto esta mesma sequência foi observada em outras espécies de *Staphylococcus* sp. analisadas neste estudo. Este gene foi positivo para ECoP e ECoN, com alta incidência em *S. schleiferi* (66,7%) e *S. epidermidis* (25%). Possivelmente, a sequência nucleotídica do gene *femA* testada neste estudo tenha sofrido algum tipo de mutação na respectiva sequência nucleotídica, o que não deve ter interferido na sua viabilidade.

A fim de complementar esta discussão, pode-se sugerir a realização de testes de avaliação da sensibilidade dos *Staphylococcus* sp. isolados neste estudo, a antimicrobianos, principalmente a meticilina. Contudo, mediante aos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que esta sequência gênica também pode estar presente em outras espécies de *Staphylococcus* sp., sobretudo em ECoN.

9.3 Eletroforese em gel de agarose mostrando padrão de amplificação dos genes das enterotoxinas e gene *femA*

Exemplo dos padrões de amplificação do gene *femA* nas diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* após PCR e eletroforese em agarose 1.5%.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose mostrando padrão de amplificação dos genes das enterotoxinas e gene *femA*.



Legenda: **A.** Linha: M, marcador de peso molecular (100 pares de base; Ludwig Biotec); A, *S. aureus* ATCC 13565; B, *S. aureus* ATCC 14458; C, *S. aureus* ATCC 19095; D, *S. aureus* ATCC 23235; E, *S. aureus* ATCC 27664; N, controle negativo. **B:** Eletroforese em gel de agarose mostrando padrão de amplificação dos genes das enterotoxinas. Linha: M, marcador de peso molecular (100 pares de base; Ludwig Biotec); a-, controle negativo da PCR a+; a+, amplificação do gene *sea* com *S. aureus* ATCC 13565; b-, controle negativo da PCR b+; b+, amplificação do gene *seb* com *S. aureus* ATCC 14458; c-, controle negativo da PCR c+; c+, amplificação do gene *sec* com *S. aureus* ATCC 19095; d-, controle negativo da PCR d+; d+, amplificação do gene *sed* com *S. aureus* ATCC 23235; e-, controle negativo da PCR e+; e+, amplificação do gene *see* com *S. aureus* ATCC 27664.

9.4 Quantificação de coliformes e *Escherichia coli* e adequação aos limites microbiológicos

SA		Sal. 1	Proc. S.	Prato Q.	Sobremesa	Refrigerador	C. legumes	Gastronorm	Liquidificador	Process.	Placa c.	Bancada
1	C. term.	na	-	2,0x10 ²	0,7x10 ³	-	2,5x10 ⁴	na	-	3,1x10 ⁵	2,2x10 ⁴	-
	Conf.	na	C	NC	C	NC	NC	na	NC	NC	NC	NC
2	C. term.	-	-	-	6,8x10 ³	-	4,1x10 ²	na	-	5,0x10 ³	-	-
	Conf.	C	C	C	NC	C	NC	na	NC	NC	NC	NC
3	C. term.	-	-	-	-	0,7x10 ¹	na	-	-	-	-	9,7x10 ²
	Conf.	C	C	C	C	NC	na	C	NC	C	NC	NC
4	C. term.	4,4x10 ⁴	7,0x10 ³	-	7,4x10 ⁵	-	-	6,0x10 ⁴	na	na	-	-
	Conf.	NC	NC	C	NC	C	NC	NC	na	na	NC	NC
5	C. term.	-	2,0x10 ³	-	na	-	na	-	na	8,0x10 ²	-	7,0x10 ³
	Conf.	C	NC	C	na	C	na	C	na	NC**	C	NC
6	C. term.	2,1x10 ⁴	-	1,5x10 ³	-	8,0x10 ²	-	2,3x10 ⁴	na	4,0x10 ²	4,5x10 ²	-
	Conf.	NC	C	NC	C	NC	C	NC	na	NC	NC	C
7	C. term.	-	-	1,0x10 ³	2,0x10 ³	-	1,0x10 ⁴	na	-	-	9,0x10 ³	0,4x10 ²
	Conf.	C	C	NC	NC	C	NC	na	NC	NC	NC	NC

Legenda: SA, serviço de alimentação; A., amostra; M.O, micro-organismo, °C, graus Celsius; C. term., coliformes termotolerantes; Conf.: adequação dos alimentos à legislação sanitária (BRASIL, 2001) e dos equipamentos e superfícies à Organização Panamericana de Saúde; Sal 1.: salada crua higienizada; Sal. 2: salada cozida ou processada; C. legumes, cortador de legumes; Process., processador de legumes; Placa c., placa de corte; na: não aplicável devido a equipamento inexistente, C., conforme; NC., não conforme; **, isolamento de 3 cepas de *E. coli*; - não houve presença da Coliformes termotolerantes.

