



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)



Claudia Titze Hessel

***ESCHERICHIA COLI O157 EM ÁGUA DE IRRIGAÇÃO: DETECÇÃO,
MULTIPLICAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA AO HIPOCLORITO DE SÓDIO***

**Porto Alegre
2015**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Claudia Titze Hessel

***ESCHERICHIA COLI O157 EM ÁGUA DE IRRIGAÇÃO: DETECÇÃO,
MULTIPLICAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA AO HIPOCLORITO DE SÓDIO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo
Coorientadora: Prof. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

Porto Alegre

2015

Claudia Titze Hessel
Nutricionista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Pela Banca Examinadora:

Homologada em:

Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

ROSANE RECH
Coordenadora – Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos – PPGCTA/UFRGS

ADRIANO BRANDELLI

ANA CAROLINA RITTER

CHEILA MINÉIA DANIEL DE PAULA

VITOR MANFROI
Diretor- Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Titze Hessel, Claudia

Escherichia coli O157 em água de irrigação:
Detecção, Multiplicação e Sobrevivência ao Hipoclorito
de Sódio / Claudia Titze Hessel. -- 2015.
102 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Coorientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Escherichia coli O157. 2. Água de irrigação. 3.
PCR em Tempo Real. 4. Multiplicação. 5. Hipoclorito
de Sódio. I. Cesar Tondo, Eduardo, orient. II. da
Silva Malheiros, Patrícia, coorient. III. Título.

“O sucesso da nossa vida e do nosso futuro depende da nossa motivação e determinação ou confiança em nós mesmos. Através das experiências difíceis, a vida, às vezes, ganha maior significado”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por minha família e por tudo que já vivi até hoje. Sei que esta é apenas mais uma conquista dentre todas que já tive e ainda terei graças à Sua benção.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, pela oportunidade de descobrir e me apaixonar pela Microbiologia de Alimentos já na Iniciação Científica. Sou grata também pela confiança que sempre depositou em mim e por todos os desafios que me proporcionou ao longo dos anos, os quais me motivam a seguir estudando e me especializando na área. Além disso, agradeço pelas colaborações internacionais que realizamos e pela grande amizade que construímos nesses cinco anos de parceria.

Agradeço também a minha co-orientadora Prof. Dra. Patrícia da Silva Malheiros por sua ternura e amizade. Muito obrigada por confiar em mim, por auxiliar na minha formação docente e na escrita e correção deste trabalho.

Agradeço, igualmente, aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) pela boa convivência e amizade, em especial ao Diego Chemello Muller e Caroline Kothe pelo auxílio nas análises e por me proporcionar passar adiante tudo o que aprendi ao longo desses dois anos; à Luana Tombini Decol que realizou as coletas das amostras; à Vera Massuti pela amizade e incansável ajuda burocrática; e à Cheila Minéia Daniel de Paula que me ensinou o mundo da Microbiologia.

Agradeço ao pessoal do Norwegian Veterinary Institute (NVI), da Noruega, pela acolhida no período em que lá estive e por me ensinarem do protocolo de PCR em Tempo Real. Sou grata especialmente à Dra. Gro Johannessen, à Marianne Økland, à Linda Emanuelsen e ao Kofitsyo Cudjoe.

Agradeço aos produtores rurais que permitiram que este trabalho fosse realizado em suas propriedades. Muito obrigada!

À minha família, Papai, Mamãe e Mandi, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas, me darem forças para continuar e por celebrar cada pequena conquista da minha vida. Aos meus avós que não se encontram mais neste plano, Vovó Zezé e Vovô Elton, eu não teria chegado até aqui sem o apoio de vocês durante toda minha formação. Aos meus tios e primas que estão sempre ao meu lado torcendo por mim.

Ao meu noivo Daivis pelo eterno amor, carinho e compreensão. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e vivê-los comigo, me apoiar a seguir estudando e por me dar colo sempre que preciso.

Aos meus amigos queridos, por todos os momentos de alegria e apoio.

Enfim, meu muito obrigado a todos que de certa forma dividiram comigo este momento.

RESUMO

A água de irrigação têm sido considerada a principal fonte de contaminação microbiológica de vegetais, em nível primário de produção. *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), principalmente do sorogrupo O157, têm causado graves surtos alimentares, envolvendo muitos alimentos, dentre eles os vegetais. No Brasil, *E. coli* O157:H7 foi recentemente isolada na água de irrigação de propriedades rurais da região Sul, demonstrando risco de contaminação do produto final. Após esse isolamento, foi desenvolvido o projeto “*Baseline study about irrigation water in Brazil and Spain: Impact of microbial quality, sources, type of irrigation systems and the type of crop on the food safety of fresh products*”. O estudo realizado na presente dissertação faz parte desse projeto e teve por objetivo investigar a contaminação por *E. coli* O157 na água de irrigação de alfaces no Sul do Brasil. Além disso, objetivou-se analisar a multiplicação desse patógeno em amostra de água de irrigação bem como sua sobrevivência ao hipoclorito de sódio. Os resultados obtidos demonstram que *E. coli* O157 foi isolada em 19,65 % das 56 amostras coletadas. A prevalência de *E. coli* O157 não foi correlacionada ao sistema de cultivo, a fonte de irrigação e ao método de irrigação. *E. coli* O157 isoladas de diferentes locais foram capazes de se multiplicar na amostra indicativa de água de irrigação, atingindo populações de $6,30 \pm 0,177$ log UFC/mL, após 48 h, em temperatura ambiente. Esses resultados demonstraram que altas contagens desse microrganismo podem ocorrer em açudes utilizados para irrigar folhosos. A exposição dos isolados de *E. coli* O157 a soluções contendo 2, 7 e 20 mg/L de cloro livre, ao longo de 45 min, reduziu aproximadamente $1,30 \pm 0,66$ log UFC/mL, o que não possibilitou atingir de níveis seguros para esse patógeno. Este estudo demonstrou a presença de *E. coli* O157 na água de irrigação no Sul do Brasil e sua capacidade de multiplicação nessas águas. Além disso, evidenciou que a cloração com até 20 mg/L não foi suficiente para controlar esse perigo biológico em condições possíveis de serem alcançadas nas propriedades rurais. Tais resultados reforçam a necessidade de adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA) para prevenir a contaminação das fontes de água de irrigação, nessas propriedades.

ABSTRACT

Irrigation water have been considered the main source of microbial contamination in vevegetables at the primary level of production. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC), mainly O157 serogroup, have caused severe food outbreaks involving many foods, including vegetables. In Brazil, *E. coli* O157:H7 was recently isolated in the water irrigation farms in the southern region, demonstrating risk of contamination in the final product. After this isolation, it was developed the project "*Baseline study about irrigation water in Brazil and Spain: Impact of microbial quality, sources, type of irrigation systems and the type of crop on the food safety of fresh products*". The study in this thesis is part of this project and aimed to investigate contamination by *E. coli* O157 in irrigation water of lettuce in southern Brazil. In addition, the objective was to analyze the multiplication of pathogens in irrigation water sample and its survival to sodium hypochlorite. The results demonstrate that *E. coli* O157 was isolated in 19.65 % of the 56 samples collected. The prevalence of *E. coli* O157 was not correlated to the cultivation system, the source of irrigation and irrigation method. *E. coli* O157 isolated from different sites were able to multiply in the sample indicative of irrigation water reaching populations of 0.177 ± 6.30 log CFU/mL after 48 h at room temperature. These results demonstrate that high counts of this microorganism can occur in reservoirs used to irrigate leafy. Exposure of *E. coli* O157 isolated from solutions containing 2, 7 and 20 mg/L of free chlorine over 45 min, reduced approximately 1.30 ± 0.66 log CFU/mL, which is not allowed to reach safe levels for this pathogen. This study demonstrated the presence of *E. coli* O157 in the irrigation water in southern Brazil and its multiplication capacity in these waters. Moreover, it showed that the chlorination up to 20 mg/L was not enough to control this biological hazard in conditions likely to be achieved in rural properties. These results reinforce the need for adoption of Good Agricultural Practices (GAP) to prevent contamination of irrigation water sources in these properties.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Cultura de Hortaliças no Brasil	13
3.2. Sistemas de irrigação utilizados na produção de alface no Brasil.....	15
3.3. Fontes de água de irrigação utilizadas na produção de alfaces	18
3.4. Água e métodos de irrigação como fonte de contaminação microbológica de vegetais.....	19
3.5. Desinfecção da água por cloração	24
3.6. <i>Escherichia coli</i> patogênicas	26
3.7. <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina Shiga (STEC).....	27
3.8. <i>Escherichia coli</i> O157	31
3.9. Métodos moleculares de detecção	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Verificação da metodologia para detecção de <i>Escherichia coli</i> O157 por PCR em Tempo Real.....	35
4.2. Coleta das amostras	37
4.3. Preparação da amostra e Análise molecular	38
4.4. Confirmação da cultura	39
4.5. Teste de multiplicação de <i>Escherichia coli</i> O157 em água de irrigação	40

4.6 Teste de sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> O157 ao hipoclorito de sódio..	42
4.7. Análise estatística dos resultados.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157 em água de irrigação.....	44
5.2. Multiplicação de <i>Escherichia coli</i> O157 em água de irrigação.....	45
5.3. Teste de sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> O157 ao hipoclorito de sódio.	46
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9. ANEXOS	80
9.1. Artigo 1	80

1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos vegetais tem sido cada vez mais estimulado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO 2003). Associado a isso, doenças transmitidas por alimentos (DTA) causadas por esses alimentos têm aumentado (QUESTED et al., 2010; BETTS 2014).

Escherichia coli produtoras de toxina Shiga (STEC), principalmente o sorogrupo O157, vem ganhando notoriedade mundial, devido ao seu envolvimento com graves surtos alimentares ocorridos em diversos países, sendo também veiculados por alimentos de origem vegetal (SCALLAN et al. 2011; CDC 2012). Nos Estados Unidos, dentre os surtos onde os patógenos responsáveis foram identificados, 13% foram atribuídos à *E. coli* O157:H7 e, no Canadá, de 1998 á 2009, 47,5% foram relacionados ao mesmo patógeno (BRADEN et al., 2013; CFIA 2014). No Brasil, estudos recentes têm demonstrado a presença deste patógeno em amostras de origem ambiental e também de alimentos (DE PAULA et al., 2014).

Em alimentos de origem vegetal é muito importante prevenir a contaminação em nível primário de produção, pois durante a cadeia produtiva e de distribuição, patógenos podem ser introduzidos, sobreviver e se multiplicar (UYTTENDAELE et al., 2015). Dentre as fontes de contaminação estão o solo, adubo orgânico compostado insuficientemente, fezes animais, má higiene dos trabalhadores ou água de irrigação e de lavagem contaminadas (CDC 2006; CEUPPENS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Dessas, a água de irrigação tem sido considerada como a principal fonte de contaminação microbiológica de vegetais (ALLENDE et al., 2008; MACHADO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; LUNA et al., 2012; STRAWN et al., 2013; ALLENDE; MONAGHAN, 2015). Além disso, diferentes métodos de irrigação podem ter potencial maior ou menor de promover a contaminação e posterior

multiplicação desses microrganismos sobre os vegetais (SCF 2002; STINE et al., 2005). Assim é fundamental controlar sua qualidade e segurança.

No estudo realizado por Rodrigues et al. (2014) em propriedades rurais produtoras de alface orgânica, no Sul do Brasil, foi detectada a presença de *E. coli* O157:H7 na água de irrigação. Após esse isolamento, foi desenvolvido um projeto cujo objetivo é realizar um estudo de referência da qualidade microbiológica da água de irrigação e seu impacto sobre a segurança dos produtos frescos, uma vez que a detecção deste patógeno em água de irrigação no Sul do Brasil revelou risco de contaminação do produto final. Neste contexto, o presente trabalho visa aprofundar o estudo de *E. coli* O157 em água de irrigação de vegetais no Sul do Brasil, e investigar sua multiplicação em água de irrigação. Também objetivou-se investigar a sobrevivência de isolados a soluções de hipoclorito de sódio, avaliando uma possível forma de controle desse patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Detectar *Escherichia coli* O157 em água de irrigação, investigar sua multiplicação em água de irrigação, bem como a sobrevivência ao hipoclorito de sódio.

2.2. Objetivos específicos

- a) Utilizar a metodologia ISO 13136:2012 para a detecção de *Escherichia coli* O157 por PCR em Tempo Real em água de irrigação.
- b) Verificar se o sistema de produção é correlacionado com maior presença de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação.
- c) Verificar se a fonte de água é correlacionada com maior presença de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação.
- d) Verificar se o método de irrigação é correlacionado com maior presença de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação.
- e) Avaliar a multiplicação de isolados de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação.
- f) Avaliar a sobrevivência de isolados de *Escherichia coli* O157 frente ao hipoclorito de sódio, com diferentes concentrações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cultura de Hortaliças no Brasil

O consumo de alimentos vegetais tem sido cada vez mais estimulado por órgãos internacionais e nacionais de saúde, pois são fontes importantes de vitaminas, minerais, fibras e estarem relacionados à redução de doenças crônicas. O consumo mínimo recomendado pela OMS de frutas e hortaliças é de 400g/dia, equivalente a 3 porções de frutas e 3 porções de hortaliças, visando garantir de 9 a 12% da energia diária, considerando uma dieta de 2000 Kcal (WHO 2003).

Estima-se que o cultivo de hortaliças reproduzidas por sementes no Brasil seja de 700 mil hectares (ABCSEM 2015). Em relação à distribuição geográfica do cultivo de hortaliças no Brasil, 75 % dessas localizam-se nas regiões Sudeste e Sul do país próximo dos grandes centros urbanos, em regiões conhecidas como “cinturões verdes”. A produção no país é predominantemente familiar, sendo que 60 % das propriedades possuem área inferior a 10 hectares de exploração. As propriedades restantes (40 %) são pequenas, médias, grandes ou em fazendas de grande porte (ABCSEM 2015).

São fatores determinantes para o cultivo das hortaliças: as condições de temperatura, umidade, luminosidade, fotoperíodo, solo e água de irrigação do local de plantio. Por exemplo, para o cultivo de hortaliças folhosas, a área de plantio deve ser plana, não sujeita a inundação, de fácil acesso e que permita irrigação. O solo pode ser arenoso, argiloso, areno-argiloso (textura média), orgânico, com ou sem presença de cascalho. Em geral, essas plantas têm ciclo curto, sistema radicular relativamente superficial e são muito exigentes de água para seu pleno

desenvolvimento (DA SILVA; MAROUELLI, 2006). A água de irrigação deve estar disponível em quantidade suficiente e ter qualidades físicas, químicas e biológicas adequadas. Além dos cuidados de cultivo, na pós-colheita de folhosas, alta iluminação em associação com baixa umidade aceleram o amarelamento das folhas (EMBRAPA 2007, SENAR 2012).

Dentre as hortaliças folhosas, a alface (*Lactuca sativa L.*) é a mais consumida no Brasil e também no mundo. Trata-se de uma hortaliça de clima ameno que pertence à tribo *Cicorae* e à família *Compositae* (MORETTI;MATTOS, 2005; MOU 2008).

O Censo Agropecuário (2006) revelou que a produção de alface no país alcançou 384.820 toneladas em 2006, tendo sido comercializada principalmente “*in natura*” (IBGE 2006; SALA;COSTA, 2012). Dados coletados em centrais de distribuição, demonstram que a alface crespa ocupa aproximadamente 65 % de participação do mercado, seguido das variedades do tipo americana (20 %), do tipo lisa (10 %) e o restante com os grupos dos tipos coloridos, extra frizz, romana e outros (MORETTI;MATTOS 2005; SALA;COSTA 2012; SUINAGA et al., 2013).

Em relação ao cultivo da alface no Brasil, esta hortaliça é cultivada durante o ano todo, principalmente no regime de campo aberto e em contato com o solo sob irrigação constante ao longo do período de desenvolvimento (EMBRAPA 2007, SUINAGA et al., 2013). Ao contrário dos sistemas de produção americano e europeu, que contam com sistema logístico de cadeia de frio de distribuição, o modelo brasileiro baseia-se na produção de alface em “cinturões verdes”, próximos aos centros consumidores desta folhosa. Assim, os produtores no campo, colhem as hortaliças nas primeiras horas da manhã ou ao fim do dia, quando a temperatura ambiente é menor, acomodam as hortaliças colhidas à sombra de árvores e realizam

a distribuição às primeiras horas da manhã (MORETTI;MATTOS 2005; EMBRAPA 2007; SALA;COSTA 2012; SUINAGA et al., 2013).

Durante a produção e na pós-colheita da alface, há diversas fontes de contaminação, tais como semente, adubo, água de irrigação, água de lavagem, equipamentos, manipulador e caixas de transporte (CEUPPENS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Assim, é essencial a manutenção da higiene ao longo de toda cadeia, a fim de reduzir a probabilidade de contaminação e deterioração. Deve-se manter os equipamentos para colheita, manuseio, armazenamento e lavagem de produtos hortícolas limpos, bem como armazenar as hortaliças em embalagens e ambientes limpos. É importante destacar que a água de lavagem deve ser, de preferência, corrente ou, se utilizados tanques, a água deve ser trocada regularmente, pois o acúmulo de fungos e bactérias pode contaminar órgãos sadios e aumentar as perdas pós-colheita (EMBRAPA 2007).

3.2. Sistemas de irrigação utilizados na produção de alface no Brasil

Os sistemas de irrigação utilizados na produção de hortaliças folhosas variam desde práticas manuais simples até práticas mecânicas mais sofisticadas. Habitualmente, métodos rudimentares, tais como mangueiras, regadores e baldes, são utilizados principalmente em países em desenvolvimento, já métodos automatizados, como sistemas de irrigação por aspersão, por canais (sulcos), por gotejamento e cultivo hidropônico, são predominantemente utilizados em países desenvolvidos (OBUOBIE et al., 2010).

