**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Ocorrência e caracterização de *Salmonella* Não
Tifóide em esgotos brutos e águas superficiais
da Região Metropolitana de São Paulo**

Lincoln Zappellini da Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Saúde
Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria
Tereza Pepe Razzolini

**São Paulo
2015**

Ocorrência e caracterização de *Salmonella* Não Tifóide em esgotos brutos e águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo

Lincoln Zappelini da Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Saúde
Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria
Tereza Pepe Razzolini

**São Paulo
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

À minha amada Bruna

Agradecimentos

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos sob processo nº 132623/2013-7, que possibilitou minha participação, em período integral, nas atividades desta pesquisa;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) pelo suporte financeiro. Edital FAPESP/SABESP (2010/50797-4);
- À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), pelo apoio logístico na coleta das amostras de águas superficiais e esgotos brutos;
- À orientadora Prof^a Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini pelos ensinamentos e discussões sobre o tema de estudo e escrita científica, pela atenção às minúcias da pesquisa, por me incentivar a dialogar com a comunidade científica ao participar de publicações do grupo e congressos da área, e pela compreensão em momentos difíceis da minha vida pessoal;
- À minha esposa Bruna por estar ao meu lado em todos os momentos desta trajetória. Por cuidar, sorrir, chorar, brigar, ouvir, falar, consolar, abraçar, acompanhar, ajudar (...) enfim, amar!;
- Aos meus pais, Neide e Nelson. Pessoas simples, que me incentivaram a trilhar os caminhos que eu escolhi para a minha vida;
- Ao meu irmão Redêncio, cunhada Marina e sobrinhos Vinícius, Renata e Thamilly, pela amizade e momentos de descontração;
- Ao grande amigo Flávio Krzyzanowski Jr., que me incentivou a ingressar na pesquisa, pela contribuição intelectual na minha formação, pela ajuda com o trabalho prático desta pesquisa e pelos momentos hilariantes em meio a tanta tensão;
- À Dr^a Solange Martone Rocha pela amizade e pela determinação em fazer desta uma pesquisa de qualidade assumindo a responsabilidade

de conduzir as análises quando não pude estar presente. Você é parte do corpo desta pesquisa;

- À Dr^a. Maria Helena Matté, pela amizade, pelos ensinamentos práticos e teóricos sobre Biologia Molecular e também por assumir grande parte do trabalho prático desta pesquisa. Você também é parte do corpo desta pesquisa;
- À Dr^a. Milena Dropa pela amizade, por ouvir minhas angústias, questionar e sanar dúvidas, apontar fragilidades e indicar caminhos, e por aceitar avaliar este trabalho;
- Aos amigos do Laboratório de Biologia Ambiental e Departamento de Saúde Ambiental: Veridiana, Maria do Carmo, Francisca, Pedro, Jéssica Santiago, Bruno, Paloma e Jéssica Volejnik, pela companhia e conversas, intelectuais ou nem tanto;
- Aos amigos do Laboratório de Prática de Saúde Pública - Mirian, Francisco, Lívia, Marina e Rafaela, RONALDA, pela companhia, conversas e orientações no laboratório;
- Aos amigos Gusta e Edgard, que me acompanham desde os tempos remotos de graduação;
- Aos familiares Ailton, Edveth, Brenda, Sandro, Andréa, Sr^a Ivone, Wanderley, Leila, Lígia e Hudson, que sempre nos acolheram e ajudaram, principalmente em momentos delicados de nossa vida;
- À Dr^a. Maria Bernadete de Paula Eduardo do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo por aceitar integrar a banca para avaliar este trabalho;
- À Dr^a. Sueli Aparecida Fernandes do Instituto Adolfo Lutz (IAL), por aceitar realizar a sorotipagem de controles positivos de *Salmonella Typhimurium* utilizados nesta pesquisa;
- Aos funcionários do setor de pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública/USP Renilda, Marilene, Ângela e Ulysses, por serem tão solícitos e me ajudarem com as questões burocráticas do mestrado.

Resumo

Silva LZ. Ocorrência e caracterização de *Salmonella* Não Tifóide em esgotos brutos e águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2015.

Salmonella Não Tifóide (SNT) é um dos patógenos que mais causam gastroenterite, representando um problema de saúde pública em todo o mundo. Portanto, a presença de SNT em matrizes ambientais como águas superficiais e esgotos tem sido alvo de pesquisas em todo o mundo. Os objetivos deste estudo foram quantificar e caracterizar SNT em amostras de águas superficiais e esgotos brutos da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). Foram coletadas amostras, quinzenalmente, no ponto de captação de água para o abastecimento público da represa Guarapiranga e do manancial São Lourenço, assim como de esgotos brutos das cidades de Taboão da Serra e São Lourenço da Serra. A quantificação de SNT foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP). A caracterização dos isolados (identificação do sorotipo e potencial patogênico) foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), com quatro conjuntos de iniciadores, contemplando marcadores genéticos consolidados (*fliC*, *invA* e *spvC*) e regiões gênicas ainda não caracterizadas. As águas superficiais apresentaram concentrações que variaram de Limite de Detecção (LD <0,06473 NMP/100 mL) a 0,67 NMP/100 mL, com frequência de 4%, enquanto nos esgotos brutos as concentrações foram de LD a 54,22 NMP/100 mL, com frequência de 54%. Foram isoladas sete cepas de amostras de águas superficiais, identificadas como *Salmonella* sp., e 499 de esgotos brutos, dentre as quais se identificaram nove sorotipos potencialmente patogênicos. Os sorotipos mais prevalentes foram *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Enteritidis e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium, que se apresentaram quase que exclusivamente nos meses de verão (dezembro a janeiro). Os

dois últimos sorotipos apresentaram padrões atípicos de *PCR*, com regiões gênicas que contêm genes que expressam constituintes fimbriais e outras ainda não caracterizadas. Esta investigação evidencia a presença de *Salmonella* Não Tifóide potencialmente patogênica nas amostras de esgoto bruto analisadas sugerindo sua circulação na população da região estudada e corrobora com o regime sazonal de salmonelose.

DeCS: Salmonella, água superficial, esgoto, sorotipo

Palavras-chave: invA, spvC, fliC

Abstract

Silva LZ. Ocorrência e caracterização de *Salmonella* Não Tifóide em esgotos brutos e águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo./Occurrence and characterization of Non-Typhoidal *Salmonella* in raw sewage and surface water from the Metropolitan Region of São Paulo [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2015.

Non-Typhoidal *Salmonella* (NST) is a concern pathogen which is responsible for gastroenteritis outbreaks worldwide. So its presence in environmental sources such as surface waters and sewage has been investigated around the world. The aims of this research were quantify and characterize NST in samples of surface water and raw sewage from Metropolitan Region of São Paulo (MRSP). Samples were collected fortnightly in the catchment point of supply from Guarapiranga reservoir and São Lourenço River, as well as raw sewage from the cities of Taboão da Serra and São Lourenço da Serra. Quantification of NST was performed using Most Probable Number technique (MPN). Characterization of the isolates (serotype identification and pathogenic potential) was carried out by multiplex Polymerase Chain Reaction technique (m-PCR) with four sets of primers, including genetic markers (*fliC*, *invA* and *spvC*) and gene regions not yet characterized. Surface water showed concentrations ranging from detection limit (DL <0.06473 MPN / 100 mL) to 0.67 MPN/100 mL with a frequency of 4%. Raw wastewater concentrations were from DL to 54.22 MPN/100 mL, with a frequency of 54%. Seven strains of surface water samples were isolated and identified as *Salmonella* sp. and 499 from raw sewage, of which nine were identified as potentially pathogenic serotypes. The most prevalent serotypes were *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, which have been found almost exclusively in summer months (December-January). The two serotypes presented atypical patterns of PCR with gene regions containing genes that

express fimbrial constituents and other not yet characterized. This research shows the presence of potentially pathogenic Non-Typhoidal *Salmonella* in raw sewage samples suggesting its circulation in the population of the study area and corroborates with the seasonal cases of salmonellosis.

DeCS: Salmonella, surface water, sewage, serotype

Keywords: invA, spvC, fliC

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 TAXONOMIA E NOMENCLATURA DE <i>Salmonella</i>	20
3.2 CIRCULAÇÃO DE <i>Salmonella</i> NÃO TIFOIDE NO AMBIENTE	23
3.2.1 Ocorrência de <i>Salmonella</i> Não Tifóide em Águas Superficiais e Esgotos Sanitários	25
3.3 EPIDEMIOLOGIA DE <i>Salmonella</i> NÃO TIFOIDE	30
3.3.1 Surtos de Salmonelose Relacionados às Águas	32
3.4 DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL E ESPACIAL DE SOROTIPOS de <i>Salmonella</i> Não Tifóide	34
3.4.1 Distribuição Temporal de Sorotipos de SNT no Estado de São Paulo	37
3.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Salmonella</i> Não Tifóide ..	38
3.5.1 Mecanismos de Patogenicidade e Presença de Genes de Virulência em <i>Salmonella</i> Não Tifóide	41
4. MÉTODOS	47
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA	47
4.1.2 Represa Guarapiranga	47
4.1.3 São Lourenço da Serra e Manancial São Lourenço	49

4.1.4 Taboão da Serra	51
4.2 AMOSTRAGEM	52
4.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> NÃO TIFÓIDE	58
4.3.1 Controle de Qualidade da Detecção e Quantificação de <i>Salmonella</i> Não Tifóide	59
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE <i>Salmonella</i> NÃO TIFÓIDE POR ENSAIOS MOLECULARES	62
4.4.1 Extração de DNA Total dos isolados de SNT	63
4.4.2 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i> – PCR)	63
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	69
5. RESULTADOS	70
6. DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
SUGESTÕES	87
ANEXOS	88
REFERÊNCIAS	103

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1. Taxonomia de <i>Salmonella</i> sp. de acordo com o White-Kauffmann-Le Minor scheme	22
Tabela 2. Distribuição de isolados de SNT, segundo estações do ano, de janeiro a dezembro de 2013	74
Quadro 1. Prevalência de sorotipos de SNT mais isolados de fontes humanas e não humanas segundo continentes geopolíticos, de 2001 a 2007	36
Quadro 2. Taxas de recuperação de <i>Salmonella</i> nos testes PIR e PRC.	62
Quadro 3. Número mais provável (NMP/100 ml) e taxas de recuperação de <i>Salmonella</i> no teste Spike, segundo tipo de matriz utilizada	63
Quadro 4. Iniciadores utilizados para identificação de <i>Salmonella</i> sp. (2); <i>Salmonella</i> Enteritidis (3) e <i>Salmonella</i> Typhimurium (1)	64
Quadro 5. Iniciadores utilizados para identificação de sorotipos de SNT e presença de genes de virulência, de acordo com os conjuntos STM, STY e STV	67
Quadro 6. Padrões de PCR dos 42 sorotipos de <i>Salmonella</i> descritos por PETERSON et al. (2010)	68

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da circulação de <i>Salmonella</i> Não Tifóide no ambiente	24
Figura 2. Processo de infecção por <i>Salmonella</i> Não Tifóide	42
Figura 3. Microcopia eletrônica e representação do Sistema de Secreção Tipo III (IP1 - SST3)	44
Figura 4. Ponto de coleta de água superficial da Represa Guarapiranga.....	54
Figura 5. Local e coleta de água superficial na Represa Guarapiranga...	54
Figura 6. Ponto de coleta de água superficial do manancial São Lourenço	55
Figura 7. Local de coleta de água superficial no manancial São Lourenço	55
Figura 8. Ponto de coleta de esgoto bruto em Taboão da Serra	56
Figura 9. Local e coleta de esgoto bruto em Taboão da Serra	56
Figura 10. Ponto de coleta de esgoto bruto em São Lourenço da Serra..	57
Figura 11. Local e coleta de esgoto bruto em São Lourenço da Serra	57
Figura 12. Concentrações de SNT (NMP/100 mL) em amostras de esgotos brutos de São Lourenço da Serra e Taboão da Serra, de janeiro a dezembro de 2013	72
Figura 13. Imagem de gel de agarose mostrando os padrões de PCR dos sorotipos identificados com os conjuntos de iniciadores de SOUMET et al. (1999)	74
Figura 14. Distribuição de sorotipos de SNT identificados nas amostras de esgotos brutos, de janeiro a dezembro de 2013	75
Figura 15. Imagem de gel de agarose mostrando os padrões de PCR dos sorotipos identificados com os conjuntos de iniciadores STM, STY e STV	76

Siglas utilizadas

ASM - American Society for Microbiology
ATR - Acid Tolerance Response
CDC - Centers for Disease Control and Prevention
DTAs - Doenças Transmitidas por Alimentos
ETE - Estação de Tratamento de Esgotos
IAP - Índice de Qualidade de Água para Fins de Abastecimento Público
IP1 - Ilha de Patogenicidade 1
IP1 - SST3 - Sistema de Secreção Tipo III
IWA - International Water Association
LD - Limite de Detecção
LIA – Lysine Iron Agar
MSL - Manancial São Lourenço
MSRV - Rappaport-Vassiliadis modificado
NMP - Número Mais Provável
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Polimerase Chain Reaction
PIR - Precisão Inicial de Recuperação
PRC - Precisão de Recuperação em Curso
PulseNet - Foodborne Disease Outbreak Surveillance System
RG - Represa Guarapiranga
RMSP - Região Metropolitana de São Paulo
SLS - São Lourenço da Serra
SNT - *Salmonella* Não Tifóide
Spike - Semeadura de Matriz
TSB - Tryptic Soy Broth
TS - Taboão da Serra
TSI - Triple Sugar Iron Agar
XLD - Xilose Lisina Desoxicolato

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é tipicamente classificada de acordo com as enfermidades causadas em humanos e dividida em dois grupos: *Salmonella* Tifóide, representado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi, causadora de febre tifoide e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Paratyphi A, B e C, que causam febre entérica, e; *Salmonella* Não Tifóide (SNT), que compreende mais de 2.500 sorotipos (WHO, 2007), responsáveis por causar gastroenterites (salmonelose) e que, eventualmente, podem evoluir para bacteremias.

Os agravos causados por SNT representam um problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que SNT seja responsável por 93 milhões de casos novos de gastroenterite todos os anos, dos quais 155 mil evoluem para óbito (MAJOWICZ et al., 2010). Nos países da União Europeia as salmoneloses foram a segunda maior causa das doenças zoonóticas em 2012, atrás apenas da campilobacteriose, com 91.034 casos confirmados e 61 óbitos (EFSA/ECDPC, 2014). Em 2005, o Sistema Nacional Australiano de Vigilância de Doenças Notificáveis registrou 7.720 casos de salmonelose, sendo esta a segunda maior causa de infecções por bactérias no país (HALL et al., 2008). Em 2008, nos Estados Unidos, SNT foi o patógeno que mais causou infecções, contando com 7.444 casos de salmonelose confirmados, o que representou 38,95% das infecções por bactérias naquele ano (NYACHUBA, 2010).

Os números citados acima podem ser ainda maiores, levando em consideração que uma parte expressiva de casos de salmonelose é subnotificada. Nos Estados Unidos, por exemplo, para cada caso de salmonelose notificado pelo *Foodborne Disease Outbreak Surveillance System (PulseNet)*, avalia-se que 38 não sejam detectados ou reportados.

Desta forma, estima-se que o número de casos neste país seja de aproximadamente 1.4 milhões anualmente, resultando em 15.000 hospitalizações e 400 mortes (VOETSH et al., 2004).

No Brasil, as doenças transmitidas por água e alimentos são classificadas como DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos). Entre os anos de 2000 e 2013, foram registrados 8.746 surtos de DTAs, cujo principal patógeno foi *Salmonella* sp., apontado como causa primária de 39,39% (1.525/3.872) dos surtos com identificação do agente etiológico envolvido. Destaca-se que dos 4.888 surtos de DTAs com causa identificada, 492 (10%) tiveram como veículo de contaminação a água, sendo esta uma importante fonte de contaminação por SNT no país (ALVES, 2013).

A presença de SNT tem sido relatada em esgotos sanitários e em águas superficiais, inclusive aquelas destinadas ao abastecimento público (ESPIGARES et al., 2006; HSU et al., 2011; JOKINEN et al., 2011; O' REILLY et al., 2007; THOMAS et al., 2012), representando um fator de risco à saúde humana, uma vez que este patógeno tem sido relacionado a surtos de gastroenterite pelo consumo de água contaminada ou de alimentos cultivados com águas contaminadas (ANGULO et al., 1997; CDC, 2008; LEVANTESI et al., 2012).

O comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, especialmente aqueles destinados ao abastecimento público e recreação de contato primário, em função da contaminação biológica, revela um quadro preocupante. Esse cenário é reflexo do descompasso entre os serviços de distribuição de água e coleta e tratamento de esgotos no Brasil, fortemente marcado por diferenças entre as Unidades da Federação e entre áreas urbanas e rurais (IBGE, 2011). Apesar de São Paulo ser o estado com a melhor situação de coleta de esgotos por município no Brasil, onde 644 dos 645 municípios possuem rede coletora (IBGE, 2011), esta coleta não é realizada de forma integral em todos os municípios. Dados do ano de 2013 revelaram que na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), com

população de quase 20 milhões de pessoas, cerca de 13% dos esgotos sanitários não são coletados, sendo que praticamente um terço (32%) do que é coletado sequer recebe tratamento (SABESP, 2013).

