

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Marcelo Luiz Lima Brandão

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *NOROVIRUS* GENOGRUPO II E
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)**

Rio de Janeiro

2012

Marcelo Luiz Lima Brandão

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *NOROVIRUS* GENOGRUPO II E AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Mestrado Acadêmico em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dr. Victor Augustus Marin

Dra. Marize Pereira Miagostovich

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Brandão, Marcelo Luiz Lima

Detecção e quantificação de norovirus genogrupo ii e avaliação da qualidade microbiológica de alface (*lactuca sativa*) / Marcelo Luiz Lima Brandão. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

119 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2011.

Orientadores: Dr. Victor Augustus Marin e Dra. Marize Pereira Miagostovich

Detection and quantification of norovirus genogroup ii and microbiological quality evaluation of lettuce (*lactuca sativa*).

Marcelo Luiz Lima Brandão

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *NOROVIRUS* GENOGRUPO II E
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

BANCA EXAMINADORA

Celio Mauro Viana (Doutor)

Universidade Federal Fluminense (UFF)

José Paulo Gargliardi Leite (Doutor)

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

ORIENTADORES

Victor Augustus Marin (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Marize Pereira Miagostovich (Doutora)

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)

Aos meus pais Roberto e Gildete, meu irmão
Rodrigo e meus avós Amália e Ozório

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação e ao INCQS pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através do projeto: “Pesquisa de Norovirus e Avaliação da Qualidade Microbiológica de Hortaliças” referente ao Edital MCT/CNPq N.º 019/2010.

Às Vigilâncias Sanitárias Municipais e Estadual que pactuaram no “Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos – PNMQSA” pela coleta das amostras.

Ao Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos/Fiocruz pelo sequenciamento das amostras.

A chefia do Laboratório de Microbiologia de Produtos, Dra. Paula Cardarelli-Leite pelo apoio para realização do mestrado.

A chefia de Departamento de Microbiologia, Dra. Suely Fracalanza pelo apoio para realização do mestrado.

Ao Setor de Bactérias de Referência do INCQS pela provisão das cepas de referência.

Ao Sergio Alves da Silva pela colaboração nas análises estatísticas dos dados.

Aos meus orientadores Dr. Victor Marin e Dra. Marize Miagostovich pela orientação e contribuição no meu aprendizado.

A Deus por me dar forças para continuar vivendo a cada dia.

Aos meus pais por terem feito de mim uma pessoa vencedora e que sempre busca melhorar.

A meu avô e minha avó por me amarem muito e me acolherem sempre que preciso.

Ao meu irmão por ser meu grande amigo de todas as horas.

Aos meus amigos Samuel Ponce, Lucas Rangoni, Ana Clara, Danielle Ponce e Josué Coutinho pela amizade.

Ao Davi Almeida e Fernanda Bispo pelo companheirismo, paciência e ajuda nos momentos de trabalho. Jamais esquecerei a contribuição de vocês.

Aos amigos do Setor de Alimentos e aos que nele estiveram presentes: Carla Rosas, Márcia Warnken, Silvia Bricio, Valéria Medeiros, Samara Pinto e Juliana Costa pelo otimismo, ajuda em todos os momentos que solicitei e aos momentos vividos no laboratório.

Aos companheiros dos Setores de Meios de Cultura e Esterilização pela atenção e eficiência ao atendimento dos pedidos para realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do IOC, Carmen Bauer, Túlio Fumian, Juliana Andrade, Julia Fioretti e Adriana Corrêa, pela gentil acolhida em seu laboratório e pelos ensinamentos.

Aos colegas de turma, pelos momentos compartilhados e a todos os professores.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

As hortaliças como a alface (*Lactuca sativa*) têm sido associadas a diversos surtos de doenças de origem alimentar. Dentre os patógenos envolvidos, os norovírus (NoV) são reconhecidos como os principais agentes etiológicos de gastroenterite, sendo as estirpes do genogrupo II (GII) mais prevalentes. Dessa forma, muito esforço tem sido realizado no desenvolvimento de métodos para detecção desses vírus em hortaliças. Os estudos têm focado na padronização dos métodos e otimização das etapas de extração, concentração e detecção do ácido nucléico viral. O uso de outros vírus como controle interno também tem sido estudado, para identificação de falhas durante a análise e evitar resultados falso-negativos. O presente estudo teve como objetivo investigar a contaminação de NoV GII pelo método de concentração por filtração em membrana negativa seguida de *semi-nested PCR* e *PCR* em tempo real e avaliar a qualidade microbiológica (pesquisa de *Salmonella* e enumeração de coliformes) de 90 amostras de alface (30 *in natura*, 30 minimamente processadas e 30 de serviços de alimentação) no Estado do Rio de Janeiro. O bacteriófago PP7 foi utilizado como controle interno e uma otimização do método comparando a solução salina fosfatada tamponada (PBS) e o tampão glicina (TG) foi realizada. Nenhuma amostra apresentou contaminação por NoV GII e *Salmonella*. As amostras *in natura* apresentaram qualidade microbiológica satisfatória de acordo com a legislação. Uma amostra minimamente processada (3,3%) e seis de serviços de alimentação (20%) apresentaram condições higiênic-sanitárias insatisfatórias devido ao número de coliformes termotolerantes acima do permitido, indicando que os procedimentos de higienização realizados nos serviços de alimentação não foram eficazes para eliminação dos micro-organismos ou que a contaminação pode ocorrer, por parte dos manipuladores. O bacteriófago PP7 foi detectado em 40; 86,7 e 76,7% das amostras *in natura*, minimamente processadas e de pratos prontos para consumo, respectivamente. O uso do TG aumentou a recuperação do bacteriófago PP7 ($p = 0,029$), mas não apresentou diferença significativa na recuperação de NoV GII ($p = 0,57$), e aumentou a sensibilidade da *semi-nested PCR* na detecção de NoV GII nas amostras artificialmente contaminadas. Esta última apresentou menor sensibilidade que a *PCR* em tempo real na detecção de NoV GII. Os resultados apontam o TG como eluente mais eficiente e que o bacteriófago PP7 é aplicável como controle interno do método.

Palavras-chave: *Norovirus*; Alface; *PCR* em tempo real; *Semi-nested PCR*; Bacteriófago PP7; Qualidade microbiológica.

ABSTRACT

Green leafy vegetables, as lettuce (*Lactuca sativa*) have been linked to diverse foodborne outbreaks worldwide. Among several pathogens involved, norovirus (NoV) are recognized as one of the most important etiological agent associated with gastroenteritis, being genotype II (GII) the most prevalent. In this manner, efforts have been made to develop methods to detect these viruses in green leafy vegetables. Researches have focused on standardizing methods and optimize stages of extraction, concentration and detection of viral nucleic acid. The use of others viruses as internal control has also been studied, to identifying possible errors during analysis and avoid false-negatives results. This study aimed to verify the contamination by NoV GII through concentration methodology by negative-membrane filtration followed by detection by semi-nested PCR and quantification by Real Time PCR and microbiological quality evaluation (*Salmonella* research and enumeration of total and thermo tolerant coliform) of 90 samples of lettuce (30 *in natura*, 30 minimally processed and 30 from food services) in the state of Rio de Janeiro. Bacteriophage PP7 was utilized as internal control and a method optimization comparing phosphate buffered saline (PBS) and Glycine buffer (GB) was carried out. No sample showed contamination by NoV GII and *Salmonella*. Samples of *in natura* lettuce exhibited satisfactory microbiology quality according Brazilian resolution. One minimally processed sample (3.3%) and six (20%) from food service showed unsatisfactory hygienic-sanitary conditions because of the number of thermotolerant coliforms above of allowed, indicating that hygienic proceedings in restaurants were not effective for eliminating those microorganisms or that the contamination may occur by employers. PP7 bacteriophage was detected in 40, 86.7 and 76.7% of *in natura*, minimally processed and food service, respectively. Using GB increased PP7 bacteriophage recovery ($p = 0.029$), but did not demonstrate significant difference in NoV GII recovery ($p = 0.57$), and increased sensitivity of semi nested PCR technique for detecting NoV GII in samples artificially contaminated. This last one exhibited lower sensitivity than Real Time PCR for NoV GII detection. Results point out that GB is an elution buffer more efficient and that PP7 bacteriophage is applicable as an internal control of this method.

Keywords: *Norovirus*; lettuce; real time PCR; semi-nested PCR; PP7 bacteriophage; microbiological quality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Esquema das etapas do processamento de alface 24
- Figura 2 Classificação dos norovírus em cinco genogrupos (GI-V) baseado na 34
diversidade da sequência completa da proteína do capsídeo VP1. Cepas
humanas correspondem aos genogrupos I, II e IV

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Padrão microbiológico sanitário para alface <i>in natura</i> , minimamente processada e servida em serviços de alimentação segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12/2001	28
Quadro 2	Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa	46
Quadro 3	Sequência, localização no genoma e tamanho de fragmento gerado dos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de <i>Norovirus</i> genogrupo II	47
Quadro 4	Reagentes utilizados nas reações de reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de <i>Norovirus</i> genogrupo II	47
Quadro 5	Sequência, localização no genoma e tamanho de fragmento gerado dos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação do bacteriófago PP7	50
Quadro 6	Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação do bacteriófago PP7	50
Quadro 7	Sequência, localização no genoma e tamanho de fragmento gerado dos iniciadores utilizados na <i>semi-nested</i> reação em cadeia pela polimerase qualitativa para detecção de <i>Norovirus</i> genogrupo II	53
Quadro 8	Reagentes utilizados nas reações de <i>semi-nested</i> reação em cadeia pela polimerase para detecção de <i>Norovirus</i> genogrupo II	54
Quadro 9	Esquema das suspensões virais utilizadas na contaminação das alíquotas e seus respectivos tampões utilizados no processamento	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação do desempenho do método de detecção de vírus em alface <i>in natura</i> artificialmente contaminadas com bacteriófago PP7 e <i>Norovirus</i> genogrupo II. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata	69
Tabela 2	Recuperação do bacteriófago PP7 inoculado nas amostras de alface por reação em cadeia pela polimerase em tempo real	75
Tabela 3	Análises bacteriológicas das amostras de alface	79
Tabela 4	População de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de alface	84
Tabela 5	Recuperação do bacteriófago PP7 e <i>Norovirus</i> genogrupo II a partir de amostras de alface contaminadas artificialmente com uso de solução salina tamponada fosfatada e tampão glicina. Os valores representam a média das duplicatas de três experimentos independentes	90
Tabela 6	Resultados do <i>semi-nested</i> reação em cadeia pela polimerase para detecção de <i>Norovirus</i> genogrupo II com uso de solução salina fosfatada tamponada e tampão glicina nas alíquotas contaminadas artificialmente, com uso do <i>RNA</i> extraído diretamente do concentrado e diluído 10x	93

LISTA DE ABREVIATURAS

A – adenina

C – citosina

Ca²⁺ – íon cálcio

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*

Ct – ciclo *threshold*

DNA – ácido desoxirribonucléico do inglês *deoxyribonucleic acid*

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) do inglês *deoxynucleotide triphosphate*

DTA – doenças transmitidas por alimentos

EDTA – etilenodiamino tetra-acético

FCV –calicivírus felino do inglês *feline calicivirus*

G – guanina

HAV – vírus da hepatite A do inglês *hepatitis A virus*

HCl – ácido clorídrico

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HK – ágar entérico Hektoen

L-EMB – ágar Eosina Azul de Metileno segundo Levine do inglês *Levine's Eosin-Methylene Blue*

LIC – limite inferior de confiança

LSC – limite superior de confiança

LST – lauril sulfato triptose

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MNV-1 – *norovirus* murinho-1 do inglês *murine norovirus-1*

mPCR – múltipla reação em cadeia pela polimerase do inglês *multiplex polymerase chain reaction*

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro do inglês *messenger ribonucleic acid*

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NMP – número mais provável

NoV – *Norovirus*

°C – graus centígrados

pb – pares de base

PBS – solução salina fosfatada tamponada do inglês *phosphate buffered saline*

PCR – reação em cadeia pela polimerase do inglês *polymerase chain reaction*

pH – potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RB –Rambach

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RLA – região de leitura aberta

RNA – ácido ribonucléico do inglês *ribonucleic acid*

RT-PCR - reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa do inglês *reverse transcription - polymerase chain reaction*

RV - rotavírus

ssRNA – ácido ribonucléico fita simples do inglês *single stranded ribonucleic acid*

T – timina

TB – tampão de fosfato de Butterfield

TG – tampão glicina

TSI – tríplice açúcar ferro do inglês *triple sugar iron*

UFC – unidade formadora de colônia

VBBL – verde brilhante bile lactose

VP – proteína estrutural

XLD – ágar xilose lisina desoxicolato

LISTA DE SIGLAS

Anvisa– Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – Coleção Americana de Culturas do inglês *American Type Culture Collection*

CAC– Comitê do Codex do inglês *Codex Alimentarius Commission*

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*

CCFH– Comitê de Higiene de Alimentar Codex do inglês *Codex Committee on Food Hygiene*

CMRVS – Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária

EUA – Estados Unidos da América

FAO– Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA– Agência Americana de Controle de Medicamentos e Alimentos do inglês *Food and Drug Administration*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

Lacen – Laboratório Central de Saúde Pública

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

MS – Ministério da Saúde

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica do inglês *National Center for Biotechnology Information*

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SUS – Sistema Único de Saúde

WHO– Organização Mundial da Saúde do inglês *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

- (-) – polaridade negativa
- (+) – polaridade positiva
- D – fator de diluição do ácido nucléico extraído
- E – eficiência da reação em cadeia da polimerase
- N_A – número de cópias de genoma de NoV GII/g na amostra
- N_I – número de cópias de genoma da suspensão fecal de NoV GII inoculadas nas amostras
- P – peso (g) da amostra
- P_I – número de cópias de genoma do bacteriófago PP7 inoculadas na amostra
- P_R – número de cópias de genoma do bacteriófago PP7 recuperadas na amostra
- R^2 – coeficiente de regressão quadrático
- R_N – percentual de recuperação da estirpe de NoV GII
- R_P – percentual de recuperação do bacteriófago PP7
- V_A – volume (μL) do concentrado viral
- V_B – volume (μL) do ácido nucléico extraído do concentrado viral
- V_C – volume (μL) do ácido nucléico eluído
- V_D – volume (μL) do molde utilizado para síntese do *cDNA*
- V_E – volume (μL) de *cDNA* produzido
- V_F – volume (μL) de *cDNA* molde adicionado a reação de *Taqman*
- V_G – volume (μL) da suspensão de partículas virais inoculadas na amostra
- V_H – volume (μL) do ácido nucléico extraído da suspensão de partículas virais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E SUA RELAÇÃO COM OS ALIMENTOS	20
1.2 A HORTALIÇA ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>).....	21
1.2.1 Definições e características gerais.....	21
1.2.2 Formas de cultivo e processamento.....	22
1.2.3 Importância na dieta e perfil de consumo.....	25
1.2.4 Produção	26
1.2.5 Legislação.....	27
1.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	28
1.4 <i>Salmonella</i> spp.....	30
1.5 COLIFORMES	32
1.5.1 Coliformes termotolerantes	32
1.6 VÍRUS ASSOCIADOS A DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	33
1.7 NOROVIRUS.....	33
1.7.1 Classificação.....	33
1.7.2 Morfologia e características físico-químicas.....	34
1.7.3 Genoma e proteínas virais	35
1.7.4 Patogênese, patologia e manifestações clínicas.....	35
1.7.5 Epidemiologia.....	36
1.7.6 Tratamento, prevenção e controle	38
1.7.7 Métodos de detecção em alimentos	39
1.8 JUSTIFICATIVA	41
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA EFICIÊNCIA DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO DE VÍRUS A PARTIR DE ALFACE NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERIÓFAGO PP7	43
3.1.1 Contaminação artificial das amostras	44
3.1.2 Processamento das amostras e concentração viral	44

3.1.3 Extração de ácidos nucleicos.....	45
3.1.4 Reação de transcrição reversa.....	46
3.1.5 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de <i>Norovirus</i> genogrupo II	46
3.1.6 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação do bacteriófago PP7.....	49
3.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>).....	52
3.2.1 Amostragem	52
3.2.2 Detecção e quantificação de <i>Norovirus</i> genogrupo II	52
3.2.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	56
3.2.4 Enumeração de coliformes	59
3.2.5 Identificação de <i>Escherichia coli</i>	61
3.2.6 Avaliação do padrão microbiológico segundo a Resolução da Diretoria de Colegiado n.º 12/2001	64
3.3 COMPARAÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA TAMPONADA E TAMPÃO GLICINA NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERIÓFAGO PP7.....	65
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	66
3.4.1 Comparação do número de coliformes totais e termotolerantes entre as amostras de alface.....	66
3.4.2 Correlação da presença de <i>Escherichia coli</i> entre as amostras de alface	67
3.4.3 Comparação da recuperação do controle interno entre as amostras de alface.....	67
3.4.4 Avaliação do desempenho das soluções salina fosfatada tamponada e tampão glicina na recuperação de vírus a partir de alface	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA DE CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANA NEGATIVA NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERIÓFAGO PP7 A PARTIR DE ALFACE	68
4.2 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>).....	71
4.2.1 Detecção e quantificação de <i>Norovirus</i> genogrupo II	71
4.2.2 Avaliação do uso do bacteriófago PP7 como controle interno.....	74
4.2.3 Avaliação da qualidade bacteriológica.....	78
4.3 COMPARAÇÃO DA SALINA FOSFATADA TAMPONADA E DO TAMPÃO GLICINA NA METODOLOGIA DE CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANA	

NEGATIVA NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERIÓFAGO PP7 A PARTIR DE ALFACE.....	89
5 CONCLUSÕES.....	96
6 PERSPECTIVAS.....	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE A – ESQUEMA DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE NOROVIRUS A PARTIR DE ALFACE.....	113
ANEXO A – TABELA DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL.....	114
ANEXO B – MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E REAGENTES	115

1 INTRODUÇÃO

Segundo o artigo nº 196 da Constituição Federal de 1988, *“a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantindo mediante políticas sociais e econômicas que visem a redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação”* (BRASIL, 1988).

De acordo com o artigo 2º da Lei nº 8.080 de 19/9/1990, *“a saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício”*. O artigo 6º diz que *“estão incluídas no campo de atuação do Sistema Único de Saúde, a execução de ações de vigilância sanitária; controle e fiscalização de alimentos, água e bebidas para o consumo humano”* (BRASIL, 1990).

1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E SUA RELAÇÃO COM OS ALIMENTOS

O termo vigilância sanitária tem sua origem na denominação “política sanitária”, que a partir do século XVIII era responsável pelo controle do exercício profissional e o saneamento, com o objetivo maior de evitar a propagação de doenças (GERMANO; GERMANO, 2001). A definição de vigilância sanitária está contida no artigo 6, §1º da Lei nº 8.080 de 19/9/1990, que regula em todo território nacional, as ações e serviços de saúde, executados isolados ou conjuntamente, em caráter permanente ou eventual, por pessoas naturais ou jurídicas de direito público ou privado. De acordo com o parágrafo 1º: *“Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”* (BRASIL, 1990).

Em janeiro de 1999, foi promulgada a Lei nº 9.782, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que tem como uma de suas atribuições exercerem atividades de regulação, normatização, controle e fiscalização na área de vigilância sanitária. Conforme descrito no parágrafo 1º, *“os alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas e seus insumos são considerados bens e produtos submetidos ao controle e fiscalização sanitária pela Agência”* (BRASIL, 1999).

A vigilância sanitária é um dos braços executivos que estruturam e operacionalizam o Sistema Único de Saúde (SUS) na busca de concretização do direito social à saúde, por meio de sua função principal de eliminar ou minimizar o risco sanitário envolvido na produção, processos e serviços (LUCCHESE, 2001).

Os alimentos são uma das grandes preocupações da vigilância sanitária, pois o controle higiênico-sanitário destes é preponderante para prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e relevante fator de desenvolvimento social (GERMANO; GERMANO, 2001). Na tentativa de minimizar danos à saúde, autoridades de todo o mundo vêm intensificando esforços para melhorar a segurança dos alimentos (WHO, 2002).

No Brasil, dentre os gestores do Ministério da Saúde (MS) envolvidos no controle sanitário de alimentos, se encontram a Gerência-Geral de Alimentos/Anvisa, as Vigilâncias Sanitárias Estaduais, Distrital e Municipais, os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Dentro de suas competências, estão atribuídos o controle e fiscalização dos critérios exigidos para o consumo de alimentos, quanto aos padrões microbiológicos, de contaminantes, de aditivos, de rotulagem, entre outros, segundo as legislações vigentes. Essa competência também é compartilhada com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que é responsável pelo controle da sanidade de produtos de origem animal e vegetal dentro da cadeia produtiva.

1.2 A HORTALIÇA ALFACE (*Lactuca sativa*)

1.2.1 Definições e características gerais

De acordo com a Resolução – CNNPA n° 12 (BRASIL, 1978), “*as hortaliças são plantas herbáceas da qual uma ou mais partes são utilizadas como alimento na sua forma natural*”. De acordo com as partes da planta que são utilizadas como alimento, as hortaliças são classificadas como: verduras, quando utilizadas as partes verdes; legumes, quando utilizado o fruto ou a semente; e raízes, tubérculos e rizomas, quando utilizadas as partes subterrâneas. Dentro desta classificação, a alface é considerada como uma verdura. Esta classe de alimentos possui dispensa de obrigatoriedade de registro de produto na Anvisa (ANVISA, 2000).

As hortaliças *in natura* são aquelas que para o consumo imediato exigem apenas a remoção da parte não comestível e os tratamentos indicados para a sua higienização e conservação (ANVISA, 2000). Pode-se dizer que a alface *in natura* não sofreu nenhuma espécie de transformação pós-colheita e que é oferecida ao consumidor inteira, ainda que embalada e refrigerada e algumas até lavadas. O importante é que não tenha ocorrido nenhuma alteração nas propriedades físicas do produto colhido (SEBRAE, 2008). Estes alimentos são muitas vezes denominados com outros termos sinônimos, como: hortaliças frescas, inteiras ou cruas (CAC, 2003).

Os produtos *in natura* são, em geral, encontrados expostos à temperatura ambiente, acessíveis ao contato das mãos de diferentes pessoas, inteiros (ou seja, incluindo partes não comestíveis como talos), podendo apresentar cortes, manchas, injúrias e folhas murchas e inaproveitáveis (SEBRAE, 2008).

As hortaliças minimamente processadas são aquelas submetidas ao processamento industrial que apresentam a forma original fisicamente alterada, embora mantenham o estado fresco. Estas são selecionadas, lavadas, descascadas, fracionadas, sanificadas, embaladas, e posteriormente refrigeradas ou congeladas (MELO et al, 2012; SEBRAE, 2008).

Muitos sinônimos são utilizados para os vegetais minimamente processados, tais como: *fresh-cut* (em inglês), levemente processados, parcialmente processados, pré-processados, pré-preparados, pré-cortados, entre outros (RODRIGUES et al, 1999).

1.2.2 Formas de cultivo e processamento

Os sistemas de produção de vegetais folhosos se apresentam em duas categorias: os campos abertos e os sistemas de cultivo protegidos. Dentro destas categorias podem existir grandes variações em termos de processo, tamanho, localização, condições ambientais e produtividade (FAO/WHO, 2008c).

O cultivo de hortaliças necessita de ambiente com frequente irrigação, especialmente nos meses de seca. A irrigação destes produtos exige água de qualidade sanitária adequada. Mas isso nem sempre ocorre e inúmeros relatos de vírus transmitidos por estes alimentos, tais como o vírus da hepatite A (HAV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV) têm sido notificados (FAO/WHO, 2008a; GERMANO; GERMANO, 2001). A alface, por apresentar folhas de

grande superfície, tem a contaminação facilitada durante a irrigação com água contaminada e contaminação cruzada por outros fômites (KOOPMANS; DUIZER, 2004).

Os sítios de produção dos vegetais e os vegetais pós-colhidos podem ser contaminados diretamente ou indiretamente por animais domésticos ou pela fauna silvestre. A contaminação direta pode ocorrer por animais que entram nos campo de cultivo, ou indiretamente pela contaminação por resíduos fecais, água, aerossóis e sujidades (FAO/WHO, 2008c).

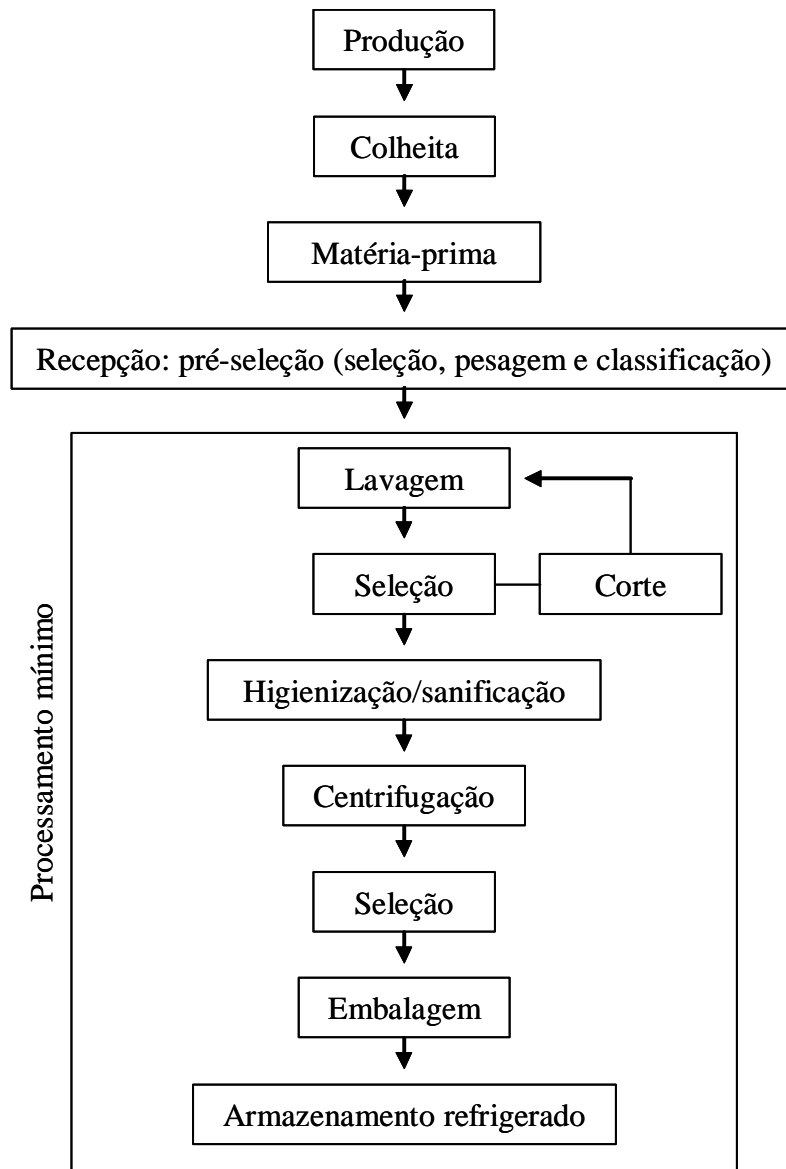
As técnicas inadequadas de manuseio dos vegetais após a colheita, especialmente durante as operações de transporte e armazenamento, geram perdas enormes, acarretando grandes prejuízos aos produtores e varejistas e também aos consumidores, que podem estar adquirindo um produto de qualidade duvidosa (SANT'ANA et al, 2002). Dessa forma, o processamento mínimo consiste numa tecnologia que diminui sensivelmente as perdas das hortaliças na pós-colheita, além de fornecer aos consumidores um produto de qualidade, pronto para consumo, e proporcionar maiores ganhos aos produtores e comerciantes agregando valor ao vegetal (FERNANDES et al, 2002; SANT'ANA et al, 2002).