A irrigação correta é essencial para a produção de alfaces. Esses vegetais são colhidos com menos de 60 dias, apresentam raízes superficiais e pouco

ramificadas (menos de 20 cm de solo) e contêm alto teor de umidade(entre 80 % e 95 % das partes comercializadas) (MAROUELLI et al., 2010; BATISTA et al., 2012).

No Brasil, devido ao clima quente, mesmo em regiões úmidas ou na estação chuvosa, a deficiência de umidade no solo é frequentemente um fator limitante para obtenção de produtividade elevada e de boa qualidade na produção. Assim, a suplementação das necessidades hídricas por meio de irrigação é essencial para o sucesso da produção de hortaliças (MAROUELLI;SILVA 2011). Conforme estudo realizado pela EMBRAPA Hortaliças (2006), um erro frequentemente cometido pelos produtores de hortaliças no Brasil é a irrigação em excesso. Esta prática favorece a incidência de doenças fúngicas e bacterianas nas plantas e eleva o uso de agrotóxico (DA SILVA; MAROUELLI, 2006; MAROUELLI et. al., 2010).

Dentre os sistemas para a irrigação de alface produzidos em campo aberto no Brasil, são utilizados predominantemente a irrigação por aspersão e irrigação por gotejamento (MAROUELLI;SILVA 2011).

3.2.1. Irrigação por aspersão

A irrigação por aspersão é o método em que a água é aplicada na através de aspersores na forma de chuva, podendo ser aplicada para qualquer tipo de solo e topografia. É o sistema que melhor possibilita a distribuição da água sobre a superfície do solo. Entretanto, esse sistema sofre interferência de fatores climáticos, como vento, e sua eficiência é prejudicada em clima quente e seco, devido a perda por evaporação (DA SILVA; MAROUELLI, 2006; MAROUELLI;SILVA, 2011; UYTENDAELE et al., 2015). Além disso, a aplicação de água sobre a parte aérea das plantas, que ocorre na irrigação por aspersão, propicia condições de alta

umidade junto à folhagem, favorecendo o desenvolvimento de doenças fúngicas e bacterianas, além de remover parte dos agrotóxicos aplicados (MAROUELLI; SILVA, 2011).

Esse sistema é o mais utilizado no Brasil em culturas cultivadas em canteiros, culturas de alta densidade e em hortaliças folhosas de modo geral, como na produção de alface (SENAR 2012). Da área total de hortaliças irrigadas no país, mais de 90 % são realizadas por aspersão (MAROUELLI et al., 2008).

3.2.2. Irrigação por gotejamento

No sistema de gotejamento a água é aplicada no entorno de cada planta ou um grupo de plantas de modo a molhar apenas a zona da raiz. Este método limita a umidade no local de aplicação, aplica a água em regime de frequência de baixo volume e é o que melhor se adapta à utilização da fertirrigação, proporcionando aplicação eficiente de nutrientes, CO₂ e alguns agrotóxicos. Além disso, se adapta bem ao plantio em linha, como no cultivo de alface (DA SILVA; MAROUELLI, 2006; MAROUELLI; SILVA 2011; SENAR 2012).

Muito embora a área de hortaliças irrigadas por gotejamento no Brasil seja muito inferior à irrigada por aspersão, seu uso tem aumentado expressivamente nas últimas décadas. Sua expansão se deu, principalmente, pela conservação da água e energia, e por permitir um maior controle no fornecimento de água as plantas (DA SILVA; MAROUELLI, 2006; MAROUELLI; SILVA, 2011; UYTENDAELE et al., 2015).

3.3. Fontes de água de irrigação utilizadas na produção de alfaces

As fontes de água para irrigação de alface incluem água advinda do sistema público de abastecimento (água municipal potável), água da chuva, de aquíferos profundos, águas subterrâneas, águas residuais, poços artesianos ou águas de superfície.

Por ser tratada, a água municipal é a de melhor qualidade, mas está disponível apenas em algumas regiões desenvolvidas e possuem custo mais elevado. Em seguida, estão águas subterrâneas, água da chuva e águas de superfície (UYTTENDAELE et al., 2015). Por sua qualidade aceitável e baixo custo, estas fontes estão sendo cada vez mais utilizadas (SUSLOW et al., 2003; JAMES 2006; MAROUELLI;SILVA 2011). No entanto, a qualidade e a sustentabilidade dos reservatórios estão naturalmente ameaçadas em algumas regiões. Isso resulta da degradação de rios de águas cristalinas, destruição de zonas úmidas, e contaminação química e microbiológica da água (REID et al., 2003).

As águas encontradas na natureza podem conter impurezas em suspensão ou dissolvidas, dificultando ou até mesmo inviabilizando o seu uso para fins de irrigação. Em dissolução, podem ser encontrados gases, sais, metais pesados e agrotóxicos. Impurezas em suspensão podem ter origem mineral, como areia, salitre e argila, ou orgânica, como matéria morta e viva. A matéria morta pode ter origem vegetal, como folhas, galhos e outros detritos vegetais, ou origem animal. Na matéria viva, podem estar presentes na água algas, bactérias, vírus, protozoários, entre outros organismos (MAROUELLI et al., 2008).

Os aspectos físicos e químicos são de grande importância para a água de irrigação, resultando na qualidade da produção vegetal. No entanto, destaca-se os aspectos biológicos, especialmente para as que são consumidas “*in natura*”. Os produtos vegetais que serão consumidos crus não devem ser irrigados com água contaminada por agentes patogênicos, frequentemente encontrados em águas superficiais especialmente nos cinturões verdes dos grandes centros urbanos (MAROUELLI et al., 2008; MAROUELLI; SILVA 2011; SENAR 2012).

3.4. Água e métodos de irrigação como fonte de contaminação microbiológica de vegetais

Qualquer fonte de água pode estar contaminada com patógenos microbianos. Este fato é bem conhecido para a água de consumo humano, motivo pelo qual ao longo dos anos diversos esforços têm sido realizados para se separar águas contaminadas por matéria fecal e fontes de água potável. Do mesmo modo, os patógenos podem estar presentes em águas utilizadas para irrigação e produção de alimentos, e, assim, introduzir-se na cadeia alimentar (UYTTENDAELE et al., 2015).

Na produção de alimentos de origem vegetal, a água de irrigação é considerada como o principal fator de risco de contaminação microbiológica (ALLENDE et al., 2008; ALLENDE; MONAGHAN, 2015). Além disso, a maioria dos vegetais têm pH 4,5 ou mais alto o que favorece a multiplicação microbiana (EMBRAPA 2007). Os alimentos mais comumente associados à contaminação microbiológica veiculada por água de irrigação são vegetais folhosos (alface, espinafre, alface e misturas ou saladas) seguidos de ervas, sementes germinadas, tomates, e *berries* (UYTTENDAELE et al., 2015).

Dentre os microrganismos patogênicos aos humanos que são carregados pelas águas de irrigação, os mais comuns incluem *Salmonella* enterica (vários sorotipos) e *E. coli* O157 produtora de Shiga toxina. Surtos associados com *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* são relativamente raros em vegetais (UYTTENDAELE et al., 2015).

O primeiro momento em que o produto fresco pode ser contaminado com patógenos é durante a fase de produção, que compreende a plantação, cultivo, irrigação e outras atividades e tratamentos associados com a produção da planta madura no campo. A contaminação dos produtos na própria fase de produção ocorre frequentemente como consequência da exposição à água ou solo contaminados (UYTTENDAELE et al., 2015).

A fonte de irrigação pode ser classificada em relação ao risco de contaminação microbiológica, em ordem crescente: água municipal (potável), água da chuva, água subterrânea, água de superfície e água residual não tratada (LEIFERT et al. 2008; PACHEPSKY et al. 2011; UYTTENDAELE et al., 2015).

Água da chuva ou água recolhida da chuva são geralmente de boa qualidade microbiológica, embora tenham mais microrganismos que a água potável. A qualidade da água da chuva depende, em parte, do modo como é recolhida ou transportada. Por exemplo, uma água da chuva recolhida do telhado pode estar contaminada com bactérias patogênicas e parasitas protozoários, devido a presença de aves, insetos e fezes de animais, especialmente após períodos relativamente longos de seca (BURCH; THOMAS 1998; AHMED et al., 2012; UYTTENDAELE et al., 2015).

Águas subterrâneas (poço artesianos) são geralmente de boa qualidade microbiológica se infiltrações superficiais são evitadas (BURCH; THOMAS 1998). Já

as águas de superfície apresentam qualidade imprevisível, uma vez que as atividades rio acima como descargas de águas residuais, presença de fezes de animais domésticos ou selvagens, entre outras fontes, podem rapidamente alterar os níveis de contaminantes que entram no fluxo de água (BURCH; THOMAS 1998; UYTTENDAELE et al., 2015).

Em geral, se espera que a irrigação com água de superfície represente maior risco para a saúde humana do que a irrigação com água subterrânea. Isso porque essas últimas têm a capacidade de evitar a contaminação fecal de animais e água de escoamento de campos adjacentes (SUSLOW et al., 2003). Além disso, a maioria destas fontes de água são naturalmente reabastecidas por precipitação, naturalmente não contaminadas (UYTTENDAELE et al., 2015). É também importante notar que, muitas vezes, diferentes fontes de água são combinadas, a fim de se obter o volume de água necessário para a irrigação (STINE et al., 2005).

Os métodos de irrigação aplicados na agricultura variam normalmente por região de cultivo. Cada método pode ter seu próprio potencial de introduzir patógenos ou promover a multiplicação desses sobre o produto (SCF 2002; STINE et al., 2005).

Na irrigação por aspersão há uma maior contaminação de culturas, pois a parte comestível do produto é exposta diretamente à água. Ainda, as gotas podem recontaminar a safra a partir da superfície do solo e patógenos contidos nas gotas em aerossol podem ser transportados pelo vento, criando um risco à saúde para os residentes nas proximidades (MARITES et al., 2010; BARKER-REID et al., 2009). Assim a irrigação por aspersão é melhor aplicada nas fases iniciais do crescimento da planta, maximizando a oportunidade da morte do patógeno até a data de colheita (UYTTENDAELE et al., 2015).

Na irrigação por gotejamento o risco de transferência de patógenos para plantas é minimizado, devido a menor exposição da água irrigada com o produto e redução de respingos em solos contaminados. Este método certamente proporciona maior grau de proteção da saúde dos trabalhadores rurais e consumidores, especialmente quando os métodos são automatizados (HAMILTON et al., 2006; SONG et al., 2006; CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2012).

Caso a fonte de água esteja contaminada por agentes patogênicos esta não deve ser utilizada para irrigação se o sistema utilizado for aspersão. Entretanto, dependendo da hortalíça e do grau de contaminação da água, o sistema de gotejamento pode ser utilizado, desde que com supervisão técnica (DA SILVA; MARUOELLI 2006; MARUOELLI; SILVA 2011).

A sobrevivência dos patógenos é igualmente importante, pois pode afetar a probabilidade de ocorrência de um surto (FONSECA et al., 2011). Pesquisas observaram que fontes com muitos nutrientes e elevada carga orgânica podem aumentar a sobrevivência de patógenos na água. O número de fatores-chave possíveis de influenciar a morte bacteriana na superfície da folha são: a baixa umidade (mais importante), alta temperatura, exposição a raios Ultra-Violeta (UV), e secagem mediada pelo vento na superfície da folha (WOOD et al., 2010; OLIVEIRA 2012; GU et al., 2013; UYTENDAELE et al., 2015).

O risco de surto associado à contaminação patogênica em vegetais por água de irrigação é maior quando a irrigação é feita logo antes da colheita (UYTENDAELE et al., 2015). Kisluk e Yaron (2012) demonstraram que um recipiente de água contendo 2,5 log/UFC de *Salmonella* spp. foi suficiente para contaminação e persistência do patógeno em vegetais por até 48 horas, após a irrigação por aspersão. Outro estudo demonstrou que a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 foi de

mais de 28 dias em vegetais contaminados com água de irrigação, sendo que na própria água a sobrevivência foi de aproximadamente 109 dias (SCOTT et al. 2006). Assim, práticas de segurança alternativas, como a suspensão da irrigação antes da colheita são recomendadas para proteção do consumidor em locais onde a qualidade da água de irrigação não é controlada (UYTTENDAELE et al., 2015).

No Brasil, os limites de contaminação da água para fins de irrigação estão regulamentados pela Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas, sem remoção de película, esta resolução estabelece o limite máximo de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL de amostra (CONAMA, 2005).

Em recente estudo realizado por Rodrigues et al. (2014), em propriedades rurais produtoras de alface orgânica, no Sul do Brasil, foi detectada a presença de *E. coli* O157:H7 na água de irrigação em uma das propriedades analisadas, após uma enchente, onde as alfaces já estavam prontas para a colheita, demonstrando possibilidade de contaminação do produto final (RODRIGUES et al., 2014). Após esse isolamento, foi desenvolvido o projeto "*Baseline study about irrigation water in Brazil and Spain: Impact of microbial quality, sources, type of irrigation systems and the type of crop on the food safety of fresh products*". Este projeto tem o objetivo de realizar um estudo de referência da qualidade microbiológica da água de irrigação e seu impacto sobre a segurança de produtos vegetais frescos, pesquisando microrganismos indicadores e patogênicos. Dentre os patógenos pesquisados no projeto estão *E. coli* STEC, incluindo o sorogrupo O157, que compreende a pesquisa realizada nesta dissertação.

3.5. Desinfecção da água por cloração

O termo “desinfecção da água” constitui a remoção, inativação ou morte de microrganismos patogênicos (EPA, 2004). Dentre os diversos métodos existentes e empregados no mundo o mais utilizado é a solubilização do cloro em água.

Este método é amplamente empregado em Estações de Tratamento de Água (ETA) para conferir potabilidade, em estações de tratamento de água para recreação humana (piscinas), em tratamento de águas residuais e em indústrias de processamento vegetal (EUROPEAN UNION 2007; WORLD CHLORINE COUNCIUL 2008).

As primeiras experiências com a aplicação de cloro na água para fins de desinfecção aconteceram em 1894 e, este se tornou o oxidante mais utilizado nas ETA, devido à sua facilidade de obtenção, baixo custo e alta eficiência (PÁDUA et al., 2007). Entretanto, diversos fatores afetam a estabilidade do cloro em água e sua ação desinfetante. Dentre eles estão o pH da água, a concentração de matéria orgânica e a exposição a luz solar (EUROPEAN UNION, 2007; VAN HAUTE et al., 2013).

Quando solubilizado em água, o cloro é convertido a cloro livre disponível (Cl_2), ácido hipocloroso (HClO) e ânion hipoclorito (OCl^-). O ácido hipocloroso é a forma mais ativa para desinfecção e está predominante nos valores de pH 5 a 7. Em pH abaixo ou acima desta faixa há predominância das formas Cl_2 e OCl^- , respectivamente, sendo essas formas de menor poder oxidante e desinfetante (MEYER et al., 1994). Assim, o grau de dissociação do cloro e seu poder desinfetante são determinados pelo pH da água em que está dissolvido.

O mecanismo de ação desinfetante do ácido hipocloroso se dá pelo rompimento das ligações químicas das moléculas presentes na célula bacteriana, quando um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por cloro. Esta substituição gera uma mudança ou perda da conformação, levando a morte do microrganismo (EUROPEAN UNION, 1998).

Além do pH da água, a concentração de matéria orgânica também influencia na eficiência do processo de desinfecção pelo cloro. O cloro reage com a matéria orgânica ficando imobilizado, diminuindo sua concentração em solução, e conseqüentemente sua ação desinfetante (EUROPEAN UNION, 1998; EPA, 2004; GÓMEZ-LÓPEZ, 2014). Assim, quanto maior a concentração de matéria orgânica em solução, maior será a necessidade de doses mais elevadas, a fim de manter um nível eficaz de cloro livre (FC), disponível para inativação microbiana (GÓMEZ-LÓPEZ, 2014). A matéria orgânica pode ser derivada da decomposição da vegetação terrestre, resultando de ácidos húmicos e fúlvicos, da decomposição de vegetais aquáticos e algas e de efluentes industriais (BECKER, 2010; MEYER et al., 1994; PÁDUA et al., 2007). A reação do cloro com matéria orgânica gera subprodutos tóxicos, tais como trihalometanos (THM), sendo dois deles (clorofórmio e bromodiclorometano) reconhecidos como possivelmente carcinogênicos para humanos. Além disso, quanto maior a dosagem de cloro em solução, maior será a probabilidade de formação de THM (IARC, 1999; MEYER et al., 1994; PÁDUA 2007; EUROPEAN UNION, 2007).

A OMS estabeleceu o valor de referência máximo de 5 mg/L para cloro livre em água de consumo humano (OMS, 2003). Na União Europeia as quantidades admissíveis de cloro livre disponível na água potável são diferentes entre os países, variando entre 0,1 e 0,5 mg/L (EUROPEAN UNION, 2007). No Brasil, segundo a

Portaria MS nº 2914/2011, da ANVISA, as águas para consumo humano devem ser submetidas a um processo de desinfecção para inativação de microrganismos patogênicos e devem conter um teor mínimo de cloro residual livre de 0,2 mg/L (BRASIL, 2011).

Já para desinfecção de vegetais a quantidade de cloro adicionado à água depende do teor específico de compostos oxidáveis, da quantidade necessária para eliminar os microrganismos, e mais uma reserva suficiente para manter um mínimo de concentração de "cloro livre disponível" (VAN HAUTE, 2013; GÓMEZ-LÓPEZ, 2014). No RS, para desinfecção de vegetais em serviços de alimentação deve-se proceder a imersão em solução clorada com 100 a 250 mg/L de cloro livre, por 15 minutos, e depois enxaguar os vegetais com água potável (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

3.6. *Escherichia coli* patogênicas

Escherichia coli (*E. coli*) são bastonetes Gram-negativos, móveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, compondo um grupo grande e diversificado de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (JAY, 2005; FENG; JINNEMAN 2011). Essas bactérias habitam naturalmente o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, sendo as mais abundantes da microbiota intestinal humana (OLSEN; GOULDING 2000; MITTELSTADT, 2006; FENG; JINNEMAN 2011). A maioria das cepas de *E. coli* não causam doenças aos humanos, no entanto, algumas cepas adquiriram genes de virulência localizados em ilhas de patogenicidade ou incorporaram bacteriófagos ou plasmídeos, que lhe conferiram diferentes tipos de patogenicidade (KAPER, 2004).