Os sistemas públicos de distribuição de água são susceptíveis a falhas, as quais foram responsabilizadas por ocasionar 18,8% (13/69) dos surtos de diarreia associados à água, entre 2000 e 2002, no Estado de São Paulo (DDTHA/CVE/SES-SP, 2004). Se a contaminação dos mananciais que servem ao abastecimento público ocorrer simultaneamente a um tratamento ineficiente da água, pode ocorrer a disseminação de SNT no sistema público de abastecimento, expondo a população ao patógeno (HSU et al., 2011) e colocando em risco, principalmente, aquelas pessoas mais susceptíveis ao desenvolvimento de bacteremias, como crianças, idosos e imunodeprimidos (portadores do HIV, transplantados e pessoas em fase de tratamento quimioterápico) (CASTRO et al., 2002; FEASEY et al., 2012).

As infecções por SNT, em cerca de 99% dos casos, são causadas por poucos sorotipos pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (CDC, 2005). Apenas *Salmonella* Enteritidis foi responsável por 62% dos surtos causados por SNT, associados a restaurantes do Estado de São Paulo, entre 1999 a 2002 (EDUARDO et al., 2004). *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (incluindo a variação monofásica 4,5,12:i:-), responderam por 32,8% das infecções por SNT nos EUA, em 2011, (CDC, 2013) e 70,6% na Europa, em 2013 (EFSA/ECDPC, 2014). Além disso, estudos de âmbito global demonstram que menos de 20 sorotipos de SNT representam de 50 a 90% dos isolados de fontes antrópicas e não antrópicas (GALANIS et al., 2006; HENDRIKSEN et al., 2009; HERIKSTAD et al., 2002; RODRIGUE et al. 1990).

Geralmente, os surtos de salmonelose são mais incidentes no verão (CDC, 2013; EFSA/ECDPC, 2014), mas dependendo da região também podem apresentar picos de casos na primavera (WAGNER et al., 2013). É possível que nestas épocas do ano haja uma maior circulação de sorotipos de SNT mais virulentos na população. Sendo assim, a quantificação e

caracterização de sorotipos de SNT em amostras ambientais, como águas superficiais que servem ao abastecimento público e recreação da RMSP e esgotos sanitários brutos gerados nesta região, auxiliam na compreensão dos sorotipos circulantes de SNT de relevância epidemiológica nesta população ao longo do ano.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar e caracterizar *Salmonella* Não Tifóide (SNT) de amostras de esgotos brutos e águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar SNT de amostras de esgotos brutos gerados por duas cidades da Região Metropolitana de São Paulo: Taboão da Serra e São Lourenço da Serra;
- Quantificar SNT de amostras de águas superficiais provenientes de dois mananciais: represa Guarapiranga e manancial São Lourenço, ambos destinados ao abastecimento público da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP);
- Identificar os sorotipos de SNT e detectar a presença de genes de virulência nos isolados das amostras de águas superficiais e esgotos brutos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TAXONOMIA E NOMENCLATURA DE *Salmonella*

Salmonella spp. são bastonetes gram-negativos, não esporogênicos e, como todas as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são oxidase negativa. Bactérias deste gênero são caracteristicamente mesofílicas, anaeróbias facultativas, não fermentam sacarose e a maioria também não fermenta a lactose (WINN Jr et al., 2008). Praticamente todos os sorotipos de *Salmonella* são móveis, com exceção de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Gallinarum e a variação Pullorum (WHO, 2007).

O nome *Salmonella* é derivado de *Salmonella choleraesuis*, uma homenagem feita por Lignieres, em 1900, ao bacteriologista americano D. E. Salmon que, seis anos antes, isolou a bactéria pela primeira vez de intestino de porcos e a nomeou inicialmente de *Bacillus choleraesuis*. Desde então, a taxonomia e nomenclatura de *Salmonella* vem sofrendo diversas alterações como resultado de um longo processo de discussão, envolvendo taxonomistas e órgãos que regulamentam a sistemática de procariotos e bactérias (BRENNER et al., 2000; SU e CHIU, 2007; TINDALL et al. 2005)

A taxonomia de *Salmonella*, como hoje é conhecida, começou a se estabelecer a partir de 1987, quando Le Minor e Popoff, do Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* do Instituto Pasteur (França), formalizaram uma proposta taxonômica junto a Comissão Judicial do Comitê Internacional de Sistemática de Bactérias (TINDALL et al., 2005). Esta proposta foi aprovada recentemente, em 2005 (JUDICIAL COMMISSION, 2005), consolidando o “*Kauffman-White scheme*”, que já vinha sendo

adotado pela comunidade científica e por órgãos governamentais há mais de uma década (SU e CHIU, 2007).

O “*Kauffman-White scheme*” que a partir de 2007 é denominado “*White-Kauffman-Le Minor scheme*”, define o sistema de classificação de *Salmonella* com base em décadas de estudos sobre a interação de anticorpos com os antígenos somático (O) e flagelar (H). Este esquema é definido e atualizado pelo Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* do Instituto Pasteur (França), colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS), e se encontra em sua 9ª edição (WHO, 2007).

A Tabela 1 resume a classificação de *Salmonella* de acordo com a 9ª edição do Manual “*Antigenic formulas of the Salmonella serovars*”, editado por Grimont e Weill (WHO, 2007). Observa-se que o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, que por sua vez são subdivididas em seis subespécies, às quais são computados 2.579 sorotipos. Aproximadamente 60% dos sorotipos pertencem à *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Neste grupo a maioria dos sorotipos é denominada de acordo com a região geográfica onde foram isolados pela primeira vez, enquanto outros, nomeados antes de 1966, receberam nomes relacionados aos sintomas provocados pela sua infecção. Aqueles que não possuem nome são denominados pela sua fórmula antigênica (SU e CHIU, 2007; WHO, 2007).

A Tabela 1 também reflete a nomenclatura de *Salmonella* definida pelo manual e adotada pela OMS, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e a *International Water Association* (IWA). O gênero *Salmonella* deve ser escrito em itálico e com a letra inicial maiúscula. Espécie e subespécie são escritas em itálico, com letras minúsculas. O sorotipo não é italizado e começa com a primeira letra maiúscula. Quando mencionados pela primeira vez devem conter a indicação de “subespécie” ou “subsp.” e “sorotipo” ou “sor.”, por exemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium, em seguida podendo ser contraído para *Salmonella* Typhimurium.

Tabela 1. Taxonomia de *Salmonella* sp. de acordo com o *White-Kauffmann-Le Minor scheme*.

Gênero	Espécies	Subespécies	Exemplos de sorotipos	Número de sorotipos
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	Typhimurium, Montevideo	1.531
		<i>salamae</i> (II)	9,46:z:z39	505
		<i>arizonae</i> (IIIa)	43:z29:-	99
		<i>diarizonae</i> (IIIb)	6,7:l,v:1,5,7	336
		<i>houtenae</i> (IV)	21:m,t:-	73
		<i>indica</i> (VI)	59:z36:-	13
	<i>bongori</i>	subespécies V	13,22:z39:-	22
Total				2.579

Adaptado de SU e CHIU (2007) e WHO (2007)

Atualmente é comum observar revistas científicas que adotam a contração do gênero *Salmonella* ao mencionar o sorotipo. Os periódicos científicos publicados pela Sociedade Americana de Microbiologia (*American Society for Microbiology* - ASM) adotam a contração “*S. Typhimurium*” (http://jb.asm.org/site/misc/journal-ita_nom.xhtml#02). Outro exemplo é a revista *Nature* que ainda adota a nomenclatura “*S. typhimurium*” em trabalhos recentes (MEUNIER et al., 2014). Por outro lado, as publicações do CDC, como a *Emerging Infectious Diseases* (<http://wwwnc.cdc.gov/eid/page/scientific-nomenclature>), e da IWA, como a *Water Research* (JOKINEN et al., 2011), adotam a nomenclatura recomendada no manual da OMS, que estipula que o gênero só pode ser contraído quando seguido de epíteto (*S. enterica* Typhimurium, ou *Salmonella* Typhimurium) (WHO, 2007). Portanto, a título de padronização, a nomenclatura adotada neste trabalho será a da 9ª edição do Manual “*Antigenic formulas of the Salmonella serovars*”.

3.2 CIRCULAÇÃO DE *SALMONELLA* NÃO TIFOIDE NO AMBIENTE

A Figura 1 representa um esquema de circulação de SNT no ambiente. Observa-se que essa bactéria circula em diversas matrizes ambientais (águas superficiais, subterrâneas e residuárias e os subprodutos gerados em processos de tratamento) assim como em animais, vegetais e seus derivados, utilizados na alimentação humana. As águas superficiais, cuja destinação é o abastecimento público, irrigação e dessedentação de animais e ainda à recreação, ocupam a posição central, representando um elemento intermediador na disseminação e transmissão de SNT, uma vez que servem de corpo receptor de material fecal e esgotos sanitários tratados ou não.

Portadores de SNT liberam entre 10^4 e 10^8 células/g de fezes (MAIER et al., 2009), que podem ser lançadas de forma direta ou indireta no solo e águas superficiais, ou então coletadas por fossas sépticas ou redes coletoras de esgotos sanitários (Figura 1). A prática de defecação ao ar livre é mais comum do que se imagina, pois ainda hoje é exercida por 1,1 bilhões de pessoas em todo o mundo (15% da população mundial), sendo sete milhões do Brasil (WHO/UNICEF, 2012). A coleta das fezes por fossas sépticas também pode ser uma fonte de contaminação de águas superficiais, por meio de interligações com as águas subterrâneas (BESSONG et al., 2009; HALEY et al., 2008).

A concentração de SNT em esgotos sanitários é da ordem 1 a 10^5 células/L (WHO, 2006). A redução desses patógenos em sistemas de tratamento por lodos ativados varia de 1 a 4 logs, o que significa que mesmo nos efluentes essas concentrações podem variar de 10 a 10^4 células/L (WHO, 2003). Além do mais, SNT também pode estar presente no lodo de esgoto resultante do tratamento, o que tem sido alvo de pesquisas em todo o mundo devido as implicações de sua destinação à agricultura (SIDHU e TOZE, 2009).

Figura 1. Esquema representativo da circulação de *Salmonella* Não Tifóide no ambiente.

Notas: → Fluxo de SNT; forma de contaminação; seres vivos; águas; fezes e subprodutos de tratamentos; alimentos.

3.2.1 Ocorrência de *Salmonella* Não Tifóide em Águas Superficiais e Esgotos Sanitários

A presença de SNT em águas superficiais e esgotos brutos evidencia a importância destes veículos como fonte de disseminação de patógenos no ambiente. A exposição da população a estas águas coloca a saúde humana em risco, sendo então alvo de estudos da ocorrência de SNT em diversos países, com águas que servem a diferentes propósitos.

Constatou-se, no Sul da Califórnia, a infecção em animais que viviam em torno dos domicílios de uma comunidade agrícola localizada às margens de um rio que recebia lançamentos de uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE). KINDE et al. (1996) verificaram que a infecção era por *Salmonella* Enteritidis cuja presença foi evidenciada nos efluentes da ETE e nas águas do rio. Análises moleculares mostraram que o perfil plasmidial dos isolados das amostras ambientais e clínicas eram compatíveis e, portanto, os efluentes da ETE seriam os responsáveis pela contaminação da água do rio e, por conseguinte, dos animais expostos a essas águas.

Foi realizada, por WAAGE et al. (1999), a determinação da ocorrência de *Salmonella* SNT em amostras de água do lago Maridalsvannet (responsável pelo abastecimento da cidade de Oslo - Noruega), de três rios e ainda em amostras de esgoto bruto da ETE Bekkelaget. SNT não foi detectada nas amostras de água, tanto nas amostras do lago como nas dos rios, mas esteve presente no esgoto bruto. Os autores especularam que estas águas poderiam conter células de SNT que são viáveis, mas não cultiváveis, sendo improvável a sua recuperação por métodos que utilizem meios de enriquecimento.

HO e TAM (2000) compararam duas técnicas para a enumeração de *Salmonella* em amostras de esgoto bruto e águas superficiais de rios e riachos de Hong Kong. *Salmonella* esteve presente em 65% das amostras (34/52), com concentrações que variaram de 1 a $4,6 \times 10^3$ células/L. O

número de amostras positivas para *Salmonella* foi igual entre as técnicas de tubos múltiplos e imunoensaio para todos os tipos de águas testadas.

ARVANITIDOU et al. (2005) averiguaram a diversidade de sorotipos de SNT em dois rios do norte da Grécia. Foram verificadas 21% (8/38) de amostras positivas do rio Aliakmon, utilizado como fonte de água para a cidade de Thessaloniki, a segunda maior da Grécia. O rio Axios, que recebe esgoto antes de entrar no país, apresentou 36,8% (21/57) de amostras positivas. Os sorotipos de SNT isolados das amostras de água foram *Salmonella* Tshiongwe, Bovis morbificans, Dabou, Hadar, Mbandaka, Muenster, Montevideo, Jubilee, Hilbrow, Infantis, Halle, Roan, Virchow, Yolo, Ibadan, Cerro, Cubana, Seftenberg, Kedougou. Os autores hipotetizaram que pode ter ocorrido mudanças na epidemiologia de salmonelose em humanos ou animais da região, pois os sorotipos *Salmonella* Agona, Anatum e Enteritidis, que foram isolados oito anos antes destes rios (ARVANITIDOU et al., 1997), não foram verificados neste estudo.

Na Espanha, ESPIGARES et al. (2006) estudaram os efeitos do tratamento de esgotos sanitários por lodos ativados na seleção de sorotipos de SNT e de variações resistentes a antibióticos. Foram realizadas 21 coletas simultâneas de esgoto bruto e esgoto tratado, totalizando 42 amostras, das quais foram isoladas 21 cepas de SNT. O percentual de amostras positivas para esgotos brutos e tratados foi semelhante, com 52,4% e 47,6%, respectivamente, assim como não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os sorotipos de SNT isolados antes e após o tratamento, embora *Salmonella* Typhimurium e Newport estivessem presentes apenas em esgotos brutos.

JENKINS et al. (2008) utilizaram o método do Número Mais Provável para quantificar *Salmonella* em amostras de água de uma bacia hidrográfica localizada no norte da Geórgia (USA). Foram observadas concentrações entre $<0,015$ NMP/L (Limite de Detecção - LD) e 0,55 NMP/L no afluente da bacia e de LD a 3,4 NMP/L em seu efluente. A causa provável de

contaminação destas águas por *Salmonella* foi a utilização de cama de frango como fertilizante em plantios realizados às margens da bacia, ocasionando no arraste dos insumos dessa prática devido ao escoamento superficial de água (*run-off*) em períodos de chuva intensa na região.

O escoamento superficial de água durante períodos de alta precipitação também foi a causa apontada como fonte de contaminação de águas superficiais na Holanda. SCHETS et al. (2008) isolaram os sorotipos *Salmonella* Newport e Virchow do canal Herengracht, que serve à drenagem urbana de Amsterdam e do rio Amstel, localizado nas intermediações da cidade. É possível que o escoamento superficial estivesse arrastando as sujidades das ruas, como fezes de animais, para os canais que atravessam a cidade. Já no rio Amstel, é provável que a contaminação por *Salmonella* seja originária das áreas de cultivos agrícolas localizadas às margens do rio.

GAERTNER et al. (2009) avaliaram a influência dos eventos de alta precipitação na contaminação de água e sedimentos do lago Spring, nascente do rio San Marcos (Texas - USA). Foram realizadas quatro coletas em nove pontos no lago e em poças que se formaram após períodos de alta precipitação (100 – 760 mm). Os resultados observados suportaram a hipótese traçada pelos autores de que a contaminação das águas do lago se dava mediante o escoamento das águas contidas nas poças, uma vez que a presença de SNT nas águas do lago só foi detectada nos dias que sucederam as chuvas. Outra evidência foi que os sorotipos *Salmonella* Montevideo e Kentucky somente foram isolados em uma das poças e em pontos do lago localizados à jusante desta poça.

Em estudo realizado por HALEY et al. (2009), nos Estados Unidos, averiguou-se a distribuição, diversidade e sazonalidade de *Salmonella* nas águas do Rio Little, localizado dentro da bacia do rio Suwannee (Georgia). A análise espacial revelou resultados positivos em 79,2% das amostras, com concentrações de 4,96 a 7,46 NMP/L. Na análise temporal foram verificados resultados positivos para todos os seis pontos de coleta em cinco meses do

ano de 2005 e de dois meses do de 2006, com concentrações entre o LD ($< 1,8\text{NMP/L}$) e $68,6\text{ NMP/L}$. Neste estudo foram isolados 12 sorotipos de SNT, sendo que a maior diversidade foi observada na primavera e no verão, meses de maior precipitação na região. Os pesquisadores problematizaram que uma das causas prováveis de contaminação destas águas fosse devido às fossas sépticas utilizadas por 33-38% da população que habita o entorno do rio.

PATCHANEE et al. (2010) analisaram a ocorrência de *Salmonella* em amostras de quatro bacias hidrográficas da Carolina do Norte (EUA), cada qual localizada dentro de áreas de criação de porcos, residencial/industrial, florestal e agrícola. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na prevalência de *Salmonella* entre as amostras originárias de cada local de amostragem. Os resultados mostraram que a frequência de amostras positivas foi de 41,7% (produção de suínos), a menor frequência observada, e de 58,8% (residencial/industrial) a maior observada. A maior diversidade de sorotipos de SNT foi verificada no sistema residencial/industrial, com oito dos 12 sorotipos isolados.