As etapas do processamento mínimo são basicamente: a pré-seleção, classificação, lavagem, corte, sanitização, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento refrigerado. Esse processo visa garantir a manutenção da cadeia de frio, ininterruptamente, desde a etapa de recepção do produto *in natura* até o estágio de exposição na prateleira do ponto de venda (SEBRAE, 2008). Um esquema geral das etapas da produção de alface minimamente processada é ilustrado na Figura 1.

Existe um grande potencial para introdução e amplificação de perigos associados às hortaliças durante a cadeia alimentar. Mesmo a produção primária sendo a maior preocupação na introdução de perigos, também existe oportunidades nos procedimentos pós-colheita, durante o transporte, processamento, embalagem, distribuição e comércio desses produtos. Essas etapas podem propiciar que patógenos contaminantes aumentem em número, além de possibilitar a contaminação cruzada do produto, particularmente no caso das hortaliças cortadas, misturadas e/ou empacotadas (FAO/WHO, 2008b).

Nas etapas de pós-colheita, os procedimentos de lavagem e sanitização têm tido particular atenção, uma vez que a utilização de saneantes eficazes e outras intervenções são necessárias para redução de patógenos nestes alimentos (FAO/WHO, 2008c).

Figura 1 - Esquema das etapas do processamento de alface



Fonte: Adaptado de SANT'ANA et al, 2002

O controle da temperatura no armazenamento é um ponto crítico na segurança destes vegetais. A baixa temperatura previne a multiplicação e a infecciosidade de determinados patógenos durante a estocagem e distribuição (FAO/WHO, 2008c; FRÖDER et al, 2007). Esses cuidados são também essenciais para o aumento da vida de prateleira desses produtos, que no Brasil é muito baixa (cinco a sete dias), comparando-se à de mercados internacionais que pode chegar a 21 dias (SANTOS et al, 2010).

1.2.3 Importância na dieta e perfil de consumo

As hortaliças são essenciais para compor uma dieta nutritiva e equilibrada, uma vez que são fontes de vitaminas, minerais e fibras (GERMANO; GERMANO, 2001; TABAN; HALKMAN, 2011). Pesquisas científicas das últimas duas décadas têm demonstrado que uma dieta rica em vegetais protege os indivíduos contra diferentes tipos de câncer e diminui a ocorrência de doenças coronarianas (CAC/RCP 53-2003; TABAN; HALKMAN, 2011).

A alface possui componentes funcionais importantes para a dieta humana, como vitaminas do complexo B (B1, B2 e B6), vitaminas C e E, folato, niacina e ácido pantotênico (PHILIPPI, 2001).

Os vegetais folhosos possuem baixo valor calórico, sendo assim recomendados sem restrições quantitativas em diversas dietas, fazendo com que se tornem componentes imprescindíveis nas saladas dos brasileiros (BEUCHAT, 2002; FERNANDES et al, 2002).

Entre as hortaliças mais vendidas para consumo cru está a alface, bastante utilizada na confecção de sanduíches, decorações de pratos e saladas, além da alface pronta para consumo na forma minimamente processada, que é considerada a mais popular entre os vegetais minimamente processados (SEBRAE, 2008).

Mudanças significativas no padrão dos consumidores têm ocorrido. Consumidores que cozinhavam produtos no passado estão agora consumindo alimentos crus como parte de uma dieta regular, aumentando assim a demanda por novos tipos de produtos frescos, principalmente os de origem vegetal (FAO/WHO, 2008b; SEBRAE, 2008).

Órgãos governamentais de todo o mundo têm incentivado o consumo de vegetais frescos e frutas como parte de uma dieta saudável e para prevenir doenças (TABAN; HALKMAN, 2011). Em paralelo, a indústria varejista de produtos frescos tem desenvolvido processos para agregar valor aos produtos, como as saladas embaladas, o que atrai o consumidor por conveniência e variedade (BERGER et al, 2010).

O consumo de vegetais teve uma média de aumento de 4,5% por ano entre 1990 e 2004 (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

No Brasil, a Política Nacional de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde, dentre suas diretrizes, visa à promoção do consumo de hortaliças como uma prática alimentar e adoção de um estilo de vida saudável; prevenção e controle dos distúrbios nutricionais e de doenças associadas à alimentação (SECRETARIA DE POLITICAS DE SAÚDE, 2000).

São diversas as vantagens que as hortaliças minimamente processadas trazem para o consumidor, produtor e distribuidor. Para o consumidor, elas oferecem: uma maior praticidade no preparo dos alimentos, a manutenção das características sensoriais e nutricionais do vegetal fresco, ausência de desperdício devido ao descarte de partes inadequadas ao consumo, maior segurança na aquisição de hortaliças limpas e embaladas, conhecimento da procedência do produto, possibilidade de escolha da marca e aquisição em menores quantidades (FERNANDES et al, 2002; MELO et al, 2012; PEREZ et al, 2008). Para os produtores e distribuidores, a atividade normalmente mal remunerada de produção e venda de produtos hortícolas *in natura* ganha incremento devido à agregação de valor ao produto (PEREZ et al, 2008). A produção e distribuição mais racional, a redução de perdas durante o armazenamento e transporte, a maior facilidade de manipulação e acomodação do produto nas prateleiras são outros benefícios que o processamento mínimo propicia (MELO et al, 2012).

Segundo Sato e colaboradores (2006), o processamento mínimo de hortaliças no Brasil é ainda recente, embora se apresente como um nicho de mercado emergente e esteja voltado para um perfil de consumidores com poder aquisitivo mais elevado. Acredita-se que a principal resistência à compra desses produtos seja o preço relativamente superior ao do produto *in natura* (MELO et al, 2012; SATO et al 2006). Além disso, existe a desconfiança de parte dos consumidores quanto à qualidade e à conservação dos produtos minimamente processados devido a alterações de coloração, muitas vezes decorrentes das variações de temperatura dos balcões refrigerados dos pontos de venda (MELO et al, 2012).

Perez e colaboradores (2008) realizaram um estudo sobre o perfil dos consumidores de hortaliças minimamente processadas de Belo Horizonte, MG. Estes autores observaram que os motivos principais que levam ao consumo destes alimentos são a comodidade e praticidade (46%), o pouco tempo para o preparo de refeições (21%) e a qualidade higiênica dos produtos (11%). Dentre os fatores que levam os consumidores a não adquirir estes produtos estão os elevados preços (31,9%), a não confiança (17,9%) e o desconhecimento (7,8%).

1.2.4 Produção

De 1980 a 2004, a produção global anual de frutas e vegetais cresceu 94%. Neste período a média de crescimento anual da produção de vegetais foi de 4,2% ao ano, quase duas vezes maior que a de frutas que foi de 2,2% (EUROPEAN COMMISSION, 2007). Em muitos

países, hortaliças são atualmente produzidas em escala industrial, com produção, colheita e empacotamento sendo realizados praticamente em turnos de 24 horas (FAO/WHO, 2008b).

Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) indicam que em 2009, mais de 10 quadrilhões de toneladas de alface e chicória foram produzidas pelos 20 maiores produtores mundiais. A China foi a primeira colocada, sendo responsável por 55,3% desse total, seguido dos Estados Unidos da América (EUA) com 17,6% e Itália com 4,1% (FAOSTAT, 2011).

A produção brasileira de hortaliças é realizada em cerca de 800 mil hectares com produção anual em torno de 14 milhões de toneladas. No período de 1980 a 2005, a produção nacional de hortaliças teve um incremento de 195% de seu portfólio. O Estado de São Paulo é o grande produtor e o principal mercado consumidor de hortaliças do país. Em 2004, foram cultivados 146.081 hectares com 55 espécies de hortaliças que produziram cerca de 3,6 milhões de toneladas (SEBRAE, 2008). Na produção de alface e chicória, o Brasil teve destaque como produtor e importador destes produtos nos últimos anos (FAOSTAT, 2011).

As hortaliças ainda constituem os produtos minimamente processados mais vendidos no mundo. No Brasil, a alface figura entre as hortaliças minimamente processadas mais vendidas (SEBRAE, 2008).

O aumento da demanda na produção de hortaliças é vista como resultado da preocupação da população com uma melhor nutrição e de uma política de segurança alimentar dos países. A circulação destes produtos é grande, sendo estes comercializados de forma local, nacional e/ou internacional (FAO/WHO, 2008b). Contudo, em paralelo ao aumento da produção e consumo evidenciou-se um aumento de surtos de DTA associados a vegetais frescos pelo mundo (BERGER et al, 2010).

1.2.5 Legislação

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 12 de 02/01/2001 (ANVISA, 2001) estabelece os critérios microbiológicos para o controle higiênico-sanitário de alimentos. Os parâmetros para avaliação de amostras indicativas de alface *in natura*, minimamente processadas e de pratos prontos para o consumo estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Padrão microbiológico sanitário para alface *in natura*, minimamente processada e servida em serviços de alimentação segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12/2001

Hortaliças: legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis)	Micro-organismos	Tolerância para amostra indicativa
a) frescas, "in natura", inteiras, selecionadas ou não, com exceção de cogumelos	<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausência
b) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos	Coliformes a 45°C/g	10 ²
	<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausência
Pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares)	Micro-organismos	Tolerância para amostra indicativa
d) a base de verduras e legumes crus, temperados ou não, em molho ou não	<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausência
	Coliformes a 45°C/g	10 ²

Esta resolução não contempla vírus em nenhum dos grupos de alimentos nela relacionados.

1.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As DTA ocorrem pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio de transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico (ANVISA, 2001).

São conhecidos cerca de 250 agentes etiológicos causadores de DTA, que podem se manifestar através de distintas síndromes, isoladas ou associadas, tais como as diarreicas, neurológicas, renais, hemolíticas, ictéricas, respiratórias e sistêmicas (SÃO PAULO, 2002). Dentre os agentes mais envolvidos estão: *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Typhi e outros sorovares, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, estafilococos produtores de enterotoxinas, *Escherichia coli* patogênicas, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni* (BRASIL, 2005).

As DTA se destacam como um problema de Saúde Pública mundial, com 1,5 bilhão de casos de gastroenterites anuais, afetando em especial crianças abaixo de cinco anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento (FAO/WHO, 2008a).

Estima-se que dois milhões de crianças morram anualmente devido à gastroenterite grave, pois a cobertura do tratamento de reidratação ainda é baixa (SCHAETTI, 2009).

No Brasil, de 1999 até 2010, 6.971 surtos de DTA foram registrados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, com acometimento de 1.804.932 pessoas e 88 óbitos nesse período (BRASIL, 2011). Destes surtos, 114 (1,64%) tiveram como tipo de alimento incriminado hortaliças, castanhas e sementes. Contudo na maioria dos casos (38,6%) o alimento envolvido não foi identificado (BRASIL, 2011). No período de 1996-2006, o Brasil registrou que 75% dos surtos associados a produtos frescos foram devido ao consumo de vegetais folhosos e ervas (FAO/WHO,2008c).

No ano de 2004, foram notificados mais de dois milhões de casos de diarreia, afetando principalmente as regiões Nordeste e Sudeste do país e crianças menores de cinco anos de idade. A magnitude das doenças diarreicas agudas nessa faixa etária pode ser demonstrada pela quantidade de recursos destinados ao pagamento de internações hospitalares por esses agravos, que no período de 1995 a 2004 somaram mais de 173 bilhões de reais (BRASIL, 2006).

Diversos fatores têm contribuído para as mudanças e tendências no panorama das DTA pelo mundo. Entre esses se destacam: o rápido crescimento populacional e mudança do perfil demográfico (tendência a maior população idosa); o aumento do comércio global de alimentos; o aumento do deslocamento de pessoas; as mudanças nos hábitos alimentares, como o aumento do consumo de alimentos crus ou brandamente cozidos; o aumento da proporção de indivíduos imunocomprometidos; as mudanças nas práticas de produção; a intrusão do homem em ambientes selvagens; e as mudanças no clima, favorecendo o aparecimento de novos vetores em regiões alteradas (NEWLL et al, 2010).

Durante as últimas duas décadas, o número de surtos de gastroenterite humana causados por patógenos alimentares associados ao consumo de vegetais verdes folhosos e suas respectivas saladas prontas para consumo tem aumentado em todo o mundo (TABAN; HALKMAN, 2011).

De acordo com o relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e da Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2008a) de 1970-2007, pelo menos 49 surtos de DTA associados ao consumo de hortaliças e ervas foram reportados na literatura com pelo menos 25 mortes.

Com o aumento da importância das DTA em Saúde Pública, tornou-se necessária uma complexa regulamentação das atividades desenvolvidas em todos os pontos da cadeia produtiva. O setor de saúde tem importante parcela de responsabilidade pelo contínuo processo de elaboração de normas e da fiscalização de seu cumprimento (WALDMAN; FREITAS, 2008).

Na tentativa de sanar os problemas com produtos minimamente processados, especialistas anunciaram algumas recomendações para diferentes macrosssegmentos da cadeia produtiva, incluindo os órgãos de fiscalização. Dentre estas recomendações pode-se destacar: intensificar a fiscalização de produtores de vegetais higienizados, identificando possíveis falhas no processo de higienização ou no pós-processo; aumentar a fiscalização nos pontos de venda de vegetais higienizados, a fim de identificar produtos que estejam em desacordo com a legislação vigente; e criar programas de monitoramento periódicos com o objetivo de traçar um panorama real da atual situação de vegetais higienizados comercializados em todo o território nacional (SEBRAE, 2008).

Identificar o papel dos vegetais folhosos em surtos pode ser difícil, especialmente quando eles são um componente de saladas diversas com uma série de outros ingredientes misturados que são igualmente capazes de transmitir patógenos. Os dados epidemiológicos geralmente reportam a categoria do alimento incriminado como “salada” ou “salada verde”, sendo assim impossível identificar o tipo de hortaliça (FAO/WHO, 2008c)

1.4 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi inicialmente caracterizado em 1885, tendo sua denominação em homenagem ao patologista Daniel Salmon. Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bastonete Gram-negativo, não esporulado, que forma ácido e gás a partir da glicose (JAY, 2005). O gênero apresenta ainda como características metabólicas bem definidas a capacidade de descarboxilação da lisina, produção de gás sulfídrico e utilização do citrato como fonte única de carbono. Atualmente, com base em características fenotípicas, o gênero é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. Particularmente, *S. enterica* subdivide-se em seis subespécies: *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* e *salamae* (EUZÉBY, 2012).

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas na água, solo, fezes de animais, insetos, e superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e

cozinhas (SILVA et al, 2007a). Têm como hábitat primário o trato intestinal de animais, como pássaros, répteis, aves de granja, homem e ocasionalmente insetos; fazendo assim do homem e dos animais seus principais reservatórios (JAY, 2005; SILVA et al, 2007a). Salmonelas colonizam uma grande variedade de hospedeiros. Desta forma, animais criados em fazendas como aves, gado e suínos podem estar colonizados, frequentemente assintomáticos, levando a produção de carnes e outros produtos contaminados (NEWLL et al, 2010). Quando presentes no intestino, os micro-organismos são excretados nas fezes, das quais podem ser transmitidos por insetos e por outros vetores para outras localidades, podendo ser encontrados em águas, principalmente águas poluídas (JAY, 2005).

A salmonelose ocorre devido à ingestão de alimentos contendo um número significativo de determinadas linhagens do gênero (JAY, 2005). A dose infectante é de 15 a 20 células, variando de acordo com o sorovar e com o estado imunológico do hospedeiro podendo atingir grupos de qualquer faixa etária. Os sintomas surgem em torno de 5 a 48 horas após a ingestão do alimento, podendo prolongar-se dependendo do hospedeiro, da dose infectante ingerida e da cepa de *Salmonella* envolvida (SILVA et al, 2007a). Os sintomas mais comuns são: náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia (JAY, 2005). Estes sintomas são geralmente acompanhados de fraqueza, fadiga muscular, febre baixa, nervosismo e sonolência. A taxa de mortalidade é em média de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida, 2% entre o primeiro e os 50 anos e de 15% em pessoas acima de 50 anos (JAY, 2005).

Surtos de salmonelose de origem alimentar são observados e reportados com frequência, reflexo de uma baixa dose infectante em humanos, da habilidade de se multiplicar em alimentos não processados e do longo tempo de sobrevivência no ambiente (NEWELL et al, 2010). A salmonelose é considerada a DTA mais problemática na maioria dos países, inclusive no Brasil (SILVA et al, 2007a).

Existe uma vacina disponível no mercado internacional para *Salmonella* Typhi, mas esta é apenas licenciada para uso em indivíduos com dois anos de idade ou mais (SCHAETTI, 2009).

Uma nova tendência recentemente identificada nas infecções por *Salmonella* é um aumento nos surtos associados com alimentos não usuais, como os produtos frescos (NEWLL et al, 2010). Estudos sugerem que algumas cepas de *Salmonella* desenvolveram a habilidade de aderir e colonizar vegetais (FRANZ; VAN BRUGGEN, 2008).

As hortaliças folhosas, especialmente a alface, têm sido identificadas como veículos de patógenos como *Salmonella* (SANTOS et al, 2010). Segundo o relatório da FAO/WHO

(2008c) *Salmonella* tem sido descrita como agente etiológico de diversos surtos associado ao consumo de alface.

1.5 COLIFORMES

Os coliformes são bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, não-esporulados, que fermentam e produzem gás a partir da glicose, e fermentam a lactose até a produção de ácido e gás em um período de 48 horas a 35°C. De forma geral, os coliformes são representados por cinco gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (IVERSEN et al, 2008; JAY, 2005).

Os coliformes foram historicamente utilizados como micro-organismos indicadores de contaminação fecal e, assim, medir a presença potencial de patógenos entéricos em água fresca. Contudo, como a maioria dos coliformes é encontrada no meio ambiente, essas bactérias possuem limitada relevância higiênica. Com o objetivo de diferenciar os coliformes termotolerantes dos totais, foi desenvolvido um teste para detecção de coliformes de origem fecal (FORSYTHE, 2002).

1.5.1 Coliformes termotolerantes

Os coliformes termotolerantes são definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose em caldo EC, com produção de gás, no período de 48 horas, a 45,5°C, com exceção dos isolados de moluscos, 44,5°C (FORSYTHE, 2002). Um teste para coliformes termotolerantes é essencialmente um teste para *E. coli* tipo I, embora algumas linhagens de *Citrobacter* e *Klebsiella* possam se adequar a esta definição (JAY, 2005). A denominação de coliformes termotolerantes é equivalente à denominação de coliformes a 45°C e coliformes de origem fecal (ANVISA, 2001).

Embora a presença de um grande número de coliformes e *E. coli* em alimentos seja altamente indesejável, sua eliminação de todos os alimentos frescos e refrigerados é praticamente impossível (JAY, 2005). Os coliformes têm grande valor como indicadores de segurança de alimentos em muitos produtos. Eles possuem importante utilidade como

componentes de programas de alimentos seguros, como no plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na produção de determinados produtos (JAY, 2005).

1.6 VÍRUS ASSOCIADOS A DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Com o desenvolvimento de técnicas de detecção molecular mais sensíveis, os vírus têm sido amplamente reconhecidos como importantes agentes etiológicos de surtos de DTA nos países desenvolvidos (FAO/WHO, 2008a,b; KOOPMANS; DUIZER, 2004).

Os NoV e o HAV são os mais frequentemente envolvidos em DTA de origem viral, sendo os NoV responsáveis por mais de 96% de surtos não bacterianos de gastroenterite aguda em adultos (FAO/WHO, 2008a).

Análises epidemiológicas e laboratoriais confirmaram os NoV como agentes etiológicos de diversos surtos, apontando a contaminação de saladas, por manipuladores, como uma das fontes de infecção, reforçando o papel deste tipo de alimento como potencial veículo de transmissão destes vírus (BERGER et al, 2010; FAO/WHO, 2008c; GREEN, 2007; MESQUITA; NASCIMENTO, 2009; NEWLL et al, 2010; TABAN; HALKMAN, 2011; VIVANCOS et al, 2009; WADL et al, 2010).

No Brasil estudos têm demonstrado a importância dos NoV como agentes etiológicos causadores da gastroenterite (FERREIRA et al, 2008, 2010; LUCHS et al, 2011; MORILLO et al, 2008, 2011; SOARES et al, 2007; VICTORIA et al, 2007, 2009).

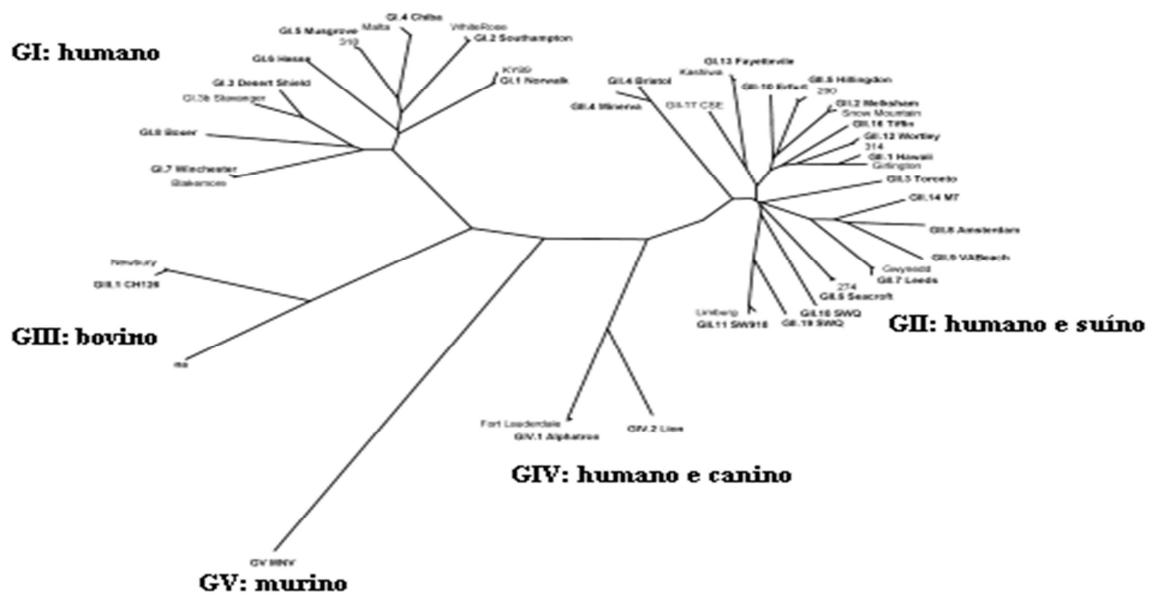
1.7 NOROVIRUS

1.7.1 Classificação

Os NoV pertencem ao gênero *Norovirus* que se inserem na família *Caliciviridae*, que abrange ainda outros quatro gêneros. Os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* formam o grupo dos calicivírus humanos, que são agentes etiológicos de gastroenterite (ICTV, 2009). O gênero *Norovirus* possui apenas uma espécie denominada *Norwalk virus* (ICTV, 2009), considerada

protótipo. Com base na análise da sequência completa de aminoácidos do gene que codifica para a proteína do capsídeo VP1, Zheng e colaboradores (2006) estabeleceram a classificação do gênero *Norovirus* de acordo com percentual de identidade dos aminoácidos: cepa (0-14,1%), genotipo (14,3-43,8%) e genogrupo (44,9-61,4%). A partir destes parâmetros, foram definidos cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV) e 29 genotipos. Os genogrupos I, II e IV representam os NoV que infectam humanos, exceto GII/11, conforme visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Classificação dos norovírus em cinco genogrupos (GI-V) baseado na diversidade da sequência completa da proteína do capsídeo VP1. Cepas humanas correspondem aos genogrupos I, II e IV.



Fonte: Adaptado de ZHENG et al, 2006

1.7.2 Morfologia e características físico-químicas

Os NoV são compostos por um capsídeo protéico, não-envelopado, de simetria icosaédrica. A isometria do capsídeo possui de 35-39 nm de diâmetro e apresenta estrutura hexagonal (ICTV, 2009).

Os NoV humanos possuem densidade de 1,36 a 1,41 g/cm³ em cloreto de céso e se distinguem morfologicamente dos outros calicívirus, quando observados pela microscopia

eletrônica. Em condições *in vitro* os vírions são estáveis em ambiente com pH entre 4,5-7 (GREEN, 2007; ICTV, 2009).

Estudos realizados por Keswick e colaboradores (1985), mostraram que os NoV mantêm infecciosidade em voluntários após: exposição do filtrado fecal a pH 2,7 por 3 horas à temperatura ambiente; tratamento com éter a 20%, a 4°C por 18 horas; e incubação a 6°C por 30 minutos. Estes são resistentes à inativação pelo tratamento com cloro na concentração de 3,75 a 6,25 mg/L (cloro residual livre de 0,5 a 1,0 mg/L), usualmente encontrada na água distribuída pelo sistema de abastecimento. Os NoV são inativados após tratamento com cloro a 10 mg/L (GREEN, 2007; KESWICK et al, 1985). Estes vírus são mais resistentes à destruição por cloro do que os outros vírus entéricos, como RV e poliovírus (GREEN, 2007; JAY, 2005).

1.7.3 Genoma e proteínas virais

O ácido nucléico dos NoV consiste em uma molécula linear de ácido ribonucléico (*RNA*) de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva (+*ssRNA*) com aproximadamente 7,7 kilobases. O genoma completo possui de 7300-7700 nucleotídeos, com conteúdo de guanina (G) + citosina (C) de 48-55,8%. A extremidade 5' do genoma possui uma proteína estrutural ligada (VPg) e a terminação 3' possui uma extensão de poli adenina (A) (ICTV, 2009).

