

Vegetais minimamente processados comercializados no município do Rio de Janeiro: pesquisa de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* e de *Salmonella spp.*

Ready to eat marketed in the municipality of Rio de Janeiro: research for *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella spp.*

Vegetales mínimamente procesados comercializados en la ciudad de Rio de Janeiro: investigación de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* y de *Salmonella spp.*

Recebido: 19/09/2022 | Revisado: 29/09/2022 | Aceitado: 03/10/2022 | Publicado: 09/10/2022

Maryah Christina dos Santos Senna Nilo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4049-9964>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil
E-mail: maryahsennanutri@gmail.com

Cristiane Rodrigues Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6306-4998>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil
E-mail: Cristiane.silva@unirio.br

Victor Augustus Marin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9827-6552>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil
E-mail: victor.marin@unirio.br

Resumo

Introdução: Os vegetais minimamente processados são cada vez mais reconhecidos como importantes veículos para a transmissão de patógenos humanos. A importância clínica de *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.* tem sido reconhecida por serem relevantes microrganismos patógenos oportunistas. Sabe-se que a alimentação é a principal forma para a entrada de bactérias no trato gastrointestinal humano, e as bactérias com genes de resistência a antibióticos ingeridas poderiam transferir tais genes às bactérias patogênicas ou oportunistas do trato gastrointestinal. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi pesquisar a presença de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella spp.* em vegetais minimamente processados e comercializados no município do Rio de Janeiro através do método de reação em cadeia da polimerase. **Metodologia:** Foram coletadas 30 amostras de vegetais minimamente processados de diferentes tipos, no período de março de 2017 a março de 2018. Para identificar a presença das bactérias nas amostras foi realizada a extração de DNA com posterior análise de Reação em Cadeia da Polimerase e visualização no gel de agarose. **Resultados e Discussão:** No presente estudo em nenhuma das 30 amostras analisadas por PCR foi encontrada a presença de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella spp.* **Conclusão:** O resultado encontrado não descarta a presença dessas bactérias em vegetais minimamente processados, que já foram encontrados em diversos estudos. Os vegetais minimamente processados possuem uma grande microbiota com diferentes gêneros de bactérias e essas com resistência aos antibióticos, podendo se tornar um risco aos consumidores.

Palavras-chave: Bactérias; *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella spp.*; Vegetais minimamente processados.

Abstract

Introduction: Ready to eat vegetables are increasingly recognized as important vehicles for the transmission of human pathogens. The clinical importance of *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* and *Salmonella spp.* has been recognized as being relevant pathogenic opportunistic microorganisms. It is common knowledge that eating is the main way for bacteria to enter the human gastrointestinal tract, and bacteria with antibiotic resistant genes might transfer these genes to opportunistic pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract. **Objective:** This work's objective was to research the presence of *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.* ready to eat vegetables marketed in Rio de Janeiro city, by the molecular method of polymerase chain reaction. **Methodology:** 30 samples of ready to eat vegetables of different types, were collected between March 2017 and March 2018. To detect the presence of bacteria in the samples, DNA were extracted and a polymerase chain reaction analyses made afterwards, complemented with visualization on agarose gel. **Results and Discussion:** In this study, in none of the 30 samples, the presence of the *S.*

maltophilia, *P. aeruginosa* and *Salmonella spp* was detected. Conclusion: This result does not preclude the presence of these bacteria in ready to eat vegetables as they were detected in many other studies. Ready to eat vegetables have a great microbiota, with different types of bacteria, many of them antibiotic resistant, with a potential risk for consumers.

Keywords: Bacteria; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella spp*; Ready to eat vegetables.

Resumen

Introducción: Los vegetales mínimamente procesados se reconocen cada vez más como vehículos importantes para la transmisión de patógenos humanos. La importancia clínica de *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* y *Salmonella spp.* ha sido reconocido por ser un importante microorganismo patógeno oportunista. Se sabe que la alimentación es la principal vía para que las bacterias ingresen al tracto gastrointestinal humano, y las bacterias con genes de resistencia a los antibióticos ingeridos podrían transferir tales genes a bacterias patógenas u oportunistas en el tracto gastrointestinal. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.* en vegetales mínimamente procesados y comercializados en la ciudad de Río de Janeiro por el método de reacción en cadena de la polimerasa. **Metodología:** Fueron colectadas 30 muestras de vegetales mínimamente procesados de diferentes tipos desde marzo de 2017 hasta marzo de 2018. Para identificar la presencia de bacterias en las muestras se realizó extracción de ADN con posterior análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa y visualización en gel de agarosa. **Resultados y Discusión:** En el presente estudio, ninguna de las 30 muestras analizadas por PCR contenía *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.* **Conclusión:** El resultado encontrado no descarta la presencia de estas bacterias en vegetales mínimamente procesados, que ya han sido encontrados en varios estudios. Los vegetales mínimamente procesados tienen una gran microbiota con diferentes géneros de bacterias y estas con resistencia a los antibióticos, lo que puede convertirse en un riesgo para los consumidores.

Palabras clave: Bacterias; *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella spp*; Vegetales mínimamente procesados.

1. Introdução

Os vegetais minimamente processados são aqueles que passaram por operações como, pré-seleção, classificação, lavagem, corte, sanitização, enxágüe, centrifugação, embalagem e armazenamento refrigerado. Devem ter boa consistência, frescor e coloração aceitável, além de ser livre de microrganismos patogênicos ao ser humano, resultando em um produto 100% aproveitável que oferece aos consumidores, conveniência e qualidade nutricional (Santos et al., 2010). Segundo a Associação Internacional dos Produtos Mínimamente Processados (Internacional, 2007), produtos minimamente processados (“fresh cut”, levemente processados ou parcialmente processados) são definidos como qualquer fruta ou hortaliça, ou ainda qualquer combinação delas, que foi alterada fisicamente a partir de sua forma original, embora mantenha seu estado fresco.

Já se sabe que as frutas e hortaliças são de grande importância na alimentação e prevenção de doenças, devido ao seu grande potencial antioxidante, protegendo as células contra danos oxidativos e inibindo a síntese de substâncias inflamatórias, além de terem pouca densidade energética e serem ricas em fibras. Deste modo, são responsáveis pela proteção contra diversas doenças como, osteoporose (Wynn et al, 2010), câncer gástrico (Bastos et al, 2009), doenças neurodegenerativas e declínios cognitivos relacionados à idade (Joseph et al, 2009), hipertensão (Alonso et al, 2004), doenças cardiovasculares (Voutilainen et al, 2006), linfomas (Zhang et al, 2000), diabetes tipo II (Van dam et al, 2002) e obesidade (Tamers et al, 2009). Vegetais e legumes em especial as folhas que são consumidas cruas, são cada vez mais reconhecidos como importantes veículos para a transmissão de patógenos humanos (Lynch et al., 2009).

O gênero *Stenotrophomonas* faz parte da família Xanthomonadaceae, juntamente com *Xanthomonas* e *Xylella*. É um gênero de bactérias bacilares, gram negativas, aeróbicas, não fermentadoras, que possuem espécies que são comuns no solo, na água, em plantas e uma única espécie patogênica para os humanos a *Stenotrophomonas maltophilia* (La Sala et al. 2007). A *S. maltophilia* não é considerada um patógeno altamente virulento, mas se tornou na última década um importante patógeno hospitalar, sendo associado a um grande número de caso/fatalidade principalmente em pacientes gravemente debilitados ou

imunodeprimidos, apresentando taxas de mortalidade que variam de 14 a 69% em pacientes com bacteremia (Jang et al, 1992; Victor et al, 1994).