HSU et al. (2011) estudaram a ocorrência de *Salmonella* em 18 pontos de captação de água de cinco rios da cidade de Taiwan (China), totalizando 116 amostras. *Salmonella* foi detectada em sete (~39%) pontos de captação e esteve presente em 8,6% das amostras (10/116), compreendendo todos os rios investigados. Foram isolados seis sorotipos de SNT, tais como *Salmonella* Enteritidis, Newport, Montevideo, Victoria, Houten e Albany. Os autores ressaltaram que o rio Kaupin, responsável pelo abastecimento de 2,5 milhões de pessoas, foi o que apresentou maior contaminação por *Salmonella*, provavelmente em decorrência do lançamento de esgotos sanitários urbanos e da atividade das fazendas localizadas em seu entorno.

No Canadá, JOKINEN et al. (2011) realizaram estudo com o intuito de isolar *Salmonella enterica* de amostras do rio Oldman, cujas águas são

destinadas a atividades de recreação, irrigação e dessedentação, além de fezes de animais (que vivem às margens dessa fonte de água) e de amostras de esgoto bruto da ETE Fort Macleod. Os sorotipos isolados das amostras de água do rio Oldman foram *Salmonella* Derby, Give var. 15+, Heidelberg, I:11:r:-, Mbandaka, Rubislaw, Senftenberg, Typhimurium. Os autores destacam que o único sorotipo em ambas as amostras de esgoto bruto e de água superficial foi *Salmonella* Heidelberg, já em relação às amostras de fezes dos animais e água superficial foram isolados em comum *Salmonella* Give var. 15+, Heidelberg, I:11:r:- e Rubislaw, concluindo então que os esgotos sanitários e as fezes dos animais investigados podem representar possíveis fontes de contaminação do rio Oldman por SNT.

RAJABI et al. (2011) investigaram a distribuição e diversidade genética de *Salmonella enterica* na cabeceira do rio Suwannee (Flórida – EUA). Foram isolados oito sorotipos de SNT destas águas, dentre os quais *Salmonella* Muenchen e Bradenrup, que figuram entre os sorotipos de maior relevância epidemiológica naquela região. Outro aspecto interessante deste estudo é que os pontos mais contaminados do rio foram aqueles em que havia atividade humana próximo às margens, com a concentração de *Salmonella* aumentando entre 10 e 100 vezes nestes locais.

Estudo da ocorrência de *Salmonella* em águas superficiais da América Central foi realizado por JIMENEZ e CHAIDEZ (2012). Foram coletadas amostras de três rios, localizados em Sinaloa (México). Os autores verificaram que 45% (38/84) das amostras analisadas foram positivas para *Salmonella*, com amplas variações em sua concentração, de ND (<300 NMP/L) a 46000 NMP/L.

THOMAS et al. (2012), analisaram as águas superficiais de três corpos hídricos do Canadá: Canagagigue e Conestogo, localizados na zona rural com agricultura intensiva e, o riacho Laurel, que corta a zona urbana. Foi observado que *Salmonella* Typhimurium foi o sorotipo mais isolado no verão e outono e que no verão e primavera foi *Salmonella* Heidelberg,

correspondendo com elevada incidência de salmoneloses na região. Os autores sugeriram que o aumento na prevalência destes sorotipos pode ter sido causado pelo aumento na produção de esterco nas fazendas da região, que estariam contaminando os rios por meio de escoamento superficial de água, frequentes nessas estações do ano.

Os estudos sobre a ocorrência de *Salmonella* em águas superficiais e esgotos sanitários analisados nesta seção encontram-se resumidos no Anexo 1, que também traz informações dos sorotipos de SNT isolados nas respectivas pesquisas. Nota-se que a maioria dos trabalhos foram realizados na América do Norte (8/15), mas também há estudos da América Central (1), Europa (4) e Ásia (2). Além do mais, com exceção de duas pesquisas, todas as outras foram desenvolvidas na última década, mostrando que o conhecimento sobre a presença de sorotipos de SNT em águas superficiais é relativamente recente, assim como suas possíveis fontes de contaminação e as implicações sobre a utilização destas águas pela população.

Foram observados 69 sorotipos de SNT presentes em águas superficiais e 10 em esgoto bruto, entre os quais sete têm ocorrência em comum entre ambas as matrizes (ANEXO 1). Os resultados positivos para *Salmonella* sp. variaram de 18,6 a 52,4% em esgotos brutos e de 0 à 100% das amostras de água superficial, que apresentaram concentrações entre ND (Não Detectado) e 46.000 NMP/L. Todavia, a comparação entre os estudos é limitada, pois os resultados são expressos em unidades diferentes, como NMP/L, NMP/100 mL e CFU/100 mL.

3.3 EPIDEMIOLOGIA DE *Salmonella* NÃO TIFOIDE

Em países desenvolvidos, ou nas regiões mais industrializadas de países em desenvolvimento, SNT geralmente causa diarreia autolimitante, sendo que a infecção sanguínea ocorre em cerca de 5% dos casos (HOHMANN, 2001), com taxas de fatalidade de aproximadamente 1 a 5%

(FEASEY et al., 2012; LAUPLAND et al., 2010). Nos Estados Unidos, por exemplo, a incidência de casos de salmonelose variou de 8,16 a 35,17/100.000 habitantes em 2011 (CDC, 2013) e, na Europa, esta taxa foi de 0,01 - 97,53/100.000 habitantes, com média de 22,2/100.000 habitantes em 2012 (EFSA/ECDPC, 2014).

Na África Subsaariana, característica por altos índices de subnutrição infantil e de adultos HIV positivos, estima-se que a incidência anual de salmonelose seja de 175 a 388 casos/100.000 crianças de 3 a 5 anos e de 2.000 a 7.000/100.000 adultos HIV positivos (FEASEY et al., 2012). Nesta região as bacteremias por *Salmonella* spp. são importantes causas de morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças menores de 5 anos e pessoas imunodeprimidas, com taxas de fatalidade que chegam de 20 a 25% (FEASEY et al., 2012; KARIUKI et al., 2006).

Não foram verificados dados sobre a incidência de gastroenterites ou bacteremias causadas por SNT no Brasil. No entanto, em pesquisa realizada na cidade de Ribeirão Preto/SP, com 1.138 cepas de SNT isoladas de amostras biológicas entre 1985 e 1999, foram observadas taxas de bacteremia de até 20,1% por *Salmonella* Typhimurium, considerada, pelos autores, alta para um país em desenvolvimento (CASTRO et al., 2002).

Em estudo desenvolvido por MEDEIROS et al. (2001) na cidade de Ribeirão Preto - SP, de 1994 a 1997, *Salmonella* sp. foi identificada como a quarta maior causa de diarreia em crianças, sendo que a maior parte das cepas (78,1%) foram isoladas das fezes de crianças com idade entre zero e dois anos. Em outra pesquisa realizada em um hospital pediátrico de Salvador – BA, verificou-se que este patógeno foi o segundo mais isolado em amostras de fezes (38%) e o principal agente causador de diarreias entre crianças menores de cinco anos (DINIZ-SANTOS et al., 2005).

Em países industrializados a principal preocupação em relação aos meses mais quentes e chuvosos está focada na disseminação de SNT em águas superficiais por escoamento superficial (GAERTNER et al., 2009;

HALEY et al., 2009; JENKINS et al., 2008; SCHETS et al., 2008; THOMAS et al., 2012). Por outro lado, na África Subsaariana, o aumento na incidência de infecções por SNT pode estar associado ao aumento concomitante de malária na região (FEASEY et al., 2012; KARIUKI et al., 2006).

3.3.1 Surtos de Salmonelose Relacionados às Águas

Estudos epidemiológicos sobre surtos de salmonelose podem auxiliar na compreensão de como as diferentes formas de gerenciamento e de utilização da água atuam na disseminação deste patógeno na população. LEVANTESI et al. (2012), estudaram a contribuição da água na exposição à SNT em surtos ocorridos em todo o mundo. Os autores relatam que há poucas ou nenhuma publicação sobre o assunto na África e Américas Central e Latina e que a maior parte dos dados são de países desenvolvidos, como EUA, Austrália e Itália. Segundo CRAUN, CALDERON & CRAUN (2004) apud LEVANTESI et al. (2012), nos EUA, de 1971 a 2000, foram registrados 15 surtos, dos quais quatro foram associados à utilização de águas superficiais. Os principais sorotipos de SNT envolvidos nestes surtos foram *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis, Bareilly, Javiana, Newport e Weltevreden (CRAUN et al., 2010).

Em 1993, ANGULO et al. (1997) investigaram as causas de um surto de salmonelose em Gideon (Missouri – EUA), após confirmados sete casos de gastroenterites causados por *Salmonella* Typhimurium. Os pesquisadores estimaram que o surto atingiu aproximadamente 650 pessoas, das quais 15 foram hospitalizadas e sete morreram. A cidade era abastecida por água (não clorada) captada de dois poços, no entanto, foi evidenciado que a contaminação ocorreu em uma das três torres utilizadas como reservatório, onde foram encontradas rachaduras com tamanho suficiente para permitir a entrada de pássaros que se alojavam no local e defecavam na água.

O' REILLY et al. (2007) realizaram um estudo de caso controle após um surto de gastroenterite que acometeu cerca de 1.450 pessoas, entre visitantes e residentes, de South Bass Island, Ohio (EUA). Pessoas que consumiram água de torneira do município tiveram 8,2 vezes (2,9 - 25,3; IC 95%) mais chances de adoecer que os controles. Foram verificados diversos agentes etiológicos nas fezes de pessoas com diarreia, dentre eles *Salmonella* Typhimurium. Uma parte dos moradores da cidade usava água de poços particulares, enquanto o sistema municipal de abastecimento captava água do lago Erie, local que recebia o esgoto tratado da cidade. Os autores não conseguiram elucidar a contribuição de cada uma destas fontes para o surto, isto porque muitos moradores mantinham conexões cruzadas entre seus poços e o sistema municipal de abastecimento.

Em 2008 ocorreu um dos maiores surtos de salmonelose já registrados nos Estados Unidos e Canadá, no qual 1.442 pessoas foram afetadas, dentre as quais ocorreram dois óbitos (CDC, 2008). A causa presumida foi a ingestão de pimenta jalapeño e tomates, ambos importados do México. O agente etiológico identificado foi *Salmonella* Saintpaul, presente em águas superficiais utilizadas na irrigação das pimentas e dos tomates, todavia, a fonte de contaminação destas águas não foi divulgada.

BESSONG et al. (2009) investigaram surto de diarreia na comunidade de Tshikwi, localizada na província de Limpopo, África do Sul. Foram notificados 37 casos de diarreia em crianças menores de cinco anos e 23 casos em pessoas maiores de cinco anos. Foi verificado que a água de um dos poços que serviam a comunidade não atendia aos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação do país, sendo detectada a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Os autores problematizaram que os poços pudessem estar sendo contaminados por meio de alguma interação com as águas do rio Khandanama, onde se averiguou a presença de *Salmonella* sp. Outra hipótese aventada foi que o método analítico utilizado na detecção de *Salmonella* sp. não fosse sensível o suficiente para detectar sua presença em baixas concentrações e que possivelmente esses

patógenos se multiplicaram até alcançar a dose infecciosa quando a água era estocada em jarras por vários dias, pratica comum na comunidade.

3.4 DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL E ESPACIAL DE SOROTIPOS de *Salmonella* Não Tifóide

O estudo sobre a distribuição temporal e espacial de sorotipos de SNT possibilita a identificação de sorotipos, ao observar variações de prevalência em amostras de fontes humanas e não humanas ao longo do tempo. Além disso, esses dados podem ser utilizados para comparação de isolados de fontes humanas e não humanas, entre países ou continentes geopolíticos, permitindo a identificação de sorotipos endêmicos de determinada região (HENDRIKSEN et al., 2009)

Mudanças na economia, política e no comportamento da sociedade, em relação à produção e distribuição de alimentos e à utilização dos recursos hídricos, contribuíram para a emergência de determinados sorotipos de SNT nas últimas décadas (BRASIL, 2010; NYACHUBA, 2010).

A influência destas mudanças na disseminação de SNT começou a ser demonstrada ao final da década de 60 por CLARK et al. (1973). Este estudo reuniu evidências que demonstravam que *Salmonella* Agona foi introduzida e disseminada nos EUA, Reino Unido, Holanda e Israel, por meio de ração para frangos produzida com farinha de peixe importada do Perú. Esta pode ter sido a fonte de disseminação de *Salmonella* Agona em grande parte do mundo, uma vez que no início da década de 70 este país foi o exportador de aproximadamente 60% da farinha de peixe negociada no mercado internacional (CLARK et al., 1973).

Ao final da década de 80, RODRIGUE et al. (1990) verificaram um aumento na taxa de isolados de *Salmonella* Enteritidis em todo o mundo, a partir do qual chegaram a cogitar a possibilidade de uma nova pandemia. A

frequência de isolados de *Salmonella* Enteritidis aumentou em 24 países entre 1979 e 1987, inclusive no Brasil, sendo que a sua disseminação foi relacionada, principalmente, ao consumo de ovos crus em preparações. Neste período, houve uma diminuição de 14 para oito países que relataram *Salmonella* Typhimurium como o sorotipo mais prevalente.

Mais tarde, HERIKSTAD et al. (2002) realizaram pesquisa semelhante, a fim de estimar a prevalência global e regional de SNT entre 1990 e 1995. Participaram 104 países, dos quais 69 (66%) conduziam sorotipificação como parte da estratégia de vigilância. Os autores observaram que *Salmonella* Enteritidis foi o isolado mais frequente em 35 países, sendo que sete são do continente americano (88%) e 22 da Europa (87,5%). No continente americano houve um aumento nos isolados deste sorotipo, de 11,3% em 1990 a 42,6% em 1995, ao contrário do que ocorreu com *Salmonella* Typhimurium, que caiu de 20,8% para 8,0%.

Em função do baixo número de países que conduziam sorotipificação de *Salmonella* (citado acima), em 2000 a OMS lançou o programa *WHO Global Salm-Surv*, mais tarde nomeado *WHO Global Foodborne Infections Network* (HENDRIKSEN et al., 2009). O objetivo fundamental do programa é detectar, controlar e prevenir infecções entéricas por alimentos e água em toda a cadeia produtiva de alimentos. Uma das atividades desenvolvidas para alcançar este objetivo foi aperfeiçoar a capacidade de sorotipificação de *Salmonella* dos laboratórios de referência de cada país participante (HENDRIKSEN et al., 2009).

A partir deste programa foram publicados dois trabalhos sobre a distribuição global e regional de sorotipos de SNT de 2001 a 2007 (GALANIS et al., 2006; HENDRIKSEN et al., 2009). O Quadro 1 ilustra a prevalência dos quatro sorotipos mais isolados em fontes humanas e não humanas, segundo continentes geopolíticos no período de 2001 a 2007. Observa-se que *Salmonella* Enteritidis continua sendo o sorotipo mais prevalente isolado de fontes humanas na maioria dos continentes em todo o período estudado,

com exceção da América do Norte e Oceania. No entanto, segundo o “*Salmonella Annual Report*”, *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais isolado de fontes humanas nos Estados Unidos em 2011, representando 16,5% dos isolados, seguido de Typhimurium (13,4%) e Newport (11,4%) (CDC, 2013).

Quadro 1. Prevalência de sorotipos de SNT mais isolados de fontes humanas e não humanas segundo continentes geopolíticos, de 2001 a 2007.

Ano	Continentes geopolíticos					
	África	América Latina e Caribe	América do Norte	Ásia	Europa	Oceania
Isolados de fontes humanas						
2001	T (38) ¹ E (18) Mb (3)	E (54) T (16) N (5) Ag (3)	T (22) E (20) He (10) N (6)	E (35) T (8) R (4) Ha (3)	E (59) T (18) Ha (2) I (2)	T (54) E (5) V (7) Sa (3)
2002	E (26) T (25) I (4)	E (31) T (18) Mo (6)	T (29) E (21) N (15) He (10)	E (38) T (6) R (6) W (6)	E (85) T (5) Ha (2) I (2)	E (9)
2003	E (17) T (21) K (6) C (8)	E (42) T (23) N (3) Ag (3)	T (21) E (14) He (13) N (8)	E (31) W (13) T (9) R (4)	E (67) T (15) Ha (2) I (1)	T (51) E (6) V (3) Sa (3)
2005	E (23) T (18) C (4) Mu (2)	E (33) T (23) Ag (6) N (4)	T (21) ² E (20) N (10) He (6)	E (21) W (12) C (6) T (3)	E (67) T (11) Ha (2) I (2)	T (52) ³ E (10) Sa (3) V (1)
2007	E (24) T (13) K (5)	E (40) T (26) Ag (4) N (5)	E (26) ² T (21) He (9) N (2)	E (25) W (8) C (7) T (5)	E (60) T (12) Ha (2) I (1)	T (44) ³ E (11) V (3) Sa (2)
Isolados de fontes não humanas						
2002	E (16) An (16) C (8) Am (8)	E (28) T (12) Se (7) Mb (7)	T (23) He (19) N (11) K (7)	An (23) R (13) St (9) E (7)	I (28) E (27) T (16) L (7)	ND

Fonte: dados de 2002 (GALANIS et al., 2006); 2001, 2003, 2005 e 2007 (HENDRIKSEN et al., 2009)

Notas: () percentual de isolados; ND Não Disponível

Sorotipos de SNT pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: Ag - Agona, An - Anatum, Am - Amsterdam, C - Corvallis, E - Enteritidis, Ha - Hadar, He - Heidelberg, I - Infantis, K - Kentucky, Mb - Mbandaka, Mo - Montevideo, Mu - Muenster, N - Newport, R - Rissen, Sa - Saintpaul, Se - Senftenberg, T - Typhimurium, V - Virchow, W - Weltevreden

⁽¹⁾ Nos anos de 2001, 2003, 2005 e 2007: valores de média aritmética ajustada dos percentuais de isolados de SNT nos países pertencentes ao respectivo continente

⁽²⁾ Em 2005 apenas os Estados Unidos submeteram os dados à OMS e em 2007 somente o Canadá

⁽³⁾ Em 2005 e 2007 apenas a Nova Zelândia submeteu os dados à OMS

Outros sorotipos de SNT parecem ser específicos de alguns continentes, como *Salmonella* Kentucky na África; Newport, Agona e Montevideo na América Latina; Newport e Heidelberg na América do Norte; Rissen e Weltevreden na Ásia; Hadar e Infantis na Europa; Virchow e Saintpaul na Oceania (Quadro 1). Entretanto, deve ser observado o seu potencial de mobilização mediante práticas comerciais e processos migratórios (NYACHUBA, 2010).