Este genoma possui três regiões de leitura aberta (RLA) codificadoras: a primeira codifica uma poliproteína que, após a tradução, é clivada em proteínas não estruturais, como a *RNA* polimerase *RNA* dependente; a segunda codifica a proteína VP1; e a terceira uma pequena proteína do capsídeo VP2 que está associada com a estabilidade da proteína VP1 (GREEN, 2007; MORILLO; TIMENETSKY, 2011).

1.7.4 Patogênese, patologia e manifestações clínicas

O hospedeiro natural dos NoV são os seres humanos (ICTV, 2009). Esses vírus são extremamente infecciosos, e a ingestão de apenas algumas partículas infecciosas (1 a 100) é

suficiente para causar a infecção e gerar a doença (FAO/WHO, 2008a; GREEN, 2007; URBANUCCI et al, 2009).

A alta taxa de ataque (50-70%), o elevado número de portadores assintomáticos, o período prolongado de excreção viral (acima de duas semanas após o término dos sintomas) e a persistência dos vírus no meio ambiente contribuem para o caráter explosivo dos surtos de NoV de origem alimentar (GREEN, 2007). As principais formas de transmissão são por via fecal-oral, água e alimentos contaminados (KONEMAN et al, 2001; MORILLO; TIMENETSKY, 2011).

As infecções por NoV tem um período de incubação de 24 a 48 horas, atingindo, indistintamente, crianças e adultos. Os sintomas mais comuns são náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e febre. A doença, em geral, é autolimitada, mas, casos graves e mortes ocorrem em determinados grupos de risco, como idosos e indivíduos com doenças crônicas (PATEL et al, 2009).

1.7.5 Epidemiologia

Os NoV são a causa mais frequente de surtos de gastroenterite não bacterianas. Estes surtos ocorrem todos os anos, principalmente em eventos familiares (MESQUITA; NASCIMENTO, 2009; VIVANCOS et al, 2009), hospitais (CAMPOS et al, 2008; FERREIRA et al, 2008), bases militares (WADL et al, 2010), *campings* (BARRABEIG et al, 2010), navios cruzeiros (WIDDOWSON et al, 2004; WIKSWO et al, 2011), presídios (LUCHS et al, 2011) e casas de repouso (SAID et al, 2008), causando doença em pessoas de todas as faixas etárias.

Infecções por NoV são a causa de aproximadamente 200.000 mortes em crianças com menos de cinco anos pelo mundo, com 900.000 atendimentos pediátricos e 64.000 internações nos países desenvolvidos (SCHAETTI, 2009).

O papel dos alimentos na epidemiologia das infecções por NoV tem sido demonstrado pelo aumento anual de surtos, principalmente associados ao consumo de carnes, sanduíches, produtos de panificação, frutas, hortaliças, leite, ostras e águas contaminadas (FAO/WHO, 2008a; KOOPMANS; DUIZER, 2004).

Estudos de epidemiologia molecular mostram uma grande diversidade genética de NoV envolvidos em surtos (FIORETTI et al, 2011; SIEBENGA et al, 2009), contudo relatos

globais mostram o predomínio do GII nos casos de infecções de origem alimentar (FAO/WHO, 2008a). Recentemente, estudos epidemiológicos têm demonstrado que aproximadamente 70% dos surtos são causados pela variante GII.4 (KOOPMANS; DUIZER, 2004; MORILLO; TIMENETSKY, 2011).

A importância epidemiológica dos NoV nos surtos de origem alimentar tem sido demonstrada pelo estabelecimento de redes laboratoriais de vigilância nos países industrializados, embora pouco se saiba sobre o papel destes vírus nos países em desenvolvimento (VIDAL et al, 2005). A maioria dos países, principalmente da América Latina, não possui sistemas de vigilância para DTA de origem viral (FAO/WHO, 2008a; VIDAL et al, 2005). Nestes países, a definição do vírus como agente etiológico em surtos tem sido realizada por investigações epidemiológicas que associam a detecção do vírus nas fezes de pessoas que adoeceram ao consumo de determinados alimentos (VIDAL et al, 2005).

A investigação de vírus em alimentos tem se tornado, a cada dia, uma exigência no âmbito da Saúde Pública, embora ainda não exista uma inspeção sistemática ou mesmo legislação que estabeleça critérios de segurança, no que diz respeito à presença desses agentes etiológicos nos alimentos. Recentemente, a otimização e a padronização de métodos para detecção de NoV em alimentos tem sido intensificada, como forma de estabelecer bases laboratoriais para a vigilância epidemiológica destas infecções. A identificação direta dos NoV em alimentos envolvidos em surtos é obtida raramente, principalmente devido à complexidade das matrizes alimentares, dos baixos níveis de contaminação e da diversidade genética (FAO/WHO, 2008a).

1.7.5.1 Epidemiologia no Brasil

Estudos recentes no Brasil demonstraram que o NoV GII é o mais prevalente entre os genogrupos (CAMPOS et al, 2008; FERREIRA et al, 2008, 2010; FIORETTI et al, 2011; GEORGIADIS et al, 2010; MORILLO et al, 2008, 2011; PRADO et al, 2011; RESQUE et al, 2005; VICTORIA et al, 2007). Contudo, outros genogrupos também são encontrados, como cepas pertencentes ao genogrupo I (MORILLO et al, 2011; PRADO et al, 2011; SOARES et al, 2007; VICTORIA et al, 2010).

Soares e colaboradores (2007) reportaram uma ocorrência de 47,6% e 52,3% de NoV GI e II, respectivamente, em amostras de fezes de crianças com diarreia aguda no Estado do

Rio de Janeiro. Neste mesmo Estado, Ferreira e colaboradores (2008), caracterizaram NoV GII como agente etiológico de gastroenterite aguda, sendo estes vírus detectados em amostras de fezes coletadas na região. Morillo e colaboradores (2008) identificaram NoV GII em 15,7% de amostras de fezes diarreicas de pacientes de um hospital localizado no Estado de São Paulo. Na cidade de Porto Alegre, RS, foram analisadas 365 amostras de fezes de pacientes com sintomas de gastroenterite aguda, num período de 1 ano, das quais NoV GII foram identificadas em 48 amostras (13,2%) (GEORGIADIS et al, 2010).

Em amostras ambientais, Victoria e colaboradores (2010) detectaram NoV em 22 amostras (23%) de águas ambientais coletadas na cidade de Florianópolis do Estado de Santa Catarina. Os autores detectaram três cepas de NoV GII a partir de amostras de água para consumo e uma cepa de NoV GI e outra de GII em uma amostra de água para consumo clorada, demonstrando que existe um risco à saúde da população no consumo destas águas. Prado e colaboradores (2011) detectaram a circulação de cepas de NoV GI e II em amostras de efluentes de duas estações de tratamento de esgoto hospitalar na área metropolitana do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2008.

Em amostras de alimentos, não existem estudos no Brasil quanto à ocorrência de NoV. O único trabalho publicado apresenta dados da avaliação de um método de recuperação de NoV GII em amostras de alface e queijo tipo “Minas” artificialmente contaminadas (Fumian et al, 2009).

1.7.6 Tratamento, prevenção e controle

Não há tratamento específico para os NoV. Nos casos de diarreia aguda, deve-se ingerir sal de reidratação oral ou outras soluções de reidratação para reposição de açúcares. A reposição de fluídos e eletrólitos é extremamente importante para evitar a desidratação (PATEL et al, 2009).

Não existe ainda uma vacina comercial disponível para NoV (RÁCZ et al, 2005). Em 2009, durante a 5^a Conferência Nacional de Vacinas para Doenças Entéricas, foram apresentados dados sobre o desenvolvimento de uma vacina bivalente para NoV, formulada a partir de partículas do vírus. Esta vacina induz uma resposta imune robusta e equilibrada em camundongos e ratos depois da administração via parenteral e nasal (SHAETTI, 2009).

Na sua 40^a Sessão, o Comitê de Higiene de Alimentos *Codex* (CCFH) do *Codex Alimentarius*, criou um grupo de trabalho para elaboração de uma proposta com diretrizes para aplicação de princípios gerais de higiene no controle de vírus em alimentos. O relatório emitido pela FAO /WHO classificou os NoV como um dos principais agentes etiológicos de infecções de origem alimentar com maior incidência mundial. Os produtos frescos, moluscos bivalves crus e alimentos prontos para consumo foram citados como os mais comumente associados a essas infecções (FAO/WHO, 2008a). O documento também ressalta a indisponibilidade de métodos padronizados para a detecção de vírus em alimentos e a utilização destes por poucos países, alertando que estas tecnologias precisam ser transferidas e executadas em outras localidades.

Em Julho de 2009, o *CCFH* elaborou o documento CX/FH 09/41/8, atualmente em revisão, onde foram abordados os princípios gerais de higiene a serem aplicados no controle de vírus em alimentos. Os NoV foram classificados no grupo 1 de prioridade, baseado nos critérios de incidência, mortalidade, potencial de transmissão e perigo à saúde pública.

Para o controle adequado das infecções virais de origem alimentar, se faz necessária uma avaliação do real potencial de transmissão por manipuladores infectados; a padronização de métodos de detecção de vírus em alimentos e de investigação de surtos de DTA virais; e o desenvolvimento e capacitação de laboratórios de vigilância para detecção das fontes comuns de surtos ainda no estágio primário. Além da criação de medidas específicas para o controle dos vírus; identificação e ênfase do papel dos vírus nos planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle; e da informação aos consumidores sobre os riscos dos vírus nos alimentos (FAO/WHO, 2008a).

1.7.7 Métodos de detecção em alimentos

Muitos esforços foram realizados nos últimos anos no desenvolvimento de métodos de detecção de vírus entéricos em alimentos. Contudo, mesmo sendo utilizados em muitos países, existe uma falta de harmonização entre os métodos utilizados (FAO/WHO, 2008a).

Os calicivírus humanos não são cultiváveis em culturas celulares e a sorotipagem direta utilizando-se anticorpos neutralizantes não é possível de ser realizada (GREEN, 2007).

As técnicas moleculares, como areação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (*RT-PCR*), são considerados os métodos padrão-ouro para detecção de

NoV em amostras de origem clínicas, ambientais e de alimentos (STALS et al, 2009, 2011). Contudo, a detecção molecular não necessariamente indica a presença de vírus infecciosos (FAO/WHO, 2008a; KONEMAN et al, 2001).

Comparadas às amostras clínicas, a detecção de NoV em alimentos é dificultada devido à baixa concentração de partículas virais (GUÉVREMONT et al, 2006), o que requer grandes volumes de amostras ou metodologias de maior sensibilidade. Além disso, algumas substâncias presentes na composição dos alimentos podem inibir os métodos utilizados na detecção e quantificação do material genético (FAO/WHO, 2008a).

Como as amplificações pela *PCR* requerem um pequeno volume de amostra e são sensíveis a inibidores, etapas de extração e concentração das partículas virais a partir das amostras de alimentos antes da purificação do *RNA* são necessárias (MORTON et al, 2009; SÁNCHEZ et al, 2012).

Além disso, o sequenciamento do genoma tem demonstrado que os NoV possuem uma diversidade genética muito grande, o que dificulta a elaboração de métodos específicos para todos os genótipos de NoV (FAO/WHO, 2008a; PANG et al, 2005).

O uso de outros vírus como controle interno na execução dos ensaios também tem sido muito estudado, com objetivo de identificar possíveis falhas durante a análise e evitar resultados falso-negativos (FUMIAN et al, 2010; MATTISON et al, 2009; RAJAL et al, 2007b; STALS et al, 2009). A inclusão de um controle interno pode ajudar a elucidar o papel de importantes variáveis do método aplicado, como eficiência da extração e purificação dos ácidos nucleicos, e a recuperação de patógenos em procedimentos de filtração (RAJAL et al, 2007b). Um resultado negativo no controle interno durante uma etapa de amplificação pode indicar falhas no procedimento devido ao mau funcionamento do aparelho termociclador, erro na mistura da *PCR*, baixa atividade da polimerase ou, a presença de substâncias inibitórias na amostra (STALS et al, 2009).

Dentre os vírus estudados como controle interno nos ensaios de detecção de vírus a partir de alimentos, se encontram: o *Norovirus* murino 1 (MNV-1) (SÁNCHEZ et al, 2012; STALS et al, 2009, 2011), o calicivírus felino (FCV) (MATTISON et al, 2009,2010; SCHULTZ et al, 2011) e o fago MS2 (SCHERER et al, 2010). Outro vírus já utilizado, mas como controle interno na análise de amostras ambientais e de águas, é o bacteriófago PP7 de *Pseudomonas aeruginosa*. Este bacteriófago já apresentou sucesso como controle interno de métodos de detecção de vírus humanos em águas naturais (MORALES-MORALES et al, 2003; RAJAL et al, 2007b) águas pluviais (RAJAL et al, 2007a), e em esgoto (FUMIAN et al, 2010).

Atualmente, os novos métodos de detecção de vírus a partir de alimentos têm focado na otimização das etapas de extração, concentração e detecção dos ácidos nucleicos (FAO/WHO, 2008a; GUÉVREMONT et al, 2006; SÁNCHEZ et al; 2012; SCHERER et al, 2010; STALS et al, 2011; TIAN et al, 2011). Contudo, na maioria das vezes os vírus presentes nos alimentos não são detectados, seja por falta de um método apropriado ou pela não disponibilidade do alimento incriminado (MORALES-RAYAS et al, 2010). Logo, ainda existe uma necessidade de métodos de preparação de amostras que eluam e concentrem as partículas virais de uma diversidade de alimentos sem diminuir a sensibilidade do método molecular utilizado na detecção (FAO/WHO, 2008a; GUÉVREMONT et al, 2006).

1.8 JUSTIFICATIVA

O INCQS tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos vinculados à vigilância sanitária.

Com o aumento dos casos de DTA associados ao consumo de produtos frescos como as hortaliças, faz-se necessário um monitoramento da qualidade higiênico sanitária destes alimentos de forma a minimizar riscos que possam vir a causar danos à saúde da população. A verificação da qualidade higiênico-sanitária das hortaliças poderá gerar informações sobre as características microbiológicas desses produtos subsidiando possíveis ações de vigilância sanitária.

Diante da preocupação mundial com o papel dos NoV em surtos de gastroenterite aguda de origem alimentar e da falta de uma metodologia padronizada para a pesquisa destes vírus em alimentos, é de grande importância a avaliação de uma metodologia para a pesquisa de NoV em hortaliças.

Os resultados desse estudo poderão apresentar dados brasileiros inéditos sobre a ocorrência de NoV em hortaliças, uma vez que não há dados quanto à ocorrência destes patógenos em alimentos no Brasil.

A determinação de uma metodologia eficiente para a detecção de NoV em alimentos poderá ser introduzida para os Lacen, podendo contribuir para a elaboração de futuros programas de monitoramento visando traçar o perfil da contaminação de alimentos por NoV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a contaminação por *Norovirus* genogrupo II pela metodologia de concentração por membrana negativa, avaliando o uso de controle interno e eluentes, assim como a qualidade microbiológica de alface (*Lactuca sativa*) *in natura*, minimamente processada e de serviços de alimentação no Estado do Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar experimentalmente a eficiência de recuperação de NoV GII e do bacteriófago PP7 pela metodologia de concentração por filtração em membrana negativa e avaliar o uso do bacteriófago PP7 como controle interno;
- Detectar e quantificar NoV GII por *semi-nested PCR* e *PCR* em tempo real, respectivamente;
- Caracterizar os NoV GII detectados por sequenciamento parcial do genoma;
- Pesquisar *Salmonella* spp. e enumerar coliformes totais e termotolerantes;
- Identificar *Escherichia coli* por provas bioquímicas;
- Avaliar as condições higiênico-sanitárias de alface, segundo a RDC nº 12/2001;
- Comparar a eficiência da metodologia de concentração por filtração em membrana negativa na recuperação do bacteriófago PP7 e NoV GII com uso de solução salina tamponada fosfatada (PBS) e do tampão glicina (TG).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA EFICIÊNCIA DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO DE VÍRUS A PARTIR DE ALFACE NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERIÓFAGO PP7

Foi realizada uma avaliação do desempenho da metodologia de detecção de vírus a partir de alface na recuperação do bacteriófago PP7(ATCC 15692-B2) de *P. aeruginosa* e de uma cepa NoV GII. O bacteriófago PP7 foi gentilmente cedido pela Dr.^a Verônica B. Rajal (*Department of Civil and Environmental Engineering, University of California, Davis, One Shields Avenue, Davis CA 95616, EUA*) tendo sido obtido pela cultura celular de uma cepa de *P. aeruginosa* ATCC 15692 utilizando um protocolo previamente descrito (RAJAL et al, 2007b). A cepa de NoV GII foi obtida de uma suspensão fecal n.º 15085 pertencente à coleção do Laboratório de Referência em Gastroenterite do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz,

A avaliação preliminar da metodologia foi realizada de forma qualitativa e quantitativa. A análise qualitativa foi realizada pela comparação do número de amostras que apresentaram sinal de amplificação (positivas) na *PCR* em tempo real e o número total de reações de *PCR* em tempo real realizadas. A análise quantitativa foi realizada pela comparação da média do número de cópias de genoma recuperadas nas amostras com o número de cópias de genoma inoculadas nas mesmas (STALS et al, 2011). Os resultados das análises quantitativas e qualitativas foram expressos, respectivamente, como “recuperação” e “taxa de sucesso”.

As etapas de processamento das amostras até a síntese do *cDNA* foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS/Fiocruz. O preparo das reações de quantificação pela *PCR* em tempo real foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do IOC/Fiocruz.

Para todos os procedimentos moleculares, salas individualizadas (três no INCQS e quatro no LVCA/IOC) foram utilizadas para evitar contaminação cruzada das amostras.

A suspensão fecal contendo a cepa de NoV GII n.º 15085 foi utilizada como controle positivo nas etapas de extração de ácidos nucléicos e nos ensaios moleculares. Água

DNase/RNase livre (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo em todos os procedimentos de avaliação do bacteriófago PP7 e de NoV GII.

3.1.1 Contaminação artificial das amostras

Uma amostra de alface *in natura*, obtida no comércio no Município do Rio de Janeiro, foi dividida em 15 alíquotas de 25 g em sacos plásticos estéreis *Whirl-Pak*[®] *Bag* (Nasco, Atlanta). Em cada ensaio, três alíquotas foram contaminadas com 200 µL de uma suspensão de partículas do bacteriófago PP7 e 200 µL da suspensão fecal de NoV GII n.º 15085. Duas alíquotas foram processadas no mesmo ensaio sendo estas inoculadas com 200 µL de solução salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,2 (ANEXO B), representando o controle negativo. Foram realizados três ensaios em dias diferentes, totalizando 15 alíquotas (nove contaminadas e seis como controle negativo).

3.1.2 Processamento das amostras e concentração viral

O processamento das amostras e concentração do material genético viral foi realizado conforme a metodologia descrita por Fumian e colaboradores (2009) com pequenas modificações.

Foram pesados 25 g de cada amostra em sacos plásticos estéreis *Whirl-Pak*[®] *Bag* (Nasco, EUA), seguidos da adição de 225 mL de PBS pH 7,2. Esta suspensão foi homogeneizada em aparelho *Stomacher*[®] (Seward, Fisher Scientific, Canadá), em velocidade normal por 1 min para a eluição das partículas virais localizadas na superfície da alface. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 7.000 rpm por 30 min a 4°C (Beckman Mod. J2-21, Rotor JS-13, EUA). A porção aquosa do sobrenadante foi transferida para um erlenmeyer estéril e adicionados 2,5 mL de uma solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 2 M (Sigma-Aldrich, EUA), a fim de se obter uma concentração final de 25 mM de MgCl₂. Aferiu-se o pH desta solução com uma fita indicadora de faixa 0-14 (Merck, Alemanha), e

quando necessário este foi ajustado para uma faixa de 4 - 5 com uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 6 N (Merck, Alemanha).

As partículas virais presentes na amostra foram concentradas pelo método de adsorção-eluição, utilizando membranas negativamente carregadas tipo HA 0,45 μm *Stericup*[®] (Nihon Millipore[®], Japão). Todo o volume de amostra foi transferido para a parte superior do sistema de filtração, e a parte inferior foi acoplado a um compressor/aspirador (Fanem, Brasil). Realizou-se a completa filtração da amostra. Posteriormente foram filtrados 200 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 0,5 mM pH 3,0 (Merck, Alemanha) para remoção de cátions e fixação das partículas virais na membrana. A membrana do sistema foi retirada e transferida para uma placa de Petri descartável estéril (J'Prolab, Brasil), seguida da adição de 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10 N pH 10,5-10,8 (Merck, Alemanha). Esta placa foi agitada em aparelho tipo "vortex" (IKA, China) por 10 min para eluição das partículas virais adsorvidas na membrana. Esse volume foi transferido para o ultrafiltrador *Centriprep*[®] (Millipore, Irlanda) no qual foram adicionados 50 μL de uma solução de tampão Tris-EDTA 100 X (ANEXO B) e 50 μL de uma solução de H_2SO_4 a 50 mM pH 3,0 (Merck, Alemanha) para neutralização da solução. O ultrafiltrador foi centrifugado a 5.000 rpm por 30 min a 4°C em centrífuga (Eppendorf 5804 R, F-34-6-38, Alemanha). Após a centrifugação, foi realizada a aferição do volume do concentrado. Quando este apresentou volume maior que 2 mL, novas centrifugações a 5.000 rpm por 5 min foram realizadas até a obtenção do concentrado viral com volume ≤ 2 mL. O concentrado viral foi congelado em freezer temperatura de -80°C.

3.1.3 Extração de ácidos nucleicos

O RNA viral foi extraído a partir de 140 μL do concentrado viral utilizando-se o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit*[®] (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em cada extração foi eluído um volume final de 60 μL .

3.1.4 Reação de transcrição reversa

Para a síntese do *cDNA*, foi realizada uma reação de transcrição reversa (*RT*) utilizando-se o kit *High-Capacity* (Applied Biosystems, EUA). A mistura da reação de *RT* foi realizada conforme o Quadro 2.

Quadro 2 – Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa

Reagentes	Volume (μL)
Água <i>DNase/RNase</i> livre ^a	5,25
Tampão [10 X] ^b	2,5
dNTP [100 mM] ^b	1,0
<i>MultiScribe</i> TM <i>Reverse Transcriptase</i> [50U/ μL] ^b	1,25
Iniciador randômico [10 X] ^b	2,5
<i>ssRNA</i>	12,5
Volume total	25,0

^a- BioBasic, Ontario, Canadá; ^b-Kit *High-Capacity* (Applied Biosystems, EUA).

A mistura de reação foi acondicionada em um aparelho termociclador (MJ Research/Peltier PTC – 200) e submetida a um programa de: 25°C por 10 min, 37°C por 2 h, 85°C por 5 min e resfriada a 4°C.

Para reduzir a presença de inibidores da *PCR*, foram realizadas reações a partir dos 60 μL de ácidos nucleicos eluídos e de uma diluição destes na proporção 1:10 em água *DNase/RNase* livre (BioBasic, Canadá).

3.1.5 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de *Norovirus* genogrupo II

A quantificação de NoV GII foi realizada pela técnica da *PCR* em tempo real (KAGEYAMA et al 2003). Os iniciadores, sondas, respectiva região no genoma e tamanho do fragmento gerado estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3 – Sequência, localização no genoma e tamanho de fragmento gerado dos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de *Norovirus* genogrupo II

Iniciadores (polaridade)	Sequencia 5' – 3'	Região no genoma	Fragmento (pb ^a)	Referência
COG 2F(+)	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	RLA ^b -1		
COG 2R(-)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	RLA-2	98	Kageyama et al, 2003
Ring 2(+)(sonda)	^{Fam} - TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT ^{-Tamra}	RLA-1		

Legenda dos nucleotídeos: R: A/G; Y: C/T; B: C/T/G; R: A/G; N: A/C/T/G.

^a- pares de base; ^b- região de leitura aberta.

Para a quantificação de NoV GII, foi preparado uma mistura em microplaca com 96 cavidades (Applied Biosystems, EUA) conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 – Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de *Norovirus* genogrupo II

Reagentes	Volume (µL)
Água DNase/RNase livre ^a	3,875
PCR Master Mix ^b	12,5
Iniciador COG 2F ^a [10 µM] ^c	1,5
Iniciador COG 2R ^a [10 µM] ^c	1,5
Sonda Ring 2 [10 µM] ^c	0,625
cDNA	5,0
Volume total	25,0

^a- Gibco®, EUA; ^b- Applied Biosystems, EUA, ^c- Applied Biosystems, EUA.

Em cada experimento foi aplicada uma curva padrão de plasmídeos recombinantes pCR2.1 (Invitrogen, EUA) contendo inserto de NoV GII. A curva foi realizada com diluições seriadas de base 10 dos plasmídeos, conforme descrito por Fumian (2008).

A eficiência da reação de amplificação da curva padrão foi calculada em percentual conforme a equação 1 (RAJAL et al, 2007b; STALS et al, 2009):

$$E = (10^{1/s} - 1) \times 100 \quad (1)$$

onde 'E' (%) é a eficiência da PCR, e 's' é o coeficiente angular da curva padrão.

A microplaca foi vedada com um filme adesivo (Applied Biosystem, EUA) e a reação realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, EUA) em um programa de: 50°C por 2 min, seguida de desnaturação a 95°C por 10 min e 45 ciclos de 95°C por 15 s e 56°C por 1 min.

3.1.5.1 Determinação do título da suspensão fecal contendo a cepa de Norovirus genogrupo II

O cálculo do número de cópias de genoma da suspensão fecal de NoV GII n.º 15085 inoculadas nas alíquotas de alface (N_I) foi realizado conforme a equação 2:

$$N_I = \left(\frac{n D V_E V_C V_G}{V_F V_D V_H} \right) \quad (2)$$

Onde n é a média do número de cópias amplificadas, baseado na curva padrão; D é o fator de diluição do ácido nucléico extraído; V (μ L) representam os volumes de cDNA produzido (V_E); de cDNA molde adicionado a reação de *TaqMan* (V_F); do ácido nucléico eluído (V_C); do molde utilizado para síntese do cDNA (V_D); da suspensão de partículas virais inoculadas na amostra (V_G); e do ácido nucléico extraído da suspensão de partículas virais (V_H).

3.1.5.2 Determinação do número de cópias de genoma de Norovirus genogrupo II recuperados nas amostras

O número de cópias de genoma de NoV GII/g nas amostras (N_A) foi calculado conforme a equação 3:

$$N_A = \left(\frac{n D V_E V_C V_A}{V_F V_D V_B P} \right) \quad (3)$$

Onde n é a média do número de cópias amplificadas, baseado na curva padrão, D é o fator de diluição do ácido nucléico extraído; V (μL) representam os volumes de *cDNA* produzido (V_E); de *cDNA* molde adicionado a reação de *TaqMan* (V_F); do ácido nucléico eluído (V_C); do molde utilizado para síntese do *cDNA* (V_D); do concentrado viral (V_A); do ácido nucléico extraído do concentrado viral (V_B); e P (g) é a massa da amostra.