O gênero *Pseudomonas* constitui a família denominada Pseudomonadaceae, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é, uma bactéria em forma de bastonete gram-negativa, aeróbica (e, por vezes, facultativamente anaeróbias), com motilidade unipolar. (Koneman et al, 2001; Winn et al, 2009). Tem sido identificado como um agente patogénico oportunista de seres humanos e plantas. Possuem necessidades nutricionais mínimas, sobrevivendo em uma grande variedade de ambientes. Encontram-se amplamente distribuídas no solo e na água, e podem também fazer parte da microbiota normal do trato intestinal e pele de 3 a 5 % da população (Kerr, 2009)

Pseudomonas aeruginosa é uma das espécies mais frequentemente associada a doenças em seres humanos, onde ela atua como um agente patogénico oportunista, com o potencial de causar infecções em quase qualquer órgão ou tecido, especialmente em pacientes comprometidos por uma doença subjacente, de idade ou de deficiência imunitária. Seu crescimento ótimo ocorre a 37°C, mas também pode crescer a 42°C, tem tendência de se desenvolverem bem em ambientes úmidos, talvez um reflexo da sua ocorrência natural no solo e água (Germiller, 2005). Possui uma elevada resistência a fatores ambientais, crescendo rapidamente sobre uma vasta gama de substratos, sendo tolerante a desinfetantes químicos, incluindo o cloro (Craun et al. 2005). A *Pseudomonas aeruginosa* é um agente patogénico em humanos e plantas, e um dos principais microrganismos nosocomiais. (Aloush, 2006; NNIS, 2004; Wisplinghoff, 2004). A capacidade do microrganismo *P. aeruginosa* para causar a doença é reforçada tanto pela resistência inata e adquirida a muitos antimicrobianos e desinfetantes, fatores de virulência e capacidade de se adaptar vários ambientes. (Kerr, 2009). Segundo o European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC, 2013) os principais microrganismos associados às IRAS (Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde) incluem: *Escherichia coli* (15,9%), *Staphylococcus aureus* (12,3%), *Enterococcus spp.* (9,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,9%), e *Klebsiella spp.* (8,7%).

O gênero *Salmonella spp.* pertence à família Enterobacteriaceae, são bactérias em forma de bastonete (bacilo) Gram-negativo, não-esporuladas e anaeróbios facultativos. (Fortuna e Franco, 2005). Existem seis subespécies de *Salmonella*, com uma variedade de 2500 sorotipos. A *Salmonella spp.* pode sobreviver bastante tempo fora de um hospedeiro, o que aumenta a taxa de transmissão (Alves, 2012). Podem estar presentes no solo, no ar, na água, em águas residuais, nos seres humanos, em animais, nos alimentos, nas fezes, nos equipamentos. Entretanto, o seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e de outros animais. São patógenos intracelulares que invadem a membrana mucosa do trato intestinal, e são transmitidas de forma fecal-oral aos seres humanos principalmente através da água, da carne, dos ovos e dos produtos das aves domésticas contaminados (Kottwitz et al. 2008). Segundo Von Rückert et al. 2006, a incidência de salmoneloses continua aumentado significativamente em todo o mundo. Geralmente, os humanos são infectados por *Salmonella spp.* através de água e alimentos contaminados, sendo as aves e os bovinos indicados como as principais origens dessa bactéria.

Ao longo dos últimos anos, tem havido um aumento significativo na oferta de produtos minimamente processados em serviços de varejo e alimentos. Este aumento pode ser ligado à crescente demanda de alimentos práticos e convenientes para os consumidores urbanos, tendo em conta a necessidade de economia de tempo e esforço associado ao estilo de vida moderno. Do ponto de vista tecnológico, a produção desses produtos constitui um enorme desafio para a indústria alimentícia, considerando as dificuldades associadas com as boas práticas no processamento (Denoya, 2015). A importância clínica de *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.* tem sido reconhecida por serem relevantes microrganismos patógenos oportunistas e sabe-se que a alimentação é a principal forma para a entrada de bactérias no trato gastrointestinal humano e as bactérias com genes de resistência a antibióticos ingeridas poderiam transferir tais genes às bactérias patogénicas ou oportunistas do trato gastrointestinal (Rossi et al., 2014). Neste aspecto, o objetivo do trabalho foi pesquisar a presença de *Stenotrophomonas*

maltophilia, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella spp.* em vegetais minimamente processados e comercializados no município do Rio de Janeiro através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2. Metodologia

2.1 Amostras

Para a aquisição das Amostras foram visitados 22 estabelecimentos comerciais formais no município do Rio de Janeiro, incluído supermercados e “hortifrutis” sendo coletadas 30 amostras de vegetais minimamente processados de diferentes tipos. No período de março de 2017 a março de 2018.

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão de produtos e estabelecimentos, respeitando-se os requisitos da Resolução RDC no 331, de 23 de dezembro de 2019.

- a) Embalagem: Original e não violada;
- b) Temperatura na superfície: Menor ou igual a 8 °C;
- c) Carimbo de Inspeção: Presença de carimbo de inspeção do Serviço de Inspeção Federal (SIF), Estadual (SIE) ou Municipal (SIM);
- d) Data de Validade: Produtos dentro do período de validade;
- e) Produto visualmente não alterado e não deteriorado;
- f) Estabelecimento comercial devidamente formalizado.

A temperatura de armazenamento no balcão refrigerado foi verificada com termômetro de infravermelho Skill-Tec SKTI-550, precisão $\pm 1,5\%$, no momento de aquisição. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo durante a condução ao laboratório e armazenadas em geladeira a 8 °C até o momento de análise, no máximo 24 horas após a coleta, garantindo a manutenção da temperatura de refrigeração.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) da Unirio.

2.2 Preparo Das Amostras

Foi realizada a assepsia da embalagem com etanol 70%. Dentro da cabine de biossegurança, com o auxílio de tesoura previamente esterilizada. Em seguida foi feito o corte da embalagem e pesagem, assepticamente, em balança analítica BG 200 (Gehaka, Brasil) de $25,0 \pm 0,2$ g de amostra, colhida de vários pontos com auxílio de colher estéril, procedendo à sua homogeneização em erlenmeyer estéril com 225 mL de caldo GN (HiMedia, Índia), meio seletivo para bactérias Gram-negativas.

O erlenmeyer com o caldo GN foi incubado a 35 °C por 24 horas na incubadora B.O.D. SL 200/334 (Solab, Brasil) para a recuperação e pré-enriquecimento de células bacterianas Gram-negativas estressadas. Foram então coletadas alíquotas de 1,0 mL do caldo GN para a extração do DNA total. (Okuno et al,2018; Choi et al, 2013; Babu et al.,2013)