Atualmente, com base nos sintomas das doenças e em características sorológicas, as *E. coli* patogênicas são divididas em seis grupos, sendo esses: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (GUTH, 2002; SAUCEDO, 2003; KAPER, 2004; JAY, 2005, FENG; JINNEMAN 2011).

As *Escherichia coli* patogênicas são caracterizadas por possuírem os antígenos da classe O (do lipopolissacarídeo) e H (de origem flagelar). Estes também definem os sorogrupos (antígeno O único) ou sorotipos (antígenos O e H) desses microrganismos (CFIA 2014). Além disso, possuem fatores específicos de aderência que lhes permitem colonizar locais onde normalmente não habitam, como o intestino delgado e uretra. Muito frequentemente, essas adesinas formam estruturas morfológicas distintas conhecidas como fímbrias (ou pilli) (KAPER, 2004).

O termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é utilizado para as cepas que provocam algumas das seguintes síndromes clínicas: colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU) ou púrpura trombocítica trombocitopênica (PTT). De acordo com essa definição, todas as cepas EHEC são patogênicas e constituem um importante grupo de patógenos emergentes transmitidos por alimentos, tendo como principal representante o sorotipo *E. coli* O157:H7 (BELL, 2002; DE PAULA et al., 2014).

3.7. *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC)

Dentre o grupo de *E. coli* EHEC há as que produzem uma toxina denominada Shiga (*stx*), sendo conhecidas como STEC (FENG, 1995; BELL 2002;

MITTELSTADT, 2006). Atualmente, três termos são utilizados para identificar esses microrganismos: *E. coli* produtora de toxina-Shiga (STEC), *E. coli* verotoxigênica (VTEC) e *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC). De um modo geral, todas EHEC são STEC, mas nem todas STEC são EHEC (BELL, 2002; KAPER, 2004).

Esses patógenos foram relatados pela primeira vez em 1977, sendo descritos como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), pois suas citotoxinas são nocivas a células Vero, utilizadas em cultura de tecidos. Mais tarde foi descoberto que suas toxinas são semelhantes às toxinas Shiga produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (DOYLE 1984; FENG 1995; MITTELSTAEDT 2006). Desse modo, se tornaram conhecidas como STEC. Até o momento, pelo menos 100 sorotipos de *E. coli* já foram identificados como sendo capazes de produzir toxinas Shiga (KAPER et al 2004).

Toxinas Shiga são o principal fator de virulência das STEC (CALDERWOOD et al., 1996). Elas são citotoxinas de origem protéica, as quais possuem estrutura com duas subunidades (A e B) e são codificadas por bacteriófagos inseridos no cromossomo bacteriano. A subunidade A (32 kDa) constitui a parte biologicamente ativa e uma subunidade pentamérica B (monómeros de 7 kDa) media a ligação a receptores na membrana celular de células eucarióticas ao receptor celular específico chamado Globotriaosilceramida (Gb3) (SCHEUTZ;STROBINE 2005; SCHEUTZ et al., 2012).

As toxinas Shiga são codificadas por dois genes imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas, conhecidos como *stx1* e *stx2* (BELL, 2002; KAPER et al 2004). As formas partilham aproximadamente 60% de homologia de ácido desoxirribonucleico (ADN) e de aminoácidos, mas são imunologicamente distintas (SCHEUTZ;STROBINE 2005; SCHEUTZ et al., 2012). Uma cepa EHEC

pode expressar apenas o gene *stx1*, apenas o *stx2*, ambas ou múltiplas formas desse gene. Distintos subtipos têm sido identificados, que incluem: *stx1a*, *stx1c* e *stx1d*. Já subtipos para *stx2* incluem *2a STX*, *2b STX*, *2c STX*, *2d STX*, *2e STX*, *2f STX* e *2g STX* (SCHEUTZ;STROBINE 2005; SCHEUTZ et al., 2012).

Após ligação à membrana da célula alvo, moléculas de toxina são internalizadas por um mecanismo de endocitose mediado por receptores e vesículas contendo toxina são formadas. Em algumas células as vesículas contendo toxinas sofrem fusão com lisossomas resultando em degradação da toxina, em outras células, após o processamento no aparelho de Golgi e no retículo endoplasmático, a subunidade é cortada por uma protease gerando um mecanismo cataliticamente ativo levando a morte celular (LAW, 2000).

A síndrome clássica causada pela infecção por STEC é a colite hemorrágica (CH), que provoca diarreia sanguinolenta e leva a outras complicações. Após a CH cerca de 5 % das pessoas desenvolvem SHU. Na SHU ocorre diarreia, dor abdominal, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e insuficiência renal. Após a SHU, a segunda maior complicação é a PTT. Nesta síndrome ocorre microangiopatia trombótica caracterizada por uma profunda trombocitopenia, sintomas neurológicos, disfunção renal, febre e isquemia do órgão. Na ausência de tratamento, a doença está associada com uma taxa de mortalidade maior do que 90 % (NOVITZKY et al., 2005; TARR et al., 2005; SCULLY et al.,2008; PUTTALINGAMMA;NIVEDITHA, 2014).

Estudos recentes têm observado que muitas cepas de STEC não causam SHU, demonstrando que existem outros fatores de virulência adicionais que levam essas a causar doença (BOLTON 2011). Estes fatores estão presentes em ilhas de patogenicidade, que incluem “*locus of enterocyte effacement*” (LEE) e “*non-LEE-*

encoded” (NLE) (BETTELHEIM, 2007; BOLTON 2011; COOMBES et al.,2011). Um fator de virulência codificado nesta zona é o gene *eae*. Este gene codifica a proteína intimina, uma proteína de membrana externa de 94 a 97-kDa (Lei, 2000; Puttalingamma e Niveditha, 2014). O gene *eae* é responsável pela aderência do microrganismo sobre a mucosa intestinal, causando a lesão ligação-desaparecimento (*attaching and effacing*). Essa lesão está associada com drástico desordenamento do citoesqueleto da célula do hospedeiro, resultando no desaparecimento de vilosidades e na produção de uma estrutura com forma de pedestal, rica em actina polimerizada (FENG, 1995; KAPER et al 2004).

Majowicz et. al. (2014) realizaram uma revisão sistemática, a fim de determinar a incidência global de infecções e óbitos causados por STEC. O estudo englobou artigos científicos de mais de 21 países, cobrindo 30 % da população mundial. Foi estimado que STEC são responsáveis por 2.801,000 casos de doenças agudas, 3890 casos de SHU, 270 casos de falência renal e 230 mortes por ano no mundo. Apesar da baixa ocorrência de casos e mortes, infecções por STEC levam a graves sequelas, sendo mais frequentes em bebês e crianças (BRAYAN et al., 2015).

No Brasil, as pesquisas sobre STEC ainda são poucas, sendo o sorovar O157:H7 o mais investigado. No ano de 2007, Rodolpho e Marin (2007) isolaram STEC em amostras de carne, superfície de máquinas e mãos de manipuladores em açougues no Estado de São Paulo no ano de 2005 à 2006. Já Mantilla et al. (2012) isolaram 113 cepas de STEC a partir de carne bovina adquirida em comércios varejistas no município de Niterói (Rio de Janeiro), sendo essas pertencentes às classes EPEC e EIEC. No mesmo ano, 48 STEC foram isoladas a partir de amostras

de queijo Minas Frescal adquiridas no município de Araguaina, Estado do Tocantins (BORGES et al., 2012).

3.8. *Escherichia coli* O157

Escherichia coli O157 é pertencente ao grupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), enteropatogênica (EPEC), pois também têm a capacidade para causar lesões “*attaching and effacing*” nas células da microvilosidade intestinal e do subconjunto de STEC (O’SULLIVAN et al., 2008).

A *Escherichia coli* O157 geralmente não fermenta o sorbitol, não produz β -glucuronidase, é oxidase negativa, catalase positiva e indol positiva. Sua dose infectiva 10^2 organismos, é muito menor em comparação aos outros grupos de *E. coli* patogênica (HAAS et al., 2000; STRACHAN et al., 2001). Animais ruminantes e bovinos leiteiros são considerados os principais reservatórios de *E. coli* O157 (GANSHEROFF;O’BRIEN, 2000). No entanto, este microrganismo já foi isolado a partir de peixes, invertebrados, anfíbios e colonizando a superfície e tecidos de plantas (FERES;HOVDE, 2011). Além desses, a água de irrigação, de piscinas, praias, lagos, de superfície e água municipal contaminada com fezes são consideradas fontes desse microrganismo (ISLAM et al., 2004).

E. coli O157 têm se mostrado bem adaptada à sobrevivência no ambiente aquático (MAULE, 2000). Diversas pesquisas têm detectado sua presença em águas ambientais e de superfície, geralmente na presença de animais, bem como de águas residuais humanas (JOHNSON et al., 2003; GANNON et al., 2004; GARCIA-ALJARO et al. , 2005). Além disso, já foi relatada sua sobrevivência por 2 meses em amostras coletadas de rio, lago e poço contaminado por matéria fecal (AVERY et

al., 2008). Wang e Doyle (1998) relataram a sobrevivência de *E. coli* O157: H7 em água a <10 °C durante longos períodos de tempo. Similarmente, Kerr et. al. (1999) observaram a sobrevivência dessa bactéria por longos períodos em água mineral engarrafada.

Este microrganismo foi reconhecido primeiramente como um patógeno humano em 1982, após um surto de CH, nos Estados Unidos (RILEY et al., 1983). Entretanto, foi reconhecido mundialmente após um grande surto veiculado por hambúrgueres mal assados comercializados por uma rede de *fast-food*, também nos Estados Unidos (BELL et al. 1994).

No Brasil o primeiro relato de isolamento de uma cepa de *E. coli* O157:H7 ambiental ocorreu em 1997 a partir de uma amostra de água de poço na cidade de São Paulo. Diversos casos clínicos de SHU já foram relatados no país, entretanto o único caso descrito na literatura relacionado à *E. coli* O157:H7 veiculada por alimento envolvido em surto alimentar, ocorreu em Campinas, em 2001, supostamente causado por ingestão de carne mal cozida (CVE, 2013; DE PAULA et al., 2014).

No RS, Loiko et al. (2013) identificou 22 cepas de *E. coli* O157:H7, em carne bovina, produzida por um abatedouro frigorífico exportador. Rodrigues et al. (2014) isolaram *E. coli* O157:H7 em água de irrigação e de lavagem de alfaces orgânicas em uma propriedade do RS. Os trabalhos citados demonstram que a presença das STEC já é um fato no Brasil, podendo trazer graves problemas de saúde pública.

3.9. Métodos moleculares de detecção

As infecções causadas por *E. coli* O157:H7, principalmente as portadoras de gene *stx* e *eae*, devido a sua severidade, aumentam a preocupação em relação à produção e ao controle da segurança dos alimentos, uma vez que essa bactéria não é facilmente identificada através de técnicas microbiológicas convencionais. Atualmente, para a detecção de *E. coli* O157:H7 a partir de amostras ambientais e de alimentos há métodos que utilizam meios seletivos, ensaios imunológicos, testes sorológicos e métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O sucesso desses métodos é estimado com base em especificidade, sensibilidade e tempo de detecção, normalmente inferior a 3 horas.

Atualmente, a técnica de PCR, e, mais particularmente, PCR em tempo real é considerada a mais adequada para detecção e confirmação de patógenos devido à sua precisão e diagnóstico precoce (PICARDEAU et al., 2014). Assim, ensaios têm sido realizados para a detecção de importantes genes de virulência associados a *E. coli* O157: H7. Genes específicos são usados como marcadores, por exemplo, *wzy*O157 para detecção do sorogrupo e *stx1*, *stx2* e *eae* para marcadores de virulência (CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH 2009; NATARO;KAPER, 1998; PATON;PATON, 1998; MORELLI, 2008).

No PCR em tempo real se utiliza uma sonda de hibridação alvo (primers) e corantes fluorogénico (probes), sendo esses capazes de detectar a *E. coli* O157:H7 e seus genes de virulência. Esta técnica não só quantifica bactérias em amostras, mas também é mais sensível do que o PCR convencional para analisar amostras com baixo número de bactérias (KLEIN, 2002; IBEKWE et al., 2002). Estudos demonstram a sensibilidade deste método como 103 vezes mais sensível do que o

geralmente obtido com a PCR convencional (YANG et al., 2013). No entanto, este método pode sobrestimar o número de bactérias presentes, uma vez que não é capaz de discriminar entre formas viáveis, viáveis não-cultiváveis e células mortas (BJERGBAEK, 2005; NA et al., 2006). O advento deste novo método de identificação de *E. coli* O157: H7 permitiu o rápido e preciso diagnóstico clínico, análise de segurança dos alimentos e desenvolvimento de estudos epidemiológicos moleculares de doenças de origem alimentar (YANG et al., 2013).

A elevada sensibilidade, especificidade e rapidez de métodos moleculares baseados em PCR levaram ao desenvolvimento de métodos baseados nessa técnica para detectar a *E. coli* O157 a partir de amostras de água (FRAHM;OBST, 2003; HEINJNEN;MEDEMA, 2006). Recentemente a International Organization for Standardization (ISO) publicou o documento ISO 13136:2012 para a detecção de *E. coli* STEC em alimentos e amostras ambientais utilizando PCR em Tempo Real (ISO 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Verificação da metodologia para detecção de *Escherichia coli* O157 por PCR em Tempo Real

Uma vez que a metodologia ISO 13136:2012 (ISO, 2012) ainda não havia sido utilizada para detecção de *E. coli* O157 no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) foi realizada sua verificação e padronização. Esta se deu da seguinte forma:

Seis cepas de *E. coli* O157 pertencentes à biblioteca de culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) foram cultivadas em caldo Triptona de Soja (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra), adicionado de antibiótico Novobiocina (Interlab®, Paris, França) (TSBm), por 24 ± 2 horas, em estufa bacteriológica a 37 ± 1 °C. Foram realizadas diluições seriadas em solução salina a 0,85 %. De cada diluição foi realizado semeadura em ágar Mac-Conkey Sorbitol (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) suplementado com Cefixima-Telurito (Interlab®, Paris, França, SMAC-CT) e as placas incubadas, durante 24 ± 2 horas, a 37 ± 1 °C. As colônias típicas foram quantificadas, a fim de verificar quantas células viáveis estavam presentes em cada diluição, ou seja, a concentração de UFC/mL conhecida. Foi realizada a extração de DNA de cada diluição, conforme o protocolo NMKTL nº 174 (NMKL 2002). Para isso, 900 µL do caldo enriquecido foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 600 µL de Percoll (Sigma-Aldrich®, St. Luis, Estados Unidos) a concentração de 40 %. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 13.200 rpm. O fluido no topo do tubo foi removido, restando 0,1 mL no tubo. O volume restante foi transferido para um novo tubo

contendo 1,2 µL de água destilada estéril e homogeneizado, utilizando vortex por 1 minuto. O tubo foi centrifugado durante 5 minutos a 10.000 rpm. O fluido no topo do tubo foi removido, restando 0,1 µL na parte inferior. Neste tubo, 1 µL de água destilada estéril foi adicionado e o tubo foi homogeneizado novamente por 1 minuto. Este último passo foi repetido mais uma vez. Em seguida, o fluido na parte superior foi descartado, restando 0,2 µL no tubo, que foi incubado durante 20 min a 95 °C, em bloco térmico. Após a incubação, o tubo foi colocado em gelo durante 5 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto a 10.000 rpm. O DNA obtido, quando não analisado imediatamente, foi armazenado a -20 °C, até a análise de PCR.

Para análise de PCR em Tempo Real se utilizou os *primers* descritos na ISO/TS 13136:2012 (ISO, 2012), os quais identificam o gene *rfbE*, específico da *E. coli* O157. As sequências se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: *Primers* e sondas fluorescentes (*probes*) utilizados para detecção de *Escherichia coli* O157 por PCR em Tempo Real.

Gene	<i>Primer</i> inicial –sequencia iniciadora	<i>Primer</i> final – sequencia finalizadora (5' - 3')	<i>Probe</i>	Tamanho do fragmento	Registro no GenBank
<i>rfbE</i> (O157)	TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC	CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT	Probe- AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG	88	AF163329

As condições de ciclagem também estão descritas na metodologia ISO/TS 13136:2012 (ISO 2012), conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Condições de ciclagem utilizadas para detecção de *Escherichia coli* O157 por PCR em Tempo Real.

Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Ciclos
120	50	1
600	95	1
15	95	45
60	60	

4.2. Coleta das amostras

As coletas das águas utilizadas para irrigação de alfaces foram realizadas em propriedades rurais da região metropolitana de Porto Alegre. Participaram do projeto seis produtores rurais, descritos abaixo (Tabela 3):

Tabela 3. Características das seis propriedades rurais participantes do projeto.

Propriedade Rural	Sistema de Produção	Fonte de água de irrigação	Método de Irrigação
1	Orgânico	Açude	Aspersão
2	Orgânico	Açude	Gotejamento
3	Convencional	Riacho	Aspersão
4	Convencional	Açude	Aspersão
5	Convencional	Açude	Gotejamento
6	Convencional	Poço	Gotejamento

Conforme a tabela demonstra, os produtores 1, 2, 4 e 5 utilizavam açude como fonte de água para irrigação. Esses açudes eram alimentados pela água da chuva. O produtor 1 possuía dois açudes (A e B) em sua propriedade. De acordo

com o canteiro que estava sendo cultivado, o açude A ou B era utilizado para irrigação. Para fim de pesquisa foram coletadas amostras de ambas as fontes.