3.1.5.3 Cálculo do percentual de recuperação de *Norovirus* genogrupo II nas amostras

O cálculo do percentual de recuperação da cepa de NoV GII n.º 15085 (R_N) nas amostras artificialmente contaminadas foi realizado através da equação 4:

$$R_N(\%) = (N_A/N_I) \times 100 \quad (4)$$

3.1.6 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação do bacteriófago PP7

A quantificação do bacteriófago PP7 foi realizada por *TaqMan PCR* em tempo real como alvo no gene da replicase, conforme descrito por Rajal e colaboradores (2007b). Os iniciadores, sonda, região do genoma e tamanho do fragmento gerado estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5 – Sequência, localização no genoma e tamanho de fragmento gerado dos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação do bacteriófago PP7

Iniciadores e sonda (polaridade)	Sequencia 5' – 3'	Região do genoma	Fragmento (pb ^a)	Referência
PP7R-247f (+)	GTT ATG AAC CAA TGT GGC CGT TAT	247-270		
PP7R-320r (-)	CGG GAT GCC TCT GAA AAA AG	320-339	73	Rajal et al, 2007b
PP7R-274p(+)(sonda)	^{FAM} -TCG GTG GTC AAC GAG GAA CTG GAA C ^{-TAMRA}	274-298		

^a- pares de base.

Para quantificação preparou-se uma mistura em uma microplaca com 96 cavidades (Applied Biosystems, EUA) conforme descrito no Quadro 6.

Quadro 6 – Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação do bacteriófago PP7

Reagentes	Volume (µL)
Água DNase/RNase livre ^a	4,7
PCR Master Mix ^b	12,5
Iniciador PP7R-247f [10 µM] ^c	1,25
Iniciador PP7R-320r[10 µM] ^c	1,25
Sonda PP7R-274p [10 µM] ^c	0,3
cDNA	5
Volume total	25

^a- Gibco®, EUA; ^b- Applied Biosystems, EUA, ^c- Applied Biosystems, EUA.

Em cada experimento foi aplicada uma curva padrão de plasmídeos recombinantes pCR2.1 (Invitrogen, EUA) contendo insertos do gene da replicase do bacteriófago PP7. A curva foi realizada através de diluições seriadas de base 10 dos plasmídeos, conforme descrito por Fumian e colaboradores (2010).

O cálculo da eficiência da reação de amplificação foi realizado conforme descrito no item 3.1.5.

A microplaca foi vedada com um filme adesivo (Applied Biosystem, EUA) e a reação realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, EUA) num programa de: 50°C por 2 min para ativação da enzima UNG, seguida de desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

3.1.6.1 *Determinação do título da suspensão contendo bacteriófago PP7*

O número de cópias de genoma do bacteriófago PP7 inoculadas na amostra (P_I) foi calculado conforme a equação 2 descrita no item 3.1.5.1.

3.1.6.2 *Determinação do número de cópias de genoma do bacteriófago PP7 recuperadas nas amostras*

O número de cópias de genoma do bacteriófago PP7 recuperadas na amostra (P_R) foi calculado conforme a equação 3 descrita no item 3.1.5.2.

3.1.6.3 *Cálculo do percentual de recuperação do bacteriófago PP7*

O cálculo do percentual de recuperação do bacteriófago PP7 (R_P) foi realizado através da equação 5:

$$R_P(\%) = (P_R/P_I) \times 100 \quad (5)$$

3.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE ALFACE (*Lactuca sativa*)

3.2.1 Amostragem

Foram analisadas 90 amostras indicativas de alface (30 amostras *in natura*, 30 minimamente processadas e 30 prontas para consumo proveniente de estabelecimentos de alimentação). As amostras foram obtidas no comércio do Estado do Rio de Janeiro e codificadas com as iniciais: “IN” para amostras *in natura*; “MP” para amostras minimamente processadas; e “SA” para as amostras de pratos prontos para consumo oriundos de serviços de alimentação.

As amostras foram coletadas pela Vigilância Sanitária do Município e do Estado do Rio de Janeiro, com objetivo de atender ao “Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos - PNMQSA”. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em embalagens de transporte sob refrigeração e enviadas ao Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz para realização dos ensaios. Quando não analisadas imediatamente, as amostras foram estocadas sob refrigeração em temperatura de 2 -8°C até o momento dos ensaios.

3.2.2 Detecção e quantificação de *Norovirus* genogrupo II

Foi realizada a pesquisa de NoV GII e a quantificação do número de cópias do genoma de NoV GII/g em todas as amostras de alface.

Anteriormente a realização dos ensaios, as amostras de campo foram contaminadas artificialmente com 50 µL de uma suspensão contendo bacteriófago PP7 (ATCC 15692-B2) de *P. aeruginosa*, utilizado como controle interno do processamento das amostras.

3.2.2.1 Processamento das amostras e concentração viral

O processamento das amostras e concentração do material genético viral foi realizado de acordo com o item 3.1.2. com uma modificação. Ao invés de se utilizar sacos plásticos estéreis *Whirl-Pak® Filter Bag* (Nasco, EUA), foram utilizados sacos com filtro interno do mesmo fabricante. Dessa forma, após a homogeneização em aparelho *Stomacher®*, a porção aquosa do filtro foi transferida para um erlenmeyer estéril e foram seguidos os mesmos procedimentos descritos no item. Um esquema geral das etapas está ilustrado no APÊNDICE A.

3.2.2.2 Semi-nested reação em cadeia pela polimerase para detecção de Norovirus genogrupo II

As reações de *semi-nested PCR* foram realizadas no Setor de Alimentos do DM do INCQS/Fiocruz. A suspensão fecal contendo uma cepa de NoV GII n.º 15085 foi utilizada como controle positivo e água *DNase/RNase* livre (BioBasic, Canadá) como controle negativo nos ensaios moleculares.

Na detecção qualitativa de NoV GII, empregou-se um sistema de *semi-nested RT-PCR* que tem como alvo o gene da *RNA* polimerase viral (BOXMAN et al, 2006). Os iniciadores, respectiva região no genoma e tamanho do fragmento gerado estão descritos no Quadro 7.

Quadro 7 – Sequência, localização no genoma e tamanho de fragmento gerado dos iniciadores utilizados no *semi-nested* reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Norovirus* genogrupo II

Iniciadores (polaridade)	Sequencia 5' – 3'	Região no genoma	Fragmento (pb ^a)	Referência
JV13I (-)	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	4585-4605	327	Boxman et al, 2006
JV12Y ^b (+)	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	4279-4299		
NoroII-R ^b (-)	AGC CAG TGG GCG ATG GAA TTC	4495-4515	236	

Legenda dos nucleotídeos: Y: pirimidina (C/T); I: inosina; N: A/C/T/G.

^a- pares de base; ^b- Combinação de iniciadores para reação de *semi-nested*: JV12Y e NoroII-R.

Foram realizadas duas reações sequenciais, conforme descrito no Quadro 8.

Quadro 8 – Reagentes utilizados nas reações de *semi-nested* reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Norovirus* genogrupo II segundo Boxman et al. (2006)

Reagentes	Volume (µL)
Água <i>DNase/RNase</i> livre ^a	38,0
Tampão [10 X] ^b	5,0
dNTP [10 mM] ^b	1,0
MgCl ₂ [50 mM] ^b	1,5
Iniciadores JV13I [10 µM] ^c e JV12Y [10 µM] ^c (1ª Reação)	1,0
Iniciadores JV12Y [10 µM] ^c e NoroII-R [10 µM] ^c (2ª Reação)	1,0
<i>TaqPlatinum DNA</i> polimerase [5 U/µL] ^b	0,5
<i>cDNA</i>	2,0
Volume total	50,0

^a - Bio Basic, Canadá; ^b - *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA); ^c - Invitrogen, EUA.

A mistura da primeira reação foi acondicionada em aparelho termociclador (MJ Research/Peltier PTC – 200) e submetida a um programa de: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 37°C por 1,5 min e extensão a 72°C por 30 s, com uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para análise dos “amplicons”, 10 µL do produto amplificado foram acrescidos a 2 µL de tampão de aplicação corado (ANEXO B) e esta mistura foi submetida à eletroforese (PowerPac Basic/Bio-Rad) em gel de agarose (Sigma Chemical Company, EUA) a 1,5% em tampão Tris–Acetato EDTA 1X (Invitrogen, EUA) (ANEXO B) a 100 V por 50 min. Como marcador de massa molecular utilizou-se 4 µL de *TrackIt™ 100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, EUA). Posteriormente o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL (Sigma Chemical Company, EUA) por 15 min, e visualizado em analisador de imagens (GE Healthcare, Inglaterra).

A visualização de um fragmento de aproximadamente 327 pb, combinação dos iniciadores JV13I e JV12Y (Quadro 7) sugere a presença de NoV GII na amostra.

Os produtos obtidos na primeira reação foram submetidas a uma segunda *PCR (semi-nested)* para identificação da presença de NoV GII, independentemente da presença ou não do produto de 327 pb, conforme descrito no Quadro 8. A mistura da segunda reação foi

acondicionada em aparelho termociclador e submetida a um programa de: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 37°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para análise dos “amplicons” utilizou-se amassa molecular *TrackIt™ 50 bp DNA Ladder* (Invitrogen, EUA) para melhor visualização do fragmento alvo.

O aparecimento de um fragmento de 236 pb (combinação dos iniciadores JV12Y e NoroII-R) indica um resultado positivo para a presença de NoV GII na amostra.

3.2.2.3 Caracterização molecular

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Os produtos do *semi-nested PCR* foram diretamente sequenciados, após purificação com o kit *Big Dye® Terminator Direct Sequencing* (Applied Biosystems, EUA), com uso dos iniciadores JV12Y e Noro-II para NoV GII (Quadro 7), utilizando a plataforma *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA) segundo o protocolo descrito por Otto e colaboradores (2008).

As sequências foram alinhadas e editadas com o programa BioEDIT ver. 7.0 (HALL, 1999) e comparadas com outras sequências do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI/GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTN 2.2.26+.

3.2.2.4 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para quantificação de Norovirus genogrupo II

A quantificação de NoV GII nas 90 amostras de alface e a determinação do número de cópias recuperadas nas amostras foram realizadas conforme descrito nos itens 3.1.5 e 3.1.5.2, respectivamente.

3.2.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para cada amostra foi realizada a pesquisa de *Salmonella* spp. conforme descrito por Andrews e Hammack (2011).

As seguintes cepas de referência foram utilizadas como controles dos meios de cultura nas diferentes etapas das análises: *Salmonella* Typhimurium - INCQS 150 (ATCC 14028); *Escherichia coli* - INCQS 033 (ATCC 25922); *Proteus vulgaris* - INCQS 106 (ATCC 13315) e *Staphylococcus aureus* - INCQS 015 (ATCC 25923). As cepas foram obtidas na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do INCQS/Fiocruz.

O resultado foi expresso como presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25 g da amostra.

3.2.3.1 Pré-enriquecimento

Em condições assépticas, foram pesados 25 g da amostra em um saco plástico estéril tipo *Stomacher* 460 (Seward, Fisher Scientific, Canadá). Em seguida foram adicionados 225 mL de caldo lactosado (BD, Sparks, EUA). O saco plástico foi posicionado em um aparelho *Stomacher*[®] (Seward, Fisher Scientific, Canadá) para homogeneização da amostra em velocidade “normal” durante 60 segundos. Posteriormente, o homogenato foi mantido à temperatura ambiente por 60 ± 5 min. Após esse período, o conteúdo do saco plástico foi homogeneizado e o pH ajustado para $6,8 \pm 0,2$ com uma solução de NaOH a 1N (ANEXO B). O pré-enriquecimento foi incubado em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h.

3.2.3.2 Enriquecimento seletivo

O pré-enriquecimento foi homogeneizado vagarosamente, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo contendo 10 mL de meio Rappaport-Vassiliadis (RV) (Merck, Alemanha) e uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo tetracionato (TT) (Merck, Alemanha) adicionado de 0,1 mL de uma solução de verde

brilhante a 0,1% (ANEXO B) e 0,2 mL de uma solução de iodo-iodeto de potássio (ANEXO B). Os tubos foram homogeneizados em agitador tipo “vortex” (IKA, China). As cepas de *S. Typhimurium* e *E. coli* foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, do meio RV e do caldo TT. O meio RV foi incubado em banho-termostático (Thermo, EUA) a $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. O caldo TT foi incubado em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, para as amostras de hortaliças minimamente processadas e de serviços de alimentação, e a $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h para as amostras *in natura* (em teoria, contém maior quantidade de micro-organismos acompanhantes).

3.2.3.3 Isolamento

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo (TT e RV), uma alçada foi semeada de cada tubo previamente homogeneizado, pela técnica de esgotamento, nos seguintes meios seletivo-indicadores: ágar entérico Hektoen (HK) (Merck, Alemanha), ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Merck, Alemanha) e ágar Rambach (RB) (Merck, Alemanha). A cepa de *S. Typhimurium* foi utilizada como controle positivo dos meios; e as cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram utilizadas como controles negativo de indicação e seleção, respectivamente. As placas foram incubadas em posição invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h.

A morfologia das colônias crescidas nos meios de isolamento foi comparada com o crescimento da cepa padrão de *Salmonella* semeada. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. apresentam-se nos meios seletivo-indicadores, conforme descrito abaixo:

- ágar HK - colônias verde-azuladas ou azuis, com ou sem centro negro brilhoso. Culturas de *Salmonella* spp. também podem apresentar colônias totalmente negras e brilhosas;
- ágar XLD - colônias vermelhas transparentes, com ou sem centro negro brilhoso, ou colônias totalmente negras e brilhosas;
- ágar RB - colônias de coloração rosa escuro a vermelho, com ou sem bordas transparentes.

A cepa de referência de *E. coli* apresenta coloração amarela no ágar XLD, colônias alaranjadas no ágar HK e colônias azuladas a vinho no ágar RB. A cepa de *S. aureus* apresenta pouco ou nenhum crescimento nos meios descritos.

3.2.3.4 Triagem bioquímica

Com o auxílio de uma agulha bacteriológica, foi tocado o centro de cada colônia suspeita para semeadura em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Merck, Alemanha), com perfuração da base em profundidade e estrias na superfície, sem flambar a agulha, a base do ágar lisina ferro (Merck, Alemanha) foi perfurada, duas vezes, em diferentes locais e, em seguida, a agulha foi deslizada pelo centro da superfície do ágar. As cepas de *S. Typhimurium* e *E. coli* foram utilizadas como controle positivo e negativo dos meios, respectivamente, além de um tubo de cada meio não semeado. Os tubos foram incubados 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.

Foram consideradas como suspeitas de *Salmonella* spp. as culturas que apresentaram, na triagem bioquímica, os resultados descritos a seguir:

- ágar TSI - superfície alcalina (vermelha) e base ácida (amarela), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do meio);
- ágar lisina e ferro - reação alcalina (roxo) na base do tubo com ou sem produção de H₂S (escurecimento do meio). Foram considerados como negativos os tubos que apresentaram reação ácida (amarela) na base.

Cada cultura suspeita de *Salmonella* spp. foi semeada em tubo de ágar nutriente inclinado (Difco, EUA) e este incubado a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.

3.2.3.5 Prova da urease

A partir do crescimento do ágar nutriente ou do ágar TSI, uma alçada com grande massa de crescimento foi semeada, com movimentos de estrias, na superfície do ágar uréia (Merck, Alemanha). As cepas de *S. Typhimurium* e *P. vulgaris* foram utilizadas como controle negativo e positivo do meio, respectivamente, além de um tubo do meio não semeado. Os tubos foram incubados a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. As culturas de *Salmonella* spp. são urease negativas e, portanto não causam modificação na coloração do meio. *P. vulgaris* se apresentam como urease positivos, alterando a cor do meio para rosa intenso.

3.2.3.6 Sorologia polivalente

As culturas características de *Salmonella* spp. obtidas a partir do ágar TSI ou do ágar nutriente foram semeadas em um novo tubo de ágar nutriente e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Após o período de incubação, acrescentou-se 1 mL de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% (Merck, Alemanha) no tubo de ágar nutriente, e este foi homogeneizado. Uma gota desta suspensão foi depositada na extremidade de uma lâmina de vidro limpa e desengordurada, seguida do acréscimo de uma gota de solução de NaCl a 0,85%. Esta suspensão foi homogeneizada com auxílio de um palito de madeira estéril. As culturas que apresentaram aglutinação com solução de NaCl a 0,85% foram classificadas como auto-aglutináveis. O ensaio prosseguiu somente com as culturas que não aglutinaram com solução de NaCl a 0,85%. Na outra extremidade da lâmina depositou-se uma gota da suspensão bacteriana do ágar nutriente, seguido do acréscimo de uma gota de anti-soro polivalente para *Salmonella* spp. (Probac, Brasil). A suspensão foi homogeneizada com palito de madeira estéril; e a lâmina inclinada com movimentos leves e circulares, continuamente por 1 minuto. A formação de grumos na mistura que contém o anti-soro polivalente caracterizou o resultado como positivo.

3.2.4 Enumeração de coliformes

Para cada amostra de hortaliça realizou-se a enumeração de coliformes totais e termotolerantes segundo Feng e colaboradores (2002).

As seguintes cepas de referência foram utilizadas como controles dos meios de cultura nas diferentes etapas das análises: *E. coli* INCQS 0033 (ATCC 25922); *S. aureus* INCQS 0015 (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* INCQS 0099 (ATCC 27853). As cepas foram obtidas na CMRVS do INCQS/Fiocruz.

3.2.4.1 *Preparo do homogenato e diluições*

Em condições assépticas, foram pesados 20 g da amostra em saco plástico estéril tipo *Stomacher* 460 (Seward, Fisher Scientific, Canadá). Em seguida adicionou-se 180 mL de solução tampão fosfato de Butterfield (TB) (ANEXO B). O saco plástico foi posicionado no aparelho *Stomacher*[®] e a amostra homogeneizada em velocidade “normal” durante 1 min. A partir do homogenato (diluição 10^{-1}) foram preparadas diluições decimais acrescentando 1 mL da diluição anterior em um frasco contendo 9 mL de TB, até a diluição 10^{-4} . As diluições preparadas foram homogeneizadas em agitador tipo “vortex” (IKA, China). As diluições foram utilizadas em um intervalo máximo de 15 min após o seu preparo.

3.2.4.2 *Teste presuntivo para bactérias coliformes*

A partir de cada diluição, alíquotas de 1 mL foram transferidas para três tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato triptose (LST) (Merck, Alemanha) com tubo de Durham. As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, do meio LST. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Após o período de incubação, verificou-se se houve turvação e presença de gás nos tubos de Durham. Os tubos negativos foram incubados por mais 24 ± 2 h. Os tubos positivos foram submetidos aos testes confirmatórios para coliformes totais e termotolerantes.

3.2.4.3 *Teste confirmatório para coliformes totais*

Com o auxílio de alça bacteriológica o crescimento de cada tubo positivo de LST foi semeado em um tubo contendo 10 mL de caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL) (Merck, Alemanha). As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, do caldo VBBL. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Posteriormente os tubos foram verificados quanto à

presença de gás nos tubos de Durham. Os tubos negativos foram reincubados nas mesmas condições e observados novamente até 48 ± 2 h.

3.2.4.4 *Teste confirmatório para coliformes termotolerantes*

Com o auxílio de alça bacteriológica, o crescimento de cada tubo positivo de LST foi semeado em um tubo contendo 10 mL de caldo EC (BD, EUA). As cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, do caldo EC. Os tubos foram incubados em banho-termostático com sistema de circulação de água (Thermo, EUA) à temperatura de $45,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Após 24 ± 2 h os tubos foram avaliados quanto à presença de gás nos tubos de Durham. Os tubos negativos foram reincubados nas mesmas condições e observados novamente até 48 ± 2 h.

3.2.4.5 *Cálculo e expressão do resultado*

Foram considerados como positivos os tubos que apresentaram crescimento e formação de gás no caldo VBBL e caldo EC. O resultado foi expresso conforme a avaliação dos tubos positivos de cada série e os valores de NMP descritos no ANEXO A.

3.2.5 *Identificação de Escherichia coli*

As seguintes cepas de referência foram utilizadas como controles dos meios de cultura nas diferentes etapas das análises: *E. coli* INCQS 0033 (ATCC 25922); *P. aeruginosa* INCQS 0099 (ATCC 27853); *S. Typhimurium*- INCQS 150 (ATCC 14028); *E. aerogenes* INCQS 0145 (ATCC 13048); e *S. aureus* INCQS 0015 (ATCC 25923) e. As cepas foram obtidas na CMRVS do INCQS/Fiocruz.

Uma alçada dos tubos positivos de caldo EC previamente homogeneizados foi semeada, pela técnica de esgotamento, no ágar Eosina Azul de Metileno segundo Levine (L-EMB) (Merck, Alemanha). As cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram utilizadas como

controle positivo e negativo, respectivamente, do ágar L-EMB. As placas foram incubadas em posição invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h.

Duas colônias características (colônias escuras com brilho metálico) de cada placa foram semeadas em ágar nutriente (Difco, EUA) e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h para realização dos testes posteriores.

3.2.5.1 *Coloração de Gram*

A partir do crescimento em ágar nutriente, foi preparada uma suspensão da cultura bacteriana em uma gota de solução de NaCl a 0,85% (Merck, Alemanha) em uma lâmina de vidro limpa e desengordurada. O esfregaço foi fixado na chama do bico de Bunsen e corado com solução de cristal violeta (ANEXO B) por 1 min. A lâmina foi lavada em água limpa corrente. Em seguida adicionou-se uma solução de lugol (ANEXO B) por 1 min e a lâmina foi lavada. O esfregaço foi descorado com etanol a 95% (Merck, Alemanha) até que a coloração azulada desaparecesse e lavado em água limpa corrente. Aplicou-se sobre a lâmina uma solução de safranina (ANEXO B) por 30 s. Foi realizada uma última lavagem e a lâmina foi seca em temperatura ambiente e examinada em microscópio ótico (Olympus, Japão).

3.2.5.2 *Produção de indol*

A partir do crescimento do ágar nutriente, com auxílio de uma agulha bacteriológica, foi realizada a semeadura no centro do meio SIM (Merck, Alemanha). Como controle positivo do meio utilizou-se uma cepa de referência de *E. coli* e como controle negativo uma cepa de referência de *S. Typhimurium*. O meio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Em seguida, adicionou-se ao crescimento 0,2 - 0,3 mL de reagente de Kovacs (ANEXO B). O aparecimento de um anel róseo na superfície do meio indicou resultado positivo.

3.2.5.3 Prova de Voges-Proskauer

A partir do crescimento do ágar nutriente, com auxílio de uma alça bacteriológica, foi realizada a semeadura em um tubo contendo 3 mL de caldo MR-VP (Merck, Alemanha). Foram utilizadas as cepas de referência de *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* como controle positivo e negativo, respectivamente. Os tubos foram incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h. Após o período de incubação, 1 mL da cultura foi transferido para um tubo de ensaio estéril. A este tubo adicionou-se 0,6 mL de solução de alfa-naftol a 5% em etanol (VP1 – ANEXO B) e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (VP2 – ANEXO B). Os tubos foram homogeneizados e a estes acrescentados cristais de creatina (Merck, Alemanha), a fim de acelerar a reação. Os tubos foram mantidos durante duas horas à temperatura ambiente. O aparecimento de coloração rósea indicou resultado positivo.

3.2.5.4 Prova de vermelho de metila

Após a retirada da alíquota de 1 mL do crescimento do caldo MR-VP (item 3.2.5.3), as culturas foram novamente incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por mais 48 ± 2 h. Foram utilizadas as cepas de referência de *E. coli* e *E. aerogenes* como controle positivo e negativo, respectivamente. Foram adicionadas 5 gotas do reagente vermelho de metila (ANEXO B). O aparecimento de coloração vermelha indicou uma reação positiva e coloração amarela uma reação negativa.

3.2.5.5 Utilização de citrato

A partir do crescimento do ágar nutriente, com auxílio de uma agulha bacteriológica, foi realizada a semeadura, com um leve inóculo, na superfície do meio citrato segundo Simmons (BD, EUA). Utilizou-se como controle positivo uma cepa de referência de *P. aeruginosa* e como controle negativo uma cepa de referência de *E. coli*. O meio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 96 ± 2 h. O surgimento de coloração azul indicou reação positiva.

3.2.5.6 *Produção de gás a partir de lactose*

A partir do crescimento em ágar nutriente, com auxílio de uma alça bacteriológica, foi realizada a semeadura em um tubo contendo caldo LST (Merck, Alemanha) com tubo de Durhan. As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, do meio LST. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 h. Após o período de incubação, os tubos foram verificados quanto à presença de gás nos tubos de Durhan.

3.2.5.7 *Interpretação*

Foram consideradas como *E. coli* os isolados que apresentaram características de bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, fermentadores de lactose e com o seguinte resultado na sequência de provas bioquímicas do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato): *E. coli* (biotipo 1) + + - -; *E. coli* (biotipo 2) - + - -.

3.2.6 *Avaliação do padrão microbiológico segundo a Resolução da Diretoria de Colegiado n.º 12/2001*

Para interpretação dos resultados, foram comparados os valores encontrados nas análises com os estabelecidos na RDC n.º 12/2001 (ANVISA, 2001) apresentados no item 1.3.5 (Quadro 1). Realizada essa comparação, as amostras foram classificadas, de acordo com a mesma RDC, como: produtos em condições sanitárias satisfatórias, cujos resultados analíticos se apresentaram abaixo ou iguais aos estabelecidos para amostra indicativa; ou produtos em condições sanitárias insatisfatórias, cujos resultados analíticos se apresentaram acima dos limites estabelecidos para amostra indicativa.

3.3 COMPARAÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA TAMPONADA E TAMPÃO GLICINA NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERÍOFAGO PP7

Foi realizada uma avaliação para determinar a eficiência do PBS e do TG (ANEXO B) na recuperação do bacteriófago PP7 e de NoV GII a partir de alface minimamente processada.