2.3 Extração De DNA

A extração de DNA é o primeiro passo na utilização de técnicas moleculares. Este processo é parte fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A análise foi baseada nos estudos de Okuno et al (2018), Choi et al. (2013) e Babu et al. (2013). A extração e a purificação de DNA foram realizadas com o kit comercial de extração GeneJET Genomic DNA Purification KIT (ThermoScientific, Lituânia) de acordo com as instruções do fabricante para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas, conforme descrito abaixo. A alíquota de 1,0 mL de caldo GN, contendo os microrganismos, foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos, descartando-se o

sobrenadante. Para realizar a pré-lise das células, o pellet foi ressuspensionado em 180 µL de Solução de Digestão e adicionados 20 µL de solução de Proteinase K, procedendo à homogeneização através de pipetagens sucessivas até se obter uma solução homogênea. A solução foi então incubada a 56°C por 30 minutos, com homogeneização manual a cada 10 minutos. Para eliminar o RNA contaminante, foram adicionados 20 µL de solução de RNase A, homogeneizando com o agitador de tubos e incubando a mistura por 10 minutos à temperatura ambiente. Para a lise das células, foram adicionados 200 µL de Solução de Lise, homogeneizando a mistura por 15 segundos no agitador de tubos. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 200 µL de etanol 99,5% à solução, com homogeneização no agitador de tubos. Para purificação do DNA, a alíquota de 620 µL de amostra lisada foi transferida para uma Coluna de Purificação de DNA Genômico GeneJET previamente inserida em um tubo coletor. A coluna foi centrifugada a 6000 x g por 1 minuto e a solução contida no tubo coletor foi descartada. Foi então adicionado 500 µL do Tampão de Lavagem I à coluna, centrifugando por 1 minuto a 8000 x g e descartando a solução do tubo coletor. Em seguida, foram adicionados 500 µL do Tampão de Lavagem II à coluna, centrifugando por 3 minutos a 12000 x g. O tubo coletor foi descartado e a coluna inserida em um microtubo tipo Eppendorf. Para eluir o DNA purificado da coluna, foram adicionados 200 µL de Tampão de Eluição à coluna, deixando em incubação por 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugando a 8000 x g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o DNA, no microtubo tipo Eppendorf, foi congelado para utilização posterior na reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Foi realizado nesse estudo a Reação de Cadeia da Polimerase para procurar qualitativamente a presença de 3 bactérias: *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.* Na Tabela 1 podemos identificar os primers e respectivos protocolos, mostrando o gene o tamanho e a sequência para cada bactéria analisada de acordo com os estudos de Okuno et al (2018), para identificação de *S. maltophilia*, de Choi et al. (2013) para identificação de *P. aeruginosa* e de Babu et al. (2013) para o gênero *Salmonella spp.*

Tabela 1 - Protocolos de PCR – primers.

| Microrganismo | Autores | Gene | Tamanho (pb) | Sequência |
|------------------------|--------------------|----------------------|--------------|---|
| <i>S. maltophilia</i> | Okuno et al (2018) | Sme1 | 192 | Direto (<i>Forward</i>) GCATGATCTCCATSGTYTTG Reverso (<i>Reverse</i>) GGCACTTCAAGAACAAGAGC |
| <i>P. aeruginosa</i> | Choi et al. (2013) | O-antígeno acetilase | 232 | Direto (<i>Forward</i>) 5'CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC3' Reverso (<i>Reverse</i>) 5'GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC3' |
| <i>Salmonella spp.</i> | Babu et al (2013) | invA | 1,067 | Direto (<i>Forward</i>) 5'GCTCTTTCGTCTGGCATTATC Reverso (<i>Reverse</i>) 5'GCATCAAATCAAAATAGACCG |

Fonte: Autores.

Na Tabela 2 se encontram os protocolos utilizados na reação de cadeia da polimerase em relação a tempo e temperatura de cada ciclo de análise. E na Tabela 3 se encontram o protocolo das concentrações e volumes dos reagentes que serão utilizados.

Tabela 2 - Protocolos de PCR - tempos e temperaturas.

| | <i>S. maltophilia</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>Salmonella spp.</i> |
|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| | Okuno et al (2018) | Choi et al. (2013) | Babu et al (2013) |
| DEsnaturação Inicial | 94 °C / 5 min | 95 °C / 3 min | 94 ° C / 4 min |
| Ciclos | 30 | 35 | 30 |
| Desnaturação | 94 °C / 45 s | 95 °C / 60 s | 94 ° C / 30 s |
| Anelamento | 68 °C / 45 s | 63 °C / 30 s | 60 ° C / 30 s |
| Extensão | 72 °C / 45 s | 72 °C / 60 s | 72 ° C / 1 min |
| Extensão Final | 72 °C / 10 min | 72 °C / 10 min | 72 °C / 8 min |

Fonte: Autores.

Tabela 3 - Protocolos de PCR – concentrações/volumes de reagentes.

| | <i>S. maltophilia</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>Salmonella spp.</i> |
|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| | Okuno et al (2018) | Choi et al. (2013) | Babu et al (2013) |
| Volume reacional | 25,0 µL | 25,0 µL | 20,0 µL |
| DNA | 2,0 µL | 2,0 µL | 5,0 µL |
| dNTP | 200 µM de cada | 200 µM de cada | 100 µM de cada |
| Tampão PCR 10X | 2,5 µL | 2,5 µL | 2,5 µL |
| MgCl ₂ | 1,5 mM | 1,5 mM | 1,5 mM |
| Taq DNA polim. | 1,0 U | 2,0 U | 1,0 U |
| Primers (de cada) | 2,0 µM | 0,8 µM | 5,0 µM |

Fonte: Autores.

As cepas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, *S. maltophilia* INCQS 00103 (ATCC 13637) (Palleroni; Bradbury, 1993) e *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 27853) (Anuj et al., 2009), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* INCQS 00258 (ATCC 13076) foram utilizadas como controles positivos e água estéril como controle negativo da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Foram utilizados o kit da Invitrogen (EUA) contendo tampão de PCR 10X, MgCl₂ e Taq DNA polimerase recombinante, o conjunto de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) da Ludwig Biotec (Brasil) e os primers sintetizados pela Integrated DNA Technologies (EUA). As amplificações de DNA serão realizadas no termociclador LifeTouch Thermal Cycler (BIOER, China).

2.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Foi preparada uma solução de gel de agarose (concentração de 0,9%) e adicionado 5µl de DS View Nucleic Acid Stain, 20.000X à solução de gel. Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,9% com uso de corante não mutagênico safer (K9-16C, KASVI) e marcadores de peso molecular (100 pb Plus II DNA Ladder – TransGen Biotech). O 100bp DNA Ladder é um marcador de peso molecular pré-misturado, contendo oito fragmentos lineares de DNA de fita dupla. O DNA Ladder é adequado para uso como padrões de peso molecular para eletroforese em gel de agarose. A escada de DNA contém fragmentos de DNA de 100 pb -1,5 kb. A banda de 500bp (100 ng/5 µl) dobrou a

intensidade de outras bandas para servir como banda de referência. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de UV acoplado a fotodocumentador (Forlab, Brasil) (Okuno et al,2018; Choi et al, 2013; Babu et al.,2013).

3. Resultados e Discussão

As 30 amostras de vegetais minimamente processados selecionadas no estudo foram compradas nas regiões da zona norte, zona sul e zona oeste da cidade do Rio de Janeiro. No Quadro 1 é possível identificar o tipo de vegetal minimamente processado de cada amostra. Todas as amostras selecionadas são de vegetais que são comumente consumidos em sua forma crua.

Quadro 1 - Tipo de vegetal minimamente processado em cada amostra.

| Amostras | Vegetal Minimamente Processado |
|----------|---|
| 1 | Alface, repolho roxo, repolho verde e cenoura |
| 2 | Agrião |
| 3 | Couve |
| 4 | Beterraba |
| 5 | Alface |
| 6 | Cenoura |
| 7 | Cenoura e repolho verde |
| 8 | Repolho roxo |
| 9 | Repolho verde |
| 10 | Pepino |
| 11 | Tomate cereja |
| 12 | Pimentão |
| 13 | Alface, agrião cenoura e cebola |
| 14 | Cenoura |
| 15 | Cebola |
| 16 | Tomate |
| 17 | Pimentão |
| 18 | Acelga |
| 19 | Cenoura e beterraba |
| 20 | Repolho verde |
| 21 | Espinafre |
| 22 | Agrião |
| 23 | Repolho verde e cenoura |
| 24 | Couve, cenoura, repolho roxo |
| 25 | Couve |
| 26 | Cenoura |
| 27 | Beterraba |
| 28 | Acelga repolho e beterraba |
| 29 | Agrião, couve e repolho verde |
| 30 | Acelga e agrião |

Fonte: Autores.