A coleta ocorreu quinzenalmente entre junho de 2014 e junho de 2015, totalizando 12 coletas em cada propriedade. Do produtor 1 foram coletadas 22 amostras, do produtor 2 três amostras, do produtor 3 doze amostras, do produtor 4 dez amostras, do produtor 5 oito amostras e do produtor 6 uma amostra. Como observado, houve uma diferença na quantidade de amostras coletadas entre os produtores. Isso ocorreu devido ao fato de que no dia da coleta ou em dias anteriores, as alfaces não estavam sendo irrigadas e, por isso, a água não pôde ser coletada. Para o produtor 1, a quantidade de amostra foi muito superior, pois o mesmo possui duas fontes de água de irrigação e utilizava ambas para irrigar suas culturas.

As amostras de água foram coletadas diretamente na fonte sempre no momento em que as culturas de alface estavam sendo irrigadas. Para isso, utilizou-se garrafas estéreis de 1000 mL de volume, sendo as amostras transportadas sob condições assépticas e de refrigeração em caixas térmicas para o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS), onde foram analisadas.

4.3. Preparação da amostra e Análise molecular

O protocolo ISO/TS 19458:2006 para coleta e análise microbiológica de água foi seguido para as etapas de filtração e enriquecimento. Na etapa de filtração, 1000 mL de amostra foram filtrados, utilizando membrana filtrante de 0,45 µm (Sartorius®, Goettingen, Germany). Foram utilizados tantos filtros quanto foram necessários para

filtrar o volume total da amostra, sendo trocados quando este não mais filtrava a amostra (filtro saturado pela matéria orgânica). Seguidamente, na etapa de enriquecimento, os filtros foram colocados em 225 mL de Água Peptonada Tamponada 1 % (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra), por 24 ± 2 horas, a 37 ± 1 °C.

A extração de DNA obedeceu o protocolo NMKTL nº 174 (NMKL 2002), já descrito no item 4.1. Em seguida, foi realizada a análise de PCR em Tempo Real, já descrita no item 4.1 utilizando o equipamento STEP ONE PLUS (Life Technologies®, Carlsbad, Estados Unidos).

4.4. Confirmação da cultura

Toda vez que a análise de PCR em Tempo Real demonstrou um resultado positivo para *E. coli* O157, foi realizada a confirmação da cultura, objetivando recuperar microrganismos viáveis para estudos posteriores. O isolamento foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela norma ISO/TS 16654:2001 (ISO 2001).

A partir de cada amostra enriquecida foi realizada separação imunomagnética utilizando *Dynabeads* (Life Technologies®, Carlsbad, Estados Unidos), seguida por semeadura em ágar Mac-Conkey Sorbitol (SMAC) (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) e ágar Mac Conkey Sorbitol suplementado com Cefixima-Telurito (SMAC-CT) (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas durante 24 ± 2 horas a 37 ± 1 °C. As colônias suspeitas foram submetidas a sorotipificação utilizando anti-soro de *E. coli* O157 (DIFCO®, Franklin Lakes, Estados Unidos). A partir das colônias presuntivas, ou seja, as que aglutinaram no teste sorológico, realizou-se a extração do DNA. O DNA das colônias foi extraído solubilizando-as em

0,1 mL de água ultrapura estéril e incubando durante 15 min, a 100 °C em bloco térmico. Após a extração do DNA, foi realizada análise de PCR em Tempo Real, a fim de confirmar a identidade dos isolados.

4.5. Teste de multiplicação de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação

Uma amostra indicativa de água de irrigação de uma propriedade participante do projeto foi coletada em garrafa estéril de 1000 mL e transportada sob condição asséptica e de refrigeração, em caixa térmica, para o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS). A amostra foi esterilizada em autoclave (121 °C e 1 ATM de pressão por 15 minutos), a fim de eliminar a contaminação microbiológica naturalmente presente na água.

Para a realização deste experimento foram utilizados três isolados de *E. coli* O157 isolados neste trabalho. Os mesmos foram escolhidos em função da sua procedência, sendo obtidos de diferentes produtores, sistemas de produção, fonte de água de irrigação e método de irrigação, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Características dos isolados de *E. coli* O157 analisadas quanto a resistência ao hipoclorito de sódio.

Identificação do Isolado	Sistema de Produção na fazenda	Fonte de água de irrigação	Método de Irrigação
1	Orgânico	Açude	Aspersão
3	Convencional	Riacho	Aspersão
5	Convencional	Açude	Gotejamento

Os isolados de *E. coli* O157 foram cultivadas em caldo Triptona de Soja (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) adicionado de antibiótico Novobiocina (Interlab®, Paris, França) (TSBm), por 24 ± 2 horas, em estufa bacteriológica, a 37 ± 1 °C. Após esta etapa, foi realizado semeadura por esgotamento em ágar Mac-Conkey Sorbitol (SMAC) (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) suplementado com Cefixima-Telurito (Interlab®, Paris, França) (SMAC-CT), sendo as placas incubadas por 24 ± 2 horas, a 37 ± 1 °C. Foi verificada a pureza através da morfologia da colônia típica e teste de sorotipagem utilizando anti-soro de *E. coli* O157 (DIFCO®, Franklin Lakes, Estados Unidos).

Após a confirmação da pureza, foi realizada a preparação do inóculo. Alíquotas de 100 µL dos isolados de *E. coli* O157 foram cultivadas em caldo Triptona de Soja (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra), adicionado de antibiótico Novobiocina (Interlab®, Paris, França) (TSBm), por 24 ± 2 horas, em estufa bacteriológica a 37 ± 1 °C, a fim de se obter uma suspensão fisiologicamente ativa. De cada isolado, 1 mL foi transferido para um tubo e este foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. O fluido no topo do tubo foi removido, restando o *pellet*. Então, 1,0 mL de água destilada estéril foi adicionado ao tubo e o pellet foi ressuspendido e homogeneizado utilizando vortex, por 1 minuto. Do tubo, 100 µL foi retirado e transferido para um tubo contendo 900 µL de água peptonada 0,1 % (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) para realização de diluições decimais.

Para avaliação da multiplicação em água de irrigação, alíquotas de 100µL de cada inóculo (1, 3 e 5), contendo aproximadamente 10^2 UFC/mL, foram transferidas, separadamente, para tubos contendo 10 mL de água de irrigação estéril. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (± 22 °C) por 48 horas.

Após 0, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas, uma alíquota de 100 µL foi retirada e transferida para um tubo contendo 900 µL de água peptonada 0,1 % (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) para realização de diluições decimais. Então, alíquotas de 20 µL foram coletadas e semeadas na superfície de placas de Petri contendo Agar Nutriente (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra), que foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37 ± 1 °C, por 24 ± 2 horas.

A quantificação das células foi realizada de acordo com a técnica da gota utilizada por Malheiros et al. (2009). Todos os ensaios foram realizados em três repetições e as contagens realizadas em triplicata.

4.6 Teste de sobrevivência de *Escherichia coli* O157 ao hipoclorito de sódio

Para realização do teste de resistência foram preparadas soluções cloradas de hipoclorito de sódio nas seguintes concentrações de cloro livre: 2 mg/L, 7 mg/L e 20 mg/L. A concentração de 2 mg/L representou a concentração de cloro livre utilizada para desinfecção de água em estações de tratamento municipal, já 7 mg/L representou a quantidade de cloro livre utilizada para desinfecção de água de lavagem de vegetais em indústria de processamento vegetal, e 20 mg/L uma concentração superior. As soluções foram adicionadas de matéria orgânica (Albumina Bovina 1 %) (Sigma Aldrich Brasil Ltda, SP, Brasil), conforme a Portaria 101/93, do MAPA (BRASIL, 1993).

Para a realização deste experimento foram utilizados os mesmos isolados e inóculos descritos no subitem 4.5.

Para avaliação da resistência frente às diferentes concentrações, alíquotas de 100 µL de cada inóculo (isolados 1, 3 e 5), contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL,

foram transferidas, separadamente, para tubos contendo 10 mL de cada solução clorada.

Após 0, 2, 4, 20 e 45 minutos de exposição, uma alíquota de 100 µL foi retirada e transferida para um tubo contendo 900 µL de água peptonada 0,1 % (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) para realização de diluições decimais. Então, alíquotas de 20 µL foram coletadas e semeadas na superfície de placas de Petri contendo Agar Nutriente (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra), as quais foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 ± 1 °C, por 24 ± 2 horas.

A quantificação das células foi realizada de acordo com a técnica da gota utilizada por Malheiros et al. (2009). Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente, em três repetições, e as contagens realizadas em triplicata.

4.7. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) versão 21.0 (SPSS Inc.Chicago, EUA). Foram realizados testes adotando o nível de significância de 5 % ($p = 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Detecção de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação

Um total de 56 amostras de água foi coletado. O PCR em Tempo Real realizado para detectar *E. coli* O157 foi positivo para 11 amostras, sendo a prevalência de 19,65 % (11/56). A maior prevalência foi observada na propriedade rural 3 (41,60 %; 5/12), seguido pela 4 (30,00 %; 3/10), 5 (12,50 %; 1/8) e 1 (9,00 %; 2/22). O patógeno não foi detectado nas fazendas 2 e 6. A análise estatística demonstrou que a prevalência de *E. coli* O157 não foi significativamente similar entre as seis propriedades amostradas (Teste de Qui-Quadrado, $p= 0,209$).

Em relação ao sistema de produção adotado, observou-se que no cultivo orgânico das alfaces houve uma contaminação significativamente maior da água de irrigação (16,10 %; 9/56) quando comparada ao convencional (3,60 %; 2/56) (Teste de Qui-Quadrado, $p= 0,049$).

A prevalência de *E. coli* O157 não foi correlacionada às diferentes fontes de água utilizadas, embora o nível de significância esteja bastante próximo do limite de 5 % (Teste de Qui-Quadrado, $p= 0,051$). Considerando a contaminação proporcional de *E. coli* O157 pela quantidade de amostra coletada em cada fonte, esta foi maior em amostras coletadas em riacho (38,46 %; 5/13) e menor em açude (14,00 %; 6/43). Em amostras de água de poço não foi observada contaminação (0/1).

Quando analisada a correlação entre presença de *E. coli* O157 e o método de irrigação adotado, foi observado que 10 dos 11 patógenos isolados foram coletados de águas aspergidas (22,70 %; 10/44). Apenas uma *E. coli* O157 foi isolada de propriedade que utilizava gotejamento para irrigação (8,33 %; 1/12). Embora

diferença tenha sido observada, esta não foi estatisticamente significativa (Teste de Qui-Quadrado, $p= 0,266$).

5.2. Multiplicação de *Escherichia coli* O157 em água de irrigação

O pH da água de irrigação coletada para análise da multiplicação dos isolados 1, 3 e 5 de *Escherichia coli* O157 foi de 7,58.

Os isolados de *E. coli* O157 inoculados em água de irrigação estéril, conservada a temperatura ambiente (± 22 °C), por 48 horas, demonstraram multiplicação conforme a Figura 1.

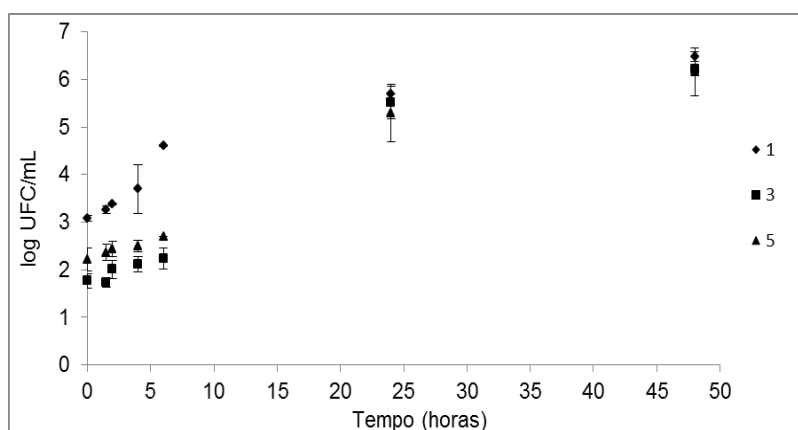


Figura 1: Multiplicação de 3 isolados de *E. coli* O157 em água de irrigação, após 48 horas, a 22 °C.

Observa-se que, embora a taxa de multiplicação não tenha sido idêntica, os 3 isolados de *E. coli* O157 apresentaram multiplicação similar nos tempo analisados.

A fase estacionária manteve-se por 6 horas, onde foi observada multiplicação média de $0,83 \pm 0,60$ log UFC/mL. Após este período, fase log de multiplicação ocorreu, atingindo $5,50 \pm 0,20$ log UFC/mL após 24 horas. Após 48 horas, foi observada a população máxima de $6,30 \pm 0,18$ log UFC/mL.

5.3. Teste de sobrevivência de *Escherichia coli* O157 ao hipoclorito de sódio

Nessa etapa do trabalho foi utilizado Hipoclorito de Sódio 2,0 – 2,5 % p/p (Água Sanitária Proquill®, Alvorada, RS, Brasil).

O valor de pH das soluções utilizadas neste estudo se manteve similar nas diferentes concentrações de cloro (Tabela 5).

Tabela 5. Valor de pH das soluções cloradas de 2, 7 e 20 mg/L utilizadas neste estudo.

Concentração de cloro (mg/L)	pH (média)
2	5,06
7	5,05
20	5,06

Os resultados dos testes de resistência a soluções cloradas demonstram que a resistência dos isolados 1, 3 e 5 de *Escherichia coli* O157, provenientes de água de irrigação, foram similares para variação na concentração de cloro e tempo de exposição (Teste de Análise Univariada, $p = 0,373$ e $p = 0,736$, respectivamente). Uma vez que não houve diferença estatística na redução logarítmica após os tratamentos entre os isolados estudados, os resultados serão apresentados conjuntamente.

A Figura 2 demonstra o comportamento dos isolados 1, 3 e 5 de *Escherichia coli* O157 em solução contendo 2 mg/L de cloro livre.

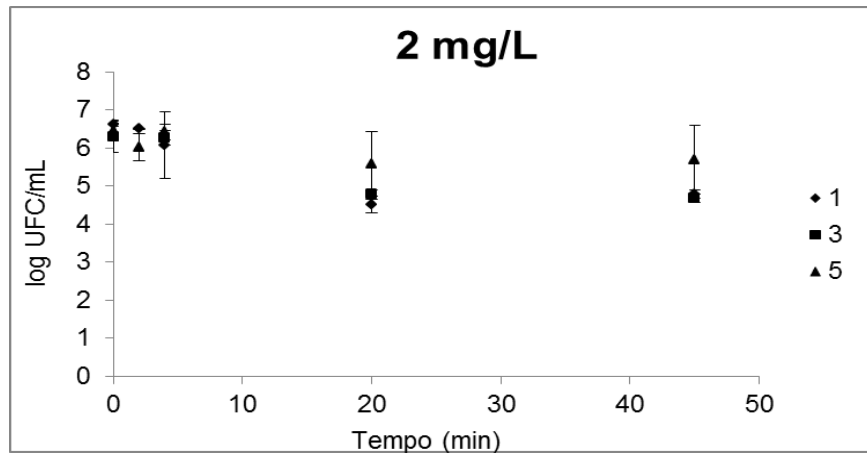


Figura 2: Sobrevivência de 3 diferentes isolados de *Escherichia coli* O157 expostas a uma solução contendo 2 mg/L de cloro livre mantidas em temperatura de 22° C, por 45 minutos.

A redução média observada na população de *Escherichia coli* O157 após 45 minutos em solução contendo 2 mg/L de cloro livre foi de $1,40 \pm 0,56$ log UFC/mL. Observa-se que nos primeiros minutos de exposição (2 e 4 minutos) houve pouca redução na população do patógeno, média de $0,20 \pm 0,29$ log UFC/mL. No entanto, entre 4 e 20 minutos foi observada uma redução maior, com média de $1,30 \pm 0,40$ log UFC/mL. Após 20 minutos até 45 minutos de exposição, a população de patógeno se manteve similar, não havendo reduções nas contagens de *E. coli* O157.

O comportamento dos isolados 1, 3 e 5 de *Escherichia coli* O157 em solução contendo 7 mg/L de cloro livre pode ser observado na Figura 3.

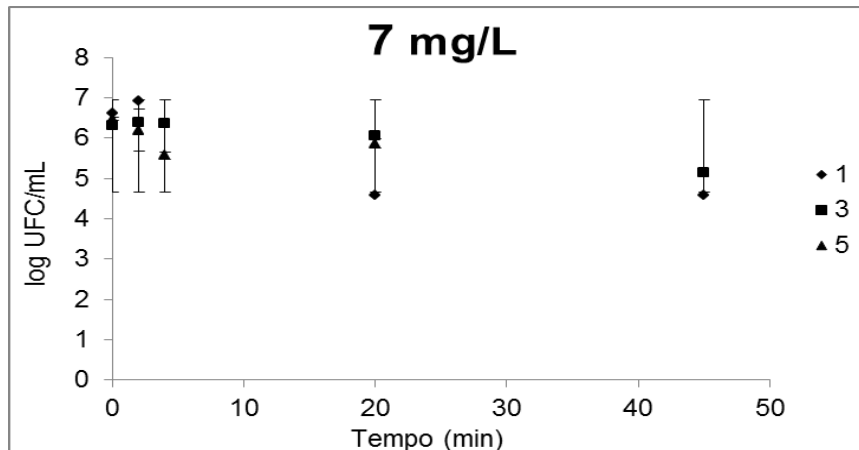


Figura 3: Sobrevivência de 3 diferentes isolados de *Escherichia coli* O157 expostas a uma solução contendo 7 mg/L de cloro livre mantidas em temperatura de 22° C, por 45 minutos.

Foi observada redução total média de 1,60 log UFC/mL na população de *E. coli* O157 após 45 minutos em solução contendo 7 mg/L de cloro livre. Nos primeiros minutos de exposição (2 e 4 minutos) houve redução média de $0,40 \pm 0,33$ log UFC/mL. Após 20 minutos foi observada redução de $0,60 \pm 1,07$ log UFC/mL (média), seguida de redução de $0,50 \pm$ log UFC/mL, após 45 minutos. Ao final do tratamento, obteve-se redução total média de $1,60 \pm 0,67$ log UFC/mL de *E. coli* O157.