A recuperação de NoV GII e do bacteriófago PP7 foram avaliadas qualitativa e quantitativamente, sendo que para NoV GII a análise qualitativa também foi realizada com a utilização da técnica de *semi-nested PCR*. No *PCR* em tempo real, a taxa de sucesso foi calculada pela comparação do número de amostras que apresentaram sinal de amplificação (positivas) e o número total de reações de *PCR* em tempo real realizadas. No *semi-nested PCR* esta análise foi feita pela comparação do número de amostras que apresentaram o fragmento de tamanho esperado para reação de identificação de NoV GII e o número total de reações de *semi-nested PCR* específicas para NoV GII realizadas (STALS et al, 2011). A análise quantitativa foi realizada pela comparação da média do número de cópias de genoma recuperadas nas amostras com o número de cópias de genoma inoculadas nas mesmas. Os resultados das análises quantitativas e qualitativas foram expressos, respectivamente, como “recuperação” e “taxa de sucesso”.

Na realização destes estudos, 650 g de uma amostra de alface americana minimamente processada obtida no comércio no Município do Rio de Janeiro foram utilizadas como matriz. A matriz foi dividida em 26 alíquotas de 25 g em sacos plásticos estéreis com filtro *Whirl-Pak® Filter Bag* (Nasco, EUA) sendo codificadas de A até Z.

A partir da suspensão do bacteriófago PP7 (10^0) e da suspensão fecal da cepa de NoV GII n.º 15085 (10^0) foram realizadas diluições decimais sucessivas em água *DNAse/RNAse* livre (BioBasic, Canadá) até 10^{-3} . Cinquenta microlitros de cada uma das suspensões foram utilizadas para infecção de seis alíquotas; e duas amostras foram utilizadas como controle negativo, sendo apenas infectadas com 50 μ L da suspensão do bacteriófago PP7 (10^0) (Quadro 9). As alíquotas A até L e W foram processadas com uso do PBS e as alíquotas M até Y e Z foram processadas com uso do TG (Quadro 9).

Quadro 9 - Suspensões virais utilizadas na contaminação das alíquotas e seus respectivos tampões utilizados no processamento

Fator de diluição da suspensão viral		Alíquotas contaminadas	
<i>Norovirus</i> genogrupo II n.º 15085	Bacteriófago PP7	Solução salina fosfatada tamponada	Tampão glicina
10 ⁰	10 ⁰	A, B, C	M, N, O
10 ⁻¹	10 ⁻¹	D, E, F	P, Q, R
10 ⁻²	10 ⁻²	G, H, I	S, T, U
10 ⁻³	10 ⁻³	J, K, L	V, X, Y
--	10 ⁰	W	Z

As amostras foram processadas conforme os procedimentos descritos nos itens 3.2.2.1 a 3.2.2.4 e 3.1.5 a 3.1.6.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Biostat 5.0 (Universidade Federal do Pará, Brasil, 2007).

3.4.1 Comparação do número de coliformes totais e termotolerantes entre as amostras de alface

A comparação entre o número de coliformes nas três classes de amostras foi realizado pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguido da comparação pelo Método de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o *P*-valor obtido foi menor que 0,05.

3.4.2 Correlação da presença de *Escherichia coli* entre as amostras de alface

Para análise estatística da ocorrência de *E. coli* entre as três classes de amostras, foi realizado o Teste Binomial (duas proporções), para determinar se a proporção desta bactéria era diferente entre as amostras. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o *P*-valor obtido foi menor que 0,05.

3.4.3 Comparação da recuperação do controle interno entre as amostras de alface

A comparação da recuperação do bacteriófago PP7 entre as três classes de amostras de alface foi realizada conforme descrito no item 3.4.1.

3.4.4 Avaliação do desempenho das soluções salina fosfatada tamponada e tampão glicina na recuperação de vírus a partir de alface

A avaliação do desempenho das soluções de eluição na recuperação de NoV GII n.º 15085e do bacteriófago PP7 foi realizada pelo Teste de Mann-Whitney, uma vez que as variáveis numéricas não apresentaram uma distribuição normal. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o *P*-valor obtido foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA DE CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANA NEGATIVA NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERÍOFAGO PP7 A PARTIR DE ALFACE

Uma avaliação preliminar às análises das amostras de campo foi realizada de forma a averiguar o desempenho da metodologia utilizada neste estudo. Com este propósito, foram realizados três ensaios independentes, em triplicata, de contaminação artificial com o bacteriófago PP7 e NoV GII n.º 15085 em uma amostra de alface *in natura*. A escolha da matriz teve como objetivo simular o pior cenário dentre as três classes de produtos avaliados nesse estudo (alface *in natura*, minimamente processada e de prato pronto para consumo) uma vez que este tipo de alimento não sofre nenhuma etapa de lavagem e/ou sanitização.

Pela *PCR* em tempo real detectou-se até 15 cópias/reacção do *DNA* plasmidial do bacteriófago PP7 com um valor médio de ciclo *threshold* (Ct) de 39,24 e 25 cópias por reacção do *DNA* plasmidial de NoV GII com um valor médio de Ct de 35,15. A eficiência das reacções foi de 84,1 e 99,2% para amplificação do bacteriófago PP7 ($y = -3,7731x + 43,80$) e da cepa de NoV GII ($y = -3,3407x + 39,94$), respectivamente. Ambas as curvas apresentaram um coeficiente de regressão quadrático ($R^2 \geq 0,992$).

Os resultados da contaminação experimental das amostras com o bacteriófago PP7 e a cepa de NoV GII estão descritos na Tabela 1. O bacteriófago PP7 foi detectado em todas as amostras contaminadas e não detectado nos controles negativos. A taxa de recuperação variou de 0,12 a 2,08%, com uma média de $0,63 \pm 0,43$ (Tabela 1). NoV GII foi detectado em seis das nove amostras contaminadas (66,7%) e não detectado nos controles negativos. A taxa de recuperação variou de 0,06 a 0,67%, com uma média de $0,24 \pm 0,20$ (Tabela 1).

Tabela 1– Avaliação do desempenho do método de detecção de vírus em alface *in natura* artificialmente contaminadas com bacteriófago PP7 e *Norovirus* genogrupo II. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata

Vírus	N.º de cópias de genoma inoculadas (x10⁶)	N.º de cópias de genoma recuperadas no concentrado ± DP^a(x10⁶)	Recuperação ± DP (%)^b (Taxa de sucesso)^c
PP7	2934,29 ± 1861,44	21,36 ± 25,98	0,63 ± 0,43(9/9)
NoV GII	16,69 ± 3,35	0,036 ± 0,029	0,24 ± 0,20(6/9)
CN ^d	0	0	0 (0/6)

^a- desvio-padrão; ^b- (# cópias de genoma recuperadas no concentrado x 100)/# de cópias de genoma inoculadas; ^c- # amostras positivas na reação de PCR em tempo real/ # reações de PCR em tempo real realizadas; ^d- controle negativo (não contaminada).

Em diversos trabalhos, o bacteriófago PP7 vem demonstrando bons resultados quando utilizado como controle interno para determinação da eficiência de técnicas para detecção de vírus (RAJAL et al, 2007a,b). Morales-Morales e colaboradores (2003) obtiveram uma média de recuperação de 46% utilizando um método de ultrafiltração em amostras de águas. Rajal e colaboradores (2007b) obtiveram uma taxa de recuperação de 64 ± 4,8% após a otimização de um método de quantificação de vírus em amostras de águas. Fumian e colaboradores (2010) desenvolveram uma *Multiplex-PCR* quantitativo com sensibilidade similar ao *Simplex-PCR* para detecção de rotavirus A em amostras de esgoto com uso do bacteriófago PP7 como controle interno e obtiveram resultados satisfatórios.

Um controle interno utilizado no processamento de amostras deve ser similar aos vírus entéricos infectantes, mas não estar associado com a amostra de alimento (FAO/WHO, 2008a; MATTISON et al, 2009). Neste estudo preliminar, o bacteriófago não foi detectado nas amostras não contaminadas artificialmente (controles negativos) (Tabela 1). O bacteriófago PP7 vem sendo utilizado como controle interno devido ao seu tamanho (25 nm) e propriedades físico-químicas similares aos poliovírus, representando assim uma boa estimativa para eficiência da filtração de vírus por membrana (RAJAL et al, 2007a,b).

Resultados de recuperação de NoV superiores ao observado neste estudo, utilizando a mesma metodologia, foram relatados por outros autores. No ensaio de infecção experimental

realizado em alface, Fumian e colaboradores (2009) obtiveram uma recuperação de NoV GII variando de 5,2 a 72,3%. Comparando com as taxas de recuperação obtidas em outras metodologias de detecção de NoV em alface, os resultados são muito variáveis. Utilizando pérolas magnéticas conjugadas com antígenos, Morton e colaboradores (2009) obtiveram um percentual de recuperação com alta variabilidade (0,005 a 99%). Morales-Rayas e colaboradores (2010) relataram 16,2% de recuperação com uso de filtros positivamente carregados; enquanto que pérolas carregadas positivamente apresentaram recuperação de 1,4%. Scherer e colaboradores (2010) encontraram uma taxa de recuperação de 23% (11-35%) e 9% (5-15%) em um método de eluição/precipitação e outro de ultrafiltração, respectivamente. Recentemente, Sánchez e colaboradores (2012) obtiveram média de recuperação de 9% em amostras de vegetais frescos cortados.

Na avaliação de outras metodologias para detecção de NoV em matrizes diferentes, maiores percentuais de recuperação têm sido reportados. No estudo realizado por Stals e colaboradores (2011), a recuperação de NoV GII em amostras de frutas vermelhas frescas e em forma de polpa foi de $35,20 \pm 31,54\%$ e $47,72 \pm 25,43\%$, respectivamente. Contudo, os autores não conseguiram recuperar NoV GII com um inóculo de $9,63 \times 10^3$ cópias de genoma/g em amostras de frutas vermelhas congeladas e em metade das amostras frescas contaminadas artificialmente, demonstrando assim que o método necessita de ajustes para melhor robustez. Observação semelhante ocorreu neste estudo, uma vez que a taxa de sucesso na detecção de NoV GII foi de seis em nove amostras (Tabela 1).

O baixo valor percentual de recuperação obtido nesta avaliação, tanto para o bacteriófago PP7 (0,12 – 2,08%) como para NoV GII (0,06 a 0,67%) pode ser associado à presença de inibidores provenientes da matriz, no caso a alface *in natura*. Os inibidores podem atuar durante uma ou mais etapas essenciais do método, principalmente durante a extração de ácidos nucleicos (degradando ou sequestrando-os) ou na *PCR* durante a amplificação do alvo (WILSON, 1997). Contudo seu verdadeiro mecanismo de atuação ainda não é totalmente compreendido (RAJAL et al, 2007a).

Como forma de contornar estas limitações, diluições do *RNA* extraído podem ser realizadas de forma a diminuir a concentração de inibidores e assim obter resultados positivos na reação de *PCR* (RAJAL et al, 2007a; VICTORIA et al, 2010). Essa estratégia teve êxito nesta avaliação, pois em todos os ensaios realizados, a utilização do *RNA* diluído antes da etapa de transcrição-reversa gerou um maior número de cópias amplificadas.

Outra questão, é que as equações utilizadas para o cálculo de recuperação do vírus consideram 100% de eficiência nas etapas de extração de ácidos nucleicos e síntese do *cDNA*.

Contudo, esses pressupostos são incorretos, pois existe uma perda de genoma nestas duas etapas, gerando um viés nos cálculos de recuperação (VICTORIA et al, 2009).

Além disso, uma perda das partículas virais durante a etapa de homogeneização da amostra (MORALES-RAYAS et al, 2010) e da filtração pode ocorrer (SCHERER et al, 2010).

Outra hipótese é que a suspensão fecal de NoV GII utilizada para contaminação das amostras possa conter moléculas de *RNA* livres que são detectadas quando submetidas à extração de ácidos nucleicos, enquanto nas amostras de alface inoculadas esses *RNA* livres são mais susceptíveis a eliminação durante a etapa de concentração. Isso leva a um cálculo subestimado da recuperação de NoV devido à heterogeneidade da suspensão fecal (SÁNCHEZ et al, 2012).

Mesmo sendo o percentual de recuperação obtido neste estudo inferior quando comparado a outros métodos para detecção de vírus em outras matrizes (MORALES-MORALES et al, 2003; RAJAL et al, 2007a,b), o fato do bacteriófago PP7 ter sido detectado em todas as amostras contaminadas, demonstra que este é aplicável como controle interno de processo.

4.2 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ALFACE (*Lactuca sativa*)

4.2.1 Detecção e quantificação de *Norovirus* genogrupo II

No presente estudo, foi utilizada uma metodologia de extração viral, seguida de detecção qualitativa por *semi-nested PCR* e quantificação por *TaqMan PCR* em tempo real de NoV GII a partir de amostras de alface. A metodologia utilizada é uma combinação do método de concentração de vírus em alface (FUMIAN et al, 2009), com substituição da etapa de centrifugação pelo uso de sacos plásticos estéreis com filtro (SÁNCHEZ et al, 2012; SCHERER, et al, 2010; STALS et al, 2011), que já realizam a separação da parte aquosa da matriz homogeneizada, tornando assim a etapa de centrifugação não mais necessária, com técnicas moleculares de detecção e quantificação (BOXMAN et al, 2006; KAGEYAMA et al, 2003).

Das 90 amostras analisadas, NoV GII não foi detectado em nenhuma amostra, tanto pelo *semi-nested PCR* como pela técnica de *PCR* em tempo real.

A maioria dos métodos de detecção de vírus em alimentos publicados é baseada em ensaios de contaminação experimental (FUMIAN et al, 2009; SÁNCHEZ et al, 2012; TIAN et al, 2011) e apenas poucos deles tiveram sucesso quando aplicados a detecção de vírus em alimentos naturalmente contaminados (DANIELS et al, 2000; MATTISON et al, 2010).

Os dados encontrados neste estudo foram similares aos relatados por outros pesquisadores. Scherer e colaboradores (2010) analisaram 21 amostras de alimentos incriminados em um surto de gastroenterite causado por NoV GII, incluindo amostras de alface, e não detectaram NoV em nenhuma amostra. De Giusti e colaboradores (2010), pesquisaram NoV em 124 amostras de vegetais inteiros e 78 amostras de saladas prontas para consumo pela técnica de *semi-nested RT-booster-PCR*, utilizando os mesmo iniciadores descritos por Boxman e colaboradores (2006), e não detectaram contaminação em nenhuma amostra. Contudo, Mattison e colaboradores (2010) detectaram NoV pela técnica de *PCR* em tempo real em 148 amostras (45,1%) de hortaliças minimamente processadas comercializadas lojas varejistas do sul de Ontario, Canadá, embora apenas 16 (6% do total de amostras) puderam ser sequenciados e confirmados como NoV (MATTISON et al, 2010).

Na primeira reação do *semi-nested PCR*, três amostras apresentaram o fragmento característico de 327 pb. Na segunda reação, o fragmento característico foi identificado em duas amostras *in natura*, 12 amostras minimamente processadas e em três amostras de prato pronto. Contudo, o sequenciamento destes fragmentos demonstrou que estes não apresentavam homologia com nenhuma sequência de NoV depositada no NCBI. Estas amostras foram então submetidas a outros dois protocolos: um de *RT-PCR* em tempo real (*one-step*) para detecção de NoV GII e uma *PCR* qualitativa (BEURET et al, 2002). Nenhuma amostra apresentou resultado positivo com uso destas outras técnicas. Logo, as amostras foram consideradas como negativas. Este resultado indica que produtos inespecíficos com tamanho similar aos dos fragmentos esperados no *semi-nested PCR* para detecção de NoV GII podem ser gerados, o que dificulta o uso desta técnica para análise de alface.

Muitos fragmentos inespecíficos foram amplificados nas três classes de amostras, principalmente nas minimamente processadas e de pratos prontos. Fumian e colaboradores (2009) relataram a presença de produtos não específicos na *PCR* qualitativa para detecção de NoV GII em amostras de alface e queijo utilizando inicializadores degenerados com alvo na região B da região terminal 3' da RLA-1 (*RNA* polimerase). Já em trabalhos que utilizaram a mesma técnica de *semi-nested PCR*, não foram relatados a presença de fragmentos

inespecíficos gerados a partir de amostras de mariscos (BOXMAN et al, 2006), águas (VICTORIA et al, 2010) e esgoto (PRADO et al, 2011).

A metodologia de filtração utilizando membranas negativamente carregadas se mostrou acessível à rotina laboratorial do Setor de Alimentos/DM. Contudo, algumas amostras, principalmente as alfaces *in natura*, tiveram que ser filtradas por longos períodos devido à saturação da membrana, o que aumentou muito o tempo de análise dessas amostras.

O método de escolha para extração dos ácidos nucleicos influencia na sensibilidade do método de detecção de NoV (MATTISON et al, 2009). Na detecção de vírus causadores de doenças de origem alimentar, a extração dos ácidos nucleicos deve estar apta a extrair o *RNA* de pelo menos 10-100 partículas virais, que representam a dose infectante, sem comprometer a qualidade do *RNA* (MORALES-RAYAS et al, 2010). Neste estudo, foi utilizado o kit de extração *QIAamp viral RNA*, que tem sido amplamente utilizado nos métodos de detecção de vírus, seja a partir de amostras clínicas (LEE et al, 2010; MATTISON et al, 2009; STALS et al, 2009), ambientais (PRADO et al, 2011; VICTORIA et al, 2009, 2010) e de alimentos (MATTISON et al, 2009; MORTON et al, 2009; SCHERER et al, 2010; STALS et al, 2011; TIAN et al, 2011). Este kit é recomendado para extração de ácidos nucleicos no protocolo de detecção de *RNA* de NoV GII por *TaqManRT-PCR* em tempo real a partir de amostras clínicas, ambientais e de matrizes alimentícias, descrito no *Compendium of Analytical Methods, Health Canada* (HOUDE et al, 2010).

Muitos autores relataram que os iniciadores aleatórios são mais sensíveis que os específicos na síntese do *cDNA*, para detecção de NoV (PANG et al, 2005). A maioria das metodologias de detecção de vírus utiliza iniciadores aleatórios na reação de transcrição reversa, independente do tipo de matriz (FUMIAN et al, 2010; PRADO et al, 2011; STALS et al, 2009, 2011; VICTORIA et al, 2009, 2010). Neste estudo foi utilizado o kit *High Capacity* na etapa de síntese do *cDNA*, que também é composto por iniciadores aleatórios.

O ensaio de *RT-PCR* convencional para detecção de NoV é um procedimento complexo, com diversas etapas e necessita da confirmação dos produtos da *PCR* por eletroforese em gel (PANG et al, 2005). Dessa forma, os métodos convencionais de amplificação têm sido cada vez mais substituídos pelo *PCR* em tempo real, devido a sua melhor eficiência e tempo para obtenção dos resultados da análise e diminuição do risco de contaminação cruzada, reduzindo assim o número de resultados falso-positivos (FAO/WHO, 2008a; PANG et al, 2005).

A técnica de *PCR* em tempo real apresenta praticidade e menor tempo laboratorial para obtenção dos resultados (PANG et al, 2005). Além disso, o uso do sistema *TaqMan* na quantificação tem como vantagem a maior especificidade na detecção.

Os iniciadores e sondas descritos por Kageyama e colaboradores (2003) foram selecionados baseados na análise de sequências da região de junção RLA1-RLA2, que apresentam maior homologia (86-100%) das sequências de 71 cepas de NoV estudadas pelos autores. A técnica de *TaqMan PCR* em tempo real utilizando este sistema de iniciadores têm sido amplamente utilizada na detecção de NoV GII a partir de amostras clínicas (PANG et al, 2005; STALS et al, 2009), ambientais (PRADO et al, 2011; VICTORIA et al, 2010) e de alimentos (MORALES-RAYAS et al, 2010; TIAN et al, 2011; VICTORIA et al, 2009, 2010). Além disso, este sistema é parte do protocolo de detecção de *RNA* de NoV GII por *TaqMan RT-PCR* em tempo real após extração de ácidos nucleicos a partir de amostras clínicas, ambientais e de matrizes alimentícias, descrito no *Compendium of Analytical Methods, Health Canada* (HOUDE et al, 2010).

Contudo para aplicação destes métodos é necessário uma infraestrutura laboratorial bem estruturada, tanto em termos de aquisição e manutenção de equipamentos, assim como uma equipe bem qualificada (FAO/WHO, 2008a).

4.2.2 Avaliação do uso do bacteriófago PP7 como controle interno

O bacteriófago PP7 foi utilizado como controle interno em todas as amostras analisadas. A proposta da utilização deste bacteriófago foi estabelecer um controle de processo que abrangesse todas as etapas da metodologia.

Os resultados da recuperação do bacteriófago PP7 nas amostras de alface estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Recuperação do bacteriófago PP7 inoculado nas amostras de alface por reação em cadeia pela polimerase em tempo real

Tipo de alface	N.º de cópias de genoma inoculadas (média ± DP^a) (x10²)	N.º de cópias de genoma recuperadas no concentrado (média ± DP) (x10²)	Recuperação(%)^b (média ± DP)	Recuperação (%) mínima	Recuperação (%) máxima	N.º de amostras detectadas (%)
<i>in natura</i>	1916,53 ± 756,14	31,51 ± 50,42	2,01 ± 3,29	0,01	10,82	12/30 (40%)
minimamente processada	1611,80 ± 728,08	9,97 ± 11,18	0,67 ± 0,88	0,01	4,36	26/30 (86,7%)
prato pronto para consumo	6320,35 ± 5822,97	16,80 ± 44,91	0,49 ± 0,69	0,001	2,39	23/30 (76,7%)

^a- desvio-padrão; ^b- (# cópias de genoma recuperadas no concentrado x 100)/# de cópias de genoma inoculadas; ^b- amostras *in natura*; ^c- não detectado; ^d- desvio-padrão.

O bacteriófago PP7 foi detectado em 12 amostras *in natura* (40%), 26 minimamente processadas (86,7%) e 23 de pratos prontos para consumo (76,7%). A taxa de recuperação média obtida nas amostras *in natura*, minimamente processadas e de pratos prontos foi de $2,01 \pm 3,29\%$; $0,67 \pm 0,88\%$; e $0,49 \pm 0,69\%$, respectivamente. Uma taxa de recuperação do bacteriófago PP7 $<0,001\%$ foi observada em 29 (32,2%) das 90 amostras analisadas. Nas outras 61 amostras (67,8%) o bacteriófago PP7 foi detectado com uma taxa de recuperação $\geq 0,001\%$ e média de $0,86 \pm 1,68\%$.

O Teste de Kruskal-Wallis demonstrou existir diferença significativa na recuperação do bacteriófago PP7 entre as três classes de amostras ($p = 0,0108$). Comparando-as pelo método de Dunn não houve diferença significativa entre as de pratos prontos e as demais. Contudo, as amostras *in natura* e minimamente processadas apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), indicando que o método utilizado apresenta menor desempenho na recuperação do controle interno quando aplicado em amostras *in natura*.

O fato do bacteriófago PP7 não ter sido detectado em todas as análises realizadas, independente da classe de amostra, demonstra que a metodologia utilizada apresenta limitações para detecção deste vírus em alface. Comparando com outros vírus utilizados como controle interno, Mattison e colaboradores (2010) ao utilizarem o FCV na pesquisa de NoV em amostras de hortaliças minimamente processadas obtiveram uma taxa de recuperação $\geq 0,01\%$ em 273 (83%) das amostras. Esse resultado foi semelhante ao observado neste trabalho, onde o controle interno (bacteriófago PP7) foi detectado em 86,7% das amostras minimamente processadas. Já Scherer e colaboradores (2010) ao utilizarem o fago MS2 como controle interno na detecção de NoV em 21 amostras de alimentos diversificados, incluindo alface, conseguiram recuperar o fago em todas as amostras, com taxa de recuperação de 6-10% para as amostras de frutas e vegetais cortados. Sánchez e colaboradores (2012) obtiveram sucesso na utilização do MNV-1 como controle interno na detecção de vírus entéricos em amostras de vegetais frescos cortados, detectando o controle interno em todas as amostras contaminadas artificialmente.

A vantagem da utilização do bacteriófago PP7 em relação a outros candidatos a controle interno mais semelhantes ao NoV, como por exemplo o MNV-1, é a manutenção das partículas virais. O bacteriófago PP7 pode ser multiplicado facilmente em uma cultura hospedeira de *P. aeruginosa* e estocada no laboratório (MORALES-MORALES et al, 2003). Já os outros vírus, como MNV-1 e FCV, necessitam de culturas celulares específicas para se multiplicarem, o que leva a necessidade de uma infraestrutura laboratorial específica para esta prática, além de profissionais capacitados para manuseio de culturas celulares.

As baixas taxas de recuperação obtidas são provavelmente devido à presença de componentes inibitórios presentes na matriz, como lipídeos, fenóis e polissacarídeos (SCHERER et al, 2010). Alimentos processados que sofreram cortes, possuem injúrias no tecido celular vegetal, liberando substâncias inibitórias que interferem nas detecções moleculares (CROCI et al, 2008). Além disso, a homogeneização mecânica da amostra com PBS no aparelho *Stomacher* gera injúrias no tecido celular da amostra de alface, independente do tipo. Scherer e colaboradores (2010) obtiveram melhor percentual de recuperação do controle interno (fago MS2) a partir de alimentos com superfície sólida e frutas congeladas devido a sua maior resistência a ruptura pelo tratamento de homogeneização em comparação a alimentos mais macios. Contudo, os resultados observados neste estudo foram inversos, pois as amostras minimamente processadas seguidas das amostras de pratos prontos, que teoricamente são as que sofreram maior injúria no tecido vegetal, apresentaram melhor percentual de detecção do controle interno (86,7 e 76,7%, respectivamente) (Tabela 2). Esse fato sugere que a submissão da alface a lavagem e/ou sanitização reduzem o número de substâncias inibitórias presentes no alimento, que poderia ser um fator relevante na inibição das reações de amplificação.

Da mesma forma que o observado no ensaio de contaminação experimental (item 4.2.1), em todas as amostras analisadas, o uso de diluições do *RNA* gerou um maior número de cópias amplificadas. Logo, a etapa de diluição dos ácidos nucleicos extraído do concentrado se mostrou essencial para redução das substâncias inibitórias e assim aumentar a sensibilidade na detecção do bacteriófago PP7.

Nas 29 amostras em que não foi detectado o bacteriófago PP7, é possível que a atividade polimerase e/ou a atividade *Taq* exonuclease 5'-3' estivessem sendo afetadas por substâncias inibitórias co-extraídas a partir do alface. Também é possível que para eliminação da interferência dos inibidores, fossem necessárias mais diluições dos ácidos nucleicos extraídos, que acabem diminuindo tanto a quantidade do *RNA* viral alvo que leve perda de sucesso na reação de amplificação. Logo, uma reação com sinal negativo não necessariamente indica a ausência do vírus na amostra (RAJAL et al, 2007a).