Ainda no Quadro 1 nota-se que a prevalência dos sorotipos isolados de fontes não humanas apresenta uma distribuição mais homogênea que os de fontes humanas. Alguns sorotipos apresentam taxas de isolados semelhantes ou superiores à *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium, como Anatum (África e Ásia), Rissen (Ásia), Heidelberg e Newport (América do Norte) e Infantis (Europa). Ressalta-se que na pesquisa de GALANIS et al. (2006) a maior parte das amostras enviadas aos laboratórios de referência foi de animais (66%) e alimentos (29%), enquanto as amostras ambientais contaram por apenas 2% do total.

3.4.1 Distribuição Temporal de Sorotipos de SNT no Estado de São Paulo

O aumento na prevalência de *Salmonella* Enteritidis também foi averiguado no estado de São Paulo a partir dos anos de 1990. Entre 1991 e 1995, TAVECHIO et al. (1996) realizaram a sorotipificação de 2.254 cepas de *Salmonella* provenientes de fontes humanas e de 3.236 cepas de não humanas tais como insumos destinados à alimentação humana, carne de aves e ração animal (60,7%) e amostras de esgotos (5,2%). Os autores constataram que *Salmonella* Enteritidis foi o único a apresentar um aumento progressivo no percentual de isolados de fontes humanas, representando 1,2% em 1991, 2% em 1992, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994 e 64,9% em 1995. Este sorotipo também foi prevalente entre fontes não humanas,

correspondendo a 16,9% do total de isolados, seguido por *Salmonella* Havana (4,7%) e Typhimurium (4,7%).

Outros dois estudos deram sequência à identificação de sorotipos de *Salmonella* isolados no estado de São Paulo. De 3.554 cepas de *Salmonella* isoladas de fontes humanas entre 1996 e 2003, 67,4% (2.396) foram identificadas como *Salmonella* Enteritidis, seguido por Typhimurium (5,2%) e a variação monofásica 4,5,12:i:- (5,1%) (FERNANDES et al., 2006). Em amostras ambientais analisadas entre 1996 e 2000, verificou-se a presença de *Salmonella* Enteritidis em 32,7% das 4.581 cepas estudadas, seguido por Senftenberg (10,3%), Hadar (6,8%) e Agona (5,1%) (TAVECHIO et al., 2002). Entretanto, neste estudo observa-se que o perfil de prevalência dos sorotipos isolados de esgoto (n = 429) é diferente, com *Salmonella* Agona (25,8%), Ohio (14,7%), Albany (4,6%), Typhimurium (1,9%) Mbandaka e Enteritidis (1,6%).

3.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella* Não Tifóide

A caracterização de isolados de SNT pode ser realizada em função de suas particularidades fenotípicas e/ou genotípicas. As características fenotípicas incluem a expressão de antígenos somático (O) e flagelar (H), metabolização de carboidratos, utilização de aminoácidos, susceptibilidade a antimicrobianos, dentre outras provas bioquímicas. As características genotípicas abrangem a presença de genes de virulência e de genes que permitam a identificação do sorotipo (e possíveis variações), e ainda, de genes que conferem resistência a antimicrobianos, o perfil plasmidial e também a identificação do fagotipo (FOLEY et al., 2009).

Diversos genes têm sido utilizados como marcadores genéticos de SNT, permitindo a identificação de sorotipos por meio da técnica de

amplificação de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR). Alguns exemplos de marcadores genéticos são:

- Sequências de DNA ribossomal 16S e 23S (BAUDART, 2000; JENSEN e STRAUS, 1993);
- Sequências conservadas de DNA, clonadas aleatoriamente de *Salmonella* Typhimurium (AABO et al., 1993; SOUMET et al., 1999; WAAGE et al., 1999);
- Sequências de DNA selecionadas a partir da comparação entre os genomas de diversos sorotipos de SNT, depositados em bancos de dados *on-line* (AKIBA et al., 2011; SEONGHAN KIM et al., 2006; PARK et al., 2009);
- Regiões gênicas ainda não caracterizadas (HYUN-JOONG KIM et al., 2006; PORWOLLIK et al., 2004; SEONGHAN KIM et al., 2006)
- Genes responsáveis pela expressão dos antígenos somático (O) e flagelar (H): *fliC*, *fliB* e região intergênica entre *fliB* e *fliA* (HONG et al., 2008; SOUMET et al., 1999; TENNANT et al., 2010);
- Genes de virulência presentes no cromossomo: *invA* e *sseL* (PETERSON et al., 2010; RAHN et al., 1992);
- Gene de virulência presente em plasmídeo: *spvC* (PETERSON et al., 2010);
- Sequência de DNA plasmidial de expressão de virulência (WOOD et al., 1994).

A combinação destes marcadores genéticos, em conjuntos de iniciadores (*multiplex*), permite a identificação de múltiplos sorotipos de SNT em uma mesma análise. SOUMET et al., (1999), desenvolveram um *multiplex* composto por três iniciadores (*primers*): ST11-ST15 (429 pb), específico para *Salmonella* sp. (AABO et al., 1993); S1-S4 (250 pb), selecionado de gene associado a plasmídeo de virulência, detectado apenas em *Salmonella* Enteritidis (WOOD et al., 1994), e; Fli15-Typ04 (620 pb), construído a partir do gene *fliC* e específico para *Salmonella* Typhimurium.

Inicialmente a especificidade do multiplex foi avaliada com a utilização de 33 cepas de 13 sorotipos de SNT, além de 17 cepas de sete gêneros diferentes (controles negativos). Em seguida, o *multiplex* foi testado para caracterizar cepas de SNT, isoladas de matrizes de granjas de frangos (não especificadas), e previamente sorotipadas por sorologia. O multiplex se mostrou eficiente para caracterizar os isolados testados, tanto no teste de especificidade quanto em relação às cepas isoladas das matrizes de frangos, pois foi evidenciada a amplificação dos fragmentos específicos para o gênero *Salmonella* e para os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium e não foi detectada a amplificação de ambos os fragmentos entre os controles negativos.

SEONGHAN KIM et al. (2006) desenvolveram dois *multiplex*, que em conjunto com outros dois iniciadores (PT4 e STM7), foram utilizados para identificar os sorotipos de *Salmonella* de maior relevância epidemiológica do estado de Washington (EUA). Os multiplex foram nomeados STM e STY, cada qual composto de cinco iniciadores, desenhados a partir de estudos prévios que sequenciaram os genomas de *Salmonella* Typhimurium (MACCLELLAND et al., 2001) e *Salmonella* Typhi (PARKHILL et al., 2001) e da análise baseada em *microarray* realizada por PORWOLLIK et al (2004). Os dois *multiplex* (STM e STY) e os dois iniciadores foram testados para identificar 273 cepas, previamente sorotipadas pelo Laboratório de Saúde Pública do Estado de Washington (USA), compreendendo 30 sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* mais isolados na região. Além disso, outras 111 cepas deste laboratório foram selecionadas aleatoriamente para a realização de um teste cego. Os autores conseguiram distinguir os 30 sorotipos testados dos quais 28 produziram padrões de bandas exclusivos. Observaram que para *Salmonella* Java foram produzidos dois padrões de banda e para Poona foram três os padrões identificados. No teste cego, foi verificado que 108 das 111 cepas (97%) foram identificadas corretamente.

PETERSON et al. (2010) desenvolveram um terceiro *multiplex* em complemento aos dois desenvolvidos por SEONGHAN KIM et al. (2006), com

o objetivo de aumentar a capacidade de discriminação de sorotipos e verificar a presença dos genes de virulência *invA*, *sseL* e *spvC* e reconhecer o potencial de patogenicidade geral dos isolados de *Salmonella*. O conjunto entre os três multiplex (STM, STY e STV) foi avaliado em um teste cego com 111 cepas isoladas de amostras clínicas e de fezes de animais (aves, mamíferos e répteis). O método mostrou-se eficiente para distinguir 42 sorotipos de *Salmonella*, com uma taxa de 100% de identificação correta no teste cego. Desta forma, foram acrescentados outros 12 sorotipos àqueles 30 identificados no método desenvolvido por SEONGHAN KIM et al. (2006).

O método descrito por PETERSON et al. (2010) possibilita a identificação de 40 sorotipos de SNT, dos quais 11 estão entre os 14 sorotipos (incluindo a variação monofásica de *Salmonella* Typhimurium [4,5,12:i:-]) mais isolados de fontes humanas no Estado de São Paulo, representando 87,3% dos isolados entre 1996 e 2003, segundo estudo de FERNANDES et al. (2006). Em relação a amostras de fontes não humanas, os conjuntos de iniciadores STM, STY e STV identificam oito dos dez sorotipos mais isolados no Estado de São Paulo, que representam 63% dos isolados entre 1996 e 2000, de acordo com estudo de TAVECHIO et al. (2002).

3.5.1 Mecanismos de Patogenicidade e Presença de Genes de Virulência em *Salmonella* Não Tifóide

O mecanismo de patogenicidade de SNT é baseado na invasão das células intestinais do hospedeiro, diferentemente de outros patógenos entéricos que produzem enterotoxinas, como *Shigella*, *Listeria* e algumas linhagens patogênicas de *Escherichia coli* (TORTORA et al, 2012). A Figura 2 ilustra em quatro etapas o processo de infecção por SNT, desde a chegada ao intestino e a aderência às células do tecido epitelial, até invasão deste tecido e o desenvolvimento da resposta inflamatória do hospedeiro,

que origina os sintomas da gastroenterite. O período de incubação da doença pode variar de 12 a 72 horas após a ingestão de alimentos ou água contaminados. Os sintomas incluem febre, dor de cabeça, náuseas, vômitos, falta de apetite, cólicas e diarreia, que duram de um a dois dias, sem a necessidade de ministrar antibióticos para o tratamento, exceto se houver invasão sanguínea (BRASIL, 2010; SILVA, 2010).

Figura 2. Processo de infecção por *Salmonella* Não Tifóide

Adaptado de TORTORA et al., 2012.

Geralmente, os sorotipos de SNT mais adaptados aos humanos apresentam uma dose infecciosa menor para manifestar os sintomas característicos da doença. Doses infecciosas descritas na literatura são amplas, variando de 15 a $> 10^5$ UFC, o que depende da virulência do sorotipo, do veículo de contaminação e da susceptibilidade (estado imunológico) do hospedeiro (ANVISA, 2013; BRETTAR e HOFLE, 2008; SILVA, et al., 2010). Pessoas ou animais que ingerem quantidades de células de SNT abaixo da dose infectante podem tornar-se portadores assintomáticos e também disseminarem SNT por meio das fezes (FEASEY et al., 2012).

Após a ingestão de água ou alimento contaminado com SNT é necessário que as células atravessem a barreira ácida do estômago para então chegar ao intestino, o primeiro local de colonização. A sobrevivência de SNT a valores de pH ácido do estômago é mediada pelo mecanismo de tolerância a ambientes ácidos (*Acid Tolerance Response* – ATR), que é regulado pelo fator- σ RpoS e pelas proteínas PhoPQ e Fur. Ao chegar ao intestino as células do patógeno se aderem às células epiteliais do hospedeiro por meio das fimbrias e então expressam os genes da Ilha de Patogenicidade 1 (IP1), sintetizando o Sistema de Secreção Tipo III (IP1 - SST3), que auxiliam na invasão a estas células (FOLEY e LYNNE, 2008).

O IP1 - SST3 é um complexo proteico em forma de agulha, constituído por quatro partes distintas e que atravessa a membrana e a parede da célula de *Salmonella* (Figura 3). A estrutura e a regulação do IP1 - SST3 dependem de pelo menos 20 proteínas (GALÁN, 2001), incluindo a InvA (Figura 3 C -estrutura B), codificada pelo gene *invA*, e que foi demonstrado ser um marcador genético para *Salmonella* sp. (RAHN et al., 1992). Este gene tem sido utilizado por diversos autores, em conjunto com outras técnicas, como fator de confirmação de cepas de SNT isoladas de águas superficiais (GAERTNER et al., 2009; HSU et al., 2011; RAJABI et al., 2011; JIMENEZ e CHAIDEZ, 2012).

A função do IP1 - SST3 é semelhante ao de uma injeção, que atua na transferência de fatores de virulência diretamente do citoplasma da célula do patógeno à célula do hospedeiro, por meio do Complexo de Translocação (Figura 3). As proteínas que formam o Complexo de Translocação são secretadas e inseridas na membrana da célula do hospedeiro pelo próprio IP1 - SST3. Os fatores de virulência transferidos desencadeiam a mobilização de vesículas nas células da camada epitelial do intestino, que por sua vez internalizam as células de *Salmonella*. Simultaneamente, são ativadas respostas inflamatórias do hospedeiro, que alteram o balanço de íons das células do intestino, aumentando o acúmulo de água no lúmen, característico da diarreia aquosa (FOLEY e LYNNE, 2008; GALÁN, 2001).

Figura 3. Microscopia eletrônica e representação do Sistema de Secreção Tipo III (IP1 - SST3)

Adaptado de GALÁN, 2001 (A e B) e FOLEY e LYNNE (2008) (C).

Notas: A – microscopia eletrônica do complexo IP1 - SST3 em forma de agulha atravessando a membrana e a parede celular de *Salmonella Typhimurium*; B - microscopia eletrônica do complexo IP1 - SST3 purificado; C – representação esquemática do complexo IP1 - SST3. A base é constituída de estruturas em forma de anel: (A) formada por subunidades de proteína PrgHK; (B) proteínas InvAC e SpaPQRS; (C) proteína InvGH; (D), subunidades PrgJ e PrgI, que interagem com o complexo de translocação na célula do hospedeiro. Escala: 100 nm.

Uma vez dentro das vesículas as células de *Salmonella* mobilizam genes associados à Ilha de Patogenicidade 2 (IP2), expressando outro complexo nomeado IP2 – SST3, característico de *Salmonella enterica*. Este complexo é responsável pela translocação de proteínas ao citoplasma da célula hospedeira, impedindo as vesículas de se fundirem aos lisossomos que carregam formas reativas de oxigênio e nitrogênio. Deste modo as células de *Salmonella* podem sobreviver e se replicar dentro das vesículas, passando de uma célula a outra do hospedeiro até atingir a lâmina basal, onde podem ser fagocitadas por células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos, ou ainda, células dendríticas nos linfonodos (FOLEY e LYNNE, 2008; GUINEY e FIERER, 2011).

As células dendríticas carregam as células de SNT dentro das vesículas, que neste caso, ao invés de se replicarem, diminuem a atividade metabólica se mantendo em um estado viável, além de sintetizar proteínas que suprimem a apresentação de antígenos às outras células do sistema imunológico, atenuando a resposta imunológica do organismo (TIERREZ e GARCIA-DEL PORTILLO, 2005). Entre 16 e 24 horas após a infecção, as células de SNT iniciam a ativação dos mecanismos de apoptose das células do sistema imunológico, em um processo dependente da expressão dos genes *sseL* e *spvBC*. Estas células se rompem liberando as células de SNT em diversos órgãos e tecidos do corpo, como sangue, ossos e articulações, meninges, trato urinário, peritônio e artérias (DHANOA e FATT, 2009; GUINEY e FIERER, 2011; RYTKÖNEN et al., 2007).

O gene *sseL* localiza-se na IP2 e codifica a proteína SseL, que bloqueia NF- κ B, que em concentração normal inibe as vias de sinalização que originam o processo de apoptose (COOMBES et al., 2007; HSU et al., 2004). Os genes *spvBC* localizam-se no *locus* gênico *spv*, encontrado em plasmídeos de virulência, mas que também já foi relacionado ao cromossomo de algumas linhagens de *Salmonella enterica* (LIBBY et al., 2000). Este *locus* tem sido relatado apenas em sorotipos de SNT altamente

virulentos como *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis, Dublin, Arizona, Gallinarum variação Pullorum, Sendai e Abortusovis (Van ASTEN e Van DiJK, 2005; CHIU e OU, 1996; GUINEY e FIERER, 2011).

Os genes *sseL* e *spvC* já foram detectados em cepas de SNT isoladas de amostras clínicas, como fezes e sangue de crianças que desenvolveram bacteremia secundária (CHIU e OU, 1996; CRAČIUNAŠ et al., 2012; PETERSON et al., 2010) e também de amostras ambientais (fezes de aves, mamíferos e répteis) (PETERSON et al., 2010), carne moída e ração animal (CHEN et al., 2005) e lodo de esgoto das ETEs da RMSP (KRZYZANOWSKI Jr et al., 2014).

4. MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

A Região Metropolitana de São Paulo é composta de 39 municípios, constituindo-se na região mais populosa do país, com aproximadamente 20 milhões de habitantes. O presente estudo abrange três cidades desta região: São Paulo, Taboão da Serra e São Lourenço da Serra. Na cidade de São Paulo é onde ocorre a captação de água da represa Guarapiranga, para abastecimento público, escolhida para integrar este estudo em função de sua relevância no fornecimento de água para a RMSP. Taboão da Serra é uma das cidades abastecidas pela represa Guarapiranga e, por fazer fronteira com São Paulo, compartilha características populacionais e culturais semelhantes. São Lourenço da Serra é abastecido pelo manancial São Lourenço, que atravessa três cidades da RMSP e deságua no rio Juquiá, sendo possivelmente influenciado na qualidade microbiológica nestes locais.

4.1.2 Represa Guarapiranga

A bacia do Guarapiranga ocupa uma área de 631 km², dos quais 26,6 km² representam o espelho d'água da represa Guarapiranga (SABESP, 2007), abrangendo os municípios de São Paulo, Embu, Itapeverica da Serra, Cotia, São Lourenço da Serra e Juquitiba, todos da RMSP. A represa Guarapiranga compõe, em conjunto com outros nove mananciais, a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHI do Alto Tietê (CETESB, 2014) e faz parte do sistema de abastecimento Guarapiranga, que integra as represas Guarapiranga, Billings (braço Taquacetuba) e Rio Capivari (ANA, 2010). Este sistema possui uma vazão de 14.000 L/s e fornece água para

cerca de 3,5 milhões de pessoas (SABESP, 2007), com participação de 30% no abastecimento de São Paulo, 100% em Taboão da Serra, 82% em Embu, 28% em Cotia e 71% em Itapeverica da Serra (ANA, 2010).

Na cidade de São Paulo, a maior parte da represa Guarapiranga está inserida na região da Capela do Socorro - bairros do Socorro, Cidade Dutra e Grajaú - que, juntos, possuem 90% do seu território inserido em Área de Proteção aos Mananciais (Leis Estaduais 898/7, 1172/76 e 9866/97; SÃO PAULO [s.d.]a). Todavia, a porção norte da represa – local onde é feita a captação de água para o abastecimento público – é caracterizada por ser uma região urbanizada, com alta densidade populacional, enquanto a parte sul (bairro de Parelheiros) está introduzida dentro da Área de Proteção Ambiental – APA Capivari-Monos, que também reúne parte das áreas ocupadas pela represa Billings e pelo rio Capivari (SABESP, 2007). Os principais afluentes da represa Guarapiranga são os rios Guarapiranga, Embu-Guaçu e Embu-Mirim, além dos ribeirões Itaim, Lavras, Represa e Fazenda da Ilha e outros 18 córregos que servem à drenagem urbana, mas que também são utilizados como receptores de esgotos sanitários em locais com infraestrutura de saneamento precária (MARTONE-ROCHA, 1999).

A construção da represa foi iniciada em 1906, pela então companhia fornecedora de energia elétrica The São Paulo Railway, Light and Power Company Limited, com o objetivo de regular a vazão do rio Tietê para o funcionamento da usina hidroelétrica Edgard de Souza, em Santana de Parnaíba. Em 1958, foi firmado um acordo entre o governo do Estado e a Light, para que a represa Guarapiranga fosse de uso exclusivo ao abastecimento público (SÃO PAULO [s.d.]a). Durante o processo de ocupação das margens da represa originou-se, inicialmente, bairros de alto padrão, inspirados em paisagens europeias, como Interlagos, Veleiros, Rio Bonito e Riviera Paulista. Com o acelerado crescimento populacional e a ocupação desordenada da cidade, também instalaram-se no local favelas e loteamentos clandestinos, destituídos de condições mínimas de saneamento, o que alterou a qualidade das águas da represa e,

consequentemente, encareceu os custos de seu tratamento (SABESP, 2007).

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) mantém dois pontos de monitoramento da qualidade da água para abastecimento público (Rede Básica), identificados como GUA 00900 e GUA 00100, localizados nos bairros da Capela do Socorro e Balneário São José, respectivamente (CETESB, 2014). Em 2013, a média de concentração de *Escherichia coli* nestes locais foi de 22 UFC/100 mL (GUA 00900) e $7,0 \times 10^3$ UFC/100 mL (GUA 00100). Apesar da baixa concentração de *Escherichia coli* no ponto GUA 00900, onde ocorre a captação de água para o abastecimento público, a média do Índice de Qualidade de Água para Fins de Abastecimento Público (IAP), que leva em consideração parâmetros químicos, físicos e microbiológicos, foi avaliada como “regular”.

Atualmente, além de servir ao abastecimento público, a represa Guarapiranga também é utilizada para atividades de recreação, pesca e balneabilidade, representando um importante ícone paisagístico da cidade. A ocupação de suas margens é diversificada, contando com clubes de esportes aquáticos, marinas, praias de areia, resquícios de Mata Atlântica e matas secundárias, propriedades particulares, favelas, loteamentos irregulares e o Parque Ecológico do Guarapiranga, que ocupa 28 km (7%) do entorno da represa (SÃO PAULO [s.d.]b).

4.1.3 São Lourenço da Serra e Manancial São Lourenço

A cidade de São Lourenço da Serra, microrregião de Itapequerica da Serra, está localizada a 56 km de São Paulo e faz fronteiras com as cidades de Embu-Guaçu, Itapequerica da Serra, Cotia, Ibiúna e Juquitiba. A extensão territorial é de 186,329 km² (IBGE, 2014a), sendo que, cerca de 90% é coberto por mata Atlântica (PMSN - SÃO LOURENÇO DA SERRA, 2010). Este é o primeiro município a integrar a região do Vale do Ribeira, a leste, e

todo o seu território está localizado dentro de Área de Preservação dos Mananciais (Leis Estaduais 898/75, 1172/76 e 9866/97).

Informações disponibilizadas pela Fundação SEADE (FUNDAÇÃO SEADE, 2014a) mostram que em 2014 a população de São Lourenço da Serra atingiu 14.595 habitantes, com grau de urbanização de aproximadamente 91% e densidade demográfica de 7,83 habitantes/ km². A economia do município é baseada, principalmente, no setor de serviços, que, em 2011, foi responsável por 80,1% de participação no Produto Interno Bruto (PIB), seguido pelo setor industrial (18,42%) e, com menor expressão, o setor agropecuário (1,48 %).

O nível de atendimento no fornecimento de água da cidade, em 2010, era de aproximadamente 62% (FUNDAÇÃO SEADE, 2014a). O abastecimento da cidade é realizado por três sistemas (PMSB - SÃO LOURENÇO DA SERRA, 2010): sistema urbano Sede municipal, que capta água do manancial São Lourenço, com vazão de 22 L/s e estimativa de ampliação para 55 L/s, em 2015; sistema rural Paiol do Meio, que capta água do manancial São Lourenço, com vazão de 13 L/s, mas que também fornece água para os bairros de Palmeiras, Palmeirinha e Jardim das Palmeiras, do município de Juititaba, e; sistema rural Despézio, que capta água de poço, com vazão de 2 L/s. Foi iniciada a implantação do Sistema Produtor São Lourenço, que prevê a captação para a produção de 4.700 L/s de água tratada, com o intuito de suprir a escassez do sistema Cantareira, que abastece a RMSP (INFRAESTRUTURA URBANA, 2014).

O manancial São Lourenço abastece a maior parte da cidade de São Lourenço da Serra, ao passo em que serve de corpo receptor da carga orgânica poluidora remanescente (DBO) desta cidade e de Juititaba, que leva em consideração os índices de coleta e tratamento de esgotos e a eficiência dos sistemas de tratamento de esgotos sanitários. Em São Lourenço da Serra, quase metade (48%) do esgoto sanitário produzido não é coletado, sendo que todo o esgoto coletado (52%) é tratado na ETE,

localizada a jusante da cidade. O processo de tratamento constitui-se em gradeamento (preliminar), seguido de lagoa aeróbia. Este sistema apresenta eficiência de aproximadamente 75% da remoção da carga orgânica (DBO) (CETESB, 2014).

Segundo Plano Municipal de Saneamento Básico de São Lourenço da Serra, em relatório divulgado pelo Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira do Iguape e do Litoral Sul, o IAP do manancial São Lourenço entre 2008 e 2011 foi considerado como “regular” (PMSB – São Lourenço da Serra, 2010). Em estudo realizado entre 2004 e 2006, verificou-se a baixa diversidade de organismos bentônicos em pontos de captação à montante de Estação de Tratamento de Água e à jusante de Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) de São Lourenço da Serra (SILVA, 2008). Sendo assim, a qualidade microbiológica das águas superficiais do manancial São Lourenço pode estar sendo afetada pelos esgotos sanitários gerados na cidade de São Lourenço da Serra.

O manancial São Lourenço pertence à bacia hidrográfica do Ribeira do Iguape e Litoral Sul. Sua nascente é localizada no município de Itapequerica da Serra e, após atravessar a cidade de São Lourenço da Serra, deságua no rio Juquiá, em Juquitiba. O alto curso do rio, desde a nascente até a entrada em São Lourenço da Serra, limita as fronteiras da Reserva Florestal do Morro Grande (METZGER et al., 2006). No trecho que atravessa a área urbana de São Lourenço da Serra há indícios de desmatamento da mata ciliar, além de residências às margens do rio. Esta região é caracterizada por um relevo fortemente montanhoso (PMSB – SÃO LOURENÇO DA SERRA, 2010). Durante as coletas observaram-se cavalos pastando em propriedades particulares e terrenos baldios no entorno do rio.

4.1.4 Taboão da Serra

Taboão da Serra localiza-se a oeste de São Paulo, cidade com a qual faz fronteira, além de Embu das Artes e Cotia. O município é o quarto menor

da RMSP, com uma área de 20.387 km² e, este ano (2014), a população atingiu 260.345 habitantes, resultando em uma densidade demográfica de 12,8 habitantes por km², com grau de urbanização de 100%. A economia da cidade é baseada, quase em sua totalidade, nos setores de serviços (principalmente o comércio varejista) e na produção o industrial, com participações no PIB (2011) de 69,9% e 30,09%, respectivamente (FUNDAÇÃO SEADE, 2014b). Ressalta-se que Taboão da Serra é considerada como cidade dormitório, pois grande parte da população reside na cidade, mas desloca-se para São Paulo para trabalhar.

Dados recentes revelam que a cobertura dos serviços de distribuição de água em Taboão da Serra é de 99% (FUNDAÇÃO SEADE, 2014b). A maior parte (87%) dos esgotos sanitários produzidos na cidade é coletado, no entanto, apenas cerca um terço destes esgotos (37%) são tratados (CETESB, 2014). A carga orgânica poluidora remanescente (DBO) da cidade é destinada, principalmente, ao córrego Pirajussara, que tem sua foz no rio Tietê (CETESB, 2014).

4.2 AMOSTRAGEM

A coleta de águas superficiais foi realizada no ponto de captação de água para o abastecimento público de dois mananciais: Represa Guarapiranga, em São Paulo (Figura 4) e manancial São Lourenço, em São Lourenço da Serra (Figuras 6 e 7 A e B). As amostras de esgoto bruto foram coletadas em duas cidades, Taboão da Serra (Figura 8) e São Lourenço da Serra (Figura 10). Na primeira, as amostras foram coletadas a partir de um poço de inspeção, localizado ao lado do córrego Pirajussara, onde o esgoto é despejado (Figura 9 A). Em São Lourenço da Serra, as amostras de esgoto bruto foram coletadas em local onde ocorre seu afloramento (Figura 11 A), antes da entrada na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE), pois o intuito era coletar esgotos brutos sem qualquer tipo de tratamento.

As amostras de águas superficiais e esgotos brutos foram coletadas respeitando uma frequência quinzenal, durante o período de janeiro a dezembro de 2013, totalizando 25 amostras de cada ponto de coleta (50 amostras de esgoto bruto e 50 de águas superficiais).

A coleta das amostras de águas superficiais da Represa Guarapiranga foi realizada com o auxílio de uma bomba de vácuo elétrica, com a mangueira esterilizada, entre 15 e 30 centímetros de profundidade (Figura 5 A e B). Em São Lourenço da Serra, as amostras de água superficial foram coletadas a partir de um dispositivo que permitiu a retirada de água bruta, à profundidade da captação, antes de receber qualquer tipo de tratamento (não mostrado em imagem). A coleta de esgotos brutos foi realizada com o auxílio de baldes de alumínio inox esterilizados (Figuras 9 B e 11 B). As amostras de águas superficiais e esgotos brutos foram transferidas para frascos de plástico esterilizados com capacidade de 10L e 1L, respectivamente. As amostras foram mantidas sob refrigeração ($< 10^{\circ}\text{C}$) durante o transporte, evitando seu congelamento, e analisadas dentro de um período de 24 horas (USEPA, 2012).

Figura 4. Ponto de coleta de água superficial da Represa Guarapiranga

Fonte: Google Maps, 2013.

Notas: 📍 Ponto de coleta com coordenadas: "S" – *South* (sul); "W" – *West* (oeste)

Figura 5. Local e coleta de água superficial na Represa Guarapiranga

Fonte: Laboratório de Biologia Ambiental /HSA (FSP/USP, 2013)

Figura 6. Ponto de coleta de água superficial do manancial São Lourenço

Fonte: Google Maps, 2013.

Notas: 📍 Ponto de coleta com coordenadas: “S” – *South* (sul); “W” – *West* (oeste)

Figura 7. Local de coleta de água superficial no manancial São Lourenço

Fonte: Laboratório de Biologia Ambiental /HSA (FSP/USP, 2013)

Figura 8. Ponto de coleta de esgoto bruto em Taboão da Serra.

Fonte: Google Maps, 2013.

Notas: Ponto de coleta com coordenadas: “S” – *South* (sul); “W” – *West* (oeste)

Figura 9. Local e coleta de esgoto bruto em Taboão da Serra

Fonte: Laboratório de Biologia Ambiental /HSA (FSP/USP, 2013).

Figura 10. Ponto de coleta de esgoto bruto em São Lourenço da Serra.

Fonte: Google Maps, 2013.

Notas: 📍 Ponto de coleta com coordenadas: “S” – *South* (sul); “W” – *West* (oeste)

Figura 11. Local e coleta de esgoto bruto em São Lourenço da Serra

Fonte: Laboratório de Biologia Ambiental /HSA (FSP/USP, 2013).

4.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* NÃO TIFÓIDE

A análise de detecção e quantificação de SNT foi realizada no Laboratório de Biologia Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública/USP.

A detecção e quantificação de SNT foi realizada pela técnica do Número Mais Provável, de acordo com método padrão internacional recomendado pela Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA/1200 “*Analytical Protocol for Non-Typhoidal Salmonella in Drinking Water and Surface Water*” (USEPA, 2012).

O ANEXO 2 mostra um esquema do procedimento adotado para a quantificação de SNT. Primeiramente, foram preparadas três séries de cinco tubos de Caldo Tríptico de Soja (*Tryptic Soy Broth* - TSB) (Difco®, Detroit, MI, EUA), contendo 10 ml de concentração tripla (3X), 5 ml (3X) e 10ml (1X), respectivamente. As amostras foram homogeneizadas e volumes de 20, 10 e 1 mL foram inoculados nas respectivas séries de tubos de TSB (10 ml, 3X; 5 ml, 3X; 10 ml 1X) e incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Após a incubação, seis gotas (30 μL) de cada tubo foram transferidas para o meio semi-seletivo Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV) (Difco®, Detroit, MI, EUA), suplementado com novobiocina e verde malaquita, que inibem o crescimento de bactérias gram-positivas, permitindo que a maior parte das espécies de *Salmonella* se multipliquem. As placas de MSRV foram incubadas a $42^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 16 - 18 horas, e as colônias com "halo esbranquiçado" foram transferidas para o Agar de Desoxicolato Lisina Xilose (XLD) (Difco®, Detroit, MI, EUA) e incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 horas. As colônias típicas (coloração preta, arredondada e com ou sem halo amarelado), foram confirmadas por testes bioquímicos, usando Agar Lisina Ferro (LIA) (Difco®, Detroit, MI, EUA), Agar Triple Sugar Iron (TSI) (Difco®, Detroit, MI, EUA), e caldo ureia (Difco®, Detroit, MI, EUA), seguido de teste sorológico, com soros Polivalente (O) e Flagelar (H) (Probac®, São Paulo,

SP, Brasil). As cepas de SNT isoladas foram inoculadas em Agar Nutriente (Difco[®], Detroit, MI, EUA) para armazenamento e posterior utilização.

Utilizou-se como controle positivo a cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC[®] 14028; NCTC 12023) e como controle negativo a cepa de *Escherichia coli* (FSP/HSA - 110/11), pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental (FSP/USP).

Os resultados foram calculados de acordo com o método de referência e expressos em NMP/100mL (Número Mais Provável), com limite de sensibilidade de 0,6473 NMP/100mL. Ressalta-se que este método não é seletivo para *Salmonella* Typhi (USEPA, 2012) e, por utilizar o meio de cultura semi-seletivo Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), também não seleciona *Salmonella* Choleraesuis e outras variações de sorotipos sem motilidade, como por exemplo *Salmonella* Gallinarum var. Pullorum e *Salmonella* Typhimurium (4,5,12:–:–) (DIFCO & BBL MANUAL, 2003).