Em solução de concentração de 20 mg/L de cloro livre pode-se observar o comportamento dos isolados 1, 3 e 5 de *E. coli* O157 na Figura 4.

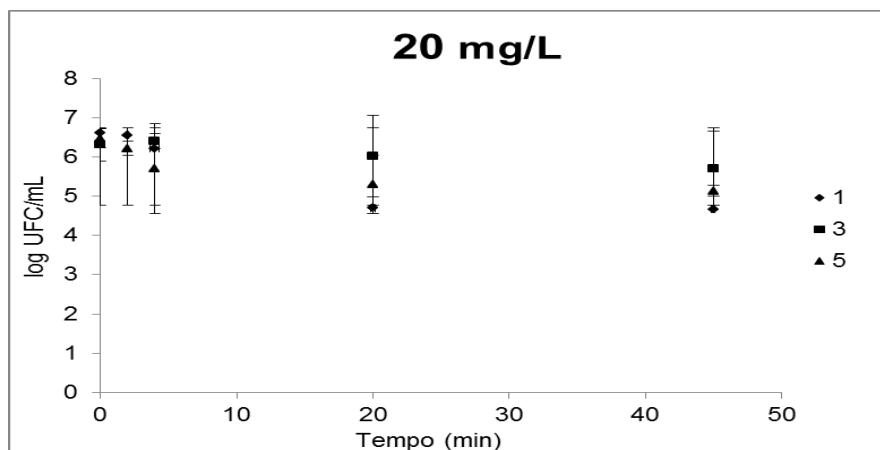


Figura 4: Sobrevivência de 3 diferentes isolados de *Escherichia coli* O157 expostas a uma solução contendo 20 mg/L de cloro livre mantidas em temperatura de 22° C, por 45 minutos.

Observa-se que até 4 minutos de exposição em solução contendo 20 mg/L de cloro livre, a população de *E. coli* O157 foi reduzida em $0,40 \pm 0,43$ log UFC/mL, em média. Após 20 minutos, a redução média foi de $1,12 \pm 0,80$ log UFC/mL. A redução máxima foi obtida após 45 minutos de exposição, com média de $1,30 \pm 0,66$ log UFC/mL.

6. DISCUSSÃO

A elevada sensibilidade, especificidade e velocidade do PCR em Tempo Real tornaram este método muito atraente para detecção e caracterização de patógenos (FRATAMICO et al. 2010; ISO, 2012). A técnica é capaz de realizar a detecção de células viáveis, viáveis mas não-cultiváveis e de células mortas (LIU et al., 2008). Deste modo pode-se explicar a quantidade menor de isolados recuperados na etapa de confirmação de cultura em relação aos detectados pelo PCR (9/11). Delbeke et. al. (2015), que relataram isolar apenas 4 de 13 amostras positivas por PCR em Tempo Real para STEC.

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas investigando a qualidade microbiológica de vegetais em nível primário de produção. Muitas têm associado o sistema de produção orgânico como de maior risco à segurança dos produtos, quando comparado ao cultivo convencional (OLIVEIRA et al., 2010; MAFFEI et al., 2013; CEUPPENS et al., 2014). Este risco pode estar relacionado à água de irrigação não tratada ou a aplicação de esterco como fertilizante sem respeitar o tempo de compostagem necessário (GOMES NETO et al., 2012; MAFFEI et al., 2013; CEUPPENS et al., 2014). Em consonância, neste estudo foi observada maior contaminação na água de irrigação em propriedades orgânicas do que em convencionais.

A produção vegetal no Brasil é predominantemente cultivada em campo aberto (MAROUELLI;SILVA 2011). Esta mesma tendência foi observada em todas as propriedades rurais analisadas nesse trabalho. Estudos demonstram que cultivos em campo aberto apresentaram maior prevalência de agentes patogênicos, quando comparado a sistemas fechados de produção (hidroponia e estufa). Tal fato pode ser

explicado, pois, em campo aberto, se torna mais difícil de controlar as múltiplas fontes de contaminação existentes, tais como animais selvagens ou de criatório, ocorrência de inundações, dentre outros (BRACKETT, 1999; JAY; COOLEY; CARYCHAO, et al., 2007; PORTO et al., 2008; CEUPPENS et al., 2014; HOLVOET et al., 2015). Holvoet et al. (2015) em seu trabalho de revisão também reconhecem que o uso de água não tratada pode ter consequências prejudiciais para a produção de alface em campos abertos. Dentre as possíveis fontes de contaminação existentes em cultivo de campo aberto se destaca a variação das condições climáticas, como precipitação e temperatura. Essas são capazes de impactar na contaminação, multiplicação e sobrevivência dos microrganismos patogênicos (PARKER et al., 2010). O estudo de Ceuppens et. al. (2014) relacionaram a contaminação de *E. coli* O157 em água de irrigação e lavagem de vegetais com a ocorrência inundações.

Neste estudo, a contaminação por *E. coli* O157 não foi significativamente correlacionada com a fonte de água de irrigação. No entanto, é importante assinalar que todas as amostras positivas foram coletadas em águas de superfície (açude e riacho), enquanto que em água de poço não houve contaminação. Mesmo sem ter sido estatisticamente significativo, este resultado pode ser explicado, pois, estudos científicos demonstram que águas superficiais (de lagos, rios, riachos, lagoas e nascentes) são mais propensas à contaminação, devido às descargas de águas residuais, águas pluviais ou pela presença de fezes de animais de criatório ou animais selvagens (TYRELL et al., 2006; UYTENDAELE et.al., 2015). Por outro lado, em geral, a água de poço (desde que a estrutura do poço esteja bem conservada) se mostra como menos propensa à contaminação por estar protegida de contaminação externa (STEELE; ODUMERU 2004; UYTENDAELE et al., 2015).

O método de irrigação predominantemente adotado no Brasil é o de aspersão. O método de irrigação por gotejamento ocupa o segundo lugar, apesar de ser mais seguro do ponto de vista microbiológico (MARITES et al. 2010; MAROUELLI; SILVA 2011; ALLENDE; MONAGHAN 2015). Neste estudo, metade dos produtores (3) adotavam o sistema de aspersão e o restante (3) de gotejamento. A *E. coli* O157 foi isolada majoritariamente em fazendas que adotaram o método de aspersão (17,90%; 10/56), sendo apenas 1 isolado em propriedades onde a irrigação por gotejamento era utilizada. Reconhecidamente a irrigação por aspersão facilita a contaminação do produto por expor a parte comestível diretamente à água contaminada, e também, as gotas dos aspersores podem recontaminar a superfície da cultura a partir de respingos no solo (MARITES et al. 2010). Por outro lado, a irrigação por gotejamento limita o contato direto entre o produto e água de irrigação, reduzindo a probabilidade de contaminação (QADIR 2008). Nesse sentido, o fato de *E. coli* O157 ter sido mais encontrada em propriedades que utilizavam irrigação por aspersão, e este método ser amplamente utilizado no país, há um maior risco de contaminação de alfaces.

A multiplicação dos três isolados de *E. coli* O157 (1, 3 e 5) em água de irrigação, atingindo população máxima de $6,30 \pm 0,177$ log UFC/mL após 48 horas, demonstra sua aptidão para sobreviver e se multiplicar nesse meio. Este comportamento já havia sido observado por outros autores. Por exemplo, Van der Linden et al. (2014) observaram multiplicação por até 14 dias de *Salmonella* e *E. coli* O157: H7 em diferentes amostras de água de irrigação. Interessantemente, Miyagi et al. (2011) observaram que *E. coli* STEC O157 se multiplicaram em água do mar esterilizada, tendo sobrevivido por pelo menos 15 dias.

A sobrevivência e multiplicação de *E. coli* O157 em águas de superfície depende de diversos fatores biológicos, físicos e químicos. Estes incluem, dentre outros, a disponibilidade de nutrientes, luz ultravioleta (UV) e temperatura. Há relatos de cepas de *E. coli* O157: H7 sobrevivendo por longos períodos em amostras de água de lago, poço, rio, e em água mineral engarrafada (JOHNSON et al., 2003; GANNON et al., 2004; GARCIA-ALJARO et al., 2005; AVERY et al., 2008).

Além disso, a rápida capacidade de multiplicação observada neste estudo coloca em risco todos os produtos vegetais que serão irrigados. Especialmente quando se utiliza o sistema de aspersão, pois a água entra em contato direto com a parte comestível, e quando esta é realizada próxima a colheita (MAROUELLI et al., 2008; MAROUELLI; SILVA 2011; SENAR 2012; UYTTENDAELE et al., 2015).

Oliveira et al. (2012) observou que *E. coli* O157:H7 sobreviveu na superfície de folhas de alface irrigadas por aspersão com água contaminada por até cinco semanas. Houve também a transferência de *E. coli* O157: H7 para as folhas de alface a partir de solo contaminado ou por água de irrigação, principalmente para as externas. Barker-Reid et al. (2009), irrigando alface com água contaminada por *E. coli*, também observaram a persistência desta nas folhas (BARKER-REID et al. 2009). Já Alama et al. (2014) revelaram que a cessação da irrigação três dias antes da colheita não impediu a recuperação de células viáveis de *E. coli* O157: H7 em espinafre (ALAMA et al. 2014).

Diversos estudos apontam que o cloro livre é mais eficaz para a inativação de agentes patogênicos em água de lavagem do que para na desinfecção de produtos frescos (GIL et al. 2009; VAN HAUTE et al. 2013; GÓMEZ-LÓPEZ et al. 2014). Neste estudo foi utilizado o hipoclorito de sódio, desinfetante mais utilizado em uso doméstico e muito utilizado em serviços de alimentação, indústrias de alimentos e de

vegetais minimamente processados no Rio Grande do Sul e Brasil. Em virtude de sua ampla aplicação para desinfecção de vegetais, este produto foi escolhido para esse experimento.

Por exemplo, Van Haute et al. (2013) observaram que durante o processo de lavagem de alface inoculada com 4 log UFC/g de *E. coli* O157, quando a lavagem foi realizada com água, após 1 hora houve aumento de 1 log na população do patógeno em água. No entanto, quando a lavagem ocorreu com água na concentração constante de 1 mg/L de cloro livre a contaminação da água foi mantida abaixo de 2,7 log UFC/ml. Similarmente, Gómez-López et al. (2014) demonstraram que *E. coli* O157 sobreviveu e se multiplicou em água de lavagem de vegetais na ausência de cloro livre e na concentração de 1 mg/L, mas a manutenção de 7 mg/L de cloro livre foi capaz de inibir a multiplicação de *E. coli* O157 na água de lavagem de vegetais.

Neste estudo, a exposição dos três isolados (1, 3 e 5) de *E. coli* O157 a soluções de 2, 7 e 20 mg/L de cloro livre ao longo de 45 minutos não foi suficiente para redução total do inóculo (média de $6,46 \pm 0,13$ log UFC/mL). Contudo, similarmente aos estudos citados, de Van Haute et al. (2013) e Gómez-López et al. (2014), as soluções utilizadas não permitiram a multiplicação do patógeno. Além disso, para todos os tratamentos, foi obtida a redução mínima de $1,30 \pm 0,66$ log UFC/mL em 45 minutos.

O comportamento dos isolados 1, 3 e 5 de *E. coli* O157 foi similar frente as concentrações de cloro livre utilizadas neste estudo: até 4 minutos de exposição não houve redução acentuada na população de *E. coli* O157, seguido de redução expressiva após 20 minutos e manutenção da população após 45 minutos. Assim, pode-se dizer que, apesar da diferença de origem (propriedades rurais e fontes de água), o comportamento e resistência das cepas foram semelhantes frente às

diferentes condições de exposição ao cloro livre. Esse resultado também poderia ser explicado pelo fato dos isolados poderem se tratarem da mesma cepa, o que não foi verificado nesse estudo uma vez que não foi realizada identificação genotípica (Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) ou Multilocus Sequence Typing (MLST)).

A redução de *E. coli* O157 nos primeiros 20 minutos de contato pode ser explicada pois, neste período ocorre o consumo do cloro livre em solução. Este comportamento também foi observado por Van Haute et al. (2013), aonde após 30 minutos de contato não houve redução significativa na população de *E. coli* O157 em água de lavagem de vegetais.

Além disso, o aumento de matéria orgânica na solução tem um efeito negativo sobre a eficiência da desinfecção, uma vez que o cloro reage com esta, diminuindo sua ação desinfetante (EUROPEAN UNION, 1998; EPA, 2004; GÓMEZ-LÓPEZ, 2014). Van Haute et al. (2013) observaram que cargas orgânicas mais elevadas levam ao rápido consumo de cloro, diminuindo a eficiência da desinfecção do cloro.

O valor médio de pH das soluções de hipoclorito de sódio utilizadas neste estudo foi de 5,06. Nesta faixa de pH predomina a forma mais ativa para desinfecção, o ácido hipocloroso. Assim, pode-se inferir que o cloro livre em solução estava em sua forma mais ativa para desinfecção.

O percentual de redução obtido neste estudo em concentrações baixas de cloro livre (2, 7 e 20 mg/L) é similar ao obtido pela lavagem mecânica das folhas de alface. Segundo Beuchat et al. (2001) e Van Haute et al. (2013) a lavagem de alface mecanicamente reduz em até 1 log UFC/mL da carga microbiana.

O frequente envolvimento de produtos vegetais em DTA provocados por *E. coli* O157 implicou no desenvolvimento de diversos estudos sobre métodos de desinfecção do produto final e sua eficácia em relação a resistência de cepas de *E.*

coli O157. Para isso, na desinfecção de vegetais são utilizadas concentrações elevadas de cloro livre. Por exemplo, a legislação estadual do RS estabelece que para alimentos folhosos consumidos crus, deve-se preceder a higienização, a fim de reduzir a contaminação superficial, em serviços de alimentação. Conforme a Portaria nº 78 de 2009 do Rio Grande do Sul, a etapa de desinfecção deve ser realizada com o uso de solução clorada contendo no mínimo 100 e no máximo 250 mg/L de cloro livre e tempo de contato de 15 minutos (SES-RS, 2009).

Diversos estudos demonstram a eficácia da utilização deste método para eliminação de microrganismos patogênicos em vegetais. Chesca et al. (2002) observaram que *E. coli* O157:H7 e *E. coli* não patogênica, artificialmente inoculadas em amostras de alface e submetidas a imersão em solução de 200 mg/L de hipoclorito de sódio, por 15 minutos reduziram, em média, de 2,70 a 4,09 log UFC/mL, respectivamente (CHESCA et al., 2002). Já, o estudo de Silva et al. (2003) demonstrou que hipoclorito e dicloroisocianurato de sódio (sanitizantes utilizados na indústria de alimentos e serviços de alimentação) foram eficazes para eliminação de *E. coli* O157:H7 em suspensão, nas concentrações de 100 e 200 mg/L, após 30s de contato (SILVA et al., 2003). Similarmente, Santos et al. (2012) encontraram que solução de água sanitária com 200 mg/L de cloro ativo reduziu a carga microbiana inicial de bactérias heterotróficas mesófilas, coliformes termotolerantes e de *E. coli* presente em folhas de alfaces, após 15 minutos de imersão (SANTOS et al., 2012).

No entanto, outros autores relatam que a eficiência de cloro para descontaminação de alface é limitada a redução de 1 e 2 log, mesmo em concentrações elevadas (LUO et al., 2011; TIRPANALAN et al., 2012; SAPERS 2001). Solomon (2001) e López-Gálvez et al. (2010) sugerem que a baixa eficiência do hipoclorito pode estar relacionada à internalização das células bacterianas nos

estômatos teciduais das folhas de alface. Portanto, apesar de lavar e sanitizar as folhas com solução clorada, a inacessibilidade de um grande número de organismos por sua localização abaixo da superfície, é, talvez, a razão para a falta de eficácia da higienização de superfície. Assim, esses alimentos podem veicular microrganismos, e causar DTA (TAORMINA; BEUCHAT 1999; BUCK et al., 2003). Entretanto, cabe ressaltar que, o método utilizado neste trabalho (suspensão) não reproduz as condições de adesão e formação de biofilmes que pode ocorrer naturalmente na superfície de vegetais.

A partir do estudo realizado, é possível delinear cenários, bem como propor medidas de controle de segurança de alimentos.

Considerando o cenário 1, em uma fonte de água de irrigação naturalmente contaminada (ex. açude) com *E. coli* O157, pode-se inferir que poderá haver multiplicação e sobrevivência do microrganismo na água de irrigação. E, mesmo que a água de irrigação seja tratada com soluções cloradas de baixa concentração (2, 7 e 20 mg/L) este tratamento poderá não ser eficaz para eliminação total do patógeno. Assim, se esta água for utilizada para irrigação de vegetais pelo método de aspersão o produto final poderá ser contaminado, expondo o consumidor ao risco. Neste caso, a medida preventiva seria a implementação de Boas Práticas Agrícolas (BPA) e a interrupção da irrigação, antes da colheita, por no mínimo três dias. Em relação às BPA, destaca-se a necessidade do controle de acesso de animais de criatório a fonte ou reservatório de água de irrigação e a compostagem de adubo orgânico, por pelo menos 90 dias.

No cenário 2, se tem uma fonte de água não contaminada naturalmente por *E. coli* O157, que é canalizada e armazenada em um reservatório para posterior irrigação. Neste reservatório se realiza a desinfecção da água com 2, 7 ou 20 mg/L

de cloro livre, antes da irrigação. Caso ocorra contaminação posterior por *E. coli* O157 no reservatório, o cloro livre poderá evitar sua multiplicação podendo, inclusive, inativar o patógeno se carga microbiana for muito baixa (inferior a 1 log UFC/mL). Nessas condições, a cloração da água de irrigação seria a medida preventiva de controle, inibindo a contaminação da água de irrigação por *E. coli* O157.