O uso do controle interno é uma ferramenta importante para detecção de possíveis falhas no processamento da amostra. Um resultado negativo no controle interno sugere falhas durante os procedimentos de concentração, extração e/ou etapas de *PCR*. Já o sucesso na sua amplificação sugere que um resultado negativo obtido na detecção de vírus não é um falso-negativo (FUMIAN et al, 2010; RAJAL et al, 2007b).

O candidato ao controle interno de processo em um método de detecção de vírus deve ser similar ao(s) vírus alvo(s) em suas propriedades físico-químicas, possuir baixo potencial patogênico, e estar ausente naturalmente na amostra e no ambiente laboratorial (FAO/WHO, 2008a). Neste estudo, foi a primeira vez que o bacteriófago PP7 foi utilizado como controle interno para detecção de vírus em amostras de alface.

Um método para detecção de vírus em alimentos deve ser simples, sensível, prático, robusto, e ser capaz de eliminar, de forma eficiente, os inibidores dos ensaios de detecção molecular (FAO/WHO, 2008a). Idealmente, ele deve ser capaz de concentrar um baixo número de diferentes patógenos a partir de uma amostra simples com objetivo de reduzir custo e tempo (SÁNCHEZ et al, 2012). O método aplicado neste estudo apresentou boa sensibilidade para detecção do bacteriófago PP7 nas amostras minimamente processadas e de pratos prontos, mas não apresentou grande eficiência para as amostras *in natura*. Esse resultado indica que a metodologia empregada necessita de melhorias, de forma a aumentar sua eficiência na recuperação dos vírus neste tipo específico de matriz.

Como forma de otimizar esta metodologia, foi realizado outro ensaio de infecção experimental em matriz de alface minimamente processada, com diferentes concentrações do bacteriófago PP7 e de NoV GII, e comparando o uso de outro tampão de eluição para homogeneização da amostra, o TG (TROTIER et al, 2010). Esse novo planejamento experimental visou à obtenção de uma maior recuperação do bacteriófago PP7 e de NoV GII e, consequentemente, o aumento a sensibilidade do método. Os resultados desta avaliação serão descritos posteriormente no item 4.3.

4.2.3 Avaliação da qualidade bacteriológica

Nesse aspecto, o presente estudo visou à obtenção de um panorama da qualidade bacteriológica de alfaces *in natura*, minimamente processadas e de pratos prontos para consumo de serviços de alimentação no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os parâmetros avaliados foram a presença de *Salmonella* spp., número de coliformes totais e termotolerantes, com identificação da presença de *E. coli* nas amostras que apresentaram coliformes termotolerantes.

Os resultados das análises bacteriológicas das amostras de alface estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3– Análises bacteriológicas das amostras de alface

N.º	<i>Salmonella</i> spp. ^a	Coliformes ^b		
		totais	termotolerantes	<i>E. coli</i>
IN ^c 1	Ausência	11000	<3,0	-
IN2	Ausência	11000	<3,0	-
IN3	Ausência	>11000	<3,0	-
IN4	Ausência	4600	<3,0	-
IN5	Ausência	>11000	43	<i>E. coli</i> tipo 1
IN6	Ausência	4600	23	<i>E. coli</i> tipo 1
IN7	Ausência	11000	<3,0	-
IN8	Ausência	>11000	3,6	<i>E. coli</i> tipo 1
IN9	Ausência	>11000	93	<i>E. coli</i> tipo 1
IN10	Ausência	11000	<3,0	-
IN11	Ausência	>11000	240	<i>E. coli</i> tipo 1
IN12	Ausência	>11000	43	<i>E. coli</i> tipo 1
IN13	Ausência	>11000	23	<i>E. coli</i> tipo 1
IN14	Ausência	11000	3,6	<i>E. coli</i> tipo 1
IN15	Ausência	1500	9,2	<i>E. coli</i> tipo 1
IN16	Ausência	>11000	15	<i>E. coli</i> tipo 1
IN17	Ausência	>11000	<3,0	-
IN18	Ausência	>11000	15	<i>E. coli</i> tipo 1
IN19	Ausência	11000	<3,0	-
IN20	Ausência	>11000	93	<i>E. coli</i> tipo 1
IN21	Ausência	4600	3,6	<i>E. coli</i> tipo 1
IN22	Ausência	>11000	9,2	<i>E. coli</i> tipo 1
IN23	Ausência	1500	93	<i>E. coli</i> tipo 1
IN24	Ausência	>11000	20	<i>E. coli</i> tipo 1
IN25	Ausência	11000	3,6	NI ^d
IN26	Ausência	>11000	43	<i>E. coli</i> tipo 1
IN27	Ausência	11000	23	<i>E. coli</i> tipo 1
IN28	Ausência	>11000	240	<i>E. coli</i> tipo 1
IN29	Ausência	4600	240	<i>E. coli</i> tipo 1
IN30	Ausência	11000	1500	<i>E. coli</i> tipo 1

Continuação da Tabela 3.

MP ^e 1	Ausência	4600	<3,0	-
MP2	Ausência	>11000	150	NI
MP3	Ausência	>11000	9,2	<i>E. coli</i> tipo 1
MP4	Ausência	3,6	3,6	<i>E. coli</i> tipo 1
MP5	Ausência	43	<3,0	-
MP6	Ausência	460	<3,0	-
MP7	Ausência	460	<3,0	-
MP8	Ausência	4600	<3,0	-
MP9	Ausência	930	<3,0	-
MP10	Ausência	930	<3,0	-
MP11	Ausência	2400	<3,0	-
MP12	Ausência	430	<3,0	-
MP13	Ausência	4600	<3,0	-
MP14	Ausência	150	<3,0	-
MP15	Ausência	23	<3,0	-
MP16	Ausência	150	<3,0	-
MP17	Ausência	>11000	<3,0	-
MP18	Ausência	4600	<3,0	-
MP19	Ausência	430	<3,0	-
MP20	Ausência	4600	<3,0	-
MP21	Ausência	21	<3,0	-
MP22	Ausência	93	<3,0	-
MP23	Ausência	4600	<3,0	-
MP24	Ausência	43	<3,0	-
MP25	Ausência	1500	7,4	NI
MP26	Ausência	11000	<3,0	-
MP27	Ausência	430	<3,0	-
MP28	Ausência	>11000	<3,0	-
MP29	Ausência	>11000	<3,0	-
MP30	Ausência	>11000	<3,0	-

Continuação da Tabela 3.

SA ^f 1	Ausência	>11000	<3,0	-
SA2	Ausência	240	<3,0	-
SA3	Ausência	4600	43	<i>E. coli</i> tipo 1
SA4	Ausência	>11000	430	<i>E. coli</i> tipo 1 e 2
SA5	Ausência	460	<3,0	-
SA6	Ausência	2400	93	<i>E. coli</i> tipo 1
SA7	Ausência	93	<3,0	-
SA8	Ausência	930	<3,0	-
SA9	Ausência	2400	3,6	NI
SA10	Ausência	4600	3,6	NI
SA11	Ausência	240	<3,0	-
SA12	Ausência	930	3,6	NI
SA13	Ausência	>11000	>11000	NI
SA14	Ausência	4600	430	NI
SA15	Ausência	930	93	NI
SA16	Ausência	11000	430	NI
SA17	Ausência	9,2	<3,0	-
SA18	Ausência	>11000	3,6	NI
SA19	Ausência	>11000	3,6	NI
SA20	Ausência	11000	7,4	<i>E. coli</i> tipo 2
SA21	Ausência	11000	<3,0	-
SA22	Ausência	2400	23	<i>E. coli</i> tipo 1
SA23	Ausência	2100	3,6	NI
SA24	Ausência	>11000	7,4	<i>E. coli</i> tipo 2
SA25	Ausência	2400	3,6	NI
SA26	Ausência	>11000	2100	<i>E. coli</i> tipo 2
SA27	Ausência	>11000	74	<i>E. coli</i> tipo 1
SA28	Ausência	>11000	9,2	NI
SA29	Ausência	>11000	9,2	NI
SA30	Ausência	11000	110	<i>E. coli</i> tipo 1

^a- presença ou ausência em 25 g; ^b- número mais provável/g; ^c- amostras *in natura*; ^d- não identificado; ^e- amostras minimamente processadas; ^f- amostras de pratos prontos para consumo oriundos de serviços de alimentação.

Salmonella não foi detectada em nenhuma amostra (Tabela 3). Logo, todas as amostras de alface *in natura* foram consideradas satisfatórias de acordo com a legislação brasileira, uma vez que a ausência deste patógeno é o único parâmetro estabelecido para esse tipo de alimento (ANVISA, 2001).

A ausência de *Salmonella* nas amostras *in natura* concorda com os resultados de outros estudos previamente realizados no Brasil (ABREU et al, 2010; SANTANA et al, 2006). Em termos mundiais, até o ano de 1998, a prevalência de *Salmonella* em vegetais crus era, na maioria dos dados relatados, de 4-8% (WHO, 1998). Contudo, a literatura recente tem demonstrado que essa prevalência tem diminuído neste tipo de alimento (DE GIUSTI et al, 2010; FDA, 2001; JOHANNESSEN et al, 2002; LITTLE et al, 1999; LONCAREVIC et al, 2005; MUKHERJEE et al, 2004; OKAFO et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2010).

Little e colaboradores (1999) avaliaram alfaces inteiras importadas comercializadas em supermercados, feiras e outros estabelecimentos na Inglaterra e não detectaram *Salmonella* em nenhuma amostra. O *Food and Drug Administration* (FDA) (2001) também pesquisou patógenos em diversos vegetais importados, incluindo 116 amostras de alface, das quais apenas uma apresentou contaminação por *Salmonella* (1,2%). Em 2002 na Nigéria, Okafo e colaboradores (2003) analisaram 55 amostras de alface em sistemas de cultivo seco e irrigado, e não detectaram *Salmonella* em nenhuma amostra. Neste mesmo ano, Johannessen e colaboradores (2002) avaliaram a qualidade bacteriológica de 200 amostras de alface de supermercados e também não detectaram o patógeno. Mukherjee e colaboradores (2004) encontraram uma amostra de alface orgânica contaminada com *Salmonella* em um total de 55 amostras analisadas (1,8%) em um estudo realizado em fazendas nos Estados Unidos da América. Na Noruega, a qualidade bacteriológica de 179 amostras de alface orgânico foi investigada, e *Salmonella* não foi isolada (LONCAREVIC et al, 2005). Na Espanha, Oliveira e colaboradores (2010) não detectaram *Salmonella* em 72 amostras de alface oriundas de sistemas de produção convencional e orgânicos. Na Itália, De Giusti e colaboradores (2010) reportaram baixa ocorrência de *Salmonella* em amostras de vegetais inteiros. Esses autores relataram que de 91 amostras de alface *in natura* analisadas, duas (2,2%) foram positivas para *Salmonella* com uso de métodos moleculares (*PCR Bax System*), sendo que em apenas uma destas a presença foi confirmada pelo método de cultivo.

Diversas pesquisas realizadas reportam a ausência de *Salmonella* em vegetais minimamente processados no mundo. Sago e colaboradores (2001) analisaram 415 amostras de alface prontas para consumo na Inglaterra e não encontraram *Salmonella* em nenhuma amostra. De Giusti e colaboradores (2010) não detectaram *Salmonella* em um total de 699

amostras de saladas prontas para consumo na Itália. Contudo, alguns estudos obtiveram resultados positivos no isolamento deste patógeno. Entre os anos de 2005-2006 na Espanha, Abadias e colaboradores (2008) encontraram *Salmonella* em uma amostra de alface minimamente processada em 29 amostras analisadas (3,4%).

No Brasil, Fröder e colaboradores (2007) detectaram *Salmonella* em uma (2,4%) de 41 amostras de alface minimamente processadas e em uma (4,8%) de 21 amostras de saladas misturadas minimamente processadas, compostas principalmente por alface, comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil. Já outros relatos reportam a ausência deste patógeno em vegetais minimamente processados comercializados no Brasil (PAULA et al, 2009; SANTOS et al, 2010; SMANIOTO et al, 2009), o que corrobora com os resultados deste estudo.

Em relação às amostras de alface de pratos prontos para consumo, resultados similares foram relatados por Sagoo e colaboradores (2003), que avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de alface de serviços de alimentação e restaurantes *self-service* na Inglaterra e não detectaram *Salmonella*. No Brasil, Paula e colaboradores (2003) analisaram 30 amostras de alfices de restaurantes *self-service* da cidade de Niterói, Rio de Janeiro, e também não detectaram *Salmonella* em nenhuma amostra.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das populações de coliformes nas amostras de alface. Todas as três classes de amostras apresentaram coliformes totais, sendo que a maioria das amostras minimamente processadas apresentou contagens entre 100 e 11000 NMP/g (60%) e de pratos prontos entre 1000 e >11000 NMP/g (73,3%). As amostras *in natura* apresentaram contagens mais elevadas, tendo metade das amostras com resultado >11000NMP/g (Tabela 4). As amostras *in natura* apresentaram coliformes totais em quantidade superior que as outras classes de amostras ($p < 0,05$). As amostras minimamente processadas e de pratos prontos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), indicando que os procedimentos utilizados na higienização destas amostras eliminaram de forma similar este grupo de micro-organismos. Nas amostras minimamente processadas foi detectada uma população de coliformes termotolerantes inferior que nas *in natura* e de pratos prontos ($p < 0,05$). Estas duas últimas não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), indicando que os procedimentos de higienização realizados nos serviços de alimentação não são eficazes para eliminação destes micro-organismos ou que uma contaminação por parte dos manipuladores pode estar ocorrendo nestes estabelecimentos.

Tabela 4 – População de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de alface

Micro-organismos	Tipo de alface	População ^a (% de amostras positivas)					Número de amostras positivas (%)
		<3,0	3,1-99	100-999	1000-11000	>11000	
Coliformes totais	<i>in natura</i>	0	0	0	15(50)	15(50)	30(100)
	minimamente processada	0	6(20)	9(30)	9(30)	6(20)	30(100)
	prato pronto para consumo	0	2(6,7)	6(20)	12(40)	10(33,3)	30(100)
Coliformes termotolerantes	<i>in natura</i>	8(26,7)	18(60)	3(10)	1(3,3)	0	22(73,3)
	minimamente processada	26(86,7)	3(10)	1(3,3)	0	0	4(13,3)
	prato pronto para consumo	8(26,7)	16(53,4)	4(13,3)	1(3,3)	1(3,3)	22(73,3)

^a- Número Mais Provável/g.

Comparando os resultados com trabalhos publicados no Brasil, dados similares foram descritos por Paula e colaboradores (2003), que encontraram coliformes totais em todas as amostras de pratos prontos para consumo, contendo alface, analisadas com a maioria das contagens ≥ 240 NMP/g (83,3%). Já no estudo realizado por Fröder e colaboradores (2007) em São Paulo, resultados mais elevados foram encontrados. Segundo os autores, uma população de $\geq 10^3$ UFC/g foi encontrada em 97,1% dos vegetais minimamente processados analisados, enquanto neste estudo o observado foi de 50% (Tabela 4). Silva e colaboradores (2007b) também reportaram elevado número de coliformes totais em amostras de vegetais minimamente processados comercializados em Porto Alegre, com contagens superiores a $3 \log_{10}$ NMP/g. Em um estudo mais recente, Santos e colaboradores (2010) analisaram 33 amostras de alface minimamente processadas comercializadas em supermercados, varejões e feiras livres da cidade de Campinas, SP. O número de coliformes totais variou de <2 a $7,1 \log_{10}$ UFC/g, sendo que a maioria das contagens observadas (84,8%) foi de $2,7$ a $7,1 \log_{10}$ UFC/g.

Na Espanha, Soriano e colaboradores (2000) relataram um número de coliformes totais variando de $<0,47$ a $3,38 \log_{10}$ NMP/g em 140 amostras de alface servidas em restaurantes universitários.

A ocorrência de micro-organismos em vegetais pode refletir a qualidade sanitária das etapas de processo e as condições microbiológicas dos produtos *in natura* no momento da colheita (JAY, 2005). Contudo, diferente de outros tipos de alimentos, as bactérias do grupo coliforme são parte da microflora natural de vegetais folhosos. Logo, esses indicadores possuem baixa significância como parâmetro para avaliação da segurança desse tipo de alimento (FAO/WHO, 2008c).

Os coliformes totais podem ser encontrados em fezes, no solo e em plantas, nos quais persistem mais que bactérias patogênicas (por exemplo, *Salmonella* e *Shigella*). Conseqüentemente, a presença desse grupo de micro-organismos em alimentos não necessariamente indica contaminação fecal recente ou a ocorrência de patógenos entéricos (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Esse fato foi observado neste estudo, uma vez que mesmo todas as amostras apresentando coliformes totais, a presença de *Salmonella* não foi identificada.

Coliformes termotolerantes foram detectados na maioria das amostras *in natura* e de pratos prontos para consumo (73,3%) e em quatro (13,3%) amostras minimamente processadas (Tabela 4). Nas três classes de alface; 86,7; 96,7 e 80,1% das amostras *in natura*,

minimamente processadas e de pratos prontos, respectivamente, apresentaram menos de 100 NMP/g (Tabela 4).

Em análises bacteriológicas de alface orgânica *in natura*, Loncarevic e colaboradores (2005) relataram resultados números ao desse estudo, onde apenas 16 de 179 (8,9%) amostras apresentaram coliformes termotolerantes. Em um estudo mais recente realizado em Brasília, DF, foi avaliada a contaminação de alface cultivada sob adubação orgânica. Os autores relataram que os coliformes termotolerantes estavam presentes em 16 de 29 (55,2%) amostras, com contagens variando de 4 a ≥ 2400 NMP/g (ABREU et al, 2010).

Uma amostra (3,3%) minimamente processada (MP2) e seis amostras (20,0%) de pratos prontos (SA4, 13, 14, 16, 26 e 30) apresentarem número de coliformes termotolerantes superiores a 100/g, que é o limite permitido pela legislação brasileira (ANVISA, 2001), sendo essas amostras consideradas em condições sanitárias insatisfatórias (Tabela 3).

A avaliação dos resultados demonstra qualidade higiênico-sanitária insatisfatória no preparo das alfaces nos serviços de alimentação estudados, tornando necessária a orientação aos manipuladores quanto à importância da correta higienização desses alimentos.

A ocorrência de uma amostra minimamente processada fora dos padrões legais indica uma ineficiência durante os procedimentos de lavagem e sanitização dos produtos frescos ou falhas na manutenção da cadeia de frio durante o transporte e armazenamento destes alimentos.

Resultados superiores aos observados neste estudo foram descritos por Paula e colaboradores (2003) que detectaram coliformes termotolerantes acima de 100 NMP/g em 16 (53,3) amostras de alface de restaurantes *self-service* na cidade de Niterói, RJ.

Silva e colaboradores (2007b) encontraram quatro (14,3%) amostras de vegetais minimamente processados contendo coliformes termotolerantes acima do limite aceitável na cidade de Porto Alegre, RS. Em São Paulo, 25 (61%) amostras de alface minimamente processada de diferentes tipos e 19 (90,5%) amostras de saladas misturadas minimamente processadas (compostas principalmente por alface) estavam fora dos padrões brasileiros devido ao número de coliformes termotolerantes superior a 10^2 (FRÖDER et al, 2007). Em um estudo realizado por Santos e colaboradores (2010) em Campinas, SP, de 155 amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas, 51 (33%) apresentaram contagem de *E. coli* maiores que 2 log UFC/g, não atendendo a RDC n.º 12/2001 (ANVISA, 2001). Dentre as hortaliças que não atenderam aos padrões se encontravam amostras de alface (americana e mimosa), saladas mistas, entre outras (SANTOS et al, 2010).

Neste estudo, foi realizada a pesquisa de *E. coli* nas amostras que apresentaram coliformes termotolerantes. Outros gêneros pertencentes ao grupo dos coliformes termotolerantes, como *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp., são normalmente constituintes da microbiota nativa de vegetais frescos, sendo *E. coli* considerada um indicador de contaminação fecal mais apropriado (LONCAREVIC et al, 2005). Segundo Franco e Landgraf (2002), os níveis de organismos fecais, como *E. coli*, são considerados melhores indicadores de contaminação.

E. coli foi detectada em 70; 6,7 e 30% das amostras de alface *in natura*, minimamente processadas e de pratos pronto para consumo, respectivamente (Tabela 3). Nas amostras de alfaces *in natura* que apresentaram coliformes termotolerantes, não foi identificada a presença de *E. coli* em apenas uma amostra (Tabela 3). Em contraste, em 50% das amostras minimamente processadas e em 40,9% das amostras de pratos prontos para consumo que apresentaram coliformes termotolerantes foi isolada *E. coli* (Tabela 3). Foi observada diferença significativa na ocorrência de *E. coli* entre as três classes de amostras ($p < 0,001$). Esses resultados indicam falhas nos procedimentos de higienização ou contaminação por parte dos manipuladores durante o processamento das alfaces minimamente processadas e, principalmente, das servidas em serviços de alimentação.

Dentre as cepas de *E. coli* identificadas, cepas de *E. coli* tipo 1 foram detectadas em todas as amostras *in natura* (IN5, 6, 8, 9, 11-16, 18, 20-24, 26-30), minimamente processadas (MP3 e 4) e na maioria das amostras de pratos prontos para consumo (SA3, 4, 6, 22, 27 e 30) (Tabela 3). A contaminação por *E. coli* tipo 2 foi observada em quatro amostras de pratos prontos para consumo (SA4, 20, 24 e 26) (Tabela 3).

A presença de *E. coli* nas amostras de alface *in natura* pode estar associado a práticas inadequadas durante a colheita ou contaminação esporádica da água de irrigação (OLIVEIRA et al, 2010). Neste estudo, a ocorrência de *E. coli* em amostras de alface *in natura* foi superior a relatos da literatura. Okafo e colaboradores (2003) analisaram 55 amostras de alface em sistemas de cultivo seco e irrigado e detectaram *E. coli* em cinco amostras (9,1%). Loncarevic e colaboradores (2005) identificaram *E. coli* em apenas 16 de 179 (8,9%) amostras de alface orgânica *in natura*. Já Oliveira e colaboradores (2010), detectaram *E. coli* em 22,2% (16 amostras) de alfaces orgânicas e em 12,5% (9 amostras) de alfaces convencionais.

Em relação às amostras minimamente processadas, outros estudos realizados no Brasil reportaram uma ocorrência mais elevada desta bactéria. Na cidade de Porto Alegre, RS, *E. coli* foi detectada em 28,6% (oito amostras) das amostras de vegetais minimamente processados coletadas em supermercados (SILVA et al, 2007b). Em amostras de hortaliças

minimamente processadas comercializadas em Campinas, SP; 32,9% (51 amostras) das amostras apresentavam-se contaminadas por *E. coli* (SANTOS et al, 2010).

Já em outros países, a ocorrência foi menor que a observada neste estudo. Na Espanha, Abadias e colaboradores (2008) observaram que *E. coli* estava presente em 3,4% das amostras de alface minimamente processadas.

A contaminação de *E. coli* em alfaces minimamente processadas e em pratos prontos para consumo representam um risco, pois determinadas cepas podem ser diarreiogênicas. As *E. coli* diarreiogênicas podem ser divididas em seis categorias que causam doenças, sendo estas desde diarreias moderadas a doenças sistêmicas severas (NEWELL et al, 2010). Cepas patogênicas, como *E. coli* O157:H7, são comumente isoladas em surtos associados ao consumo de vegetais (BERGER et al, 2010; FAO/WHO, 2008a,b,c; TABAN; HALKMAN, 2011; SANTOS et al, 2010; WHO, 1998).

A qualidade da água de irrigação é de suma importância no cultivo de produtos frescos, uma vez que a contaminação da água leva à contaminação da alface colhida (ABREU et al, 2010).

A maioria dos vegetais folhosos minimamente processados, como a alface, não é submetida a qualquer tratamento adicional sendo consumido cru, o que constitui um potencial problema de saúde pública, uma vez que poderão veicular agentes patogênicos (OPAS, 2009). Por esta razão, cuidados devem ser tomados no campo e durante o processamento para garantir a máxima remoção micro-organismos, evitar a contaminação cruzada e o crescimento bacteriano durante a produção e estocagem (FRÖDER et al, 2007).

A aplicação das Boas Práticas Agrícolas e das Boas Práticas de Fabricação na cadeia produtiva de vegetais minimamente processados deve ser seguida. A qualidade dos vegetais frescos, a escolha dos produtos a serem utilizados nos procedimentos de lavagem e/ou sanitização, o tipo de embalagem e o controle da temperatura durante a estocagem e distribuição também irão afetar a qualidade do produto final (FRÖDER et al, 2007).

Os administradores dos serviços de alimentação devem ter mais atenção na seleção dos fornecedores de alfaces e nos procedimentos de sanitização, de forma a oferecer produtos mais seguros aos consumidores.

No caso de ações não serem tomadas pelos produtores, as autoridades de saúde pública devem informar aos consumidores sobre os riscos associados ao consumo de saladas de alfaces em serviços de alimentação.

4.3 COMPARAÇÃO DA SALINA FOSFATADA TAMPONADA E DO TAMPÃO GLICINA NA METODOLOGIA DE CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANA NEGATIVA NA RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS GENOGRUPO II E DO BACTERIÓFAGO PP7 A PARTIR DE ALFACE

A Tabela 5 apresenta o número de cópias de genoma do bacteriófago PP7 e NoV GII inoculadas e a média de cópias recuperadas das amostras contaminadas artificialmente e o percentual de recuperação obtido com o uso de PBS e do TG. A recuperação do bacteriófago PP7 variou de 0,01 a 0,15% e 0,13 a 6,04% com a utilização da solução de PBS e TG, respectivamente (Tabela 5). Em uma das triplicatas (alíquota U) da diluição 10^{-2} com uso do TG, não foi possível a detecção do bacteriófago PP7. A recuperação mínima observada foi na diluição 10^{-1} e máxima na maior diluição (10^{-3}) tanto no uso do PBS e como do TG. O TG apresentou melhor desempenho na recuperação do bacteriófago PP7 que o PBS ($p = 0,029$).