9.5 Espécies de *Staphylococcus* isolados de alimentos.

UAN ^a	Amostra	Espécie	n. isolados ^b
1	Salada de beterraba crua	<i>S. arlatae</i>	1
2	Salada de moranga crua	<i>S. arlatae</i>	1
3	Salada de repolho cru	<i>S. pasteurii</i>	1
4	Salada de alface	<i>S. haemolyticus</i>	1
	Salada de alface	<i>S. epidermidis</i>	2
	Salada de alface	<i>S. auricularis</i>	1
	Salada de alface	<i>S. carnosus</i>	1
	Macarrão	<i>S. epidermidis</i>	2
6	Salada de couve chinesa	<i>S. simulans</i>	1
7	Salada de alface	<i>S. epidermidis</i>	1
	Salada de beterraba cozida	<i>S. gallinarum</i>	1
	Salada de beterraba cozida	<i>S. arlatae</i>	1
	Salada de beterraba cozida	<i>S. chromogenes</i>	1
Total			15

Legenda: ^a: Unidade de Alimentação e Nutrição; ^b: número de isolados; subsp.: subespécie.

9.6 Espécies de *Staphylococcus* isolados de equipamentos e ambientes.

UAN ^a	Amostra	Espécie	n. isolados ^b
1	Cortador de legumes	<i>S. pasteurii</i>	1
	Processador de legumes	<i>S. saprophyticus</i>	1
	Placa de corte	<i>S. saccharolyticus</i>	1
	Refrigerador	<i>S. saccharolyticus</i>	1
	Refrigerador	<i>S. simulans</i>	1
2	Processador de legumes	<i>S. caseolyticus</i>	1
	Bancada	<i>S. caseolyticus</i>	2
3	<i>Gastronorm</i>	<i>S. haemolyticus</i>	2
	<i>Gastronorm</i>	<i>S. hominis</i>	4
	<i>Gastronorm</i>	<i>S. vitulinus</i>	3
	<i>Gastronorm</i>	<i>S. warneri</i>	1
	Processador de legumes	<i>S. carnosus</i>	1
	Placa de corte	<i>S. saccharolyticus</i>	2
	Refrigerador	<i>S. simulans</i>	3
	Refrigerador	<i>S. saccharolyticus</i>	1
4	Placa de corte	<i>S. capitis</i>	1
	Placa de corte	<i>S. caseolyticus</i>	1
	Placa de corte	<i>S. equorum sub equorum</i>	1
	Placa de corte	<i>S. hominis</i>	1
5	Bancada	<i>S. haemolyticus</i>	3
	Bancada	<i>S. saprophyticus</i>	1
7	Cortador de legumes	<i>S. chromogenes</i>	2
	Placa de corte	<i>S. saprophyticus</i>	1
Total			36

Legenda: ^a: Unidade de Alimentação e Nutrição; ^b: número de isolados; sub., subespécie.