O consumo de vegetais minimamente processados tem sido aumentando porque as pessoas têm menos tempo para comer, juntando então a conveniência com benefícios a saúde. Além disso, este setor tem apresentado importantes avanços devido aos atributos semelhantes aos vegetais in natura (Putnik et al. 2017; Cole e Singh 2018; Schuh et al. 2020). Os alimentos minimamente processados apresentam vida de prateleira reduzida devido às etapas de processamento. Assim, é necessário controlar o crescimento de bactérias mesófilas aeróbicas. Além disso, as condições inadequadas de armazenamento contribuem para as altas contagens observadas nestes produtos. Várias bactérias patogênicas transmitidas por alimentos são mesófilico; portanto, altas contagens desse grupo patogênico podem predizer condições favoráveis para crescimento, o que traz

riscos à saúde dos consumidores (Maistro et al. 2012). Dados coletados de 2008 a 2014 mostraram que surtos associados a ingestão de frutas e hortaliças resultou em 2.926 casos da doença e levou a 347 internações no Brasil (Elias et al. 2018).

Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2013) e a legislação europeia colocaram os vegetais verdes folhosos (em particular alface e espinafre) nos níveis mais elevados de um grupo prioritário por seu forte envolvimento em surtos de doenças em nível mundial. A legislação Europeia também está colocando diversos critérios microbiológicos como índices do processo higiênico e de segurança, propondo que a recuperação de *E. coli* em VMP é um índice do processo higiênico sob o qual são produzidos, e a recuperação de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* é um índice de segurança. *Salmonella spp.* e alguns sorotipos de *Escherichia coli* são os principais microrganismos patogênicos associados à contaminação de vegetais frescos. Esses micro-organismos desempenham um papel significativo em vários surtos alimentares registrados em todo o mundo (Gurler et al. 2015).

Os vegetais frescos são colonizados por milhares de espécies microbianas que podem ou não fazer parte do seu microbioma natural. Microrganismos estranhos podem ser encontrados associados a plantas devido a contaminação de diferentes fontes, como água de irrigação impura, fertilizantes orgânicos, animais e dejetos humanos (Holden et al, 2009). Se patogênicos, esses microrganismos podem influenciar a saúde humana de várias maneiras e portanto, apresentam sérios desafios de segurança alimentar. Vários estudos já exploraram novos patógenos humanos específicos associados a plantas (Berger et al, 2010; Schikora et al, 2012)

Patógenos humanos verdadeiros ou oportunistas foram encontrados e relatados com surtos de origem alimentar devido à sua adaptação ao solo e à superfície das plantas (Holden et al, 2009). Eles podem ser altamente competitivos por nutrientes e produzir agentes antimicrobianos para suprimir a microflora nativa e colonizar as superfícies das plantas. Por exemplo, cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* estão bem documentadas colonizando trigo e morangos, respectivamente (Suckstorff et al, 2003). Uma capacidade semelhante de Burkholderia cepacia para causar infecções em plantas e humanos também foram relatadas (Bernier et al, 2003). Além dos verdadeiros patógenos humanos (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*), uma série de potenciais patógenos humanos, como *Achromobacter xylosoxidans*, *Janthinobacterium lividum*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter amnigenus*, *Bacillus cereus* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram relataram estar presentes em ambientes associados a plantas (Teplitski et al, 2011; Mendes et al, 2013).

As técnicas de detecção de microorganismos em alimentos que tem uma ação mais rápida, específica, sensível e eficiente, podem ser classificadas em técnicas baseadas em sequências de ácidos nucleicos (como reação em cadeia da polimerase (PCR), multiplex-PCR, PCR em tempo real, amplificação isotérmica mediada por loop, sequência de ácido nucleico, tecnologia baseada em biossensores e métodos imunológicos (Law, Ab Mutalib, Chan, & Lee, 2015).

Saladas pré-embaladas e prontas para consumo, como os examinados neste estudo, são lavados em água clorada, esta medida já foi demonstrada insuficiente para remover *S. maltophilia* desses itens, possivelmente porque pode existir biofilmes. *S. maltophilia* é capaz de formar biofilmes em vários materiais (Brooke, 2012).

Na análise de PCR realizada nesse estudo não foi possível identificar a presença da bactéria *S. maltophilia* em nenhuma das 30 amostras, o que corresponde a 100% das amostras analisadas. Em contra partida em um estudo realizado por Qureshi et al. (2005), *S. maltophilia* foi encontrada em 14 (78%) das 18 saladas analisadas de manjeriço doce, couve e salsa. Além disso foram coletadas colônias e 11 dos 12 isolados analisados confirmaram ser de *S. maltophilia* e demonstraram resistência a antibióticos e/ou habilidades de formação de biofilme indicando que são linhagens diferentes com variabilidades genéticas. No presente estudo também foi analisado amostras de couve, que é um alimento que frequentemente é utilizado sem ser cozido, por exemplo em sucos e saladas, mas ao contrário do estudo de Qureshi et al. (2005) não foi encontrado a bactéria.

Karumathil et al., 2016 encontrou em 6% das batatas e 2% das amostras de alface testadas a presença de *S. maltophilia*, que é comumente encontrados associados com a rizosfera de plantas, como batata, trigo e pepino. Não se sabe ao certo se a contaminação ocorreu em alguma etapa do processamento ou se já estava no vegetal. como em um estudo realizado por Berg et al. em que foram encontrados vários isolados de *S. maltophilia* de rizosferas de plantas e estes apresentaram resistência a vários antibióticos, incluindo imipenem.

A *S. maltophilia* resistente a medicamentos também foi recuperada de alimentos, incluindo gelo comestível (Gaglio et al, 2017; Nakayama et al, 2017), alimentos de rua prontos para consumo (Lin et al, 2017), vegetais minimamente processados (Ali, 2019; Gaglio et al, 2017; Karumathil et al, 2016; Li et al, 2019) e queijos (Okuno et al, 2018; Todaro et al, 2011)

A *S. maltophilia* foi um dos seis principais patógenos isolados de pacientes com pneumonia em unidades de terapia intensiva (UTIs) dos EUA durante 2015 a 2017, entre os 10 principais patógenos causadores pneumonia em pacientes em centros médicos latino-americanos durante 2008 a 2010. Como poucos novos antimicrobianos estão disponíveis para tratar essa doença intrinsecamente resistente, há uma necessidade crítica de compreender as interações de *S. maltophilia* com seu ambiente e desenvolver novas estratégias de intervenção. (Brown et al, 2012; Suckstorff et al, 2003)

Recentemente, Apisarnthanarak et al., em estudo prospectivo de pacientes hospitalizados pacientes oncológicos, identificou colonização intestinal por *S. maltophilia* em 4 (9,5%) de 41 pacientes, o que enfatiza que os alimentos podem ser uma fonte potencial desta bactéria para alguns pacientes.

A importância de *S. maltophilia* em saladas prontas, que são comercializadas de forma que produto não precisa de lavagem antes o consumo é desconhecido; apesar da presença da bactéria esses produtos servem para destacar recomendações que esses itens devem ser evitados por pessoas gravemente imunocomprometidas, especialmente aquelas com neutropenia (Berg & Martinez, 2015).