4.3.1 Controle de Qualidade da Detecção e Quantificação de *Salmonella* Não Tifóide

O controle de qualidade da detecção e quantificação de SNT foi realizado conforme descrito no método 1200/USEPA (USEPA, 2012). As amostras de águas superficiais e esgotos brutos utilizadas no controle de qualidade foram mantidas refrigeradas (> 0 – 10°C) e processadas dentro de um período de 30 ± 1 horas. O controle positivo utilizado foi a cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC[®] 14028; NCTC 12023) e o controle negativo foi a cepa de *Escherichia coli* (FSP/HSA - 110/11), pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental (FSP/USP). O controle de qualidade é subdividido em três procedimentos (USEPA, 2012):

Precisão Inicial de Recuperação (PIR). Realizado antes de iniciar as análises de detecção e quantificação de SNT (Seção 4.3). Resumidamente, quatro amostras de 200 mL de Água Peptonada foram inoculadas com *BioBall*[®] (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália) contendo 30 UFC de *Salmonella* Typhimurium (ATCC[®] 14028; NCTC 12023), homogeneizadas e analisadas conforme procedimento descrito na seção de Detecção e Quantificação de SNT (4.3). Foram calculados a média (M) do percentual de recuperação das quatro amostras, o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR), conforme a equação:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{M}) \times 100$$

Precisão de Recuperação em Curso (PRC). Realizado a cada 20 amostras coletadas de cada matriz (águas superficiais e esgotos brutos). Uma amostra de 200 ml de Água Peptonada foi inoculada com *BioBall*[®] (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália) contendo 30 UFC de *Salmonella* Typhimurium, homogeneizada e analisada conforme procedimento descrito na seção de Detecção e Quantificação de SNT (4.3). Foi calculada a precisão de recuperação e expressa de acordo com o intervalo entre:

$$(\text{R} - 2\text{DP}) \text{ a } (\text{R} + 2\text{DP})$$

Semeadura de Matriz (Spike). Realizado concomitantemente ao PRC, a fim de determinar o efeito das matrizes na recuperação de *Salmonella*. Foram reservadas duas amostras de 200 ml de cada matriz utilizada no teste, sendo que uma destas foi inoculada com *BioBall*[®] (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália) contendo 30 UFC de *Salmonella* Typhimurium. Ambas as amostras foram homogeneizadas e analisadas conforme descrito na seção de Detecção e Quantificação de SNT (4.3).

O percentual de recuperação (R) de SNT nos três procedimentos (PRI, PRC e IM) foi calculado conforme a seguinte equação:

$$R = 100 \times \frac{Ns - Nu}{T}$$

R = % de recuperação de *Salmonella*

Ns = Número Mais Provável (NMP/100 ml) na amostra com semeadura experimental

Nu = Número Mais Provável (NMP/100 ml) na amostra sem semeadura experimental

T = Concentração de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028; NCTC 12023) na solução semeada com *BioBall*® (30 UFC/200ml).

As taxas de recuperação de *Salmonella* obtidas no PRI, PRC e Spike são mostradas nos quadros 2 e 3. Observa-se no quadro 2 que a média (M) de taxas de recuperação (R) de *Salmonella* no teste PIR foi de 45,73% (DP 15,84%; DPR 34,65%), considerada aceitável pelo método 1200/USEPA, que estabelece os limites de média (M) entre 31 e 171% (USEPA, 2012).

Nos dois testes PRC as taxas de recuperação (R) foram de 43,44% e 36,21%, respectivamente, com precisão entre 11,76 e 75,12% no PRC 1, e entre 4,53 e 67,89% no PRC2 (Quadro 2). O método de referência estabelece os limites de recuperação que variam de Detectável (>0%) a 204% e de precisão máxima de 75%. Sendo assim, as taxas de precisão nos testes PRC 1 e 2 estão dentro dos padrões estabelecidos pelo método de referência, enquanto o limite superior do PRC 1 ficou 0,12% acima da precisão máxima indicada (USEPA, 2012).

As taxas de recuperação (R) nos testes *Spike* variaram de 8% (esgoto bruto) a 75,13% (águas superficiais) (Quadro 3), sendo aceitáveis pelo método USEPA 1200, que estabelece limites de recuperação entre Detectável (>0%) e 150%.

Quadro 2. Taxas de recuperação de *Salmonella* nos testes PIR e PRC.

	R (%)	M (%)	DP	DPR (%)
PIR	18,71	45,73	15,84	34,65
	50,21			
	56,81			
	57,18			
PRC 1	43,44			
PRC 2	36,21			

Notas: R (Taxa de recuperação); M (Média); DP (Desvio Padrão); DPR (Desvio Padrão Relativo); PIR (Precisão Inicial de Recuperação); PRC (Precisão e Recuperação em Curso), realizado após 20 amostras coletadas (PRC 1) e 40 amostras coletadas (PRC 2)

Quadro 3. Número mais provável (NMP/100 ml) e taxas de recuperação de *Salmonella* no teste *Spike*, segundo tipo de matriz utilizada.

Amostra	NMP/100 ml		R (%)
	Não semeada	Semeada	
Águas superficiais			
RG	0,65	23,19	75,13
MSL	LD (0,6473)	9,53	29,61
Esgotos brutos			
TS	3,15	5,55	8
SLS	LD (0.6473)	19.07	61.41

Notas: NMP (Número Mais Provável); R (Taxa de recuperação); RG (Represa Guarapiranga); MSL (Manancial São Lourenço); TS (Taboão da Serra); SLS (São Lourenço da Serra).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* NÃO TIFÓIDE POR ENSAIOS MOLECULARES

Antes da realização das análises moleculares, foi conduzido procedimento de reisolamento das cepas de *Salmonella* em meio de cultura seletivo-diferencial Agar McConkey (Difco[®], Detroit, MI, EUA). De cada placa foi selecionada uma colônia característica (transparente, com bordas arredondadas) inoculada em 2 mL de caldo Lúria e incubada a 36°C ± 1,5°C por 18 – 24 horas. O crescimento resultante foi transferido para tubos tipo

Eppendorf® com glicerol (80%) e estocado em freezer (-70°C). Os isolados congelados receberam numeração de acordo com a sequência de cepas da coleção de culturas do Laboratório de Prática de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública (FSP/USP), local onde foram realizados os ensaios moleculares.

4.4.1 Extração de DNA Total dos isolados de SNT

A extração de DNA total dos isolados de SNT foi realizada pela técnica de choque térmico, de acordo com método adaptado de CHAPMAN et al. (2001). As cepas estocadas em glicerol (80%) foram inoculadas em 2 mL de caldo Lúria e incubadas a 36°C $\pm$ 1,5°C por 18 – 24 horas. O crescimento bacteriano foi transferido para tubos tipo Eppendorf® com capacidade de 2 mL e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 24°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento resultante foi ressuspenso com 1 mL de água ultra pura (Mili Q®) estéril, homogeneizado e centrifugado novamente (14.000 rpm por 5 minutos a 24°C). Descartou-se o sobrenadante e o sedimento resultante foi ressuspenso com 200 µL de água ultra pura (Mili Q®) estéril e homogeneizado. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram aquecidos temperatura de 95°C por 10 minutos em banho Maria, transferidos ao freezer (-70°C) por 20 minutos e novamente ao banho Maria (65°C) por 1 minuto. Após o choque térmico as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm por 5 minutos a 24°C) e o sobrenadante obtido, contendo o DNA, transferido para um novo tubo e armazenado a -20 °C.

4.4.2 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR)

Primeiramente, foi realizada a amplificação do DNA com o conjunto de iniciadores desenvolvido por SOUMET et al. (1999) (Quadro 4). As amplificações foram realizadas em volume final de reação de 25µL,

contendo 5 µL de DNA adicionado a uma solução (20 µL) contendo 0,3 µM de cada iniciador (Extend, Biotecnologia Ltda, Campinas, SP, Brasil), tampão de reação 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM dNTP (Thermo Scientific, Lituania, UE) e 1,25 U de Taq Polimerase GoTaq (Promega, Madison, WI, EUA). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). Os ciclos e condições utilizados no ensaio foram: denaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (denaturação), 1 minuto a 55 °C (anelamento), 1 minuto a 72 °C (extensão) e extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os controles positivos utilizados no ensaio foram cepas de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028; NCTC 12023); *Salmonella* Typhimurium (FSP - 399/05), *Salmonella* Enteritidis (FSP - 397/05) e *Salmonella* Choleraesuis (FSP - 400/05), adquiridas da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Quadro 4. Iniciadores utilizados para identificação de *Salmonella* sp. (2); *Salmonella* Enteritidis (3) e *Salmonella* Typhimurium (1).

Iniciadores	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	gene/região gênica
Fli15 (1) Typ04 (1)	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T ACT GGT AAA GAT GGC T	620	<i>fliC</i>
ST11 (2) ST15 (2)	GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G	429	JEO402-1
S1 (3) S4 (3)	GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC	250	<i>spv</i>

Adaptado de SOUMET et al. (1999). Notas: pb (pares de bases).

A identificação de sorotipos de SNT e presença de genes de virulência foi realizada com os conjuntos de iniciadores desenvolvidos por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010) (Quadro 5). Realizaram-se os ensaios com cada conjunto de iniciador (STM, STY e STV) independentemente. Todas as amplificações foram realizadas em volume final de reação de 25µL, contendo 5 µL de DNA adicionado a uma solução (20 µL) contendo 0,3 µM de cada iniciador (Extend, Biotecnologia Ltda,

Campinas, SP, Brasil), tampão de reação 1X, MgCl_2 1,5 mM, 200 μM dNTP (Thermo Scientific, Lituania, UE) e 1,25 U de Taq Polimerase GoTaq (Promega, Madison, WI, EUA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). Os ciclos e condições utilizados no ensaio com o conjunto de iniciadores STM foram: denaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C (denaturação), 30 segundos a 62°C (anelamento), 1 minuto a 72°C (extensão) e extensão final de 5 minutos a 72 °C. No ensaio com o conjunto de iniciadores STY as condições foram iguais ao STM, porém a quantidade de ciclos na fase de denaturação (30 segundos a 94°C) foi reduzida de 40 para 35, com a intenção de diminuir o aparecimento de bandas inespecíficas. As condições do ensaio com o conjunto de iniciadores STV foram: denaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (denaturação), 15 segundos a 62°C (anelamento), 15 segundos a 58°C (extensão) e extensão final de 1 minuto a 72°C. Os controles positivos utilizados em ambos os ensaios (STM, STY e STV) foram cepas de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028; NCTC 12023), *Salmonella* Enteritidis (FSP - 397/05), adquirida do Instituto Adolfo Lutz, e *Salmonella* Mbandaka (FSP - 602/12), pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Análises Biológicas do Departamento de Saúde Ambiental (FSP/USP).

Após a amplificação por PCR, 5 μL do produto de cada reação foi separado por eletroforese a 6V/cm em gel de agarose 3,0% (Kasvi, Espanha), preparado com tampão TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM autato, 1 mM EDTA [pH 8.0]), corado com brometo de etídio (1 mg/ml). Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta e as imagens capturadas em sistema de foto-documentação (Epi Chemi II Darkroom e Software Labworks - UVP). O tamanho das bandas foi estimado por comparação com marcador molecular O'GeneRuler 50 pb DNA Ladder (Thermo Scientific, Lituania, UE) e identificadas de 1 a 5, sendo o número 1 para a banda de maior tamanho e 5 para a de menor tamanho (Quadro 5). O

padrão de bandas obtido para cada cepa, entre os três conjuntos de iniciadores, foi comparado aos perfis divulgados por PETERSON et al. (2010) (Quadro 6).

A determinação do sorotipo de SNT foi realizada conforme a presença/ausência de bandas no ensaio com o conjunto de iniciadores descritos por SOUMET et al. (1999) e com os três conjuntos de iniciadores STM, STY e STV (SEONGHAN KIM et al. 2006; PETERSON et al., 2010).

Quadro 5. Iniciadores utilizados para identificação de sorotipos de SNT e presença de genes de virulência, de acordo com os conjuntos STM, STY e STV.

Região/ gene	Iniciadores	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Fragmento nº
STM				
STM 1	STM0716F STM0716R	AACCGCTGCTTAATCCTGATGG TGGCCCTGAGCCAGCTTTT	187	1
STM 2	STM1350F STM1350R	TCAAAATTACCGGGCGCA TTTTAAGACTACATACGCGCATGAA	171	2
STM 3	STM0839F STM0839R	TCCAGTATGAAACAGGCAACGTGT GCGACGCATTGTTTCGATTGAT	137	3
STM 4	STM4525F STM4525R	TGGCGGCAGAAGCGATG CTTCATTCAGCAACTGACGCTGAG	114	4
STM 5	STM4538F STM4538R	TGGTCACCGCGCGTGAT CGAACGCCAGGTTTCATTTGT	93	5
STY				
STY 1	STY0311F STY0312R	TGGTATGGTTAAGCGGAGAATGG GAGAGTCATAGCCCACACCAAAG	301	1
STY 2	STY0346F STY0347R	GGCTGGAGCAGCCTTACAAAA AAGAGTTGCCTGGCTGGTAAAA	262	2
STY 3	STY2299F STY2300R	AATCCCCCCCCCTCAAAAA GGTACACGTTTACTGTTTGCTGGA	220	3
STM 6	STM3845F STM3845R	ATATCTCATCGTCTCCTTTTCGTGT GAAGGTCCGGATAGGCATTCT	181	4
STY 4	STY2349F STY2349R	AATTACGGAGCAGCAGATCGAGG TGCGGCCAGCTGTTCAAAA	124	5
STV				
<i>spvC</i>	SPVC 1 SPVC 2	ACTCCTTGACACAACCAAATGCGGA TGTCTTCTGCATTTGCGCCACCATCA	571	1
<i>invA</i>	INVA 1 INVA 2	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	244	2
PT4	PT4F PT4R	GGCGATATAAGTACGACCATCATGG GCACGCGGCACAGTTAAAA	225	3
<i>sseL</i>	SseLF SseLR	TTCCGCGACAACCGACCTTTCTAA TTCTTGAACCAGACCTTGCGTTGC	169	4
STM 7	STM2150F STM2150R	CATAACCCGCCTCGACCTCAT AGATGTCGTGAGAAGCGGTGG	101	5

Adaptado de SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010).

Quadro 6. Padrões de *PCR* dos 42 sorotipos de *Salmonella* descritos por PETERSON et al. (2010)

Conjuntos de iniciadores			Sorotipo
STM	STY	STV	
1	1, 2, 3, 5	2, 4, 5	Typhi
1, 2	0	2, 4	Chester
1, 2	2	2, 4	Brandenburg
1, 2	1, 2	2, 4	Poona 2
1, 2	2, 5	2, 4	Javiana
1, 2	2, 5	2, 4, 5	Uganda
1, 3	4	2, 4	Orion
1, 5	1, 2	ND	Poona 1
1, 5	2	ND	Poona 3
1, 2, 3	1, 2, 4, 5	2, 4	Westhampton
1, 2, 3	1, 2, 4, 5	2, 4, 5	Senftenberg
1, 2, 5	0	2, 4, 5	Muenchen
1, 2, 5	2	2, 4, 5	Stanley
1, 2, 5	2, 4	2, 4	Muenster
1, 2, 5	2, 5	2, 4	Minnesota
1, 2, 5	2, 5	2, 4, 5	Meleagridis
1, 2, 3, 5	0	2, 4	Newport
1, 2, 3, 5	5	2, 4	Derby
1, 2, 4, 5	0	ND	Java 1
1, 2, 4, 5	0	2, 4	London
1, 2, 4, 5	0	2, 4, 5	Paratyphi B
1, 2, 4, 5	0	2, 4, 5	Reading
1, 2, 4, 5	2	2, 4, 5	Heidelberg
1, 2, 4, 5	1, 4, 5	2, 4	Weltevreden
1, 2, 3, 4, 5	0	2, 4	Anatum
1, 2, 3, 4, 5	0	2, 4, 5	Saintpaul
1, 2, 3, 4, 5	4	1, 2, 4, 5	Typhimurium
2	2	2, 4	Infantis
2, 3	5	2, 4, 5	Agona
2, 4	0	ND	Java 2
2, 5	0	2, 4, 5	Braenderup
2, 5	0	2, 4	Ohio
2, 5	2, 4	2, 4, 5	Bareilly
2, 5	2, 4	2, 4	Oranienburg
2, 5	2, 5	1, 2, 4, 5	Choleraesuis
2, 5	2, 5	2, 4	Kentucky
2, 3, 5	0	2, 4	Bovismorbificans
2, 3, 5	1, 5	2, 4, 5	Tennessee
2, 3, 5	2, 3	2, 4, 5	Berta
2, 3, 5	2, 5	2, 4	Mbandaka
2, 3, 5	3	1, 2, 4	Dublin
2, 3, 5	3	1, 2, 3, 4	Enteritidis
2, 3, 5	5	2, 4	Thompson
3, 5	0	2, 4, 5	Hadar
5	2, 4	2, 4	Montevideo

Adaptado de Peterson et al. (2010).

Notas: ND - Perfil de bandas Não Determinado por Peterson et al. (2010); 0 - ausência de banda.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Qui Quadrado foi utilizado para determinar se existem diferenças na presença de SNT nos esgotos brutos entre as cidades de Taboão da Serra e São Lourenço da Serra e também para determinar se há diferenças sazonais na presença de SNT nos esgotos brutos de ambas as cidades.