Por fim, no cenário 3, considerando que as medidas preventivas de BPA e desinfecção da água de irrigação não sejam adotadas pelo produtor, e este realize a irrigação de alface com água contaminada por *E. coli* O157. A população do patógeno na água de irrigação poderá atingir, pelo menos, $6,30 \pm 0,177$ log UFC/mL e, conforme já citado, a lavagem mecânica das folhas reduz, em média, 1 log e a desinfecção de alface com solução clorada mesmo em concentrações elevadas reduz, em média, de 1 e 2 log. Ainda que o consumidor realize os procedimentos de desinfecção recomendados (lavagem mecânica e sanitização), a carga de *E. coli* O157 na alface poderá ser de 3 log, valor superior a dose infectante de *E. coli* O157 (de 10^2 organismos). Neste cenário, a medida preventiva de controle é a implementação de BPA, principalmente de controle de acesso de animais à fonte de irrigação, compostagem de adubo orgânico pelo tempo recomendado e a interrupção da irrigação três dias antes da colheita.

7. CONCLUSÃO

Este estudo utilizou a técnica de PCR em Tempo Real para detecção de *E. coli* O157 em água de irrigação. O método se mostrou rápido, sensível e específico nos testes de implementação. Além disso, o método detectou a presença do patógeno nas amostras ambientais analisadas, comprovado na etapa de recuperação do microrganismo.

A presença de *E. coli* O157 em água de irrigação revela a disseminação desse patógeno na região. Ao mesmo tempo, as cepas isoladas apresentaram capacidade de sobrevivência e multiplicação na água de irrigação mantida em temperatura ambiente. Tal fato demonstra o alto risco de contaminação de vegetais irrigados por essas águas, sendo necessária a adoção de medidas de controle, em nível de produção primária. Além disso, a desinfecção da água com 2, 7 e 20 mg/L de cloro livre ao longo de 45 minutos evitou a multiplicação do patógeno. Entretanto, a redução foi observada até 20 minutos de exposição, não havendo redução da população dos isolados de *E. coli* O157 após este intervalo de tempo.

Considerando o crescente envolvimento de vegetais em DTA causadas por *E. coli* O157 e a evidência de que fontes de água de irrigação estão contaminadas por esse patógeno, é importante que sejam conduzidos novos estudos para avaliar a resistência das outras cepas de *E. coli* O157 às soluções cloradas, bem como aos diferentes desinfetantes disponíveis no mercado. Igualmente, este estudo evidencia a necessidade de implementar estratégias de controle de risco, primariamente as Boas Práticas Agrícolas, a fim de evitar surtos veiculados por alfaces contaminados através da água de irrigação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM. Projeto para o levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil 2010/2011. **Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas**. 2015.

ALAMA, M. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and rocket as affected by inoculum and time to harvest. **Scientia Horticulturae**. V.165, p. 235–241, 2014.

ALLENDE, A., et al. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. **Journal of Food Protection**. v.12, p. 2514-2518, 2008.

ALLENDE, A.; MONAGHAN, J. Irrigation Water Quality for Leafy Crops: A Perspective of Risks and Potential Solutions. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.12,p. 7457-7477, 2015.

AHMED, W. et al. Fecal Indicators and Zoonotic Pathogens in Household Drinking Water Taps Fed from Rainwater Tanks in Southeast Queensland, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, p. 219-226, 2012.

EVERY, L. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal drinking troughs. **Science of the Total Environment**. v. 389, p. 378–385, 2008.

BARKER-REID, F. et al. Persistence of *Escherichia coli* on Injured iceberg Lettuce in the Field, Overhead Irrigated with Contaminated Water. **Journal of Food Protection**. v.73, p. 458-464,2009.

BATISTA, L.R.L. et al. Desenvolvimento da cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) submetido à irrigação com diferentes níveis de salinidade. **VII CONNEPI**. v.1, p.1-9, 2012.

BECKER, B. R. Proposta de teste para verificação da formação de trihalometanos (TAM) em ETAs. 2010. 71f. **Monografia** (Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

BELL, B.P. et al .A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic-uremic-syndrome from hamburgers. **Journal of the American Medical Association**. v.272, p. 1349-1353, 1994.

BELL, C. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)." **International Journal of Food Microbiology**. v.78, p. 197-216, 2002.

BEUCHAT, L. R. et al. Development of a proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. **Journal of Food Protection**. v. 64, p. 1103-1109, 2001.

BETTELHEIM et al. The non-O157 Shiga-toxigenic (verotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. **Critical Reviews in Microbiology**. v.33, p. 67-87, 2007.

BETTS, R. Microbial update: fruit and salad. **International Food Hygiene**. v. 25, p.9–12, 2014.

BOLTON, D. J. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. **Foodborne Pathogen Disease**. v.8, p. 357–365, 2011.

BORGES, C. A. et al. Shiga Toxigenic and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* in the Feces and Carcasses of Slaughtered Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 1119-1125, 2012.

BURCH, J.D.; THOMAS, K.E. Water disinfection for developing countries and potential for solar thermal pasteurization. **Solar Energy**. v.64, p. 87-97, 1998.

BJERGBAEK, L.A., ROSLEV, P. Formation of non culturable *Escherichia coli* in drinking water. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p.1090–1098, 2005.

BRYAN, A. et al. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 35, p. 247-272, 2015.

BRADEN, C.R.T.R.V. et al. Emerging Trends in Foodborne Diseases. **Infection Disease Clinical North America**, v.27, p. 517-533,2013.

BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Tecnology**. v.15,p.305–311, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria 101, de 11 de agosto de 1993. **Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos (anexo) determinando seu emprego em todas as atividades desenvolvidas pela rede oficial do sistema coordenado pela Coordenação Geral de Laboratório Animal CGLA do Departamento de Defesa Animal - DDA**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 ago 1993.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as**

condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 mar 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria MS nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 12 dez 2011.

CALDERWOOD, S.B., et al. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News.** v.62, p. 118-9, 1996.

CEUPPENS, S. et al. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. **International Journal of Food Microbiology.** v.181, p. 67-76, 2014.

CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC), Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC), *Escherichia coli* O157:H7. Iowa: Centre for food security and public health, **Institute for international cooperation in animal biologics**, Iowa state university; 2009.

COOMBES et al. The evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology.** v. 3, p. 1-3, 2011.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Casos confirmados e coeficientes de incidência de casos autóctones de doenças de notificação compulsória no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2008.** 2013. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/sh_9802.htm> Acesso em 28 set 2015.

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M. et al. Dispersal of *Salmonella Typhimurium* by rain splash onto tomato plants. **Journal of Food Protection**. v. 75, p :472–479, 2012.

CDC. Ongoing Multistate Outbreak of *E. coli* serotype O157:H7. **Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach - United States**. v. 26, p.1-2, 2006. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm55d926a1.htm>> Acesso em 26 set 2015.

CDC. **Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce** – Report, 2012. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/romaine-lettuce-3-23-12.html> > Acesso em 26 set 2015.

CFIA. Targeted survey investigating bacterial pathogens and generic *E. coli* in fresh leafy green vegetables. **Food Safety Action Plan 2009-2010**. 2014.

CHESCA, A.C. **Eficácia de Diferentes Sanitizantes na Desinfecção de Alface (*Lactuca sativa*) Artificialmente Inoculadas**. Tese (Doutorado). Tese de doutorado, Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP Campus Jaboticabal, 2002.

DA SILVA, H.R.; MAROUELLI, W.A. Avanços na eficiência de sistemas de irrigação em horticultura. **II Simpósio Nacional sobre o uso da água na agricultura, Passo Fundo (RS)**. p.1-11.2006.

DELBEKE, S. et al. Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella Thompson* in strawberries, a lettuce mix and basil. **International Journal of Food Microbiology**. v.193, p. 1–7, 2015.

DE PAULA, C. M. D., CASARIN, L. S., TONDO, E.C. *Escherichia coli* O157:H7 — emerging food pathogen. **Vigilância Sanitária em Debate**. v.4, p. 23-33, 2014.

DOYLE, M.P.S. Survival and growth characteristics of *E. coli* associated with hemorrhagic colitis.." **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, p. 855-856, 1984.

EMBRAPA. **Pós-colheita de Hortaliças**. 2007. Disponível em: <
<http://poscolheita.cnpdia.embrapa.br/perdas-pos-colheita-de-frutas-e-hortalicas> >
Acesso em 25 set 2015.

EUROPEAN UNION. **Drinking water standards** - Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. 1998.

EUROPEAN UNION. European Union Risk Assessment Report Chlorine. **Environment Final Report**. December 2007. Disponível em: <
<http://echa.europa.eu/documents/10162/a29afaff-c207-42fa-873e-3ba647f587d8>>.
Acesso em 25 set 2015.

EPA. **The Effectiveness of Disinfectant Residuals in the Distribution System**. 2004. Disponível em:
<http://www.epa.gov/safewater/disinfection/tcr/pdfs/issuepaper_effectiveness.pdf>.
Acesso em 25 set 2015.

FENG, P. *Escherichia coli* Serotype O157: H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. **Food and Drug Administration**. v.2, p. 47 -52, 1995.

FENG, P. W; JINNEMAN, K. Bacteriological Analytical Manual on line. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Food and Drug Administration - FDA/CFSAN**. 2011.

FERENS, W.A.; HOVDE, C.J. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. **Foodborne Pathogen Disease**, v. 8, p. 465–87., 2011.

FONSECA, J.M. et al. *Escherichia coli* survival in lettuce fields following its introduction through different irrigation systems. **Journal of Applied Microbiology**. v. 110, p. 893-902, 2011.

FRAHM, E.; OBST, U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p.123–131, 2003.

FRATAMICO, P.M.; DEBROY, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food Using Real-Time Multiplex PCR Assays Targeting the *stx1*, *stx2*, *wzyO157*, and the *fliCh7* or *eae* Genes. **Food Analytical Methods**. v.3, p. 330-337, 2010.

GANNON, V.P.J et al. Bacterial pathogens in rural water supplies in Southern Alberta, Canada. **Journal of toxicology and environmental health**. v. 67, p.1643–1653, 2004.

GANSHEROFF, L.J.; O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**. v.97, p.2959–2961, 2000.

GOMES NETO, N.J. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, p. 47-51, 2012.

GARCIA-ALJARO, C. et al. Combined use of an immunomagnetic separation method and immunoblotting for the enumeration and isolation of *Escherichia coli* O157 in wastewaters. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 589-59, 2005.

GIL et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**.v. 134, p. 37– 45, 2009.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M. et al. Minimum free chlorine residual level required for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and trihalomethane generation during dynamic washing of fresh-cut spinach. **Food Control**. v. 42, p. 132-138, 2014.

GU, G.Y. et al. Factors affecting the occurrence of *Escherichia coli* O157 contamination in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, p. 175-182, 2013.

GUTH, B. E. S. et al. First shiga toxin-producing *E. coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerging and Infectious Diseases** v. 8, p.535-536, 2002.

HAAS, C.N. et al. Development of a dose-response relationship for *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**. v.56, p.153–159. 2000.

HAMILTON, A.J. et al. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 72, p. 3284–3290, 2006.

HENGGE-ARONIS R, et al. Osmotic regulation of rpoS-dependent genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 175, p.259–265, 1993.

HEIJNEN, L.; MEDEMA, G. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. **Journal of Water and Health**. v. 4, p. 487–498,2006.

HOLVOET, K., et al. Agricultural and Management Practices and Bacterial Contamination in Greenhouse versus Open Field Lettuce Production. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.12, p. 32-63, 2015.

IARC. Overall evaluations of carcinogenicity to humans: list of all agents, mixtures and exposures evaluated to date. **International Agency for Research on Cancer**. WHO, 2009.

IBEKWE, A.M.; GRIEVE, C.M. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**. v.94, p.421–431, 2003.

IBGE. **Censo Agropecuário**. 2006. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006_segunda_apuracao/default_tab_xls.shtm > Acesso em 25 set 2015.

ISO. **Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157**. 16654, 2001.

ISO. **Microbiology of food and animal feed - Real-Time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of foodborne pathogens- Horizontal method for the detection of Shiga-Toxin *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O23, O103 and O145 serogroups**. ISO/TS 13136, 2012.

ISO. **Water quality - Sampling for microbiological analysis**. ISO 19458, 2006.

ISLAM M. et al. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Journal of Food Protection**. v.67, p. 1365–1370, 2004.

JAMES, J. Overview of Microbial Hazards in Fresh Fruit and Vegetables Operations. **Microbial Hazard Identification in Fresh Fruit and Vegetables**. J. W. Sons. Hoboken, USA. 2006.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 711p., 2005.

JAY, M.T.; COOLEY, M.; CARYCHAO, D. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. **Emerging Infection Diseases**. v. 13, p. 1908–1911, 2007.

JOHNSON, J.Y. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 49, p. 326–335, 2003.

KAPER, J.B.N. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature**. v. 2, p. 123-140, 2004.

KERR, M. et al. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in bottled natural mineral water. **Journal of Applied Microbiology**. v. 87, p.833–841, 1999.

KISLUK, G.; YARON, S. Presence and persistence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the phyllosphere and rhizosphere of spray-irrigated parsley. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4030- 4026, 2012.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**.v. 8, p. 257–260, 2002.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing E-coli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 729-745, 2000.

LEIFERT, C.B., et al. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crops in organic and 'low input' production systems: a HACCP-based approach. **Journal of Applied Microbiology**. v4, p 931-950, 2008.

LIU et al. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 bacteria in drinking water and river water. **Applied Environmental Microbiology**.v.74, p.1502–1507, 2008.

LOIKO, M. R. **Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2013.

LUO, Y.G. et al. Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during freshcut produce wash. **Journal of Food Protection**. v.74, p.352–358, 2011.

MAULE, A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 71–78, 2000.

MACHADO, S.S.B. et al. Contribuição à análise de perigos na produção de alface. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 11, p. 22 - 25 , 2009.

MALHEIROS, P.S et al. Acid And Thermal Resistance Of A Strain Involved In Several Foodborne Outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 302-317, 2009.

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

MAJOWICZ, S.E. et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne Pathogens Disease**. v.66, v. 447-455, 2014.

MANTILLA, S. P. S. Perfil de sensibilidade microbiana de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de carne bovina. **Colloquium Agrariae**. v. 8, p. 1-7, 2011.

MARITES, M. et al. Risk analysis integrating livelihood and economic impacts of wastewater irrigation on health. Wastewater irrigation and health: assessing and mitigating risk in low-income countries. **Earthscan-International Development Research Centre**. London: p. 127-148, 2010.

MARQUELLI, W.A. et al. Irrigação por aspersão em Hortaliças - Qualidade da água, aspectos do sistema e método prático de manejo. **EMBRAPA**. v.1, p. 1 -154, 2008.

MARQUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. Seleção de Sistemas de Irrigação para Hortaliças. **Circular Técnica EMBRAPA**. v.1, p.1-24, 2011.

MARTINEZ-SANCHEZ, et al. Effect of Irrigation Practices on the Quality of Fresh-Cut Lettuce. Xxviii International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (Ihc2010): **International Symposium on Postharvest Technology in the Global Market**. v. 934, p. 511-514, 2012.

MEYER, S.T. et al. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 10, p. 99-110, 1994.

MILLES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **The Journal of Hygiene** , v.38, p. 732-749, 1938.

MITTELSTAEDT, S.C. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 - revisão." **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v. 24, p. 175-182, 2006.

MIYAGI, K. et al. Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Marine Water and Frequent Detection of the Shiga Toxin Gene in Marine Water Samples from an Estuary Port. **Epidemiology and Infection**. v. 126, p. 129-133, 2001.

MOU, B. **Lettuce**. Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Cheonopiaceae, and Cucurbitaceae. New York, Springer Science, Business Media,. v.1, p. 75-118, 2008.

MORELLI, A.M.F. ***Escherichia coli* O157:H7: Ocorrência em Ambiente de Produção de Leite na Microrregião de Viçosa, Adesão em Diferentes Superfícies e Resistência a Sanitizantes**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

MORETTI, C.L.; MATTOS, L.M. Processamento mínimo de alface crespa. v.25, p. 1-7. **Comunicado Técnico EMBRAPA**. v.1, p. 1-6, 2005.

NA, S.H. et al. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, p.386–392, 2006.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. 1998. v.11, p.142–1201,1998.

NMKL. NMKL Method n^o174 - **Shigella spp. PCR method for detection in foods.**, 2002.

OBUOBIE, E. et al. Irrigated urban vegetable production in Ghana: Characteristics, benefits and risks. **International Water Management Irrigation**. v.2 , p. 1-249 , 2010.

OLIVEIRA, M.U. et al. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**. v.27, p. 679-684, 2010.

OLIVEIRA, M.V., et al. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**. v. 156, p. 133-140, 2012.

OLSEN, S.J.M., GOULDING, J.S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p 1-51,2000.

PACHEPSKY, Y., et al. "Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. **Advances in Agronomy**. v. 113, p.73-138,2011.

PÁDUA, V. L. et al. **Potenciais fatores de risco à saúde decorrentes da presença de subprodutos de cloração na água utilizada para consumo humano**. Funasa. v.1, p. 1-12, 2007.

PARKER, J.K. et al. Characterizing fecal contamination in stormwater runoff in coastal North Carolina, USA. **Water Research**. v. 44, p. 4186–4194, 2010.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, p. 598-602, 1998.

PICARDEAU, M. et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 78, p. 1–8, 2014.

PUTTALINGAMMA, V.; NIVEDITHA, S. A review: Detection of *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research**. V. 4, p. 49-52, 2014.

QADIR, M. Sustainable Management of Wastewater for Agriculture: Proceedings of the First Bridging Workshop, 2007 Nov. 11–15, Aleppo, Syria. **International Center for Agricultural Research in the Dry Areas**, 2008. Disponível em: < http://www.ais.unwater.org/ais/pluginfile.php/225/mod_label/intro/2008%20Proc%20Ffirst%20Bridging%20Workshop%20%283%29.pdf >. Acesso em 25 set 2015.

QUESTED, et. al. Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**. v. 139. p. 29-42, 2010.