A recuperação do NoV GII variou de 24,72 a 60,78% e 19,48 a 137,26% com a utilização da solução de PBS e TG, respectivamente. Os percentuais mínimos de recuperação observados para NoV GII foram de 2,04% (alíquota H) e 3,82% (alíquota U) com uso do PBS e do TG, respectivamente. Contudo, como a alíquota U não apresentou amplificação do bacteriófago PP7, indicando que alguma falha durante o ensaio pode ter ocorrido. Logo, este resultado foi excluído da triplicata, não sendo utilizado no cálculo da média e desvio-padrão da recuperação do NoV GII nesta diluição. Com isso, o percentual mínimo de recuperação de NoV GII com uso do TG foi de 6,32% (alíquota R). Nas alíquotas A e K (analisadas com PBS) e na alíquota S (analisada com TG), foram recuperadas um número maior de cópias de genoma de NoV GII que o número de cópias inoculadas. Estes resultados podem estar associados à heterogeneidade da suspensão fecal (ex: presença de partículas agregadas) utilizada para contaminação das alíquotas. Em duas alíquotas da diluição 10^{-3} , uma com uso de PBS (alíquota L) e uma com uso do TG (alíquota Y), não foi possível a detecção de NoV GII (Tabela 5). A maior taxa de recuperação observada com uso do PBS foi na diluição 10^{-3} com média de $60,78 \pm 66,21$; e com o uso do TG de $137,26 \pm 110,60$, na diluição 10^{-2} (Tabela 5). A análise dos controles negativos (alíquotas W e Z) indicou não existir contaminação intrínseca da amostra utilizada nos ensaios experimentais. A análise estatística demonstrou não existir diferença significativa entre o uso do TG e PBS na recuperação de NoV GII ($p = 0,57$).

Tabela 5 – Recuperação do bacteriófago PP7 e *Norovirus* genogrupo II a partir de amostras de alface contaminadas artificialmente com uso de solução salina fosfatada tamponada e tampão glicina. Os valores representam a média das duplicatas de três experimentos independentes

Alvo	Solução de eluição	Diluição	N.º de cópias de genoma inoculadas ($\times 10^4$)	N.º de cópias de genoma recuperadas no concentrado (média \pm DP ^a) ($\times 10^4$)	Recuperação \pm DP (%) ^b (Taxa de sucesso) ^c
Bacteriófago PP7	PBS ^d	10 ⁰	1082142,86	196,27 \pm 35,48	0,02 \pm 0,003(3/3)
		10 ⁻¹	92250,00	9,15 \pm 2,27	0,01 \pm 0,002(3/3)
		10 ⁻²	6578,57	4,00 \pm 4,73	0,06 \pm 0,07(3/3)
		10 ⁻³	155,36	0,24 \pm 0,30	0,15 \pm 0,19(3/3)
	Tampão glicina	10 ⁰	1082142,86	30461,57 \pm 52631,53	2,81 \pm 4,86(3/3)
		10 ⁻¹	92250,00	123,51 \pm 109,50	0,13 \pm 0,12(3/3)
		10 ⁻²	6578,57	15,03 \pm 7,84	0,23 \pm 0,12(2/3)
		10 ⁻³	155,36	9,39 \pm 6,94	6,04 \pm 4,47(3/3)
<i>Norovirus</i> GII	PBS ^d	10 ⁰	1264,31	730,64 \pm 676,40	57,79 \pm 53,50(3/3)
		10 ⁻¹	144,02	51,28 \pm 21,06	35,61 \pm 14,62(3/3)
		10 ⁻²	9,10	2,25 \pm 2,02	24,72 \pm 22,16(3/3)
		10 ⁻³	0,94	0,57 \pm 0,62	60,78 \pm 66,21(2/3)
	Tampão glicina	10 ⁰	1264,31	900,78 \pm 340,13	71,25 \pm 26,90(3/3)
		10 ⁻¹	144,02	28,06 \pm 31,91	19,48 \pm 22,16(3/3)
		10 ⁻²	9,10	8,44 \pm 9,99	137,26 \pm 110,60(3/3)
		10 ⁻³	0,94	0,26 \pm 0,28	27,90 \pm 29,67(2/3)

^a- desvio-padrão; ^b- (# cópias de genoma recuperadas no concentrado \times 100)/# de cópias de genoma inoculadas; ^c- # amostras positivas na reação de *PCR* em tempo real/ # reações de *PCR* em tempo real realizadas; ^d- salina tamponada fosfatada.

Nesta nova avaliação, a recuperação de NoV GII com uso do PBS foi similar ao relatado por Fumian e colaboradores (2009), que observaram valores de recuperação entre 5,2 e 72,3%. Com uma inóculo de $1264,31 \times 10^4$ cópias de genoma de NoV GII, a taxa de recuperação com uso de PBS foi de 57,79% (Tabela 5), enquanto que com um inóculo similar ($1913,24 \times 10^4$ cópias de genoma) obtiveram uma taxa de recuperação de 5,2%; que foi a mais baixa no estudo realizado pelo grupo. O percentual de recuperação maior que o obtido no trabalho de Fumian e colaboradores (2009) pode estar associado ao fato de que os autores utilizaram uma amostra *in natura* na contaminação experimental, enquanto que neste estudo foi utilizada uma amostra minimamente processada. Outra questão é que o uso de sacos plásticos com filtro na etapa de processamento das amostras pode ter evitado a perda de partículas virais que seriam sedimentadas na etapa de centrifugação. Desta forma a substituição da centrifugação pelo uso de sacos com filtro se mostrou mais eficiente para recuperação dos vírus nas amostras. A recuperação também foi superior ao relatado por Victoria e colaboradores (2009) na análise de amostras de águas. Comparando com as taxas de recuperação obtidas em outras metodologias de detecção de NoV em alface, os resultados foram superiores a maioria dos relatos (MORALES-RAYAS et al, 2010; SÁNCHEZ et al, 2012; SCHERER et al, 2010; STALS et al, 2011).

Os resultados obtidos indicam que a concentração do inóculo influenciou na recuperação dos vírus. No caso do bacteriófago PP7, o menor número de cópias inoculadas ($1,55 \times 10^6$ cópias, diluição 10^{-3}) gerou uma maior recuperação, tanto com o uso do PBS (0,15%) quanto do TG (6,04%) (Tabela 5). Provavelmente, um percentual ainda maior poderia ser obtido caso um número menor de partículas fossem inoculadas. Esse fato foi observado nas amostras de campo minimamente processadas, que é o mesmo tipo de matriz utilizada no ensaio de infecção experimental. Na análise destas amostras, com uma média de inóculo de $1,61 \times 10^5$ cópias de genoma e utilizando PBS como tampão de eluição, a média de recuperação foi de 0,67% (Tabela 2), sendo superior ao percentual de recuperação do menor inóculo utilizado na infecção experimental, que foi de $1,55 \times 10^6$ cópias (diluição 10^{-3}) gerando 0,15% de recuperação (Tabela 5). Os dados deste estudo indicam que a contaminação de alface com um grande número de partículas do bacteriófago PP7 pode reduzir a taxa de recuperação do mesmo, sendo necessários mais estudos com concentrações de inóculo menores, de forma a elucidar a melhor concentração alvo para recuperação do bacteriófago.

De acordo com Fumian e colaboradores (2009), o número de cópias de genoma inoculadas na amostra influencia o percentual de recuperação, sugerindo que a contaminação de amostras com um número elevado de partículas virais pode reduzir a taxa de recuperação.

Uma relação inversa foi observada por Stals e colaboradores (2011) na avaliação de uma metodologia de detecção de NoV em frutas vermelhas. No estudo realizado por este grupo, a eficiência da recuperação de NoV foi maior em concentrações mais elevadas de cópias de genoma de NoV GII (STALS et al, 2011). Morales-Rayas e colaboradores (2010) também observaram esse fenômeno na avaliação de dois métodos de detecção de NoV em alface, sugerindo que essa variação pode ter ocorrido devido à perda de partículas virais durante a etapa de lavagem.

Em três alíquotas (H, K e U) não foi detectado sinal de amplificação de NoV GII com a utilização do *RNA* diluído, sendo apenas detectado a partir do *RNA* extraído direto do concentrado. Neste caso, é possível que a tentativa de eliminação da interferência dos inibidores com a diluição dos ácidos nucleicos extraídos tenha diminuído tanto a quantidade do *RNA* alvo que acarretou na perda de sucesso na reação de amplificação. Nas demais amplificações, a diluição dos ácidos nucleicos extraídos gerou um maior número de cópias amplificadas. Além disso, na alíquota J, o sinal de amplificação de NoV GII apenas foi detectado com a utilização da diluição.

Em relação à análise qualitativa dos resultados, a Tabela 6 apresenta os dados obtidos pela *semi-nested PCR* para detecção de NoV GII nas alíquotas contaminadas artificialmente, com uso do *RNA* extraído diretamente do concentrado e diluído 10x. A *semi-nested PCR* foi capaz de detectar NoV GII com uso do PBS e do TG, na maioria das alíquotas inoculadas com o maior número de cópias de genoma (diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2}) (Tabela 6). Contudo, a cepa não foi detectada em nenhuma alíquota contaminada com o menor inóculo (diluição 10^{-3}) com uso de PBS, e em uma alíquota com uso de TG e *RNA* não diluído (Tabela 6). Esse resultado indica que o TG propiciou melhor recuperação de NoV GII, principalmente quando a concentração de partículas é baixa na amostra de alface. A diluição do *RNA* viral extraído a partir do concentrado das alíquotas gerou uma redução na taxa de sucesso, na utilização de ambos os tampões de eluição (Tabela 6). Esse fato também foi evidenciado na reação de amplificação de algumas alíquotas (H, K e U) na *PCR* em tempo real, conforme relatado anteriormente. Assim, como no ensaio de recuperação do bacteriófago PP7 (Tabela 5), na alíquota U, NoV GII não foi identificado o que indica que uma falha durante alguma etapa do processamento pode ter ocorrido, uma vez que o controle interno não foi amplificado. A amostra de alface minimamente processada utilizada durante este ensaio não apresentou contaminação intrínseca por NoV GII. Contudo, produtos inespecíficos foram observados no gel de agarose, assim como ocorreu na análise das amostras de campo.

Tabela 6 - Resultados do *semi-nested* reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Norovirus* genogrupo II com uso de solução salina fosfatada tamponada e tampão glicina nas alíquotas contaminadas artificialmente, com uso do *RNA* extraído diretamente do concentrado e diluído 10x

Solução de eluição	Diluição	N.º de cópias de genoma inoculadas (x10 ⁴)	Alíquota	Diluição do <i>RNA</i> extraído		Taxa de sucesso ^a	
				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹
PBS ^b	10 ⁰	1264,31	A	+ ^c	+	3/3	3/3
			B	+	+		
			C	+	+		
	10 ⁻¹	144,02	D	+	+	3/3	3/3
			E	+	+		
			F	+	+		
	10 ⁻²	9,10	G	+	ND ^d	2/3	0/3
			H	ND	ND		
			I	+	ND		
	10 ⁻³	0,94	J	ND	ND	0/3	0/3
			K	ND	ND		
			L	ND	ND		
			W	ND	ND		
	-	-	0	W	ND	ND	NA ^e
Tampão glicina	10 ⁰	1264,31	M	+	+	3/3	3/3
			N	+	+		
			O	+	+		
	10 ⁻¹	144,02	P	+	+	3/3	2/3
			Q	+	ND		
			R	+	+		
	10 ⁻²	9,10	S	+	+	2/3	2/3
			T	+	+		
			U	ND	ND		
	10 ⁻³	0,94	V	+	ND	2/3	1/3
			X	+	+		
			Y	ND	ND		
			Z	ND	ND		
	-	-	0	Z	ND	ND	NA

^a-# amostras positivas na reação de *semi-nested PCR* para identificação de NoV GII/ # reações de *semi-nested PCR* para identificação de NoV GII realizadas; ^b- salina fosfatada tamponada; ^c- aparecimento do fragmento de 236 pares de base; ^d- não detectado; ^e- não se aplica.

A taxa de sucesso da técnica de *PCR* em tempo real foi superior ao do *semi-nested PCR* na detecção de NoV GII com o uso de ambas as soluções de eluição (Tabelas 5 e 6). Dessa forma, a *PCR* em tempo real apresentou maior sensibilidade na detecção de NoV GII. Resultados iguais foram relatados por Prado e colaboradores (2011), que observaram maior sensibilidade na *PCR* em tempo real em relação ao *semi-nested PCR* na detecção de NoV GII em amostras ambientais. Essa mesma conclusão também foi apresentada por Victoria e colaboradores (2009) na detecção de NoV a partir de amostras de esgoto. Segundo os autores,

o menor tamanho dos produtos amplificados no *PCR* quantitativo pode explicar o melhor desempenho do método em relação ao *semi-nested PCR* utilizado para amplificação da região da polimerase de NoV.

A detecção de NoV em alimentos contaminados é de extrema importância. Em qualquer método de detecção, a efetividade da extração das partículas virais da matriz alimentícia antes dos procedimentos de concentração dos vírus é uma etapa crítica (TIAN et al, 2011). O tampão de eluição utilizado na homogeneização do alimento pode influenciar na recuperação dos vírus (SCHERER et al, 2010), uma vez que os NoV estão presentes na superfície da alface e dificilmente internalizados (URBANUCCI et al, 2009). Dentre os diferentes tipos de tampões de eluição, os a base de glicina são utilizados em diversas metodologias de concentração de vírus em diversos tipos de alimentos, como ostras (TROTIER et al, 2010), frutas vermelhas (SCHERER et al, 2010; STALS et al, 2011), presunto (SCHERER et al, 2010), cebolinha (SIMARD et al, 2007), alface (SCHERER et al, 2010) e em vegetais processados (SÁNCHEZ et al, 2012).

Em todas as concentrações de cópias de genoma do bacteriófago PP7 inoculadas, a eluição com o TG apresentou melhor recuperação em relação ao PBS. Na detecção de NoV, o TG apresentou melhores resultados na análise qualitativa e na maioria dos inóculos utilizados na análise quantitativa. Logo a substituição do PBS pelo TG na etapa de homogeneização da alface seria uma alternativa para otimização da metodologia.

A redução do pH após adição do tampão de eluição pode induzir a precipitação ácida das partículas virais e levar a perda de vírus durante o processo. Logo, o uso de tampões de eluição que previnam a redução do pH na etapa de homogeneização é crucial para alimentos ácidos (CROCI et al, 2008), como a alface. O TG por apresentar zona de tamponamento superior ao PBS pode ter apresentado uma melhor manutenção do pH após a homogeneização das amostras de alface, sendo assim mais eficaz na prevenção da precipitação ácida das partículas. Outra hipótese, é que nesta faixa de pH mais alta (9,5) e devido a uma força iônica maior que o PBS (duas vezes mais NaCl), a extração das partículas virais da amostra de alface seja mais eficiente (VEGA et al, 2008). Contudo, no estudo realizado por Tian e colaboradores (2011) a homogeneização com água (pH 8,0) ou PBS (pH 7,4) apresentou eficácia similar na extração de NoV de amostras de alface, sugerindo que a força iônica causada pelo NaCl presente no PBS seja insuficiente ou que esta não seja o fator principal para eluição das partículas virais da alface. Por outro lado, Sánchez e colaboradores (2012) não observaram diferença no uso do tampão Tris-glicina-extrato de carne (100 mM Tris, 50 mM de glicina, 1% [p/v] de extrato de carne, pH 9,5) ou de água peptonada tamponada (pH

7,2) para eluição de vírus em amostras de vegetais, o que sugere que a força iônica causada pelo NaCl contribui para eluição das partículas do vegetal.

Uma estratégia para otimização da metodologia seria a inclusão de uma etapa de tratamento do concentrado viral com butanol-clorofórmio para remoção de substâncias inibitórias co-extraídas com as partículas virais e clarificação do sedimento após a centrifugação, de forma a prevenir a saturação das colunas utilizadas na etapa de extração de RNA (SCHERER et al, 2010). Outra perspectiva seria a utilização do tampão caldo fosfato triptose-glicina na etapa de eluição das partículas virais da matriz, que é o tampão recomendado para extração de vírus no método de concentração de NoV GII a partir de cebolinha, que é uma matriz semelhante à alface, descrito no *Compendium of Analytical Methods, Health Canada* (SIMARD et al, 2007).

Estudos do uso de diferentes concentrações de $MgCl_2$ na etapa de concentração da amostra também poderão ser realizados, para elucidar qual seria a mais apropriada para obtenção do melhor percentual de recuperação de NoV (VICTORIA et al, 2009). A substituição da homogeneização em *Stomacher* pelo *Pulsifier* (SÁNCHEZ et al, 2012), também é uma alternativa promissora, uma vez que este equipamento remove as partículas virais da superfície do vegetal por ultrassom, o que reduziria assim a quantidade de substâncias inibitórias que são liberadas pela injúria no tecido vegetal durante a homogeneização mecânica no aparelho *Stomacher*.

A avaliação geral aponta o TG e a utilização de sacos com filtro como melhorias da técnica de concentração de vírus em alface.

5 CONCLUSÕES

- O bacteriófago PP7 demonstrou-se aplicável como controle interno do método de detecção de vírus a partir de alface. Contudo, ele apresentou baixo percentual de recuperação nas amostras *in natura*, sendo necessárias melhorias na metodologia de forma a aumentar a recuperação dos vírus neste tipo de matriz;
- Nenhuma amostra de alface apresentou contaminação por NoV GII com uso da *PCR* em tempo real e do *semi-nested PCR*;
- *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma amostra, indicando baixa ocorrência deste patógeno em alfaces comercializados no Estado do Rio de Janeiro;
- Coliformes totais foram detectados em todas as amostras, sendo a maior quantidade detectada naquelas *in natura*;
- Coliformes termotolerantes e *E. coli* foram detectados na maioria das amostras *in natura* e de pratos prontos para consumo, e em poucas amostras minimamente processadas;
- As amostras de alface *in natura* se apresentaram com qualidade microbiológica satisfatória de acordo com a Resolução Brasileira vigente. Contudo, estas apresentaram alta população de coliformes, e grande ocorrência de *E. coli*, enfatizando a necessidade do cumprimento das Boas Práticas Agrícolas;
- A qualidade microbiológica de alface minimamente processada é geralmente boa, mas a contaminação com indicadores fecais ocorre ocasionalmente;
- As alfaces comercializadas em pratos prontos para consumo nos serviços de alimentação estudados apresentaram baixa qualidade higiênico-sanitária.
- Em amostras contaminadas artificialmente, a substituição do PBS pelo TG aumentou a eficiência na recuperação do bacteriófago PP7, mas não apresentou diferença significativa na recuperação de NoV GII na metodologia de detecção de vírus a partir de alface;
- Com a utilização do TG, a técnica de *semi-nested PCR* apresentou maior sensibilidade para detecção de NoV GII em amostras contaminadas artificialmente, principalmente quando estes estão presentes em baixas concentrações;
- O *PCR* em tempo real apresentou maior sensibilidade que a técnica de *semi-nested PCR* para detecção de NoV GII em amostras de alface contaminadas artificialmente.

6 PERSPECTIVAS

Os resultados desta dissertação sinalizam que mais estudos de detecção de vírus entéricos em alimentos devem ser realizados, visando a otimizar o método de concentração viral, com objetivo de subsidiar futuras discussões sobre a inclusão desse método nos Lacen.

Essa nova otimização da metodologia poderá ser realizada com estudo de outras soluções de extração, além da inclusão de etapas de remoção de substâncias inibitórias. A avaliação da recuperação dos vírus em concentrações mais baixas é outra questão importante, com objetivo de elucidar a concentração ideal para a sensibilidade máxima das técnicas de detecção.

Estudos de metodologias para detecção de NoV em outras matrizes também poderão ser desenvolvidos, além da pesquisa futura de outros vírus de importância em saúde pública relacionados às DTA, como o HAV, vírus da hepatite E e RV.

REFERÊNCIAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **Int. J. of Food Microbiol.**, n.123, p. 121–129, 2008.

ABREU, I. M. O.; JUNQUEIRA, A. M. R.; PEIXOTO, J. R.; OLIVEIRA, S. A. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, Supl.1, p.108-118, 2010.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. Food and Drug Administration. Chapter 5, nov., 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>>. Acesso em: 18 de jan. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n.º23, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre O Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 mar. 2000.

_____. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, p. 45.

BARRABEIG, I.; ROVIRA, A.; BUESA, J.; BARTOLOMÉ, R.; PINTÓ, R.; PRELLEZO, H.; DOMÍNGUEZ, A. Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. **BMC Infect. Dis.**, v.10, n. 269, p. 1-7, 2010.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environ. Microbiol.**, v.12, n. 9, p. 2385-2397, sep. 2010.

BEUCHAT, L. R. Ecological factor influencing survival and growth of humans pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infections**. v.4, n. 4, p. 413-423, apr. 2002.

BEURET, C.; KOHLER, D.; BAUMGARTNER, A.; LÜTHI, T. M. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, n. 4, p.1925-1931, apr. 2002.

BLODGETT, R. Most Probable Number from Serial Dilutions. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. Food and Drug Administration. Appendix 2, oct. 2010. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>>. Acesso em: 18 de jan. 2012.

BOXMAN, I. L.; TILBURG, J. J.; TE LOEKE, N. A.; VENNEMA, H.; JONKER, K.; DE BOER, E.; KOOPMANS, M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 108, n. 3, p. 391-396, fev. 2006.

BRASIL.Ministério da Saúde. Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jul. 1978.

_____.Presidência da República. Constituição da República Federativa do Brasil de 5 de outubro 1998.**Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF,5 out. 1988.

_____. Congresso Nacional. Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990. Regula em todo o território nacional, as ações e serviços de saúde, executados isolados ou conjuntamente, em caráter permanente ou eventual, por pessoas naturais ou jurídicas de direito público ou privado. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990.

_____. Congresso Nacional. Lei 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 30 jan. 1999.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico**. Ano 5, n. 6, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso em: 20 out. 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Informe Técnico Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano**. 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus2.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Glossário – Doença Transmitida por Alimentos - Informações técnicas**. 2011. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758>. Acesso em: 10 dez. 2011.

CAMPOS, G. S.; MOREAU, V. H.; BANDEIRA, A.; BARBERINO, G.; ALMEIDA, P. F.; AMADOR, D. M.; DE LIMA, M. O.; SARDI, S. I. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 6, p. 1125-1129, apr. 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables**.CAC/RCP53-2003. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10200/cxp_053e.pdf>. Acesso em: 8 fev. 2012.

CROCI, L.; DUBOIS, E.; COOK, N.; DE MEDICI, D.; SCHULTZ, A. C.; CHINA, B.; RUTJES, S. A.; HOORFAR, J.; VAN DER POEL, W. H. M. Current methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: towards international standards. **Food Anal. Methods**, v. 1, p. 73-84, 2008.

DANIELS, N. A.; BERGMIRE-SWEAT, D. A.; SCHWAB, K. J. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular trace back to deli sandwiches contaminated during preparation. **J. Infect.Dis.**, v. 181, n. 4, p. 1467-1470, apr. 2000.

DE GIUSTI, M.; AURIGEMMA, C.; MARINELLI, L.; TUFI, D.; DE MEDICI, D.; DI PASQUALE, S.; DE VITO, C.; BOCCIA, A. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. **J. of Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 3, p. 996-1006, sep. 2010.

EUROPEAN COMMISSION. Directorate-General for Agriculture and Rural Development. **Agricultural commodity markets past developments fruits and vegetables**. An analysis of consumption, production and trade based on statistics from the Food and Agriculture Organization (FAO). 17 jul. 2007. 20 p.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature -Genus Salmonella**. 2012. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html>>. Acesso em: 19 jan. 2012.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. Food and Drug Administration.Chapter 4, sep. 2002.Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm064948.htm>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; FONSECA, M. C. M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidropônia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília. v. 20, n. 2, p. 195-200. 2002.

FERREIRA, M. S. R.; XAVIER, M. P. T. P.; FUMIAN, T. M.; VICTORIA, M.; OLIVEIRA, S. A.; PENNA, L. H. A.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Acute Gastroenteritis Cases Associated With Noroviruses Infection in the State of Rio de Janeiro. **J. of Med. Virol.**, v. 80, n. 2, p. 338-344, feb. 2008.

FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; VIEIRA, C. B.; XAVIER, M. P. T. P.; FIORETTI, J. M.; ANDRADE, J.; VOLOTÃO, E. M.; ROCHA, M.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Surveillance of Norovirus Infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. **J. of Med. Virol.**, v. 82, p. 1442-1448, 2010.

FIORETTI, J. M.; FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C. B.; XAVIER, M. P. T. P.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Genetic diversity of norovirus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 942-947, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT). **Core production data**. 2011. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>> Acesso em: 13 dez. 2011.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Viruses in food: scientific advice to support risk management activities**. Meeting Report. Rome: WHO, 2008a. 58p. (Microbiological Risk Assessment Series Nº 13). Disponível em:

<http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra/viruses_in_food_mra.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2010.

_____. **Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables**. Meeting Report. Rome: WHO, 2008b. 38p. (Microbiological Risk Assessment Series Pre-publication version). Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563789_eng.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2010.

_____. **Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs**. Meeting Report. Rome: WHO, 2008c. 151p. (Microbiological Risk Assessment Series Nº 14). Disponível em: <<http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0452e/i0452e00.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Survey of imported fresh produce. FY 1999 Field Assignment**. 30 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodsur6.html>>. Acesso em: 13 dez. 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artemed, 2002.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182p.

FRANZ, E.; VAN BRUGGER, A. H. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 3-4, p. 143-161, 2008.

FRÖDER, H.; MARTINS, C. G.; SOUZA, K. L. O.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M; DESTRO, M. T. Minimally Processed Vegetable Salads: Microbial Quality Evaluation. **J. of Food Protection**, v. 70, n. 5, p.1277-1280, 2007.

FUMIAN, T. M. **Padronização de PCR quantitativo e desenvolvimento de metodologia de detecção de norovírus em alimentos**. 2008. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P. G.; MARIN, V. A.; MIAGOSTOVICH, M. P. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. **J. of Virol. Methods**, n. 155, p. 39-43, 2009.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P. G.; CASTELLO, A. A.; GAGGERO, A.; CAILLOU, M. S. L.; MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of rotavirus A in sewage sample using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **J. of Virol. Methods**, n. 170, p. 42-46, 2010.

GEORGIADIS, S.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F.; CANTARELLI, V. V. Avaliação molecular de norovírus em pacientes com gastroenterite aguda. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 277-280, mai-jun. 2010.

GERMANO, P. M. L. G.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância Sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

GREEN, K. Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE D. M; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields in Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. vol 1, p. 949-979.

GUÉVREMONT, E.; BRASSARD, J.; HOUDE, A.; SIMARD, C.; TROTTIER, Y. L. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. **J. Virol. Methods**, n. 134, p. 130-135, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v.41, p.95-98, 1999.

HOUDE, A.; LEBLANC, D.; POITRAS, E.; WARD, P.; BRASSARD, J.; TROTTIER, Y.; MUELLER, P.; SIMARD, C. Detection of norovirus genogroups I and II using the conventional and real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **The Compendium of Analytical Methods**, Vol 5. Health Canada, Ottawa, ON. March 2010. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume5/opflp_10-eng.php>. Acesso em: 19 jan. 2012.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Virology Division – IUMS. **Virus Taxonomy**: 2009 Release. 2009. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: 19 jan. 2012.