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete Gram-negativo e tem sido implicado em várias infecções humanas e foi relatada como responsável para até 10% de todas as infecções humanas e é um dos importantes patógenos bacterianos comumente isolados de várias amostras clínicas e ambientais. Suas infecções em indivíduos saudáveis incluem foliculite, endocardite, osteomielite e escleroceratite (Doustdar et al., 2019; Radford et al., 2000; Tate et al., 2003). Invadem o tecido do hospedeiro e causam infecção e septicemia em hospedeiros imunocomprometidos, como pacientes portadores de HIV/AIDS, fibrose cística, bronquiectasias e pulmonares obstrutivas crônicas graves, queimaduras ou pacientes após remoção maligna ou urinária. Em relação ao trato gastrointestinal, *P. aeruginosais* está ligada à gastroenterite em lactentes e crianças imunocomprometidos e saudáveis, causando a febre de Xangai com enterite necrosante e sepsis e, embora rara, enterite necrosante em adultos (Cheng et al., 2009; Victorica e Galván, 2001).

Surtos de *P. aeruginosa* em hospitais geralmente estão ligados à contaminação cruzada entre pacientes e reservatórios ambientais comuns - água da torneira, pias e bebedouros (Costa et al., 2015; Zhou et al., 2016). No entanto, quando não há amostras positivas no ambiente da enfermaria, alimentos e drogas podem ser as possíveis fontes de *P. aeruginosa*. De acordo com o International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC), a *P. aeruginosa* está entre os patógenos adquiridos em hospitais que levam a infecções associadas a ventiladores, implantes cirúrgicos, cateteres centrais e cateteres urinários (Rosenthal et al., 2020). Por causa de sua patogenia recalcitrante e resistência a medicamentos, esse organismo é listado como um patógeno de séria ameaça pelos Centros dos EUA para Controle de Doenças (CDC) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (CDC AR, 2019; Talebi Bezmin Abadi et al., 2019).

A PCR tem sido amplamente empregada como um método rápido e específico para a detecção de *P. aeruginosa* em uma variedade de alimentos e ambientes de processamento devido à sua alta especificidade, sensibilidade, economia de tempo e fácil operação. A maioria dos métodos baseados em PCR relatados para identificar e caracterizar genes de virulência bacteriana alvo de *P. aeruginosa* usam os genes de rRNA 16S e 23S (Wei et al., 2015; Wang et al., 2016).

No estudo de Odumosu et al, 2016 foi encontrada uma maior porcentagem de *P. aeruginosa* em vegetais prontos para o consumo do que em isolados de animais e fontes humanas. A porcentagem da presença de *P. aeruginosa* nas amostras foi de aves 100%, legumes 54/82 (66%), isolados clínicos 22/112 (19,6%) e esterco de vaca 7/41 (17%). Um isolamento semelhante de alta prevalência em vegetais também foi relatado por Oluyeye et al. 2015 e Sabry et al. 2011. *P. aeruginosa* em vegetais prontos para o consumo já foi encontrada em supermercados, cozinhas hospitalares, cantinas e vendedores ambulantes (Allydice- Francis & Brown, 2012; Nithya & Babu, 2017; Viswanathan & Kaur, 2001). Tais contaminações podem ter ocorrido por diferentes exposições durante o manuseio, processamento, embalagem, transporte ou armazenamento.

No presente estudo em nenhuma das 30 amostras, correspondendo a 100% das amostras de vegetais minimamente processados analisadas foi encontrada a bactéria *P. aeruginosa* pelo método de PCR. Outros estudos porém, demonstram que essa bactéria já foi encontrada em diferentes tipos de vegetais prontos para o consumo como por exemplo: pimentão (Linu et al., 2019), pimenta (Kumar et al., 2013), tomate (Iasur- Kruh et al., 2020). A presença de *P. aeruginosa* em fezes de animais que é intencionalmente usado como fertilizantes ou involuntariamente na forma de excrementos de animais criados ao ar livre no solo sugere uma possível fonte de contaminação dos vegetais crus. (Odumosu et al, 2016). De acordo com Kominos et al. (1972), se uma pessoa consumir uma porção média de salada de tomate ela pode ingerir até 5.103 UFC de *P. aeruginosa*. Historicamente, Correa et al. 1991 relataram que pacientes oncológicos foram alimentados com amostras de vegetais prontos para o consumo e 19% dessas amostras estavam contaminadas com *P. aeruginosa*, mesmo sendo utilizado o hipoclorito a 1% como desinfetante.

Essa resistência a agentes sanitizantes é um grande problema para garantir a segurança do consumo de vegetais minimamente processados. Sabendo que a *Pseudomonas* são a comunidade bacteriana mais abundante no solo (Janssen, 2006), e em algumas áreas, quase 78% delas são *P. aeruginosa*, os vegetais poderiam ser então um dos alimentos que mais teriam contaminação e a suposição inicial de que *P. aeruginosa* habita plantas e humanos são duas espécies diferentes foi defenestrada pela demonstração da capacidade da *P. aeruginosa* clínica de colonizar plantas (Schroth et al., , 2018). Além disso, Alonso et al. (1999) demonstraram que isolados ambientais de solo contaminado apresentam virulência e resistência a antibióticos semelhantes às cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Uma vez que o consumidor for um indivíduo saudável, esse consumo não tem demonstrado nenhum risco, mas o mesmo não acontece em indivíduos imunocomprometidos.

A literatura contém estudos da qualidade microbiológica de vários vegetais minimamente processados em países ao redor do mundo, e a *Salmonella spp.* é uma das bactérias mais procuradas nesses estudos. Ela é responsável por muitos surtos de origem alimentar. em todo o mundo, com milhões de casos, mais de 100.000 mortes, e a maior taxa de hospitalização de qualquer doença bacteriana transmitida por alimentos (CDC, 2020; OMS, 2020). Relatos de salmonelose relacionados ao consumo de produtos minimamente processados têm crescido nos últimos anos (CDC, 2020; EFSA, 2019).

A salmonela é o mais importante patógeno de origem alimentar no Brasil (Gomes et al., 2013). A presença de salmonella em produtos frescos é favorecida em condições de alta (>80%) umidade relativa (UR) (Lopez-Galvez, Gil, & Allende, 2018; Williamson et al., 2018) e que sobrevivem em frutas minimamente processadas em temperaturas de refrigeração (Guo, Li, Han, & Cai, 2016; Tian, Bae, & Lee, 2013). Como vegetais minimamente processados sofrem cortes e serem alimentos com grande quantidade de água, se torna um ambiente propício para seu crescimento (Kang, Kim, Jeong, Park, & Seo, 2018). A água de lavagem desses produtos também foi descrita como uma fonte de contaminação cruzada, caso o vegetal não seja bem higienizado. (Holvoet et al., 2014; Jensen, Friedrich, Harris, Danyluk, & Schaffner, 2015; Perez-Rodriguez et al., 2014;). Ceuppens et al. (2014) realizaram uma qualidade microbiológica de alface durante a produção primária no Brasil e constataram a presença de *Salmonella* e *E. coli* de 260 amostras, das quais apenas uma era alface e as demais eram esterco, solo e água. A prevalência de *Salmonella* foi de 5,6% no esterco, 2,6% no solo, 1,9% na água e 1,3% na alface.

No presente estudo nenhuma das 30 amostras analisadas por PCR foi encontrada a presença de *Salmonella spp.* A identificação presuntiva dos isolados pertencentes ao gênero *Salmonella* foi avaliada através da amplificação do gene *invA*, localizado na ilha de patogenicidade 1 que codificam as proteínas do sistema de secreção de tipo III, descritas como essenciais para a invasão das células epiteliais por *Salmonella*. A patogenicidade da salmonela depende de uma variedade de fatores de virulência que auxiliam o patógeno nos mecanismos de adesão e invasão. O gene de invasão (*invA*) existe na maioria das cepas de *Salmonella*. (Chuanchuen et al., 2010).