REID, D.C. et al. The quality of drinking water from private water supplies in Aberdeenshire, UK. **Water Research**. v. 37, p. 245 – 254, 2003.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual de Saúde. Portaria Nº 78, de 30 de janeiro de 2009. **Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências**. Diário Oficial [do] Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, sexta-feira, 30 de janeiro de 2009.

RILEY, L.W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**. v. 308, p. 681–685, 1983.

RODOLPHO, D.; MARIN, J.N. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 599-602, 2007.

RODRIGUES, R. Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**. v. 42, p. 152-164, 2014.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**. v.30, p. 187 -194, 2012.

SAUCEDO, S.L.C. et al., J.F. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *E. coli*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, n.1, 2003.

SANTOS, F. L. et al. Evaluation of the efficacy of sodium hypochlorite in sanitization of lettuce (*Lactuca sativa*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.71, p.56-60, 2012.

SAPERS, G.M. et al.. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**. v.39, p.305–311, 2011.

SAXENA, T.; KAUSHIK, P.; MOHAN, M. K. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, p. 249–264, 2015.

SENAR. Hortaliças - Cultivo de hortaliças raízes, tubérculos, rizomas e bulbos. **Coleção SENAR**. v.145, p. 1-154, 2012.

SILVA, N. et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables and its resistance to the disinfectants used in fresh produce. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v..23, p.167-173 ,2003.

SOLOMON. E.B.; YARON, S.;MATTHEWS, K.R.. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. **International Journal of Food Microbiology**.v. 68, p. 397– 400, 2002.

SONG, I. et al. Comparison of crop contamination by microorganisms during subsurface drip and furrow irrigation. **Journal of Environmental Engineering** **125**, **2006**.

SUINAGA, F.A. et al. Desempenho produtivo de cultivares de alface crespa. **Comunicado Técnico EMBRAPA**. v.1, p. 1-15, 2013.

SUSLOW, T.V. Production practices as risk factors in microbial food safety of fresh and fresh cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 2, p. 38-77, 2003.

SCALLAN, E.G. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Unspecified Agents. **Emerging Infectious Diseases**. v.1, p. 16-22, 2011.

SCOTT, L. et al. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 6-11, 2006.

SCULLY, M. , et al. Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. **British Journal of Haematology**, v. 142, p. 819– 826, 2008.

SCHEUTZ, F. et al. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, p. 2951-2963, 2012.

SCHEUTZ, F., STROCKBINE, N.A.. Genus I. *Escherichia*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer, pp. 607–624, 2005.

SCF. Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. **Report of the scientific committee on food**, 2002. Disponível em: < http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf > Acesso em 26 set 2015.

STEELE, M.. ODUMERU, J. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. **Journal of Food Protection**. v. 67, p.2839–2849, 2004.

STINE, S.W. et al. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. **Journal of Food Protection**. v. 68, p. 913-918, 2005.

STRACHAN, N.J. et al. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. **FEMS Microbiology Letters**. v. 203, p. 69–73, 2001.

STRAWN, et al. Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, p. 588-600, 2013.

TAORMINA, P.J.; BEUCHAT, L.R. Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by

treatments with various chemicals. **Journal of Food Protection**. v. 62, p. 850–856. 1999.

TARR,P. I. et al. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**. v. 365, p. 1073–1086, 2005.

TIRPANALAN, O. et al. Mini review: antimicrobial strategies in the production of fresh-cut lettuce products. In Méndez-Vilas A (ed), **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, vol 1. Formatex Research Center, Badajoz, Spain. Disponível em: <<http://www.formatex.org/microbiology3/chapters1.html>>. Acesso em 25 set 2015.

UYTTENDAELE, et al. Microbial hazards in irrigation water: Standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.14, p. 336–356, 2015.

VAN HAUTE, S. et al. Physicochemical Quality and Chemical Safety of Chlorine as a Reconditioning Agent and Wash Water Disinfectant for Fresh-Cut Lettuce Washing. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, p. 2850 –2861, 2013.

VAN DER LINDEN et al. Enteric Pathogen Survival Varies Substantially in Irrigation Water from Belgian Lettuce Producers . **International Journal of Research and Public Health**. v.10, p. 10105-10124, 2014.

WANG, G.; DOYLE, M.P. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Water. **Journal of Food Protection**. v. 6, p. 657-775, 1998.

WOOD, J.D. et al. Population dynamics of *Escherichia coli* inoculated by irrigation into the phyllosphere of spinach grown under commercial production conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 143,p 198–204, 2010.

WORLD CHLORINE COUNCIUL. Drinking Water Chlorination. **World Chlorine Council Position Paper**. 2008. Disponível em: <http://www.worldchlorine.org/wp-content/themes/brickthemewp/pdfs/WCC_Policy_Paper_Water_Chlorination.pdf>. Acesso em 25 set 2015.

WHO^a. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. **WHO Technical Report Series**, No. 916. Geneva. 2003. Disponível em: <[://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/)> Acesso em 25 set 2015.

WHO^b. Chlorine in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chlorine.pdf> Acesso em 20 set 2015.

WHO. Microbiological Risk Assessment Series 14: **Microbiological Hazards in Fresh Leafy Vegetables and Herbs**. 2011. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i0452e.pdf>> Acesso em 20 set 2015.

YANG, X. et al. A duplex SYBR Green I realtime quantitative PCR assay for detecting *Escherichia coli* O157:H7. **Genetics and Molecular Research**. V. 12, p. 4836–4845, 2013.

9. ANEXOS

9.1. Artigo 1

Submetido ao periódico Applied Environmental Microbiology

Title: Prevalence of *Escherichia coli* O157 in different irrigation water sources of Southern Brazil

Authors: Claudia Titze Hessel^{1*}, Luana Tombini Decol¹, Diego Chemello Muller¹, Patrícia da Silva Malheiros¹, Eduardo César Tondo¹

Affiliations

¹ Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP. 91501-970, Porto Alegre/RS, Brasil.

*Corresponding Author: e-mail: claudiatitzehessel@gmail.com, Telefone: +5551 3308-6677, Fax: +5551 3308-7048

Abstract

Shiga-toxin *Escherichia coli* (STEC) are among the main bacterial contaminants of fresh produce and irrigation water are one of the principal sources of microbial

contamination. Recently, *E. coli* O157:H7 was identified for the first time in irrigation and lettuce washing water in Southern Brazil. The objective of this study was to investigate the contamination of *E. coli* O157 in irrigation water used in lettuce production in Southern Brazil by Real-Time PCR. Results demonstrated that 19.65 % of irrigation water samples were contaminated by *E. coli* O157. Higher contamination was observed in pond, followed by river and none in borehole sample. However, pathogen prevalence was not correlated to any different water sources. This study evidence the presence of *E. coli* O157 in irrigation water in Southern Brazil and the necessity to implement strategies to manage the risk associated to that.

Keywords: *E. coli* O157; Irrigation water; lettuce.

1.Introduction

Consumption of fresh products, like fruits and vegetables, has increased during the last years in the whole world. Studies based on statistical modelling of changing lifestyle showed that the overall vegetable eating are expected to grow by 4 % in the next five years (Foundation 2015, IBISWorld 2015). Moreover, the consumption of fresh produce is motivated by the World Health Organization (WHO) since it is related to a healthy lifestyle and can prevent several diseases, such as obesity, heart disease, diabetes and many types of cancer. The WHO recommendation is the intake of a minimum of 400 g of fruit and vegetables per day (WHO 2003).

According to the Food and Agriculture Organization (FAO 2015), Brazil is the 10th producer of fresh produce in the world (FAO 2015). Even though there are several very technified farms in Brazil, the horticultural production system is predominantly familiar in farms with less than 10 hectares located within or around urban centres called “greenbelts”, mostly concentrated in the South and Southeast regions of Brazil (Melo 2007, ABCSEM 2015, SEBRAE 2015). In this country, the vegetable marketing is expressive. It is estimated that around 60 % of the volume of fresh produce is sold by wholesale markets, which handle an annual average of 15 million tonnes of vegetables, totalling a value of U\$ 3 billion (ABCSEM 2015, SEBRAE 2015). Regarding the consumption, Brazilians have an annual consumption of 27.075 Kg *per capita* (IBGE - Consumer Expenditure Survey 2008/2009).

Many sources of bacterial contamination have been recognized in the fresh produce chain. The most cited in primary production are soil, manure, livestock, wild animals, and irrigation water (Delaquis et al. 2007, Lotto & Valarini 2007, Forslund et al. 2012, Park et al. 2012, Benjamin et al. 2013, Baranzoni et al. 2014, Ceuppens et al. 2014, Erickson et al. 2014, Holvoet et al. 2014). Among them, irrigation water has been considered as the main responsible for microbial contamination of vegetables at primary production (Mritunjay & Kumar 2015, Uyttendaele et al. 2015).

The horticulture in tropical countries highly depends on irrigation, since the warm weather usually increases the water evaporation. Especially for leafy vegetables which display a big area of perspiration, irrigation is very important to ensure the product quality (Marouelli & Silva 2011, Batista et al. 2012). In Brazil, the most used irrigation system is by sprinklers, spreading untreated water over edible parts of vegetables (Marouelli & Silva 2011).

Among fresh vegetables, lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most important vegetable crops grown and consumed worldwide (Puig Peña et al. , Sala & Costa 2012, Suinaga et al. 2013, FAO 2015, Foundation 2015). In Brazil, lettuce is considered the main leafy vegetable crop, representing nearly 50 % of all leafy vegetable commercialized. Among commercialized lettuces, almost 40 % are curly variety (Moretti & Mattos 2005, Sala & Costa 2012, Suinaga et al. 2013).

Regarding consumption, lettuce is mainly consumed fresh as salads or inside sandwiches prepared at food services and homes (Suinaga al. 2013, Foundation 2015). Frequently children under 6 years old and adults aging more than 55 ate it, and these aging groups are considered of higher risk of suffering foodborne diseases (Foundation 2015).

Until recently, Brazilian food was considered free of *E. coli* O157, however recent reports showed that this microorganism have been isolated sporadically from some samples since (de Paula et.al., 2014). This microorganism was already isolated from animal faeces, animal-food producing, food products, environmental and water samples (Katsuya et al. 1998, Cerqueira et al. 1999, Silveira et al. 1999, Sandrini et al. 2007, Stella 2009, Silveira 2010, Barros et al. 2012, Borges et al. 2012, Loiko 2013, Carvalho et al. 2014, Freitas et al. 2014), however only one human case was reported (de Paula et. al, 2014). Rodrigues et al. (2014) isolated for the first time *E. coli* O157:H7 from irrigation and wash water of lettuce farms in Southern Brazil (Rodrigues et al. 2014), raising concerns about the presence of this microorganism on that region. Thus, the objective of this study was to investigate the contamination of *E. coli* O157 in irrigation water used in lettuce production in Southern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Irrigation water samples (n =56) were collected in six lettuce farms located at a “greenbelt” of Porto Alegre City, Southern Brazil, between July 2014 and July 2015. All farms cultivate the crops in open fields, being two of them producing organic lettuces (Farm 1 and Farm 2) and the others conventional lettuces (Farm 4, Farm 5 and Farm 6) (Table 1). Farms produced other crops beyond lettuces. The farms were monthly visited (12 times) and as soon as the producers irrigated their crops, water samples were taken from the irrigation source (Table 1).

2.1.1. Water samples

The water samples were collected in sterile bottles (1 L) directly at the source used for irrigation. The samples were transported refrigerated inside isothermal boxes to the Laboratory of Food Microbiology of Food Science and Technology Institute of Federal University of Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS) for analysis. In order to determine *Escherichia coli* O157 in water samples, 1 L was filtered on a cellulose nitrate filter pore size, 0.45 µm (Sartorius®, Goettingen, Germany), using as many filters as necessary to filter the sample. Then, the filters were added of 225 ml of Buffered Peptone Water 1 % (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) for 24 ± 2 hours at 37 ± 1 °C.

2.2. Molecular analyses

Bacterial DNA was extracted following the protocol described by the NMKTL Method nº 174 (NMKL 2002). Briefly, 900 µl of the enrichment broth was transferred to a tube containing 600 µl of Percoll (Sigma-Aldrich®) 40 %. Then, the tube was centrifuged for 1 min at 13.200 rpm. The fluid on the top of the tube was removed and 0.1 ml was leaved at the bottom. The remaining volume was transferred to a tube contain 1.2 ml sterile distilled water and vortexed by 1 minute. The tube was centrifuged for 5 min at 10.000 rpm. The fluid on the top of the tube was removed, leaving 0.1 ml at the bottom, 1 ml of sterile distilled water was added and the tube vortexed by 1 minute. This last step was repeated again. Then, the fluid on the top was discarded, leaving 0.2 ml in the tube, which was incubated for 20 min at 95 °C in a heating block. After incubation, the tubes were placed on ice for 5 minutes and centrifuged for 1 minute at 10.000 rpm. The tubes were stored at -20 °C until PCR analysis.

The Real-Time PCR was performed according the primers (Table 2) and cycling conditions (Table 3) described in the ISO 13136:2012 (ISO 2012). It was used the software StepOne Plus® (Life Technologies®, Carlsbad, Estados Unidos) to perform the analyses.

2.3. Culture confirmation

Once the Real-Time PCR showed a positive result for *E. coli* O157 it was performed the culture confirmation. The isolation was conducted according to the methodology described by ISO 16654:2001 standard (ISO 2001). Briefly, from each enriched sample, imunomagnetic separation was performed using Dynabeads (Life

Technologies®, Carlsbad, Estados Unidos), followed by plating on Sorbitol Mac-Conkey Agar (SMAC) (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra) and Sorbitol Mac-Conkey Agar supplemented with Cefixime-Tellurite (SMAC-CT) (OXOID®, Basingstoke, Inglaterra). The plates were incubated for 24 ± 2 hours at 37 ± 1 °C. Suspected colonies were submitted to serotyping using *E. coli* O157 antiserum (DIFCO®, Franklin Lakes, Estados Unidos), by the agglutination reaction. Presumptive colonies were submitted to Real-Time PCR in order to confirm *E. coli* O157 identity and to confirm the presence of the virulence genes in the isolates according the method described in the item 2.2.

2.4. Statistical analyses

The statistical analyses were performed with SPSS Statistics version 21 at a significance level of 5 % ($p= 0.050$).

3. Results

A total of 56 water samples were analysed (Table 1). Differences in sample quantities among farms occurred once producers adopted different agricultural practices and in some sampling days it was raining and the crops were not being irrigated.

The Real-Time PCR performed to detect *E. coli* O157 (*rfbE* gene) was positive for 11 samples (19.65 %). After culture confirmation, in 9 samples the bacteria was recovered and confirmed by Real-Time PCR.

The highest prevalence was observed in the Farm 3 (41.60 %; 5/12), followed by Farm 4 (30.00 %, 3/10), Farm 5 (12.50 %; 1/8) and Farm 1 (9, 00 %; 2/22). The pathogen was not detected on Farms 2 and 6. Statistical analysis demonstrated that the prevalence of *E. coli* O157 was not significantly similar among the six sampled properties (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p = 0.209$).

Regarding the system production adopted, in the organic system of cultivation the presence of *E. coli* O157 in irrigation water was significantly higher in comparison to conventional (16.10 %; 9/56 to 3.60 %; 2/56) (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p = 0.049$).

The prevalence of *E. coli* O157 was not correlated to the different sources of water used, although the p value was rightly close to the limit of the significance (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p = 0.051$). Proportionally, the contamination of *E. coli* O157 by source, was higher in river (38.46 %; 5/13) than pond (14.00 %; 6/43). In well water samples there was not contamination (0/1).

In relation to the presence of *E. coli* O157 and the irrigation method adopted, it was observed that 10 of the 11 pathogens detected belong to Farms which adopted the sprinkler method (22.70 %; 10/44). Only 1 *E. coli* O157 was isolated from a property which used drip irrigation (8.33 %; 1/12). Although it was observed difference, this was not statistically significant (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p = 0.266$).

4. Discussion

Outbreaks of foodborne disease associated with fresh produce are not uncommon (Uyttendaele et. al., 2015). Many reports associate organic systems of

production as higher dangerous to food safety. Ceuppens et. al. (2014) investigating microbial quality in primary agricultural level in Brazil isolate pathogens only in organic farms, suggesting lower microbiological quality and safety in those production systems (Ceuppens et. al 2014). Other autors also report microbial contamination as higher in organic systems in comparison to conventional in Brazil (Gomes Neto et. al. 2012, Maffei et. al 2013).

Gomes Neto et al. (2012) suggest the practice of irrigation with untreated water and the application of manure as a fertilizer as contributing to a higher level of contamination (Gomes Neto et. al. 2012). Similary to those authors, in this study irrigation water from organic farms was significantly higher contaminated than conventional (16.10 % or 9/56 – 3.60 % or 2/56) (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p = 0.049$).

It is also demonstrated that open field farms had higher prevalence of pathogens and overall more samples with elevated levels of *E. coli* compared to the close systems (i.e. greenhouse farms). Maybe explained because of the additional external contamination sources (Sampers et al. 2015, Ceuppens et. al. 2014). In open fields, the production system is more difficult to control and more prone to contaminate as open fields have multiple contamination sources, i.e. livestock and wild animals or during rainfall and storm events (Brackett, 1999; Jay et al 2007; Oporto et. al 2008). Specially climatic conditions, rainfall and temperature, are able to impact the release, growth, and survival of pathogenic microorganisms, which may be introduced or maintained for prolonged periods in the production environment (Parker et al, 2010). In Holvoet et al. (2015) study 45 % of the water source samples without water treatment contained a pathogen. It was recognized that the absence of a water treatment system can have detrimental consequences, particularly for lettuce

production in open fields when more irrigation is necessary (Holvoet et al. 2015). In the present study all farms grow their crops in open fields, being this the main regime of cultivation adopted in Brazil (Marouelli and Silva 2011).

In the last years is increasing the evidence of fresh produce contamination linked to irrigation water (Allende e Monaghan, 2015). Water of inadequate quality has the potential to be a direct source of contamination and a vehicle for spreading contamination in the production (FDA, 1998; EFSA, 2014; Uyttendaele et.al., 2015; Allende & Monaghan 2015). Several studies have detected *E. coli* O157 in water samples such as storage roof water, tap water, house ground reservoirs, mineral water, and wastewater (Foulds et al., 2002; Shaban and Malkawi, 2007, Tharannum et al., 2009; Rodrigues et al 2014; Holvoet et al. 2015).