9.7 Espécies de *Staphylococcus* isolados de manipuladores de alimentos.

UAN ^a	Fonte	Amostra	Espécie	Coagulase	n. isolados ^b	
1	Mão	M2 ^d	<i>S. lutrae</i>	ECoP	1	
		M3 ^e	<i>S. pasteurii</i>	ECoN	1	
			<i>S. schleiferi</i>	ECoP	2	
			<i>S. hyicus</i>	ECoP	1	
2	CV ^c	M1 ^f	<i>S. intermedius</i>	ECoP	1	
	Mão	M1 ^f	<i>S. caprae</i>	ECoN	4	
		CV ^c	M2 ^d	<i>S. epidermidis</i>	ECoN	1
				<i>S. hyicus</i>	ECoP	3
3	Mão	M3 ^e	<i>S. epidermidis</i>	ECoN	1	
		M1 ^f	<i>S. auricularis</i>	ECoN	2	
			<i>S. epidermidis</i>	ECoN	1	
		M2 ^d	<i>S. hominis</i>	ECoN	4	
			<i>S. pasteurii</i>	ECoN	1	
			M3 ^e	<i>S. epidermidis</i>	ECoN	2
			<i>S. gallinarum</i>	ECoN	1	
	CV ^c	M1 ^f	<i>S. caprae</i>	ECoN	1	
			<i>S. epidermidis</i>	ECoN	1	
			<i>S. pasteurii</i>	ECoN	1	
		M2 ^d	<i>S. schleiferi</i>	ECoP	6	
			<i>S. epidermidis</i>	ECoN	6	
<i>S. cohnii</i> sub <i>urealyticus</i>			ECoN	1		
4	Mão	M2 ^d	<i>S. simiae</i>	ECoN	1	
			<i>S. hyicus-chromogenes</i>	ECoN	1	
			<i>S. saprophyticus</i>	ECoN	2	
		CV ^c	M1 ^f	<i>S. epidermidis</i>	ECoN	4
			M3 ^e	<i>S. saprophyticus</i>	ECoN	1
				<i>S. carnosus</i>	ECoN	1
	<i>S. arlatae</i>	ECoN		1		
	5	CV ^c	M1 ^f	<i>S. aureus</i>	ECoP	1
				<i>S. intermedius</i>	ECoP	1
				<i>S. schleiferi</i>	ECoP	4
		Mão	M2 ^d	<i>S. epidermidis</i>	ECoN	1
				<i>S. hyicus</i>	ECoP	1
M3 ^e				<i>S. epidermidis</i>	ECoN	5
6	CV ^c	M1 ^f	<i>S. epidermidis</i>	ECoN	1	
7	Mão	M1 ^f	<i>S. saprophyticus</i>	ECoN	1	
			<i>S. arlatae</i>	ECoN	1	
		CV ^c	M3 ^e	<i>S. auricularis</i>	ECoN	1
Total de isolados					70	

Legenda: ^a, Unidade de Alimentação e Nutrição; ^b, número de isolados; subsp., subespécie; ^c, cavidade nasal; ^d, manipulador 2; ^e, manipulador 3; ^f, manipulador 1; ECoP, Estafilococos coagulase positiva; ECoN, Estafilococos coagulase negativa.

9.8 Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação Portaria nº 78/2009

– Adaptada e aplicada neste estudo –

Nome da UAN:

Responsável:

Fone contato:

Data da visita:

Avaliador:

Avaliação	S	N	NA*
2. Edificação, Instalações, Equipamentos, Móveis e Utensílios			
2.1. Edificação e instalações projetadas de forma a possibilitar o fluxo ordenado e sem cruzamentos em todas as etapas de preparação de alimentos.			
2.4. Existência de separações entre as diferentes atividades por meios físicos ou por outros meios eficazes de forma a evitar a contaminação cruzada.			
2.5. Piso de material de fácil higienização (liso, impermeável e lavável) e em adequado estado de conservação.			
2.6. Paredes com revestimentos lisos, impermeáveis, de cores claras, de fácil higienização, sem cortinas e adequado estado de conservação.			
2.7. Teto de acabamento liso, impermeável, de cor clara, de fácil higienização e adequado estado de conservação.			
2.9. Janelas de superfície lisa, de fácil higienização, ajustadas aos batentes com telas milimetradas removíveis para limpeza e adequado estado de conservação.			
2.13. Área interna do estabelecimento livre de objetos em desuso e da presença de animais.			
2.14. Área externa do estabelecimento livre de objetos em desuso e da presença de animais.			
2.16. Luminárias localizadas na área de preparação, armazenamento e dentro dos equipamentos que possam contaminar os alimentos, apropriadas e protegidas contra explosão e quedas acidentais.			
2.21. A área de preparação do alimento dotada de coifa com sistema de exaustão interna com elementos filtrantes ou sistema de coifa eletrostática.			
2.23. Instalações sanitárias e os vestiários sem comunicação direta com a área de preparação, armazenamento de alimentos ou refeitório.			
2.24. Instalações sanitárias e os vestiários mantidos organizados em adequado estado de conservação e portas externas dotadas de fechamento automático.			
2.25. Instalações sanitárias dotadas de lavatórios e supridas de produtos destinados à higiene pessoal, como:			
a. papel higiênico			
2.25 b. sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e produto anti-séptico			
2.25 c. papel toalha não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro de secagem de mãos.			
2.27. Lavatórios dotados preferencialmente de torneira com fechamento automático, exclusivos para higiene das mãos, nas áreas de manipulação em posições estratégicas em relação ao fluxo de preparo dos alimentos e em número suficiente, com sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e produto antiséptico, toalhas de papel não reciclado, ou outro sistema higiênico e seguro de secagem das mãos e coletor de papel, acionado sem contato manual, higienizados sempre que necessário e no mínimo diariamente.			
2.29. Superfícies em contato com alimentos, lisas, íntegras, impermeáveis, resistentes à corrosão, de fácil higienização e de material não contaminante.			
2.31. Existência de registro da manutenção programada e periódica dos equipamentos e utensílios.			
3. Higienização de Instalações, Equipamentos, Móveis e Utensílios			
3.1. Existência de responsável pela operação de higienização comprovadamente capacitado.			
3.2. Operações de higienização das instalações realizadas com frequência que garanta a manutenção das condições higiênico-sanitárias.			
3.3. Existência de registros das operações de limpeza e/ou de desinfecção das instalações e equipamentos, quando não realizadas rotineiramente.			
3.10. Produtos saneantes identificados e guardados em local reservado para essa finalidade, sem contato com os alimentos.			
3.11. Utensílios, equipamentos e materiais utilizados na higienização, próprios para a atividade, conservados limpos, em número suficiente e guardados em local reservado para essa atividade.			
3.12. Panos de limpeza descartáveis, quando utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos, descartados a cada 2 horas, não excedendo 3 horas, não sendo utilizados novamente.			
3.13. Panos de limpeza não descartáveis, quando utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos, trocados a cada 2 horas, não excedendo 3 horas.			
3.14. Panos de limpeza não descartáveis limpos através de esfregação com solução de detergente neutro, desinfetados através de fervura em água por 15 minutos ou solução clorada a 200ppm, por 15 minutos, enxaguados com água potável e corrente.			
3.15. Higienização de panos de limpeza utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos realizada em local próprio para esse fim, em recipientes exclusivos para essa atividade, separados de outros panos utilizados para outras finalidades. Secagem dos panos em local adequado.			
3.17. Esponjas de limpeza, quando utilizadas em superfícies que entram em contato com alimentos, desinfetadas diariamente, por fervura em água, por no mínimo 5 minutos ou outro método adequado.			
4. Controle Integrado de pragas			
4.5. Existência de registros que comprovam o controle de vetores e pragas urbanas, tais como relatório de avaliação das medidas de controle realizado pela empresa especializada.			
5. Abastecimento de Água			
5.1. Utilização de água potável para manipulação de alimentos.			
5.2. Quando utilizada fonte alternativa, a potabilidade atestada semestralmente mediante laudos laboratoriais.			
5.9. Registros da higienização do reservatório de água verificados, datados e rubricados.			
6. Manejo de Resíduos			
6.2. Coletores de resíduos das áreas de preparação e armazenamento de alimentos dotados de tampas acionadas sem contato manual, devidamente identificados, íntegros, sacos plásticos e em número suficiente.			
6.3. Resíduos coletados na área de produção e armazenamento de alimentos retirados frequentemente e estocados em local fechado e isolado.			