Em outro estudo realizado no Brasil, Brandão et al. (2014), também não encontrou *Salmonella spp.* em qualquer alface analisada. Smanioto et al (2009) não encontraram *Salmonella spp.* em nenhuma das 15 amostras vegetais analisadas em Bauru, São Paulo, e Prado et al. (2008) não encontraram *Salmonella sp.* em VMP comercializados em Ribeirão Preto, SP. Em um Estudo realizado com 512 amostras de vegetais minimamente processados em São Paulo, Brasil encontrou menos de 1% (n = 4) de contaminação com *Salmonella spp.* (Sant'ana et al. 2011). No entanto, Ferreira e cols. (2016) e Oliveira et al. (2011) encontraram *Salmonella sp.* em 50% (n = 6) e 1,2% (n = 2) das amostras vegetais analisadas, respectivamente. Gurrador et al. (2015) encontraram o patógeno em 8% (n = 14) das amostras de salada analisadas. Schuh et al. (2020) enfatizam que a qualidade e a vida útil de vegetais minimamente processados dependem justamente da cadeia produtiva, desde a aquisição da matéria-prima, até o processamento e marketing. Segundo Cruz et al. (2019), vegetais minimamente processados são vulneráveis a deterioração e, em seguida, deve ser armazenado a 1-5°C.

Este estudo mostrou uma notável ausência da salmonella, ao mesmo tempo, Araújo et al. (2011) obtiveram uma prevalência de 100% de *Salmonella spp.* dentro saladas cruas de restaurantes de Pombal, na Paraíba. Oliveira et al. testaram 162 amostras de vegetais folhosos minimamente processados no Brasil e relataram que 53,1% continham *E. coli*, 3,7% de *Listeria spp.* e 1,2% de *Salmonella spp.* Outros estudos realizados na UAN por Fröder et al. (2007), Dias et al. (2011) e Maistro et al. (2012), a prevalência de *Salmonella spp.* nas amostras de salada foi de 3, 28,57 e 16,86%, respectivamente. A presença de *Salmonella spp.* também foi observada em saladas de restaurantes no México, onde Gómez-aldapa et al. (2013) encontraram prevalência de 6,8% em saladas cruas, enquanto Leon et al. (2013) encontraram prevalência de 1% em saladas cozidas.

4. Conclusão

O presente estudo não encontrou *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.* nas amostras analisadas. Esse resultado não descarta a presença dessas bactérias em vegetais minimamente processados, que já foram encontrados em diversos estudos, como os aqui citados. Os vegetais minimamente processados possuem uma grande microbiota com diferentes gêneros de bactérias e essas com resistência aos antibióticos, podendo se tornar um risco aos consumidores. Apenas alguns Estados Federativos brasileiros possuem uma estrutura de sistema de vigilância de doenças transmitidas por alimentos e relatórios regulares as autoridades sanitárias, consequentemente não é possível determinar o grau de risco dos resultados obtidos que podem estar superestimados ou subestimados (Gomes, Franco, & Martinis, 2013). Seria de grande importância uma maior investigação de casos e surtos de doenças transmitidas por alimentos pelas autoridades e mais estudos que analisem a qualidade microbiológica dos vegetais minimamente processados no Brasil, e estudos que possam vir a desenvolver métodos práticos, rápidos e eficazes para melhor detecção dessas bactérias em alimentos, facilitando a fiscalização do controle higiênico sanitário desses produtos.

Referências

Ali B. (2019). Functional and genetic diversity of bacteria associated with the surfaces of agronomic plants. *Plants* 8:91.

- Allydice-Francis, K., and Brown, P. D. (2012). Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *Int. J. Microbiol.* 2012:426241
- Alonso, A., De La Fuente, C., Martín-arnau, A. M., Irala, J., Martínez, J. A., Martínez-González, M. A. (2004). Fruit and vegetable consumption is inversely associated with blood pressure in a Mediterranean population with a high vegetable-fat intake: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study. *Br J Nutr.* 92(2): 311-9.
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y. (2006) Multidrug-resistant. *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:43-8.
- Alves, A. R. F. (2012). Doenças alimentares de origem bacteriana. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). *Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa*, Porto.
- Anuj, S. N., Whiley, D. M., Kidd, T. J., Bell, S. C., Wainwright, C. E., Nissen, M. D., & Sloots, T. P. (2009). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 63(2), 127-131.
- Apisarnthanarak, A., Mayfield, J. L., Garison, T., McLendon, P. M., DiPersio, J. F., Fraser, V. J., & Polish, L. B. (2003). Risk factors for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in oncology patients: a case-control study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 24(4), 269-274.
- Araújo, M.S., Rodrigues, M.S.A., Silva, R.A.S., Martins, W.F., Araújo, A.S. (2011). Análise microbiológica de saladas servidas em restaurantes da cidade de Pombal – PB. *Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Pombal, 1(1), 1.
- Authority, E. F. S. (2021). The European union one health 2019 zoonoses report. *Efsa Journal*, 19(2).
- Babu, L., Reddy, P., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2013). Optimization and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of a prominent foodborne pathogens of Enterobacteriaceae. *Ann Microbiol*, Berlin, 63, 1591-1599.
- Bastos, J., Lunet, N., Peleteiro, B., Lopes, C., & Barros, H. (2010). Dietary patterns and gastric cancer in a portuguese urban population. *Int. J. Cancer.*127(2): 433-41.
- Berg, G., & Martinez, J. L. (2015). Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. *Front. Microbiol.* 6:241.
- Bennett, S. (2014). Increasing Number and Greater Morbidity and Mortality Associated with Multistate Foodborne Disease Outbreaks – United States, 1973–2010. In: 2014 ANNUAL MEETING, 2014, Tóquio, *International Association for Food Protection*, Des Moines.
- Brandão M. L. L., Almeida, D. O., Bispo, F. C. P., Bricio, S. M. L., Marin, V. A., & Miagostovich, M. P. (2014). Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J Food Sci*, 79.
- Brasil. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 331, de 23 de dezembro de 2019. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019.
- Brasil. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2019.
- Brasil. (2014). Ministério da Saúde. *Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos*. Brasília, DF.
- Brasil. (2001). Ministério da Saúde. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Resolução RDC, de 12 de janeiro.
- Bernier, S., P.; Silo-Suh, L., Woods, D. E., Ohman, D. E., & Sokol, P. A. (2003). Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. *Infect. Immun.* 71, 5306–5313.
- Brasil (2001). Congresso. Senado. Resolução n.º 12, de 2 de janeiro. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF. Seção 1, p. 39.
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 25:2–41.
- Brown, S. P., Cornforth, D. M., & Mideo, N. (2012). Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol.* 20, 336–342.
- Dias, H. S., Pinto Júnior, W. R., Zanuto, M. E., Fonseca, N. T., Oliveira, A. S., & Porto, S. S. (2011). Avaliação microbiológica de saladas de vegetais com maionese, servidas em restaurantes comerciais *self-service* por quilo, na região Central de Vitória da Conquista, BA. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, 25(194/195), .1-2.
- Doustdar, F., Karimi, F., Abedinyfar, Z., Amoli, F. A., & Goudarzi, H. (2019) Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with eye infections referred to Farabi Hospital, Tehran, Iran. *International Ophthalmology*, 39, 1581–1587.
- CDC - Centers for disease control and prevention. (2020). *Questions and answers: Salmonella*. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html/>. (Accessed 24 February 2019).
- Cheng, Y. L., Lee, H. C., Yeung, C. Y., & Chan, W. T. (2009). Clinical significance in previously healthy children of *Pseudomonas aeruginosa* in the stool. *Pediatrics and Neonatology*, 50(1), 13–17.
- Choi, H. J., Kim, M. H., Cho, M. S., Kim, B. K., Kim, J. Y., Kim, C., & Park, D. S. (2013). Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(8), 3643–51, abr. 2013.