In addition, different sources of water used for irrigation have a different propensity to result in microbiological contamination of the crops. Surface water includes lakes, rivers, creeks, ponds, and springs that come to the surface. Very often these sources are contaminated due to discharges of (treated) wastewater, storm water runoff or livestock or wildlife feces (Tyrell et al., 2006; Uyttendaele et. al., 2015). This evidence that surface water have unpredictable quality and activities upstream can rapidly change the levels of contaminants (Allende & Monaghan, 2015). On the other hand, in general, borehole water shows less variability in terms of microbial load (Steele and Odumeru 2004). Nonetheless, the potential for groundwater contamination from surface events, such as flooding or storm-related runoff from areas of concentrated manure accumulation, manure lagoons, or sewage treatment facilities, is well recognized (Ibenyassine et al. 2007; Uyttendaele et.al., 2015). In this study, contamination by *E. coli* O157 was not correlated to the source of irrigation water, although the p value was rightly close to the limit of the

significancy (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p = 0.051$). However, it is important to point out that all positive samples were collected in open sources, being higher in pond (10.70 %; 6/56) and lower in river (8.90 %; 5/56). When considering the proportional contamination by sample quantity, the contamination in river (41.70 %; 5/12) showed to be higher than from pond (14.00 %; 6/43).

Some reports evidence the water as the source of contamination in food products. Irrigation with sewage-contaminated water was linked to hepatitis A outbreaks associated with lettuce consumption (Seymour and Appleton 2001). Soderstrom (2008) showed iceberg lettuce contamination with *E. coli* O157 that caused a large outbreak in Sweden, probably due to river water used for irrigation (Soderstrom et al. 2008). Solomon et al. (2002) showed that *E. coli* O157:H7 in contaminated water can enter the vascular system of lettuce and reach the edible parts of the plant, although the authors point out that unrealistic inoculum concentrations were used (Solomon et al., 2002). Similarly, a Belgian study reported significant differences in the microbiological quality of irrigation water obtained from different sources. They reported that 20 % of water obtained from the ponds was positive for *E. coli* STEC, while groundwater did not contain STEC (Delbeke et al., 2015). However, López-Gálvez et al. (2014) analysing surface water used for irrigation did not detect this pathogen in 16 samples in Spain (López-Gálvez et al. 2014).

It is already known that many factors need to be considered when choosing irrigation system applied, since this is closely related to contamination by fungi and bacteria (Stine & others 2005; Marouelli & Silva 2011; Allende & Monaghan, 2015). Sprinkler irrigation facilitates the contamination by exposing the edible portion of the

produce directly to water and the splashing of sprayers can create recontamination of the crop surface from the soil (Marites and others 2010). Drip irrigation limits direct contact between edible plant tissue and irrigation water (Qadir 2008). Application of microbial-contaminated irrigation water using subsurface drip irrigation has been shown to reduce contamination of crops including lettuce at harvest compared to furrow irrigation (Allende & Monaghan, 2015).

Horticulture in Brazil depends from irrigation, since the country has warm weather temperatures, and, even in humid region or during the rain period crops irrigation is essential for good production. Regarding this practice, mainly sprinkler irrigation is adopted, followed by superficial and drip irrigation (Marouelli & Silva 2011). In this study both irrigation method were adopted, being mostly *E. coli* O157 isolated from farms which adopted sprinkler method (22.70%; 10/44). From all pathogens isolated only 1 was isolated in farms where drip irrigation was used. However, it was not correlated to higher prevalence of *E. coli* O157 in samples analysed (Chi-Squared Test of Independence, Likelihood Ratio, $p= 0.266$).

The high sensitivity, specificity, and speed of Real-Time PCR make this method very attractive to detect *E. coli* directly from water samples (Frahm & Obst, 2003; Heijnen & Medema, 2006). However, this method targets the lipopolysaccharide gene (*rfbE*) and detects viable *E. coli* O157:H7 cells, viable but nonculturable (VBNC) and death cells (Liu et al., 2008). Since this method detect both microorganisms forms, the lower number of recovered bacteria on culture confirmation step (9/11) in this project could be explained. Likewise, other studies report the same situation, i. e. in Delbeke et. al. (2015) only 4 of 13 Real-Time PCR positive samples for *E. coli* STEC isolated from water, substrate and cattle feces were recovered in culture confirmation (Delbeke et. al., 2015). Even that the method

also detect VBNC and death cells, the presence of pathogen DNA indicate the current or previous contamination in the product. And, might be, presence of cells witch in some time could be viable and cause foodborne outbreak.

In Brazil, a review study about *E. coli* O157:H7 revel that records demonstrate the occurrence of HUS cases in recent years. However, it was not possible to correlate the food consumption or irrigation water to the cases. It maybe explained by the absence of adequate methods to the detection of *E. coli* O157 in most of official laboratories because this microorganism was not a significant food hazard in Brazil until recently (De Paula et al. 2014).

This study confirmed the presence of *E. coli* O157 in irrigation water of Southern Brazil, what was already reported by Rodrigues et al. (2014). Considering this result, it is essential that irrigation water sources should be controlled and the Implementation of Good Agricultural Practices (GAP) have to be adopted. Such control measures are very necessary to avoid risky practices, which could lead or increase pathogen contamination and spreading on fresh produce of Southern Brazil. The implementation of these and other measures are very important because Brazil in one of the few countries in the world that found *E. coli* O157 before its foodborne outbreaks. This advantage and the right actitude can avoid serious public health problems.

Once the GAP are still not adopted by many farmers in Brazil an alternative to manage this risk is to select the irrigation method and/or the production system used, to avoid direct contact with the edible parts of the crop with faecal contaminated irrigation water and the implementation of physical and/or chemical disinfection systems. For consumers is suggested the chlorination of vegetables eaten raw and proper cooking of food to prevent contamination by this pathogen.

Acknowledgments

The researchers thanks for CNPq, the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil, by the financial support.

Table 1. Characteristics of the six farms sampled.

Farm	Production system	Irrigation source	Irrigation type
Farm 1	Organic	Pond	Sprinkler
Farm 2	Organic	Pond	Drip
Farm 3	Conventional	River	Sprinkler
Farm 4	Conventional	Pond	Sprinkler
Farm 5	Conventional	Pond	Drip
Farm 6	Conventional	Dug	Drip

Table 2. Primers used in PCR detection to determinate *E. coli* O157 in water samples.

Target gene	Forward primer Reverse primer (5' - 3')	Probe	Fragment size	GenBank number	Reference
<i>rfbE</i> (O157)	TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCAA CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT	Probe-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG	88	AF163329	ISO 2012

Table 3. Cycling conditions used in PCR detection to determinate *E. coli* O157 in water samples.

Time (segundos)	Temperature (°C)	Cicles
120	50	1
600	95	1
15	95	45
60	60	

Table 4. *E. coli* O157 prevalence in water samples using for irrigation in Southern Brazil.

Farm	Sample analyzed (n^o)	Prevalence
Farm 1	22	2/22
Farm 2	3	0/3
Farm 3	12	5/12
Farm 4	10	3/10
Farm 5	8	1/8
Farm 6	1	0/1
Total	56	11/56

Reference List

ABCSEM (2015). Projeto para o levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil 2010/2011. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas.

Ackers, M.-L., B. E. Mahon, E. Leahy, B. Goode, T. Damrow, P. S. Hayes, W. F. Bibb, D. H. Rice, T. J. Barrett, L. Hutwagner, P. M. Griffin and L. Slutsker (1998). "An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Leaf Lettuce Consumption." *The Journal of Infectious Diseases*: 6.

Allende, A. Monaghan, J. Irrigation Water Quality for Leafy Crops: A Perspective of Risks and Potential Solutions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, 12, 7457-7477; doi:10.3390/ijerph120707457

Baranzoni, G. M., P. M. Fratamico, F. Rubio, T. Glaze, L. K. Bagi and S. Albonetti (2014). "Detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104 from sprouts." *International Journal of Food Microbiology* 173: 99-104.

Barros, M. R., W. D. da Silveira, J. M. de Araujo, E. P. Costa, A. A. D. Oliveira, A. Santos, V. A. S. Silva and R. A. Mota (2012). "Antimicrobial resistance and plasmidial profile of *Escherichia coli* strain isolated from broilers and commercial layers in the state of Pernambuco, Brazil." *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32: 405-410.

Batista, L. R. L., G. B. M. Gonzaga, J. J. A. Farias, L. S. Reis, T. V. L. d. Araújo and N. A. d. N. Junior (2012). Desenvolvimento da cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) submetido à irrigação com diferentes níveis de salinidade. VII CONNEPI.

Benjamin, L., E. R. Atwill, M. Jay-Russell, M. Cooley, D. Carychao, L. Gorski and R. E. Mandrell (2013). "Occurrence of generic *Escherichia coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast." *International Journal of Food Microbiology* 165: 65-76.

Borges, C. A., L. G. Beraldo, R. P. Maluta, M. V. Cardozo, B. E. C. Guth, E. C. Rigobelo and F. A. de Avila (2012). "Shiga Toxigenic and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* in the Feces and Carcasses of Slaughtered Pigs." *Foodborne Pathogens and Disease* 9: 1119-1125.

Brackett, R.E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biol. Tec.* 1999, 15, 305–311.

Carvalho, R. N., A. N. de Oliveira, A. J. de Mesquita, C. Rezende, A. Q. de Mesquita and R. A. M. Romero (2014). "PCR and ELISA (VIDAS ECO O157 (R)) *Escherichia coli* O157:H7 identification in Minas Frescal cheese commercialized in Goiania, GO." *Brazilian Journal of Microbiology* 45: 7-10.

Cerqueira, A., B. Guth, R. Joaquim and J. Andrade (1999). "High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil." *Veterinary Microbiology* 70(1-2): 10.

CFERT. Investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak Associated with Dole Pre-Packaged Spinach. Available online: http://www.cdc.gov/nceh/ehs/Docs/Investigation_of_an_E_Coli_Outbreak_Associated_with_Dole_Pre-Packaged_Spinach.pdf (accessed on 6 October 2014).

Ceuppens, S., C. T. Hessel, R. D. Rodrigues, S. Bartz, E. C. Tondo and M. Uyttendaele (2014). "Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil." *International Journal of Food Microbiology* 181: 67-76.

Delaquis, P., S. Bach and L. D. Dinu (2007). "Behavior of *Escherichia coli* O157 : H7 in leafy vegetables." *Journal of Food Protection* 70: 1966-1974.

Delbeke, S.; Ceuppens, S.; Holvoet, K.; Samuels, E.; Sampers, I.; Uyttendaele, M. Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Thompson in strawberries, a lettuce mix and basil. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 193. 1–7.

EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella* and Norovirus in leafy greens eaten raw assalads). *EFSA J.* 2014, 11. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal (accessed on 16 May 2015).

Erickson, M. C., M. Y. Habteselassie, J. Liao, C. C. Webb, V. Mantripragada, L. E. Davey and M. P. Doyle (2014). "Examination of factors for use as potential predictors of human enteric pathogen survival in soil." *Journal of Applied Microbiology* 116: 335-349.

FAO. (2015). "Top production vegetables 2012." Retrieved 27 July, 2015, from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD,USA, 2008

Forslund, A., J. H. J. Ensink, B. Markussen, A. Battilani, G. Psarras, S. Gola, L. Sandei, T. Fletcher and A. Dalsgaard (2012). "*Escherichia coli* contamination and health aspects of soil and tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) subsurface drip irrigated with on-site treated domestic wastewater." *Water Research* 46: 5917-5934.

Foundation, P. f. B. H. (2015). State of the Plate 2015 -Study on America's Consumption of Fruits & Vegetables. P. f. B. H. Foundation.

Freitas, E. G., M. R. A. Ferreira, J. F. N. Pinto, F. R. Conceicao and C. N. Moreira (2014). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from healthy dairy cattle in Mid-West Brazil: occurrence and molecular characterization." *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 34: 24-28.

Gomes Neto, N.J. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. *Food Control*, v. 28, p. 47-51, 2012.

Holvoet, K., I. Sampers, M. Seynnaeve, L. Jacxsens and M. Uyttendaele (2015). "Agricultural and Management Practices and Bacterial Contamination in Greenhouse versus Open Field Lettuce Production." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12: 32-63.

Holvoet, K., I. Sampers, M. Seynnaeve and M. Uyttendaele (2014). "Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production." *International Journal of Food Microbiology* 171: 21-31.

IBISWorld (2015). Global Fruit & Vegetables Processing. March 2015: 37.

ISO (2001). "16654:2001".

ISO (2012). Microbiology of food and animal feed - Real-Time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of foodborne pathogens- Horizontal method for the detection of Shiga-Toxin *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O23, O103 and O145 serogroups. ISO/TS 13136.

Jay, M.T.; Cooley, M.; Carychao, D. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13, 1908–1911.

Katsuya, E., L. Lerner, R. Costa, M. Jakabi, A. Dias and A. Tavechioet (1998). "*Escherichia coli* O157:H7, um enteropatógeno emergente." Coordenação dos Institutos de Pesquisa 1: 1.

Loiko, M. (2013). Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Lotto, M. C. and P. J. Valarini (2007). "Avaliação da contaminação de coliformes fecais em alface (*Lactuca sativa*), água de irrigação e lavagem em sistemas de produção orgânica e convencional." *Revista Brasileira de Agroecologia* 2(2): 4.

Lopez-Galvez, F.; Allende, A.; Pedrero-Salcedo, F.; Alarcon, J.J.; Gil, M.I. Safety assessment of greenhouse hydroponic tomatoes irrigated with reclaimed and surface water. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 191, 97–102.

Maffei, D.F., Silveira, N.F.D., Catanozi, M.D.L.M., 2013. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control* 29, 226–230.

Marouelli, W. A. and W. L. C. Silva (2011). "Seleção de Sistemas de Irrigação para Hortaliças." Circular Técnica EMBRAPA nº98.

Melo, P. C. T. d. (2007). Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças. 13ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Hortaliças. MAPA. Brasília.

Moretti, C. L. and L. M. Mattos. (2005). "Processamento mínimo de alface crespa." 25.

Mritunjay, S. K. and V. Kumar (2015). "Fresh Farm Produce as a Source of Pathogens: A Review." *Research Journal of Environmental Toxicology* 9: 59-70.

NMKL (2002). NMKL Method nº174.

Oporto, B.; Esteban, J.I.; Aduriz, G.; Juste, R.A.; Hurtado, A. *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in northern Spain. *Zoonoses Public Health* 2008, 55, 73–81.

Park, S., B. Szonyi, R. Gautam, K. Nightingale, J. Anciso and R. Ivanek (2012). "Risk Factors for Microbial Contamination in Fruits and Vegetables at the Preharvest Level: A Systematic Review." *Journal of Food Protection* 75: 2055-2081.

Parker, J.K.; McIntyre, D.; Noble, R.T. Characterizing fecal contamination in stormwater runoff in coastal North Carolina, USA. *Water Res.* 2010, 44, 4186–4194.

Paula, C. M. D. d., L. S. Casarin and E. C. Tondo (2014). "*Escherichia coli* O157:H7 — patógeno alimentar emergente." *Vigilância Sanitária em Debate* 2(4): 10.

Pimentel, D. and A. Wilson (2004). "Population and its discontents." *WORLD WATCH - Vision for a Sustainable World* September/October(1): 5.

Puig Peña, Y., V. Leyva Castillo, A. Suárez, J. Carrera Vara, P. L. Molejón, Y. Muñoz and O. Dueñas Moreira "Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana Microbiological quality of vegetables and factors associated with contamination in growing areas in Havana." *Rev haban cienc méd*: 111-119.

Rodrigues, R., M. Loiko, C. Paula, C. Hessel, L. Jacxsens, M. Uyttendaele, R. Bender and E. Tondo (2014). "Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil." *Food Control* 42: 12.

Sala, F. C. and C. P. Costa (2012). "Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira." *Horticultura Brasileira* 30.

Sandrini, C., M. Pereira, C. B. CS, J. Carvalhal and M. Aleixo (2007). "*Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil." *Ciência Rural* 37(1): 7.

Seymour, I.J. and Appleton, H. (2001) A review, foodborne viruses and fresh produce. *J Appl Microbiol* 91, 759–773

Solomon, E.B., Yaron, S. and Matthews, K.R. (2002) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalisation. *Appl Environ Microbiol* 68, 397–400.

SEBRAE. (2015). "O mercado de hortaliças no Brasil." Retrieved 27 July, 2015, from <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/O-mercado-de-hortaliças-no-Brasil>.

Silveira, J. (2010). Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Silveira, N., N. Silva, C. Contreras, L. Miyagusku, M. Baccin and E. Koono (1999). "Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brazil." *Journal of Food Protection* 62(11): 2.

Stella, A. E. (2009). Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da Região de Ribeirão Preto-SP, Universidade Estadual Paulista.

Suinaga, F. A., L. S. Boiteux, C. S. Cabral and C. d. S. Rodrigues (2013). "Efeitos do calor e fontes tolerância ao florescimento precoce em variedades de alface do tipo americana." *Comunicado Técnico nº 88 - EMBRAPA*: 4.

Soderstrom, A.; Lindberg, A.; Andersson, Y. EHEC O157 Outbreak in Sweden from Locally Produced Lettuce, August-September 2005. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2794> (accessed on 22 September 2005).

Tyrrel, S.F.; Knox, J.W.; Weatherhead, E.K. Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *J. Food Prot.* 2006, 69, 2029–2035.

Uyttendaele, M., L. A. Jaykus, P. Amoah, A. Chiodini, D. Cunliffe, L. Jacxsens, K. Holvoet, L. Korsten, M. Lau, P. McClure, G. Medema, I. Sampers and P. R. Jasti (2015). "Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 336-356.

WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No. 916. Geneva.