7. Manipuladores			
7.2. Manipuladores realizam exames admissionais e periódicos de acordo com a legislação específica.			
7.4. Manipuladores afastados quando apresentam doenças de pele, tais como micoses de unhas e mãos, lesões e ou sintomas que possam comprometer a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos.			
7.5. Uniforme dos manipuladores de cor clara, limpo, em adequado estado de conservação, completo (proteção para cabelos cobrindo completamente os fios, uniforme com mangas curtas ou compridas cobrindo a totalidade da roupa pessoal e sem bolsos acima da linha da cintura, sem botões ou com botões protegidos, calças compridas, calçados fechados), exclusivo à área de preparação de alimentos e trocados, no mínimo, diariamente.			
7.6. Manipuladores dotados de boa apresentação, asseio corporal, mãos higienizadas, unhas curtas, sem esmalte, sem adornos, sem barba ou bigode e cabelos protegidos.			
7.8. Manipuladores higienizam cuidadosamente as mãos antes da manipulação de alimentos, principalmente após qualquer interrupção, troca de atividade e depois do uso de sanitários.			
7.9. Existência de cartazes de orientação aos manipuladores sobre a correta higienização das mãos e demais hábitos de higiene, afixados em locais apropriados.			
7.11. Manipuladores supervisionados e capacitados periodicamente (com frequência mínima anual) em higiene pessoal, manipulação de alimentos e em doenças transmitidas por alimentos.			
7.13. Manipuladores capacitados na admissão, abordando no mínimo os seguintes temas: contaminação de alimentos, doenças transmitidas por alimentos, manipulação higiênica dos alimentos e Boas Práticas em serviços de alimentação.			
7.15. Visitantes cumprem os requisitos de higiene e saúde estabelecidos para manipuladores.			
8. Matérias-primas, Ingredientes e Embalagens			
8.3. Controle da temperatura no recebimento de matérias-primas e ingredientes, de acordo com os seguintes critérios: I. Alimentos congelados: - 12° C ou inferior ou conforme rotulagem;			
8.3. II. Alimentos refrigerados: 7° C ou inferior ou conforme rotulagem;			
8.3. III. Existência de registros comprovando o controle de temperaturas no recebimento, verificados, datados e rubricados.			
8.4. Temperatura das matérias-primas, ingredientes e produtos industrializados armazenados conforme indicações do fabricante ou de acordo com os seguintes critérios: I. Alimentos congelados: - 18° C ou inferior;			
8.4. II. Alimentos refrigerados: inferior a 5° C;			
8.4. III. Existência de registros comprovando o controle de temperaturas no armazenamento, verificados, datados e rubricados.			
8.7. Quando houver necessidade de armazenar diferentes gêneros alimentícios em um mesmo equipamento: I. Alimentos prontos colocados nas prateleiras superiores; II. Alimentos semi-prontos e/ou pré-preparados nas prateleiras centrais; III. Produtos crus nas prateleiras inferiores, separados entre si e dos demais produtos; IV. Todos os alimentos armazenados embalados ou protegidos em recipientes fechados e em temperaturas definidas neste regulamento.			
8.8. Equipamento regulado para o alimento que necessita temperatura mais baixa.			
8.9. Durante a limpeza ou descongelamento de equipamentos de frio, alimentos mantidos com temperatura inferior a 5° C, no caso de alimentos refrigerados, ou ≤ a - 18° C, no caso de alimentos congelados.			
8.12. Matérias-primas, ingredientes e embalagens armazenadas sobre paletes, estrados e/ou prateleiras, respeitando os espaços mínimos para adequada ventilação e higienização.			
9. Preparação do Alimento			
9.2. Existência de adoção de medidas a fim de minimizar o risco de contaminação cruzada.			
9.3. Produtos perecíveis expostos à temperatura ambiente pelo tempo mínimo necessário para a preparação do alimento (máximo 30 minutos).			
9.10. Descongelamento conduzido sob refrigeração à temperatura inferior a 5° C.			
9.14. Existência de monitoramento, registro e ação corretiva, da temperatura de conservação a quente.			
9.16. Temperatura do alimento preparado no processo de resfriamento reduzida de 60° C a 10° C em, no máximo, 2 horas.			
9.17. Produtos preparados conservados em temperaturas de 4° C ou menos, conservados por 5 dias, ou em temperaturas superiores a 4° C e inferiores a 5° C, conservados por menos de cinco dias.			
9.18. Produtos preparados congelados em temperaturas iguais ou inferiores a -18° C.			
9.19. Alimentos preparados embalados e identificados quando armazenados sob refrigeração ou congelamento.			
9.21. Registros das temperaturas de refrigeração e congelamento verificados, datados e rubricados.			
9.22. Os procedimentos de higienização dos alimentos hortifrutigranjeiros seguem os seguintes critérios: I. Seleção dos alimentos, retirando partes ou produtos deteriorados e sem condições adequadas; II. Lavagem criteriosa dos alimentos um a um, com água potável; III. Desinfecção: imersão em solução clorada com 100 a 250ppm de cloro livre, por 15 minutos, ou demais produtos adequados, registrados no Ministério da Saúde, liberados para esse fim e de acordo com as indicações do fabricante; IV. Enxágüe com água potável.			
9.24. Vegetais folhosos crus, corretamente higienizados e não adicionados de molho, maionese, iogurte, creme de leite ou demais ligas, preparados e prontos para o consumo, mantidos em temperatura ambiente por no máximo 1 hora ou conservados sob refrigeração por períodos maiores.			
9.25. Ovos utilizados obedecendo aos seguintes critérios: I. Utilização de ovos limpos, íntegros e com registro no órgão competente; II. Dentro do prazo de validade, com conservação e armazenamento que não propicie contaminação cruzada e seguindo as indicações da rotulagem; III. Ovos lavados com água potável corrente, imediatamente antes do uso, quando apresentam sujidades visíveis; IV. Não são preparados e expostos ao consumo alimentos com ovos crus, como maionese caseira, <i>mousse</i> , merengue, entre outros; V. Alimentos preparados somente com ovos pasteurizados, desidratados ou tratados termicamente, assegurando sua inocuidade; VI. Ovos submetidos à cocção ou fritura apresentam toda a gema dura; VII. Não são reutilizadas embalagens dos ovos para outros fins.			
9.26. Guarda de amostras (100g/100mL) de todos os alimentos preparados, incluindo bebidas (100mL), em embalagens apropriadas para alimentos, de primeiro uso, identificadas com no mínimo a denominação e data da preparação, armazenadas por 72 horas sob refrigeração, em temperatura inferior a 5° C, em cozinhas industriais, hotéis, escolas, instituições de longa permanência para idosos e estabelecimentos de educação infantil e demais estabelecimentos à critério da autoridade sanitária.			
10. Armazenamento e transporte do Alimento preparado			
10.1. Alimentos preparados mantidos na área de armazenamento ou aguardando o transporte protegidos contra contaminantes.			
10.2. Alimentos preparados aguardando o transporte identificados, com pelo menos, a designação do produto, data de preparo e prazo de validade.			
10.4. Controle de temperatura do alimento no transporte, com registro, verificação, data e rubrica.			
11. Exposição ao Consumo do Alimento preparado			
11.1. Área de exposição, consumação ou refeitório mantido organizado e em adequadas condições higiênico-sanitárias.			
11.2. Manipuladores adotam procedimentos que minimizem o risco de contaminação dos alimentos preparados por meio da anti-			