IVERSEN, C.; MULLANE, A.; MCCARDELL, B.; TALL, B. D.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1442-1447, 2008.

JAY, J. M. Gastrenterites de Origem Alimentar Causadas por *Salmonella* e *Shigella*. In: _____. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 26, p.543-561.

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSEL, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 77, p. 199–204, 2002.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F. B.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1548-1557, 2003.

KESWICK, B. H.; SATTERWHITE, T. K.; JOHNSON, P. C. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p. 261-264, 1985.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. In: _____. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. Editora Medsi, 2001. Cap 21, p. 1188-1302.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 90, n. 1, p. 23-41, 2004.

LEE, H.; PARK, Y.; KIM, M.; JEE, Y.; CHEON, D.; JEONG, H. S.; KO, G. Development of a Latex Agglutination Test for Norovirus Detection. **J. Food Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 419-425, 2010.

LITTLE, C.; ROBERTS, D.; YOUNGS, E.; DE LOUVOIS, J. Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuces: A PHLS Food Working Group Study. **J. of Food Protection**, v. 62, n. 4, p. 325–328, 1999.

LONCAREVIC, S.; JOHANNESSEN, G. S.; RORVIK, L. M. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. The Society for Applied Microbiology, **Letters in Appl. Microbiol.**, v. 41, p.186-189, 2005.

LUCCHESI, G. A. A Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. 1ª Conferência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cadernos de Textos**. Brasília, ANVISA, 2001.

LUCHS, A.; MORILLO, S. G.; RIBEIRO, C. D.; VILANOVA, B. C.; CALUX, S. J.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Gastroenteritis outbreak due to G2P[4] rotavirus and GII norovirus at two correctional facilities in Brazil, 2010. **J. of Clinical Virol.**, v. 51, p.213-214, 2011.

MATTISON, K.; BRASSARD, J.; GAGNÉ, M.; WARD, P.; HOUDE, A.; LESSARD, L.; SIMARD, C.; SHUKLA, A.; PAGOTTO, F.; JONES, T. H.; TROTTIER, Y. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborn RNA viruses. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 132, n. 1, p. 73-77, 2009.

MATTISON, K.; HARLOW, J.; MORTON, V.; COOK, A.; POLLARI, F.; BIDAWID, S.; FARBER, J. M. Enteric Viruses in Ready-to-Eat Packaged Leafy Greens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1815-1817, 2010.

MELO, B.; SILVA, C. A.; ALVES, P. R. B. **Processamento mínimo de hortaliças e frutas.** Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/pminimo.htm>>. Acesso em: 19 jan. 2012.

MESQUITA, J. R.; NASCIMENTO, M. S. J. A foodborne outbreak of norovirus gastroenteritis associated with a Christmas dinner in Porto, Portugal, December 2008. **Euro. Surveill.**, v. 14, n. 4, p.1-3, 2009.

MORALES-MORALES, H. A.; VIDAL, G.; OLSZEWSKI, J.; ROCK, C. M.; DASGUPTA, D.; OSHIMA, K. H.; SMITH, G. B. Optimization of a Reusable Hollow-Fiber Ultrafilter for Simultaneous Concentration of Enteric Bacteria, Protozoa, and Viruses from Water. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 7, p. 4098-4102, 2003.

MORALES-RAYAS, R.; WOLFFS, P. F. G.; GRIFFITHS, M. W. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 139, n. 1-2, p. 48-55, 2010.

MORILLO, S. G.; CILLI, A.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Identification and molecular characterization os norovirus in São Paulo State, Brazil. **Brazilian J. of Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 619-622, 2008.

MORILLO, S. G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; RIBEIRO, C. D.; CALUX, S. J.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Large gastroenteritis outbreak due to norovirus GII in São Paulo, Brazil, summer 2010. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 119-120, 2011.

MORILLO, S. G.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Norovirus: an overview. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 4, p. 453-458, 2011.

MORTON, V.; JEAN, J.; FARBER, J.; MATTISON, K. Detection of Noroviruses in Ready-To-Eat Foods by Using Carbohydrate-Coated Magnetic Beads. **American Society for Microbiol.**, v. 75, n. 13, p. 4611-4643, 2009.

MUKHERJEE, A.; SPEH, D.; DYCK, E.; DIEZ-GONZALEZ, F. Pre-harvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. **J. of Food Protection**, v. 67, p. 894–900, 2004.

NEWLL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 139, Supl. 1, p. S13-S15, 2010.

OKAFO, C. M.; UMOH, V. J.; GALADIMA, M. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. **The Science of the Total Environment**, v.311, n. 1-3, p. 49–56, 2003.

OLIVEIRA, M.; USALL, J.; VIÑAS, I.; ANGUERA, M.; GATIUS, F.; ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiol.**, v.27, p. 679-684, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Folhosos Minimamente Processados. In: **Guia para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças – OPAS/OMS. 2009. 320p. Cap 18: 307-326.

OTTO, T. D.; VASCONCELLOS, E. A.; GOMES, L. H.; MOREIRA, A. S.; DEGRAVE, W. M.; MENDONCA-LIMA, L.; ALVES-FERREIRA, M. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genet. Mol. Res.**, v.7, p. 861–871, 2008.

PANG, X. L.; PREIKSAITIS, J. K.; LEE, B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. **J. Clinical Virol.**, v. 33, n. 2, p. 168-171, 2005.

PATEL, M. M.; HALL, A. J.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Noroviruses: A comprehensive review. **J. Clinical Virol.**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2009.

PAULA, P.; RODRIGUES, P. S. S.; TÓRTORA, J. C. O.; UCHÔA, C. M. A.; FARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes *self-service*, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 535-537, 2003.

PAULA, N. R. F.; BOAS, E. V. B. V.; RODRIGUES, L. J.; CARVALHO, R. A.; PICCOLI, R. H. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciência e agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p.219-227, 2009.

PEREZ, R.; RAMOS, A. M.; BINOTI, M. L.; SOUSA, P. H. M.; MACHADO, G. M.; CRUZ, I. B. Perfil dos consumidores de hortaliças minimamente processadas de Belo Horizonte. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 441-446, 2008.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de Composição de Alimentos: suporte para decisão nutricional**. Brasília: ANVISA, FINATEC/NUT-UnB, 2001.

PRADO, T.; SILVA, D. M.; GUILAYN, W. C.; ROSE, T. L.; GASPAR, A. M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1287-1297, 2011.

RÁCZ, M. L.; MUNFORD, V.; CASTILHO, J. G.; RESQUE, H. R. **Gastroenterites Virais**. In: Microbiologia 4^a edição – Revista e Atualizada. 2005. Cap 85, p. 591-597.

RAJAL, V. B.; MCSWAIN, B. S.; THOMPSON, D. E.; LEUTENEGGER, C. M.; WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4287-4298, 2007a.

RAJAL, V. B.; MCSWAIN, B. S.; THOMPSON, D. E.; LEUTENEGGER, C. M.; KIDARE, B. J.; WUERTZ, S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1411-1422, 2007b.

RESQUE, H. R.; CASTILLO, J. G.; MUNFORD, V.; CARUZO, T. A. R.; SCHMICH, H.; RACZ, M. L. Detection of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus and Astrovirus in stool samples of children with gastroenteritis from São Paulo, Brazil. In: **International Union of Microbiological Societies**; São Francisco, California, USA. Abstracts V-300. 2005.

RODRIGUES, G.; ALVES, M. A. B. F.; MALUF, W. R. **Hortaliças minimamente processadas**. Boletim Técnico de Hortaliças, Lavras (MG), UFLAS, n.31, jul. 1999. Disponível em: <<http://www2.ufla.br/~wrmaluf/bth031/bth031.html>>. Acesso em: 12jan. 2012.

SAID, M. A.; TRISH, M. P.; SEARS, C. L. Gastrointestinal Flu: Norovirus in health care and long-term care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p. 1202-1208, 2008.

SAGOO, S. K.; LITTLE, C. L.; MITCHELL, R.T. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. **Letters in Appl. Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 434-439, 2001.

SAGOO, S. K.; LITTLE, C. L.; MITCHELL, R. T. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. **J of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1581–1586, 2003.

SÁNCHEZ, G.; ELIZACUÍVEL, P.; AZNAR, R. A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 152, n. 1-2, p. 9-13, 2012.

SANT'ANA, A.; AZEREDO, D. P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análises de perigos no processamento mínimo de vegetais. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p.80-84, out. 2002.

SANTANA, L. R. R.; CARVALHO, R. D. S.; LEITE, C. C.; ALCÂNTRA, L. M.; OLIVEIRA, T. W. S.; RODRIGUES, B. M. Qualidade física, microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p.264-269, 2006.

SANTOS, T. B. A.; JUNQUEIRA, N. S. V. C. A.; PEREIRA, J. L. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 2, p. 141-146, abr./jun. 2010.

SÃO PAULO (Estado). Centro de Vigilância Epidemiológica. Vigilância Ativa das Doenças Transmitidas por Alimentos: Normas e Instruções. São Paulo, 2002. Disponível em:< <http://www.cve.saude.sp.gov.br> >. Acesso em: 12 jan. 2012.

SATO, G. S.; MARTINS, V. A.; BUENO, C. R. F. Análise exploratória do perfil do consumidor de minimamente processados na cidade de São Paulo. In: III SEMINÁRIO ABAR SUL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ADMINISTRAÇÃO RURAL – Região Sul). **Anais...**Curitiba. 2006.

SCHAETII, C. Vaccines for enteric diseases: update on recent developments. **Expert Reviews Vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1653-1655, 2009.

SCHERER, K.; JOHNE, R.; SCHRADER, C.; ELLERBROEK, L.; SCHULENBURG, J.; KLEIN, G. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. **J. Virol. Methods**, v. 169, n. 1, p. 22-27, 2010.

SCHULTZ, A. C.; PERELLE, S.; PASQUALE, S. D.; KOVAC, K.; MEDICI, D. D.; FACH, P.; SOMMER, H. M.; HOORFAR, J. Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 145, Supl. 1, p. S158-166, 2011.

SECRETARIA DE POLITICAS DE SAÚDE. Política Nacional de Alimentação e Nutrição do Setor Saúde. **Rev. Saúde Pública** [online], v.34, n.1, p. 104-108, 2000.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Hortaliças Minimamente Processadas**. Estudos de Mercado SEBRAE/ESPM 2008. Relatório Completo. Série Mercado. 2008. 165p.

SIEBENGA, J. J.; VENNEMA, H.; ZHENG, D.; VINJÉ, J.; LEE, B. E.; PANG, X.; HO, E. C. M.; LIM, W.; CHOUDEKAR, A.; BROOR, S.; HALPERIN, T.; RASOOL, N. B. G.; HEWITT, J.; GREENING, G. E.; JIN, M.; DUAN, Z.; LUCERO, Y.; O'RYAN, M.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E.; RATCLIFF, R. M.; WHITE, P. A.; IRITANI, N.; REUTER, G.; KOOPMANS, M. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. **The J. of Infect. Dis.**, v. 200, p. 802-812, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Salmonella*. In: _____. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Vareloa, 2007a. 522p. Cap.19, p.253-285.

SILVA, S. R. P.; VERDIN, S. E. F.; PEREIRA, D. C.; SCHATKOSKI, A. M.; ROTT, M. B.; CORÇÃO, G. Microbiological Quality of Minimally Processed Vegetables Sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian J. of Microbiol.**, v. 38, p. 594-598, 2007b.

SIMARD, C.; LESSARD, L.; MÜLLER, P.; HOUDE, A.; GUÉVREMONT, E.; BRASSARD, J.; TROTTIER, Y. Concentration of norovirus genogroups II and hepatitis A virus from contaminated green onions and their detection using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **The Compendium of Analytical Methods**, Vol 5. Health Canada, Ottawa, ON. Jul. 2007. Disponível em: Acesso em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume5/opflp_03-eng.php>. Acesso em: 19 jan. 2012.

SMANIOTO, T. F.; PIROLO, N. J.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ARRUDA, M. C. Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p.150-154, 2009.

SOARES, C. C.; SANTOS, N.; BEARD, R. S.; ALBUQUERQUE, M. C.; MARANHÃO, A. G.; ROCHA, L. N.; RAMÍREZ, M. L.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. Norovirus Detection and Genotyping for Children with Gastroenteritis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 8, p. 1244-1246, 2007.

SORIANO, J. M.; RICO, H.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in university restaurants. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 58, n. 1-2, p. 123-128, 2000.

STALS, A.; BAERT, L.; BOTTELDOORN, N.; WERBROUCK, H.; HERMAN, L.; UYTTENDAELE, M.; VAN COILLIE, E. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. **J. Virol. Methods**, v. 161, n. 2, p. 247-253, 2009.

STALS, A.; BAERT, L.; VAN COILLIE, E.; UYTTENDAELE, M. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. **Food Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 52-58, 2011.

TABAN, B. M.; HALKMAN, A. K. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? **Anaroebe**, v. 17, n. 6, p. 286-287, dez. 2011.

TIAN, P.; YANG, D.; MANDRELL, R. A simple method to recover Norovirus from fresh produce with large sample size by using histo-blood group antigen-conjugated to magnetic beads in a recirculating affinity magnetic separation system (RCAMS). **Int. J. Food Microbiol.**, v. 147, n. 3, p. 223-227, 2011.

TROTTIER, Y.; HOUDE, A.; BUENAVENTURA, E.; MÜLLER, P.; BRASSARD, J.; CHRISTENSEN, K.; LIU, J. **Concentration of norovirus genogroups I and II from contaminated oysters and their detection using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction.** The Compendium of Analytical Methods, Vol 5. Health Canada, Ottawa, ON. Mar. 2010. Disponível em: Acesso em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume5/opflp_01-eng.php>. Acesso em: 23 jan. 2012.

URBANUCCI, A.; MYRMEL, M.; BERG, I.; VON BONSDORFF, C. H.; MAUNULA, L. Potential internalization of caliciviruses in lettuce. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 135, n. 2, p. 175-178, 2009.

VEGA, E.; GARLAND, J.; PILLAI, S. D. Electrostatic forces control nonspecific virus attachment to lettuce. **J. of Food Protection**, v. 71, n. 3, p. 522-529, 2008.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **J. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1-5, 2007.

VICTORIA, M.; GUIMARÃES, F.; FUMIAN, T.; FERREIRA, F.; VIEIRA, C.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **J. of Virol. Methods**, v. 156, n. 1-2, p. 73-76, 2009.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; CORRÊA, A. A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; BARARDI, C. R. M. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **J. of Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 231-238, 2010.

VIDAL, R.; SOLARI, V.; MAMANI, N.; JIANG, X.; VOLLAIRE, J.; ROESSLER, P.; PRADO, V.; MATSON, D. O.; O'RYAN, M. L. Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 7, p. 1134-1137, 2005.

VIVANCOS, R.; SHROUFI, A.; SILLIS, M.; AIRD, H.; GALLIMORE, C. I.; MYERS, L.; MAHGOUD, H.; NAIR, P. Food-related norovirus outbreak among people attending two barbecues: epidemiological, virological, and environmental investigation. **Int. J. of Infect. Dis.**, v. 13, p. 629-635, 2009.

WADL, M.; SCHERER, K.; NIELSEN, S.; DIEDRICH, S.; ELLERBROEK, L.; FRANK, C.; GATZER, R.; HOEHNE, M.; JOHNE, R.; KLEIN, G.; KOCH, J.; SCHULENBURG, J.; THIELBEIN, U.; STARK, K.; BERNARD, H. Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. **BMC Infect. Dis.**, v.10, n. 30, p. 1-10, 2010.

WALDMAN, E. A.; FREITAS, F. R. M. A Vigilância epidemiológica e sua interface com as práticas de vigilância sanitária. In: COSTA, E. A. (Org.). **Vigilância Sanitária Desvendando o Enigma**. Salvador: Ed. Universidade Federal da Bahia, 2008. p. 135-148.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review**. 1998. Prepared by L.R. Beuchat. Doc. HO/FSF/FOS/98.2. Disponível em:

<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

_____. **WHO Global Strategy for Food Safety: Safer food for better health**. Switzerland: WHO, 2002. 20 p. ISBN: 92 4 154574 7. Disponível em:

<http://www.who.int/foodsafety/publications/general/global_strategy/en/index.html>. Acesso em: 12 jan. 2012.

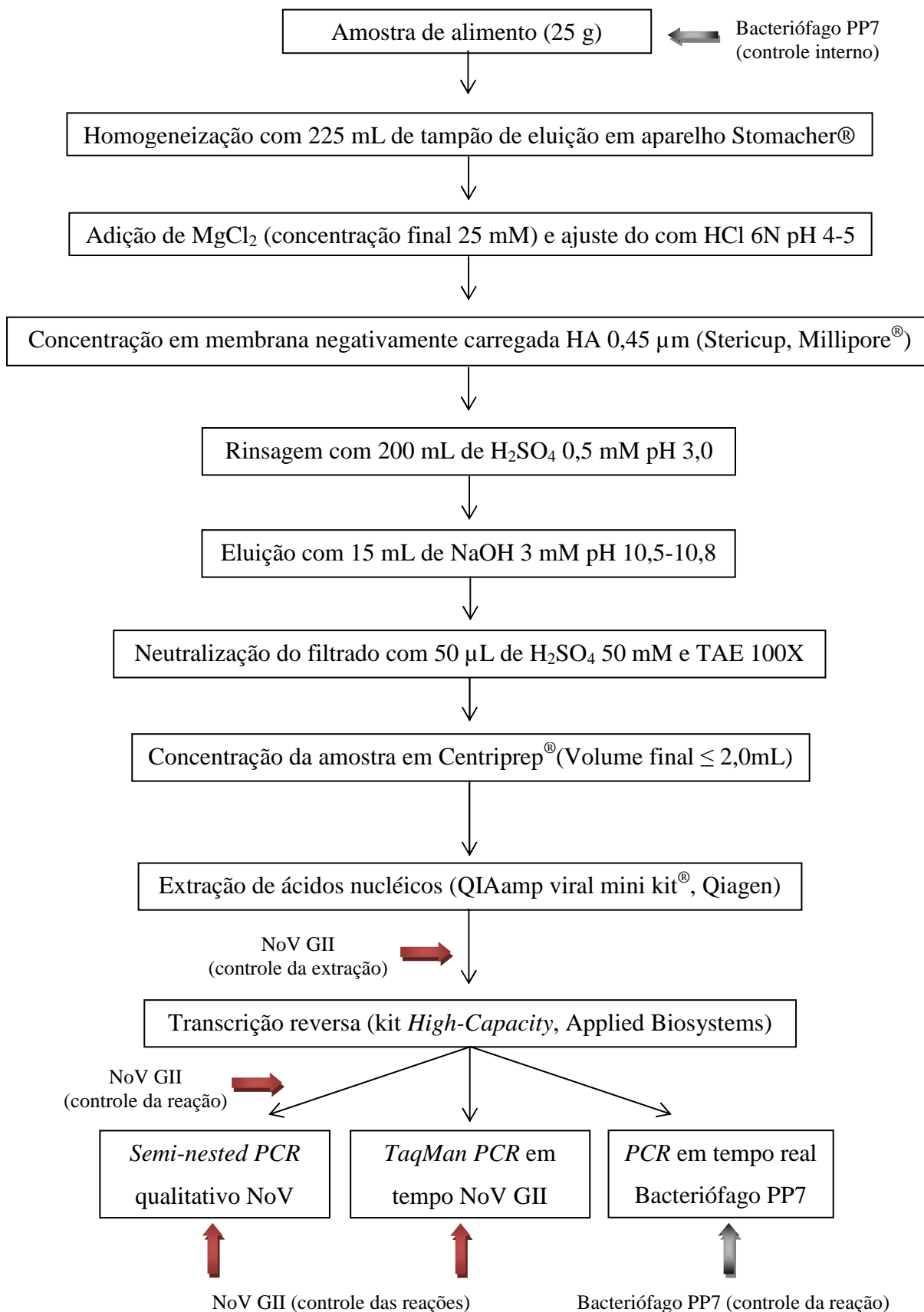
WIDDOWSON, M. A.; CRAMER, E. H.; HADLEY, L.; BRESEE, J. S.; BEARD, R. S.; BULENS, S. N.; CHARLES, M.; CHEGE, W.; ISAKBAEVA, E.; WRIGHT, J.G.; MINTZ, E.; FORNEY, D.; MASSEY, J.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Outbreaks of Acute Gastroenteritis on Cruise Ships and on Land: Identification of a Predominant Circulating Strain of Norovirus—United States, 2002. **J. of Infect. Diseases**, v.190, p. 27-36, 2004.

WIKSWO, M. E.; CORTES, J.; HALL, A.J; VAUGHAN, G.; HOWARD, C.; GREGORICUS, N.; CRAMER, E. H. Disease Transmission and Passenger Behaviors during a High Morbidity Norovirus Outbreak on a Cruise Ship, January 2009. **Clinical Infect.Dis.**,v.52,p.1116-1122, 2011.

WILSON,I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

ZHENG, D. P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R. L.; BEARD, R. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v. 346, n. 2, p. 312-323, 2006.

**APÊNDICE A – ESQUEMA DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE NOROVIRUS A
PARTIR DE ALFACE**



ANEXO A – TABELA DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Número Mais Provável para três séries de três tubos contendo 0,1; 0,01; 0,001 g da amostra e intervalo de confiança de 95% (BLODGETT, 2010).

Tubos positivos			NMP ^a /g	Limites de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limites de confiança	
0.1	0.01	0.001		Inf. ^b	Sup. ^c	0.1	0.01	0.001		Inf.	Sup.
0	0	0	<3,0	--	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	--

^a - número mais provável; ^b - inferior; ^c - superior.

ANEXO B – MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E REAGENTES

a) Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N

Hidróxido de sódio (NaOH) ¹	40,0 g
Água purificada	q.s.p. 1000 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o hidróxido de potássio na água e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 min. Estocar a temperatura ambiente.

b) Solução de verde brilhante a 0,1%

Verde brilhante ¹	0,1 g
Água purificada	q.s.p. 100 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o verde brilhante na água. Estocar a temperatura ambiente.

c) Solução de iodo iodeto de potássio

Iodeto de potássio ¹	5,0 g
Iodo ressublimado ¹	6,0 g
Água purificada estéril	20 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o iodeto de potássio em 5 mL de água purificada estéril. Adicionar o iodo e dissolver por agitação. Diluir para um volume final de 20 mL. Estocar a temperatura ambiente.

d) Solução Tampão Fosfato de Butterfield

Fosfato de potássio monobásico ¹	34,0 g
Água destilada	500 mL

¹ - Merck, Alemanha

Solução estoque

Ajustar o pH para 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N. Completar o volume para 1000 mL com água destilada. Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 min. Manter a solução estoque a temperatura de refrigeração.

Solução de uso

Medir 1,25 mL da solução estoque e acrescentar água destilada para um volume final de 1000 mL. Distribuir alíquotas de 90 mL em garrafas de diluição e/ou 225 mL em frascos de 500 mL. Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 min.

e) Solução de cristal violeta

Solução 1

Cristal violeta ¹	2,0 g
Etanol a 95% ¹	20 mL

¹- Merck, Alemanha

Solução 2

Oxalato de amônio ¹	0,8 g
Água purificada	80 mL

¹- Merck, Alemanha

Misturar as soluções 1 e 2. Aguardar aproximadamente 24 horas. Filtrar através de papel de filtro.

f) Solução de lugol

Cristais de iodo ¹	1,0 g
Iodeto de potássio ¹	2,0 g
Água purificada	300 mL

¹- Merck, Alemanha

Triturar o iodo e o iodeto com auxílio de gral e pistilo. Adicionar, separadamente, alíquotas de 1 mL, 5 mL e 10 mL de água purificada. A cada adição de água, homogeneizar a mistura. Lavar o gral e o pistilo com o restante da água. Armazenar o reagente em frasco escuro.

g) Solução de safranina

Solução estoque

Safranina O ¹	1,0 g
Etanol a 95% ¹	2,0 g

¹ - Merck, Alemanha

Solução de uso

Misturar 10 mL da solução estoque com 90 mL de água purificada.

h) Reagente de Kovacs

Paradimetilaminobenzaldeído ¹	5,0 g
Álcool amílico ¹	75 mL
Ácido clorídrico concentrado ¹	25 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o benzaldeído em álcool amílico e adicionar o ácido clorídrico vagarosamente. Estocar o reagente entre 2-8°C em frasco âmbar.

i) Reagentes para Voges-Proskauer

Reativo 1 (VP1)

Alfa-naftol ¹	5,0 g
Álcool absoluto ¹	100 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o alfa-naftol no álcool. Estocar o reagente entre 2-8°C em frasco âmbar.

Reativo 2 (VP2)

Hidróxido de potássio ¹	40,0 g
Água purificada	q.s.p. 500 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o hidróxido de potássio na água. Estocar a temperatura ambiente.

j) Vermelho de metila

Vermelho de metila ¹	0,10 g
Etanol 95% ¹	300 mL
Água purificada	q.s.p. 500 mL

¹ - Merck, Alemanha

Dissolver o vermelho de metila em etanol. Completar o volume até 500 mL com água purificada. Estocar a temperatura ambiente.

k) Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS) Adaptada de Mac Faddin, 1985

Fosfato de potássio monobásico anidro (KH ₂ PO ₄) ¹	2,45 g
Fosfato de sódio bibásico anidro (Na ₂ HPO ₄) ¹	8,1 g
Cloreto de sódio(NaCl) ¹	8,5 g
Água purificada	q.s.p. 1000 mL

¹ - Merck, Alemanha

Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 min.

pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C

l) Tampão TAE 100X

Solução 1

Tris ¹	8,17 g
Água purificada	50 mL

¹ - Biorad, Brasil

Solução 2

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ¹	1,86 g
Água purificada	50 mL

¹ - Qeel, Brasil

Misturar as soluções 1 e 2. Aguardar aproximadamente 24 horas. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 min.

m) Tampão de aplicação corado

Azul de bromofenol ¹	0,25 g
Xileno cianol ¹	0,25 g
Glicerol ¹	30,0 mL
Tris HCl 20 mM pH 8,0	q.s.p. 100 mL

¹ - Invitrogen, EUA

n) Tampão TAE 1X

Tampão TAE 10X ¹	100 mL
Água MilliQ esterilizada	q.s.p. 1000 mL

¹ - Invitrogen, EUA

o) Tampão glicina pH 9,5 (TROTIER et al, 2010)

Glicina ¹	7,50 g
Cloreto de sódio (NaCl) ¹	17,55 g
Água purificada	q.s.p. 1000 mL

¹ - Merck, Alemanha

Suspender e dissolver os componentes em 800 mL de água destilada e ajustar o pH para 9. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 min.

pH final: $9,5 \pm 0,1$ a 25°C