- Cole, M. L. & Singh, O. V. (2018). Microbial occurrence and antibiotic resistance in ready-to-go food items. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2600–2609.
- Correa, C. M. C., Tibana, A., & Gontijo Filho, P. P. (1991). “Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a university and oncology hospital of Rio de Janeiro,” *Journal of Hospital Infection*, 18(4), 301–306.
- Costa, D., Bousseau, A., Thevenot, S., Dufour, X., Laland, C., Burucoa, C., & Castel, O. (2015). Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. *Journal of Hospital Infection*, v.91, 3, p.271–274.
- Craun, G. F., Calderon, R. L., & Craun, M. F. (2005). Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environ. Health Res.* 15 (4), 243–262.
- Ceuppens, S., Hessel, C. T., Rodrigues, R. Q., Bartz, S., Tondo, E. C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 67–76.
- Chuanchuen, R., Ajariyakhajorn, K., Koowatanukul, C., Wannaprasat, W., Khemtong, S., & Samngannim, S. (2010). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from dairy cows. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(1), 63–69.
- Cruz, M. R. G. D., Leite, Y. J. B. D. S., Marques, J. D. L., Pavelquesi, S. L. S., Oliveira, L. R. D. A., Silva, I. C. R. D., & Orsi, D. C. (2019). Microbiological quality of minimally processed vegetables commercialized in Brasilia, DF, Brazil. *Food Science and Technology*, 39, 498–503.
- Denoya, G. I., Vaudagna, S. R., & Polenta, G. (2015). Effect of high pressure processing and vacuum packaging on the preservation of fresh-cut peaches. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 801–806.
- Elias, S. O., Tombini Decol, L., & Tondo, E. C. (2018). Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. *Food Quality and Safety*, 2(4), 173–181.
- Ferreira, C. C., Gregório, E. L., Costa, J. D., de Paula, R. B. O., de Araujo Neta, H. A. G., & Fontes, M. D. (2016). Análise de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Belo Horizonte-MG. *HU Revista*, 42(4), 307–313.
- Froder, H., Martins, C. G., Souza, K. L. O., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., & Destro, M. T. (2007). Minimally processed vegetable salads: Microbial quality evaluation. *Journal of Food Protection*, 70, 1277–1280.
- Fortuna, J. L., & Franco R. M. (2005). Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v.19, nº.128, p.33–44.
- Gaglio, R., Francesca, N., Di Gerlando, R., Mahony, J., De Martino, S., Stucchi, C., Moschetti, G., Settanni, L. (2017). Enteric bacteria of food ice and their survival in alcoholic beverages and soft drinks. *Food Microbiol.* 67:17–22.
- Gallo, S. W., Ramos, P. L., Ferreira, C. A. S., & Oliveira, S. D. D. (2013). A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 390–391.
- Germiller, J. A., El-Kashlan, H. K., & Shah, U. K. (2005). Chronic *Pseudomonas* infections of cochlear implants. *Otology & neurology*, 26(2), 196–201.
- Gurler, Z., Pamuk, S., Yildirim, Y., & Ertas, N. (2015). The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 79–83.
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and *Salmonella* in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican Restaurants. *Journal of Food Science*, 78(8), M1201–M1207.
- Guo, Y., Li, M., Han, H., & Cai, J. (2016). *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis on fresh-cut cucumber slices after reduction treatments. *Food Control*, 70, 20–25.
- Holden, N., Pritchard, L., & Toth, I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 689–703.
- Holvoet, K., De Keuckelaere, A., Sompers, I., Van Haute, S., Stals, A., & Uyttendaele, A. (2014). Quantitative study of cross-contamination with *Escherichia coli*, *E. coli* O157, MS2 phage and murine norovirus in a simulated fresh-cut lettuce wash process. *Food Control*, 37, 218–227.
- Iasur-Kruh, L., Bari, V. K., Abu-Nassar, J., Lidor, O. & Aly, R. (2020) Characterization of an endophytic bacterium (*Pseudomonas aeruginosa*), originating from tomato (*Solanum lycopersicum* L.), and its ability to inhabit the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Plant Signaling and Behavior*, 15, 1766292.
- IFPA. (2007). *Internacional Fresh-Cut Produce Association*.
- Jang, T. N., Wang, F. D., Wang, L. S., Liu, C. Y., & Liu, I. M. (1992). *Xanthomonas maltophilia* bacteremia: an analysis of 32 cases. *Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi*, 91(12), 1170–1176.
- Janssen, P. H. (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environment Microbiology*, 72, 1719–1728.
- Jensen, D. A., Friedrich, L. M., Harris, L. J., Danyluk, M. D., & Schaffner, D. W. (2015). Cross contamination of *Escherichia coli* O157:H7 between lettuce and wash water during home-scale washing. *Food Microbiology*, 46, 428–433.
- Joseph, J., Cole, G., Head, E., & Ingram, D. (2009). Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 12795–12801.
- Holden, N., Pritchard, L., & Toth, I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 689–703.

- Kang, I. B., Kim, D. H., Jeong, D., Park, J. H., & Seo, K. H. (2018). Heat resistance of *Salmonella* Enteritidis under prolonged exposure to acid-salt combined stress and subsequent refrigeration. *International Journal of Food Microbiology*, 285(1), 165–172.
- Karumathil D. P., Yin, H.-B., Kollanoor-Johny, A., & Venkitanarayanan, K. (2016). Prevalence of multidrug-resistant bacteria on fresh vegetables collected from farmers' markets in Connecticut. *J Food Prot* 79:1446–1451.
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect.* 73:338e344.
- Kominos, S. D., Copeland, C. E., Grosiak, B. & Postic, B. (1972) Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Applied Microbiology*, 24, 567–570
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (2001). *Diagnóstico Microbiológico*. (5ª Ed.) Medsi.
- Kottwitz, L. B. M., Back, A., Leão, J. A., Alcocer, I., Karan, M., & Oliveira, T. C. R. M. (2008). Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 496-498.
- Kumar, A., Munder, A., Aravind, R., Eapen, S.J., Tümmler, B. & Raaijmakers, J.M. (2013) Friend or foe: genetic and functional characterization of plant endophytic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 15, 764–779
- LaSala, P. R., Segal, J., Han, F. S., Tarrand, J. J., & Han, X. Y. (2007). First reported infections caused by three newly described genera in the family Xanthomonadaceae. *Journal of clinical microbiology*, 45(2), 641-644.
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.
- León, B. H., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Vázquez-Barrios, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. *Letters in applied microbiology*, 56(6), 414-420.
- Li, D., Wong, C. H., Seet, M. F., & Kuan, N. (2019). Isolation, characterization, and inactivation of *Stenotrophomonas maltophilia* from leafy green vegetables and urban agriculture systems. *Front Microbiol* 10:2718.
- Lin, L., Wang, S. F., Yang, T. Y., Hung, W. C., Chan, M. Y., & Tseng, S. P. (2017). Antimicrobial resistance and genetic diversity in ceftazidime non-susceptible bacterial pathogens from ready-to-eat street foods in three Taiwanese cities. *Sci Rep* 7:15515.
- Linu, M. S., Asok, A. K., Thampi, M., Sreekumar, J. & Jisha, M.S. (2019) Plant growth promoting traits of indigenous phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chilli (*Capsicum annum* L.) rhizosphere. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50, 444–457
- Lopez-Galvez, F., Gil, M. I., & Allende, A. (2018). Impact of relative humidity, inoculum carrier and size, and native microbiota on *Salmonella* ser Typhimurium survival in baby lettuce. *Food Microbiology*, 70, 155–161.
- Lynch, J. P. (2001). Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest.*, 119 Suppl 2:S373-84.
- Maistro, L. C., Miya, N. T. N., Sant'Ana, A. S., & Pereira, J. L. (2012). Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP - Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. *Food Control*, 28, 258–264
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 634–663.
- Nakayama, T., Há, N. C., Quoc Le P., Kawahara, R., Kumeda, Y., Sumimura, Y., & Yamamoto, Y. (2017). Consumption of edible ice contaminated with *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Stenotrophomonas* is a risk factor for fecal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Vietnam. *J Water Health.* 15:813–822.
- National Nosocomial Infections Surveillance. (2004). System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued. *Am. J. Infect. Control.*, 2004. 32:470e85.
- Nithya, A. & Babu, S. (2017) Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India. *BMC Microbiology*, 17, 64.
- Odumosu, B. T., Ajetunmbi, O., Dada-Adegbola, H., & Odutayo, I. (2016). Antibiotic susceptibility pattern and analysis of plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* from human, animal and plant sources. *Springerplus*, 5(1), 1-7.
- Okuno, N. T., Freire, I. R., Segundo, R. T. R.S., Silva, C. R., & Marin, V. A. (2018). Polymerase chain reaction assay for detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in cheese samples based on the smeT gene. *Curr Microbiol* 75:1555–1559.
- Oliveira, M. A., Souza, V. M., Bergamini, A. M., & Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22, 1400–1403
- Oluyeye J O, Oluwaniyi T T, & Ijasan O C (2015) Composition of antibiotic resistant bacteria from irrigated vegetable farmland. *J Microbiol Res* 5:161–168
- Palleroni, N. J., & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 43(3), 606-609.
- Perez-Rodriguez, F., Saiz-Abajo, M. J., Garcia-Gimeno, R. M., Moreno, A., Gonzalez, D., & Vitas, A. I. (2014). Quantitative assessment of the *Salmonella* distribution on freshcut leafy vegetables due to cross-contamination occurred in an industrial process simulated at laboratory scale. *International Journal of Food Microbiology*, 184,86–91.

- Phillippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid determined AmpC type β lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1–11.
- Prado, S. D. P. T., Ribeiro, E. G. A., Capuano, D. M., de Aquino, A. L., de Melo Rocha, G., & Bergamini, A. M. M. (2008). Avaliação microbiológica, parasitológica e da rotulagem de hortaliças minimamente processadas comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP/Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 67(3), 221-227.
- Putnik, P., Kovačević, D. B., Herceg, K., Roohinejad, S., Greiner, R., Bekhit, A. E. D. A., & Levaj, B. (2017). Modelling the shelf-life of minimally-processed fresh-cut apples packaged in a modified atmosphere using food quality parameters. *Food Control*, 81, 55-64.
- Qureshi, A., Mooney, L., Denton, M., & Kerr, K. G. (2005). *Stenotrophomonas maltophilia* in salad. *Emerging infectious diseases*, 11(7), 1157.
- Radford, R., Brahma, A., Armstrong, M. & Tullo, A.B. (2000) Severe sclerokeratitis due to *Pseudomonas aeruginosa* in non-contactlens wearers. *Eye*, 14, 3-7.
- Sabry, A. H., Abdullah, D. A., Youssuf, A. G., & Bahig, A. E. (2011). Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia. *Foodborne Path Dis* 8:1011–1018
- Santos, T. B. A., Silva, N. D., Junqueira, V. C. A., & Pereira, J. L. (2010). Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13(2), 141-146.
- Schroth, M.N., Cho, J.J., Green, S.K., Kominos, S.D. & Publishing, M.S. (2018) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. *Journal of Medical Microbiology*, 67, 1191–1201.
- Schuh, V., Schuh, J., Fronza, N., Foralosso, F. B., Verruck, S., Vargas Junior, A., & Silveira, S. M. D. (2019). Evaluation of the microbiological quality of minimally processed vegetables. *Food Science and Technology*, 40, 290-295.
- Suckstorff, I., & Berg, G. (2003). Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *J. Appl. Microbiol.* 95, 656–663.
- Smanioto, T. F., Pirolo, N. J., Simionato, E. M. R. S., & de Arruda, M. C. (2009). Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 68(1), 150-154.
- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 2074-2079.
- Suckstorff, I., & Berg, G. (2003). Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 656-663.
- Talebi, B., Abadi, A., Rizvanov, A. A., Haertlé, T. & Blatt, N. L. (2019). World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. *Bio Nano Science*, 9, 778–788.
- Tamers, S. L., Agurs-Collins, T., Dodd, K. W., & Nebeling, L. (2009). US and France adult fruit and vegetable consumption patterns: an international comparison. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(1), 11-17.
- Tate, D., Mawer, S. & Newton, A. (2003). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis associated with a swimming pool inflatable. *Epidemiology and Infection*, 130, 187–192.
- Teplitski, M., Warriner, K., Bartz, J., & Schneider, K. R. (2011). Untangling metabolic and communication networks: Interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends Microbiol.* 19, 121–127.
- Tian, J. Q., Bae, Y. M., & Lee, S. Y. (2013). Survival of foodborne pathogens at diferente relative humidities and temperatures and the effect of sanitizers on apples with different surface conditions. *Food Microbiology*, 35, 21–26.
- Todaro, M., Francesca, N., Reale, S., Moschetti, G., Vitale, F., & Settanni, L. (2011). Effect of salting technologies on the chemical and microbiological characteristics of PDO Pecorino Siciliano cheese. *Eur Food Res Technol* 233:931–940.
- Van Dam, R. M., Rimm, E. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2002). Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in US men. *Annals of internal medicine*, 136(3), 201-209.
- Victor, M. A., Arpi, M., Bruun, B., Jønsson, V., & Hansen, M. M. (1994). *Xanthomonas maltophilia* bacteremia in immunocompromised hematological patients. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 26(2), 163-170.
- Victorica, J., Galván, M. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 43(12), 49–52.
- Viswanathan, P. & Kaur, R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 205–213.
- Von Rückert, V., Saldanha, D. A., Pinto, P. S. D. A., Rodrigues, A. C. A., Bevilacqua, P. D., & Pinto, M. S. (2006). Métodos de pesquisa de *Salmonella* sp durante o abate de frangos. *Hig. aliment*, 49-54.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., & Rissanen, T. H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *The American journal of clinical nutrition*, 83(6), 1265-1271.
- Wang, Y., Geng, Y., & Hao, B. (2016). Study on the detection method of *Rhodospseudomonas palustris* with 16S rDNA PCR. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*. 5, 20–25

- Wei, L., Qing-Ping, W. U., Zhang, J. M., Ke-Gang, W. U., Guo, W. P., & Que, S. H. (2015). The pollution survey of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water and spring water and the analyses of virulence genes and antibiotic resistance of the isolates. *Microbiol. China* 42, 125–132.
- Whitby, P. W., Carter, K. B., Burns, J. L., Royall, J. A., LiPuma, J. J., & Stull, T. L. (2000). Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4305-4309.
- WHO - World Health Organization. (2020). Salmonellosis world wide. <https://www.who.int/topics/salmonella/es/#/>. (Accessed 16 March 2020).
- Williamson, K., Pao, S., Dormedy, E., Phillips, T., Nikolich, G., & Li, L. (2018). Microbial evaluation of automated sorting systems in stone fruit packinghouses during peach packing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 98–102.
- Winn, W., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico* (6ª Ed.) Guanabara Koogan.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases*, 39(3), 309-317.
- Zhang, S. M., Hunter, D. J., Rosner, B. A., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Speizer, F. E., & Willett, W. C. (2000). Intakes of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9(5), 477-485.
- Zhou, Z., Hu, B., Gao, X., Bao, R., Chen, M., & Li, H. (2016). Sources of sporadic *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in surgical ICUs: Association with contaminated sink trap. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(7), 450-455.