sepsia das mãos ou pelo uso de luvas descartáveis.			
11.3. Equipamentos de calor e frio necessários à exposição ou distribuição de alimentos preparados sob temperaturas controladas devidamente dimensionados e em adequado estado de higiene, conservação e funcionamento.			
11.5. Registro da temperatura do equipamento de exposição ou distribuição de alimentos preparados verificado, datado e rubricado.			
11.7. Utensílios utilizados na consumação do alimento, tais como pratos, copos, talheres devidamente higienizados e armazenados em local protegido.			
11.8. Ausência de ornamentos e plantas na área de produção e, quando presentes na área de consumo, não constituem fontes de contaminação para os alimentos preparados.			
11.9. Funcionários responsáveis pela atividade de recebimento de dinheiro, cartões, não manipulam alimentos.			
12. Documentação e Registro			
12.1. Serviços de Alimentação dispõe de Manual de Boas Práticas e de Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) disponíveis aos funcionários envolvidos e à autoridade sanitária.			
12.2. Os POP contêm instruções sequenciais das operações, a frequência de execução e as ações corretivas, especificando o cargo e ou a função dos responsáveis pelas atividades e aprovados, datados e rubricados pelo responsável do estabelecimento.			
12.3. Registros mantidos por período mínimo de 30 dias contados a partir da data de preparação dos alimentos.			
12.4. Serviços de Alimentação têm implementado Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) de:			
a) Higienização de instalações, equipamentos e móveis.			
b) Controle Integrado de Vetores e Pragas Urbanas.			
c) Higienização do Reservatório.			
d) Higiene e Saúde dos Manipuladores.			
13. Responsabilidade			
13.1. Responsável pelas atividades de manipulação dos alimentos comprovadamente submetido a Curso de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, abordando no mínimo: contaminação de alimentos, doenças transmitidas por alimentos, manipulação higiênica dos alimentos e Boas Práticas.			
13.3. Responsável pelas atividades de manipulação dos alimentos atualiza-se, através de cursos, palestras, simpósios e demais atividades que se fizerem necessárias, pelo menos anualmente, em temas como: higiene pessoal, manipulação higiênica dos alimentos e doenças transmitidas por alimentos.			
13.7. Responsável pela manipulação dos alimentos em caso de surtos de doença transmitida por alimentos realiza notificação compulsória aos Órgãos Oficiais de Vigilância Sanitária.			

Legenda: S, sim; N, não; NA, não aplicável.

10 APÊNDICES

10.1 Termo de adesão à pesquisa para as Empresas de Refeições coletivas

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE (PPGMAA)

AUTORIZAÇÃO PARA EXECUÇÃO DE PESQUISA

À Empresa _____

O controle da qualidade higiênico-sanitária tem recebido muita atenção em pesquisas e debates, na área da saúde, por ser um item de fundamental influência na disseminação de doenças transmitidas por alimentos. O uso das boas práticas de manipulação configura procedimento operacional necessário para garantir a qualidade dos alimentos produzidos, pois utiliza princípios básicos de higiene. Além disso, é necessário ter certeza de que as técnicas higiênicas utilizadas na produção dos alimentos estão sendo suficientes para minimizar ao máximo a microbiota patogênica da linha de produção. Utilizam-se técnicas de microbiologia clássica e molecular para fazer rastreamento dos possíveis patógenos que por ventura ainda permaneçam na linha de produção e nos alimentos, mesmo com procedimentos de controle de higiene instalados. Os alimentos, bem como seus manipuladores, podem ser veículos de disseminação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Para o controle da qualidade higiênico-sanitária na produção de alimentos, os estabelecimentos fazem uso de algumas ferramentas de auxílio como as boas práticas. O uso desta ferramenta configura procedimento operacional necessário para garantir a qualidade dos alimentos produzidos, pois utiliza princípios básicos de higiene.

A aluna de doutorado acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Jozi Fagundes de Mello, vem por meio desta, solicitar a Vossa Senhoria a autorização e inclusão da Empresa _____, na realização da pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE UNIDADES ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DE *Staphylococcus* spp.”. Este estudo pretende verificar a microbiota presente em restaurantes e detectar a presença do patógeno *L. monocytogenes* para realizar estudos de determinação do perfil genético das linhagens isoladas no Rio Grande do Sul.

A pesquisa se realizará em 10 diferentes restaurantes indicados pela Empresa e mediante autorização escrita. A pesquisadora, e um auxiliar irão preencher uma lista de verificação de boas práticas, segundo a PORTARIA ESTADUAL SES/RS Nº 78/09 publicada no Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul. Para análises microbiológicas serão coletados materiais de superfície ambiental, equipamentos, utensílios, alimentos prontos para

consumo (100g de cada alimento a ser analisado), das mãos e vestíbulo nasal dos manipuladores de alimentos. Os manipuladores de alimentos serão convidados a participar da pesquisa e somente serão inclusos mediante assinatura de um termo de consentimento informado. Os nomes das Empresas, dos Restaurantes e de todos os funcionários que participarão da pesquisa, serão mantidos em sigilo absoluto.

Após a conclusão da pesquisa, todos os resultados serão repassados para a Empresa na forma de relatório, apresentação em forma de seminário, além de orientações quanto a possíveis não conformidades detectadas, sugerindo ações corretivas na intenção de promover práticas saudáveis de higiene na manipulação de alimentos. Telefones de contato a disposição para esclarecimentos adicionais, caso necessário: Comitê de Ética da UFRGS: 3308-3629; Doutoranda pesquisadora Jozi Mello e Professora. Dra. Marisa da Costa – pesquisadora responsável - 3308-3663 e 3308-4111.

Jozi Fagundes de Mello
Doutoranda PPGMAA

Profa. Dra. Marisa da Costa
Orientadora da pesquisa

Responsável pela Empresa

10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para manipuladores de alimentos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE (PPGMAA)

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____, aceito participar da coleta de material biológico necessário para o desenvolvimento da pesquisa “AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE UNIDADES ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DE *Staphylococcus* spp.”, que tem o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias e presença do patógeno *L. monocytogenes* em restaurantes. A coleta do material será realizada através esfregaço de suabe na mão e vestíbulo nasal, os quais serão coletados pelo próprio voluntário. A participação no estudo é de total liberdade. Não serão divulgados os nomes dos estabelecimentos em estudo, bem como os nomes dos voluntários. Os voluntários serão comunicados sobre os resultados obtidos ao término da pesquisa.

O estudo será desenvolvido durante o ano de 2008 e 2009 pela doutoranda do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Jozi Fagundes de Mello, sob orientação da professora doutora Marisa da Costa. Telefones de contato a disposição para esclarecimentos adicionais, caso necessário: Comitê de Ética da UFRGS: 3308-3629; Doutoranda pesquisadora Jozi Mello e Profa. Dra. Marisa da Costa – pesquisadora responsável - 3308-3663 e 3308-4111.

Voluntário

Jozi Fagundes de Mello – Doutoranda PPGMAA