5. RESULTADOS

Para as amostras de águas superficiais a concentração de SNT ficou abaixo do limite de detecção ($<0,6473$ NMP/100 mL) em 96% (48/50) exceto em uma amostra de São Lourenço da Serra e uma da Represa Guarapiranga cujas concentrações foram de 0,67 NMP/100 mL (setembro) e 0,65 NMP/ 100 mL (novembro), respectivamente.

A figura 12 apresenta as concentrações de SNT (NMP/100 mL) nas amostras de esgoto bruto de São Lourenço da Serra e Taboão da Serra, de janeiro a dezembro de 2013. Observa-se que a frequência de SNT acima do limite de detecção (LD) do método ($<0,6473$ NMP/100 mL) foi verificada em 54% (27/50) do total de amostras. Em Taboão da Serra foi de 44% (11/25) e, em São Lourenço da Serra, 64% (16/25). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na prevalência de SNT entre os esgotos brutos de São Lourenço da Serra e Taboão da Serra ($p = 0,05$).

Em relação às estações do ano, verificou-se que o percentual de presença, considerando ambas as amostras, foi de 75% (9/12) nos meses de primavera (setembro a novembro), 67% (8/12) no verão (dezembro a fevereiro), 58% (7/12) no outono (março a maio) e 21% (3/14) no inverno (junho a agosto). Observou-se diferença estatisticamente significativa na prevalência de SNT em esgotos sanitários brutos entre o inverno e as outras estações do ano ($p = 0,05$). Portanto, a presença de SNT nos esgotos brutos das regiões estudadas ocorre com menor frequência no inverno.

As concentrações de SNT variaram de LD a 9,24 NMP/100 mL em São Lourenço da Serra, sendo que a concentração máxima observada ocorreu no mês de setembro. Já em Taboão da Serra as concentrações variaram de LD a 54,22 NMP/100 mL, com concentração máxima no mês de maio.

Figura 12. Concentrações de SNT (NMP/100 mL) em amostras de esgotos brutos de São Lourenço da Serra e Taboão da Serra, de janeiro a dezembro de 2013.

Notas: nas datas sem valores correspondem ao Limite de Detecção do método ($<0,06473$ NMP/100 mL).

Foi isolado um total de 506 cepas de SNT, sendo 499 de esgotos brutos e sete de águas superficiais. Entre os 506 isolados, 503 (99,4%) apresentaram o fragmento de DNA correspondente aos iniciadores ST11/ST15 (429 pb), sendo confirmados como *Salmonella* sp., enquanto três isolados (0,6%) não apresentaram nenhum fragmento de DNA, sendo classificados como “Negativo” para *Salmonella* sp..

Dentre as 503 cepas confirmadas, 86 (17,1%) foram identificadas como *Salmonella* Enteritidis, por apresentar o fragmento de DNA com peso molecular de 250 pb (S1/S4) e 27 (5,3%) como *Salmonella* Typhimurium, por apresentarem o fragmento de DNA de 620 pb (Fli15/Typ04). Outras 52 cepas (10,3%) foram consideradas como *Salmonella* Typhimurium atípicas, pois além de apresentar o fragmento típico do sorotipo (620 pb) também apresentou fragmento de 250 pb. Estas cepas foram isoladas de cinco amostras diferentes de esgotos brutos.

As sete cepas isoladas das amostras de águas superficiais (FSP - 662 – 667/13 e 29/14) apresentaram somente o fragmento de DNA de 429 pb (ST11/ST15), sendo identificadas como *Salmonella* sp.. Os dados dos padrões de PCR verificados para todos os isolados encontram-se disponíveis no ANEXO 3.

A Tabela 2 apresenta a distribuição de isolados de SNT, segundo estações do ano, durante período de estudo. A presença de *Salmonella* Enteritidis foi verificada apenas nos meses de verão (dezembro a fevereiro), representando 39,6% (86/217) dos isolados nesta estação. *Salmonella* Typhimurium (incluindo padrões atípicos de PCR) apresentou maior ocorrência no verão (29%), mas também foi verificada no outono (7,6%) e na primavera (5,7%).

Tabela 2. Distribuição de isolados de SNT, segundo estações do ano, de janeiro a dezembro de 2013.

Identificação	Número de cepas identificadas (%)				Total
	Verão (dez a fev)	Outono (mar a maio)	Inverno (jun a ago)	Primavera (set a nov)	
<i>Salmonella</i> sp.	68 (31,3)	146 (92,4)	58 (100)	66 (94,3)	338 (67,2)
<i>Salmonella</i> Enteritidis	86 (39,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	86 (17,1)
<i>Salmonella</i> Typhimurium *	63 (29)	12 (7,6)	0 (0)	4 (5,7)	79 (15,7)
Total	217 (43,1)	158 (31,4)	58 (11,5)	70 (13,9)	503 (100)

Notas: * *Salmonella* Typhimurium, inclui aquelas cepas com padrões atípicos de PCR.

A figura 13 mostra os padrões de PCR verificados com o conjunto de iniciadores de SOUMET et al. (1999).

Figura 13. Imagem de gel de agarose mostrando os padrões de PCR dos sorotipos identificados com os conjuntos de iniciadores de SOUMET et al. (1999).

Notas: (M) Marker de 50 pares de bases (pb).

Controles positivos: FSP - 397/05 *Salmonella* Enteritidis; FSP - 398/05 *Salmonella* Typhimurium, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Prática de Saúde Pública HSP/FSP; FSP - 141/14 *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028); FSP - 602/12 *Salmonella* Mbandaka.

Cepas deste estudo: 107 e 108/13 – *Salmonella* Enteritidis; 263 e 300/13 - *Salmonella* Typhimurium; 302 e 262/13 - padrão de PCR atípico de *Salmonella* Typhimurium; 178 e 288/13 – *Salmonella* sp..

Com a utilização dos conjuntos de iniciadores STM, STY e STV, propostos por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010), verificou-se que 10,5% (53/506) dos isolados das amostras de esgotos brutos apresentaram padrões de PCR correspondentes a nove sorotipos de SNT (Figura 14). Os sorotipos de SNT mais frequentes foram *Salmonella* Mbandaka (20 isolados) seguido de *Salmonella* Bradenburg e *Salmonella* Enteritidis, ambos com sete isolados. Nenhuma cepa isolada entre os meses de maio e setembro apresentou padrões de PCR correspondentes aos 40 sorotipos de SNT identificáveis com este método (Anexo 3).

Figura 14. Distribuição de sorotipos de SNT identificados nas amostras de esgotos brutos, de janeiro a dezembro de 2013.

Notas: * Todos os sorotipos identificados pertencem a *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. São apresentados apenas os sorotipos com padrões típicos de PCR.

Na figura 15 são mostrados os padrões de PCR verificados com os conjuntos de iniciadores STM, STY, e STV.

Figura 15. Imagem de gel de agarose mostrando os padrões de PCR dos sorotipos identificados com os conjuntos de iniciadores STM (superior), STY (meio) e STV (inferior).

Notas: (M) Marker de 50 pares de bases (pb).

Controles positivos: FSP - 397/05 *Salmonella* Enteritidis; FSP - 141/14 *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028); FSP - 602/12 *Salmonella* Mbandaka.

Cepas deste estudo: 107/13 – padrão de PCR atípico de *Salmonella* Enteritidis (STM 2,3,5/STY 3,4/ STV 1,2,3,4); 108/13 – *Salmonella* Enteritidis (STM 2,3,5/STY 3/ STV 1,2,3,4); 125/13 – *Salmonella* Agona (STM 2,3/STY 5/ STV 2,4,5); 149/13 - *Salmonella* Mbandaka (STM 2,3/STY 2,5/ STV 2,4); 164/13 *Salmonella* Bradenburg (STM 1,2/STY 2/ STV 2,4); 231/13 – padrão de PCR atípico de *Salmonella* Typhimurium (STM 1,2,3,4,5/STY 2,4,5/ STV 1,2,4,5); 234/13 - *Salmonella* Typhimurium (STM 1,2,3,4,5/STY 4/ STV 1,2,4,5); 265/13 – *Salmonella* Bareilly (STM 2,5/STY 2,4/ STV 2,4,5); 274/13 – *Salmonella* Bradenburg (STM 2,5/STY 0/ STV 2,4,5); 288/13 – *Salmonella* Saintpaul (STM 1,2,3,4,5/STY 0/ STV 2,4,5); 50/14 – *Salmonella* Hadar (STM 3,5/STY 0/ STV 2,4,5).

Integrando-se os achados a partir dos métodos propostos por SOUMET et al (1999) e PETERSON et al. (2010), observou-se que os padrões de PCR de sete cepas, provenientes das amostras de esgoto, confirmaram-se como *Salmonella* Enteritidis (ANEXO 3). Outras 39 cepas apresentaram padrões atípicos de PCR de *Salmonella* Enteritidis, por apresentarem o fragmento de DNA correspondente ao iniciador STM6 (fragmento nº 4 do conjunto de iniciadores STY [181 pb]), ou por não apresentar qualquer fragmento de DNA do conjunto de iniciadores STY. Duas cepas confirmaram-se como *Salmonella* Typhimurium, enquanto outras 76 apresentaram padrões atípicos de PCR de *Salmonella* Typhimurium, por apresentarem os fragmentos de DNA nº 2 e/ou 5 (STY), ou não apresentar o gene *spvC* (fragmento nº1 do conjunto de iniciadores STV [571 pb]). Notou-se que entre estas 76 cepas, 66 (87%) apresentaram os padrões de PCR: 1,2,3,4,5 (STM), 2,4,5 (STY), 1,2,4,5 (STV), que diferem dos padrões estipulados no método de referência pela presença dos fragmentos nº 2 (STY 2 [262 pb]) e nº5 (STY 4 [124 pb]), ambos do conjunto de iniciadores STY. As cepas que apresentaram padrões atípicos de PCR de *Salmonella* Typhimurium foram isoladas de sete amostras diferentes de esgotos brutos.

Os três isolados classificados como “Negativo” no ensaio segundo SOUMET et al. (1999) não apresentaram o marcador genético *invA* (244 pb) para *Salmonella* sp. além dos outros genes de virulência pesquisados (*sseL* e *spvC*). Em dois isolados (77/13 e 562/13) detectou-se o *invA*, porém os genes de virulência *sseL* (169 pb) e o *spvC* (571bp) não foram detectados. O gene de virulência *spvC* (571 pb) foi observado em 25% (125/506) dos isolados, entre os quais 42 (34%) foram identificados como *Salmonella* Enteritidis e 72 (58%) como *Salmonella* Typhimurium, incluindo aqueles isolados que apresentaram padrões atípicos de PCR de ambos os sorotipos.

6. DISCUSSÃO

A ocorrência de SNT em amostras ambientais, como águas superficiais e esgotos sanitários brutos, evidencia a circulação desses patógenos no ambiente em decorrência do perfil epidemiológico de determinada população. Estudos como os realizados por SILVA (2008) e relatórios divulgados pela CETESB (CETESB, 2014) e pela prefeitura de São Lourenço da Serra (PMSB – São Lourenço da Serra, 2010) apontam que a contaminação biológica das águas do manancial São Lourenço e da represa Guarapiranga é consequência da pressão antrópica recebida em função de um processo histórico de ocupação irregular de suas margens.

SNT está presente em apenas 4% das amostras de águas superficiais das regiões estudadas, com concentrações que variam de LD ($<0,6473$ NMP/100ml) a 0,67 NMP/100 mL. O limite de detecção (LD) dos métodos de quantificação de SNT, pela técnica de tubos múltiplos, varia amplamente na literatura (0,015 NMP/L - 300 NMP/L), dificultando comparações mais apuradas entre os estudos (WAAGE et al., 1999; JENKINS et al., 2008; HALEY et al., 2009; RAJABI et al., 2011; JIMENEZ e CHAIDEZ, 2012). Se consideradas águas superficiais impactadas por despejo de esgotos sanitários nota-se que estas tendem a apresentar prevalência e concentração superior às verificadas neste estudo. DOLEJSKÁ et al., 2009 e HSU et al., 2011 relataram prevalências de 8,6 a 56%, respectivamente e BONADONNA et al., (2003 e 2006), verificaram concentrações que variaram de 10 a 10^5 NMP/100ml. É possível que a baixa prevalência e concentração de SNT, nos pontos de captação de água para o abastecimento público, sejam influenciadas pela diluição dos esgotos sanitários despejados nestes mananciais, ficando abaixo do limite de detecção durante a maior parte do período de estudo. Outra hipótese é que as cepas isoladas do manancial São Lourenço sejam provenientes de fontes difusas de contaminação, como

fezes de cavalos (JOKINEN et al., 2011) e/ou por influência da fauna silvestre à jusante de São Lourenço da Serra (PATCHANEE et al., 2010). No caso da represa Guarapiranga, é possível que a única cepa isolada seja proveniente do arraste de sujidades, por escoamento superficial, das ruas da cidade de São Paulo (SCHETS et al., 2008).

Não há diferença estatisticamente significativa na prevalência de SNT entre os esgotos brutos de São Lourenço da Serra e Taboão da Serra ($p = 0,05$), nas quais SNT está presente em 54% (27/50) das amostras. JOKINEN et al. (2011) verificaram prevalência de 18,6% (8/43) em esgotos brutos de área onde há centros urbanos e atividade agrícola, localizada no sul de Alberta (Canadá). Já ESPIGARES et al. (2006) relataram prevalência de 52,4% (11/21) em esgotos brutos de área urbana do sul da Espanha, no período de inverno (novembro a março). Diferentemente do encontrado por ESPIGARES et al. (2006), neste estudo, a prevalência de SNT nos meses de inverno difere significativamente das outras estações ($p = 0,05$) com prevalência de 21% (3/14) nos meses de inverno. Sendo assim, a prevalência de SNT em esgotos brutos pode variar entre áreas urbanas, inclusive durante a mesma estação do ano.

A presença do fragmento de DNA de 620 pb (Fli15/Typ04), correspondente ao gene *fliC*, sugere uma forte evidência na identificação de 27 cepas como pertencentes ao sorotipo *Salmonella* Typhimurium. Este iniciador tem sido utilizado unicamente para identificação de cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de diversas matrizes como carcaças de frangos (CHAGAS et al., 2013), tilápia do Nilo (sem vísceras) (DAVID et al., 2009), pele e anus de répteis (SHIN et al., 2012), sucos de frutas comercializados em barracas de vendedores ambulantes (DIANA et al., 2012) e frutas processadas e comercializadas em mercados (PUI et al., 2011). Outros autores ainda confirmaram esta identificação por sorologia clássica (*White-Kauffman-Le Minor scheme*), com isolados de amostras de lodos de esgoto (KRZYZANOWSKI et al., 2014) e vísceras e outras partes de frangos (OLIVEIRA et al., 2002; SOUMET et al., 1999).

Outras 52 cepas apresentaram padrões atípicos de *PCR* para *Salmonella* Typhimurium, pois além de apresentar o fragmento de DNA de 620 pb (Fli15/Typ04) também apresentaram o de 250 pb (S1/S4), característico de *Salmonella* Enteritidis. Contraditoriamente, cepas identificadas como *Salmonella* Typhimurium não apresentaram este fragmento em estudos de KRZYZANOWSKI et al. (2014), com isolados de lodos de esgotos, e SOUMET et al. (1999), com isolados de diversas matrizes de granjas de frango. Os iniciadores S1/S4 foram desenhados por SOUMET et al. (1999) a partir de sequência de DNA de plasmídeo de virulência com peso molecular de 38 MDa (~57,6 Kb) (WOOD et al. 1994). Sabe-se que o principal plasmídeo de virulência de *Salmonella* Enteritidis possui peso molecular de ~60 Kb e, por conter a região *F-like oriT*, é potencialmente transferível (PORWOLLIK e MCCLELLAND, 2003). Sendo assim, é plausível a hipótese de que a região *spv*, amplificada pelos iniciadores S1/S4, também esteja presente em *Salmonella* Typhimurium, entretanto, estudos posteriores são necessários para determinar se esta região está presente em plasmídeos de virulência ou no cromossomo destas cepas.

Os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium estão presentes em 32,8% das amostras de esgotos brutos, incluindo as cepas que apresentaram padrões atípicos de *PCR*. Por outro lado, estes dois sorotipos representam apenas 3,5% (15/429) das cepas isoladas de esgotos, entre 1996 e 2003, no Estado de São Paulo (TAVECHIO et al., 2002). Todavia, esses dados são representados por cepas enviadas por laboratórios, públicos e privados, e de universidades públicas, não sendo fornecidas informações sobre os métodos de isolamento, amostragem e diferenciação entre as matrizes de esgotos brutos e tratados, o que pode gerar vieses de seleção amostral na interpretação dos dados.

Os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium estão presentes nas amostras de esgotos brutos, principalmente nos meses de verão (dezembro a fevereiro), representando a maior parte (68,6%) dos isolados

nesta estação, incluindo-se as cepas que apresentaram padrões atípicos de PCR. Relatórios publicados pelo CDC (CDC, 2013) e pela EFSA (EFSA/ECDPC, 2014) mostram que os surtos de salmonelose ocorrem, sobretudo, durante esta estação do ano. Além disso, diversos estudos mostram que os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium são endêmicos do Estado de São Paulo, por apresentar alta prevalência entre isolados de fontes humanas e não humanas (CASTRO et al., 2002; FERNANDES et al., 2006; MEDEIROS et al., 2011; TAVECHIO et al., 1996, 2002). *Salmonella* Enteritidis é responsável por 62% dos surtos de salmonelose associados a consumo de alimentos em restaurantes (EDUARDO et al., 2004), e estes são os sorotipos que mais causam bacteremias por SNT (CASTRO et al., 2002). Portanto, a alta prevalência destes patógenos nos esgotos brutos da RMSP durante o verão indica que há uma maior circulação do patógeno no ambiente, estando a população mais exposta durante esta estação do ano.

As cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de esgotos brutos apresentam padrões atípicos de PCR, com o uso dos conjuntos de iniciadores STM, STY e STV. Observou-se neste estudo a presença do fragmento de DNA correspondente ao iniciador STM6 (Figura 15 - banda nº 4 do STY [181 pb]) em isolados de diferentes coletas, previamente identificados como *Salmonella* Enteritidis com o conjunto de iniciadores desenvolvido por SOUMET et al. (1999). Este iniciador amplifica a região gênica ainda não caracterizada STM3845, comum em *Salmonella* Orion, Westhampton, Senftenberg, Muenster, Weltevreden, Typhimurium, Bareilly, Oranienburg e Montevideo (SEONGHAN KIM et al., 2006). A presença desta região gênica já havia sido considerada como “incerta” em cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem clínica, analisadas pela técnica de *Microarray* (PORWOLLIK et al., 2004).

Padrões atípicos de PCR também foram observados em isolados identificados como *Salmonella* Typhimurium entre os conjuntos de iniciadores STM, STY e STV. Estes padrões constam da presença dos

fragmentos STY 2 (Figura 15 - nº 2 [262 pb]) e STY 4 (Figura 15 - nº 5 [124 pb]), que amplificam as regiões gênicas STY0346 e STY2349, respectivamente, comum em *Salmonella* Typhi, Brandenburg, Poona, Javiana, Uganda, Westhampton, Senftenberg, Stanley, Muenster, Minnesota, Meleagridis, Derby, Heidelberg, Weltevreden, Infantis, Agona, Bareilly, Oranienburg, Choleraesuis, Kentucky, Tennessee, Berta, Mbandaka, Thompson e Montevideo (SEONGHAN KIM et al., 2006). A região STY0346 pode conter os genes *tcfABCD*, responsáveis por expressar constituintes fimbriais, enquanto a região STY2349 ainda não foi caracterizada (PORWOLLIK et al., 2004). Antígenos fimbriais de *Salmonella* Enteritidis (*Sef*) e *Salmonella* Typhi (*sty*) também tem sido observados em conjunto com o gene *fliC* (Fli15/Typ04), utilizado para identificar *Salmonella* Typhimurium (DIANA et al., 2012; MALKAWI e GHARAIBEH, 2004; NILLIAN et al., 2011). No entanto, estes autores interpretaram os padrões observados como sendo uma mistura entre ambos os sorotipos, pois os ensaios de *PCR* foram realizados diretamente de amostras pré-enriquecidas, sem o isolamento prévio das cepas. Nesta pesquisa, no entanto, tomaram-se precauções de obter cepas puras para os ensaios moleculares, o que suporta a hipótese de que os fragmentos adicionais sejam pertencentes a ambos os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium.

Os padrões atípicos de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium detectados no curso desta investigação podem ampliar as possibilidades de interpretação de resultados produzidos pela análise de *PCR* com os conjuntos de iniciadores STM e STY (SEONGHAN KIM et al., 2006). Outros pesquisadores têm se empenhado no aprimoramento deste método, avaliando-o na identificação de cepas de SNT isoladas de matrizes clínicas e fezes de animais (LEADER et al., 2009; MERTES et al., 2010; PETERSON et al., 2010), além de fontes ambientais como culturas (tomates, alface, cebola) e águas subterrâneas e de irrigação (JEAN-GILLES BEAUBRUN et al., 2012) e águas superficiais (McEGAN et al., 2014). Padrões divergentes aos originais, estabelecidos por SEONGHAN KIM et al.

(2006), tem sido relatados para *Salmonella* Anatum, Derby, Hadar, Newport, Montevideo e Paratyphi B (MERTES et al., 2010); Montevideo, Newport, Muenchen, Hadar, Infantis, Paratyphi, Derby, Berta e Seftenberg (JEAN-GILLES BEAUBRUN et al., 2012); e Anatum (SALEM et al., 2010). LEADER et al., (2009) desenharam os iniciadores para as mesmas regiões gênicas previamente avaliadas por SEONGHAN KIM et al. (2006) e adicionalmente para outras sete regiões. Como resultado foram detectados dois padrões de PCR para *Salmonella* Typhimurium e dois para *Salmonella* Enteritidis, os quais estão relacionados à ausência das regiões gênicas STM3518 e Sdf, as quais não foram consideradas por SEONGHAN KIM et al. (2006).

Os padrões atípicos de PCR observados nesta pesquisa revelam a presença de genes adicionais na maior parte das cepas de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium. A presença destes genes pode ser explicada por eventos de transferência lateral de genes (conjugação, transformação e transdução), apontado como sendo o principal mecanismo de diferenciação de sorotipos de *Salmonella* no curso de sua evolução (PORWOLLIK et al., 2003), ou ainda por mutações, que podem conferir vantagens adaptativas ou ainda aumentar ou atenuar o potencial de virulência de determinadas linhagens de *Salmonella* (CHAN et al., 2003). Diferenças na presença/ausência de genes em um mesmo sorotipo também foram evidenciadas por PORWOLLIK et al. (2004) por meio de análises de microarray, sendo que os sorotipos que mais apresentaram diferenças (38 regiões gênicas) foram *Salmonella* Infantis, Paratyphi B e Muenster, enquanto os que menos apresentaram diferenças (10 ou menos regiões gênicas) foram *Salmonella* Abortusovis, Agona, Choleraesuis, Oranienburg, Paratyphi C, Senftenberg, Thompson, Typhimurium e Typhi. Deste modo, é possível que a presença de genes adicionais em *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium isoladas neste estudo tenha sido propiciada pelo nicho ao qual estas cepas estão submetidas, e ainda que estas cepas possam ser exclusivas dos locais estudados, uma vez que estes padrões atípicos de PCR não foram relatados entre cepas isoladas de nove países da Europa

(MERTES et al., 2010), Estados Unidos (JEAN-GILLES BEAUBRUN et al., 2012; McEGAN et al., 2014; PETERSON et al., 2010; SEONGHAN KIM et al., 2006) e Tunísia (SALEM et al., 2010).

Os ensaios com os conjuntos de iniciadores STM, STY e STV, permitiram ainda a identificação de outros sete sorotipos de SNT (Figuras 14 e 15). Estes dados apontam uma baixa diversidade de sorotipos de SNT em amostras de esgotos brutos, corroborado por estudos realizados no Canadá (JOKINEN et al., 2011) e na Espanha (ESPIGARES et al., 2006), nos quais foram identificados quatro e sete sorotipos de SNT, respectivamente, incluindo *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Hadar, também isolados neste estudo. Entretanto, águas superficiais possuem diversidade maior de sorotipos SNT do que em amostras de esgotos (ver ANEXO 1), com até 35 sorotipos em amostras de rios que compõem uma mesma bacia hidrográfica (THOMAS et al., 2012). Esta diferença reflete a diversidade de hospedeiros de SNT que influenciam cada tipo de matriz. Esgotos sanitários brutos são formados – ao menos teoricamente – apenas por fezes humanas, enquanto a diversidade microbiológica de águas superficiais pode ser influenciada por esgotos sanitários e industriais e também por fezes de diversos animais de criação e selvagens, que contaminam os rios por escoamento superficial (LEVANTESI et al., 2012). Outra hipótese é que há uma maior pressão seletiva nos esgotos sanitários em função da alta concentração de microrganismos em relação às águas superficiais (WHO, 2006), o que limitaria o desenvolvimento de determinados sorotipos de *Salmonella* nesta matriz.

Ao total, nove sorotipos de SNT estão presentes nos esgotos brutos estudados, sendo que todos apresentaram os genes de virulência *invA*, *SseI* e *spvC*. Apenas seis destes sorotipos (*Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Typhimurium [4,5,12,:i:-], Agona, Saintpaul, Hadar e Mbandaka) representam 80,8% (2.877/3.554) dos isolados de *Salmonella* de fontes humanas no Estado de São Paulo, entre 1996 e 2003 (FERNANDES et al., 2006). Com exceção de *Salmonella* Saintpaul, os outros cinco sorotipos citados

representam 48,9% (2.242/4.581) dos isolados de fontes não humanas no Estado de São Paulo, de 1996 a 2000 (TAVECHIO et al., 2002). Além disso, embora alguns destes sorotipos sejam epidemiologicamente menos representativos, há relatos de surtos de origem alimentar associados à *Salmonella* Braenderup (CDC, 2005), Mbandaka (HARRIS et al., 2003) e Saintpaul (CDC, 2008).

Diante do exposto, a presença de SNT com potencial patogênico em esgotos sanitários brutos da RMSP, pode-se inferir que este patógeno esteja circulando no ambiente, uma vez que 13% dos esgotos sanitários desta região ainda não são coletados (SABESP, 2013). É provável que os sorotipos de SNT verificados nesta pesquisa estejam circulando na população residente da RMSP, tendo em vista que as cidades desta região possuem características culturais semelhantes, bem como a produção e distribuição de alimentos em larga escala e fluxo migratório constante de pessoas (NYACHUBA et al., 2010). Ressalta-se que a baixa ocorrência de SNT nas águas superficiais investigadas não exclui a possibilidade de que este patógeno esteja presente em outros pontos dos mananciais investigados, ou ainda em outros mananciais do Estado de São Paulo, que também já se encontram impactados pela ação antrópica (CETESB, 2014).

CONCLUSÕES

Salmonella Não Tifóide foi frequente em 4% das amostras de águas superficiais da represa Guarapiranga e do manancial São Lourenço. Já a frequência nas amostras de esgotos sanitários de Taboão da Serra e São Lourenço da Serra foi de 54%. As concentrações de SNT variaram amplamente entre as duas matrizes investigadas, sendo superiores em esgotos brutos. Entretanto, não há diferença estatisticamente significativa na presença de SNT entre os esgotos brutos gerados nas duas cidades. SNT ocorreu com menor frequência durante os meses de inverno (junho a agosto). No entanto, durante o verão há maior ocorrência dos sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium, potencialmente patogênicos, o que pode evidenciar um reflexo do perfil epidemiológico de salmonelose na população contribuinte desses esgotos brutos analisados. Estes sorotipos apresentaram padrões atípicos de PCR relacionados à presença de genes de plasmídeos de virulência, constituintes fimbriais e outros ainda não caracterizados, que podem servir de base para o aprimoramento do método do PCR utilizado neste estudo. Outros sete sorotipos também foram identificados nos esgotos brutos (*Salmonella* Agona, Bareilly, Bradenburg, Braenderup, Enteritidis, Hadar, Mbandaka, Saintpaul, Typhimurium) representando a baixa diversidade de SNT nesta matriz, em comparação com a diversidade de SNT em águas superficiais relatada na literatura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de SNT nos esgotos brutos da região estudada sugere sua circulação na população. Esta matriz deve ser compreendida como transitória entre a população contribuinte para a sua geração e seus possíveis destinos, seja mediante transformação em subprodutos nas ETEs, ou ainda por despejo direto no ambiente. Ressalta-se a importância do monitoramento de SNT, sobretudo nos meses de verão, acompanhado de investigação epidemiológica e da realização de pesquisas para o desenvolvimento, aprimoramento e difusão de métodos moleculares economicamente viáveis para o monitoramento de SNT em matrizes ambientais.

SUGESTÕES

- Identificar a variação monofásica (4,5,12,i:-) entre as cepas identificadas como *Salmonella* Typhimurium (inclusive aquelas com padrões atípicos de PCR), com o conjunto de iniciadores desenvolvido por TENNANT et al. (2010).
- Identificar o perfil plasmidial das cepas identificadas como *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium.

ANEXO 1

Quadro. Resumo dos estudos sobre a ocorrência de SNT em águas superficiais e esgotos sanitários

Referência (Local de estudo)	Local de coleta e forma de utilização da água	Coletas e amostras	Resultados	Sorotipos isolados ²
Anvanitidou et al. (2005) (Norte da Grécia)	<ul style="list-style-type: none"> • Rio Axios: receptor de esgoto bruto antes de entrar na Grécia • Rio Aliakmon: abastece a cidade de Thessaloniki (Ambos os rios servem para atividades recreacionais) 	<ul style="list-style-type: none"> • Rio Axios (n = 57) • Rio Aliakmon (n = 38) 	<ul style="list-style-type: none"> • Axios: 36,8%¹ • Aliakmon: 21,0% 	Tshiongwe, Bovis moribificans, Dabou, Hadar, Mbandaka, Muenster, Montevideo, Jubillee, Hilbrow, Infantis, Halle, Roan, Virchow, Yolo, Ibadan, Cerro, Cubana, Seftenberg, Kedougou
Espigares et al. (2006) (Sul da Espanha)	ETE Granada	Esgoto bruto (n = 21) Esgoto tratado (n = 21)	<ul style="list-style-type: none"> • Esgoto bruto 52,4% • Esgoto tratado: 47,6% 	<ul style="list-style-type: none"> • Esgoto bruto: Anatum, Enteritidis, Goldcoast, Hadar, London, Newport, Typhimurium • Esgoto tratado: Anatum, Enteritidis, Hadar, London
Gaertner et al. (2011) (Texas - EUA)	Lago Spring - Rio San Marcos: uso da água NE	6 coletas em 6 pontos no rio e 3 poças de água às margens (amostras de água e sedimentos).	<ul style="list-style-type: none"> • Água: negativo para <i>InvA</i> antes do período de chuvas e positivo após as chuvas em pelo menos um dos pontos em todas as coletas • Sedimentos: positivo em um dos pontos de uma das coletas 	Cubana, Gaminara, Give, Javiana, Kentucky, Montevideo, Muenchen, Newport
Haley et al. (2009) (Georgia - EUA)	Rio Little, localizado dentro do da bacia do rio Suwannee: irrigação de culturas e recreação (pesca, natação e passeios de barco).	Coletas mensais em seis pontos e 12 amostras de cada ponto (n = 72)	<ul style="list-style-type: none"> • Análise espacial: positivo em 79,2% das amostras; 4,96 - 7,46 NMP/L • Análise temporal: positivo para 33,3% (2/6) dos pontos em abril e 100% em 5 meses de 2005 e 2 meses de 2006; ND (<1,8 NMP/L) - 68,6 NMP/L 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> • Muenchen; Rubislaw; Mikawasima; Braenderup; Saint Paul; Bareilly; Liverpool; I 4,[5]:b, Gaminara, Montevideo, Anatum, I 47:z4z23
HO e TAM (2000)	Rio e riachos não divulgados	n = 52	1 a 4,6 X 10 ³ células/L	NA
Hsu et al. (2011) (Taiwan)	Água bruta de 18 ETAs que captam dos rios, Choshui, Puzih, Bajhang, Zengwen e Kaupin: consumo humano. Rio Zengwen: irrigação de culturas	Coletas de janeiro a agosto de 2009 (n = 116)	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo em 8,6% das amostras (10/116) • PCR: <i>invA</i> negativo em todas as amostras do PI; 100% (10/10) do PII; 70% (7/10) do PIII 	Newport, Victoria, Enteritidis, Houten, Montevideo, Albany, Paratyphi B var. Java
Jenkins et al. (2008) (Georgia - EUA)	Bacia hidrográfica cercada por área de plantio e área arborizada. Utilização NE	Coletas mensais de afluente e efluente (n = 5 de cada)	<ul style="list-style-type: none"> • Afluente: ND (<0,015 MPN/L) - 0,55 MPN/L • Efluente: ND (<0,015 MPN/L) - 3,4 MPN/L 	NA
Jimenez e Chaidez (2012) (Sinaloa - México)	Três rios: uso da água NE	Coletas quinzenais: 14 amostras de cada um dos 6 pontos de coleta (n = 84).	<ul style="list-style-type: none"> • NMP: 45% positivos; ND (<300) - 46000 NMP/L • Ultrafiltração: 76% positivos 	NA

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Prevalência de *Salmonella* nas amostras analisadas

⁽²⁾ Inclui: sorotipos de *Salmonella* Não Tifóide; *Salmonella* Tifóide (*Salmonella* Paratyphi B var. Java); *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*; sorotipos não identificados (*Rough*)

NA – Não Analisado; NE – Não Especificado

Quadro. Sumarização dos estudos sobre a ocorrência de SNT em águas superficiais e esgotos sanitários

Continuação...

Referência (Local de estudo)	Local de coleta e forma de utilização da água	Coletas e amostras	Resultados	Sorotipos isolados ²
Jokinen et al. (2011) (Alberta - Canadá)	<ul style="list-style-type: none"> Água - Rio Oldman: consumo humano, irrigação de culturas, dessedentação de gado e recreação. Esgoto bruto: ETE Fort Macleod. (n = 43) 	<ul style="list-style-type: none"> Água - Rio Oldman (n = 342) Esgoto bruto (n = 43) 	<ul style="list-style-type: none"> Água: 8,5% (29/342) Esgoto bruto: 18,6% (8/43) 	<ul style="list-style-type: none"> Água: Derby, Give var. 15+, Heidelberg, t:11:r-, Mbandaka, Rubislaw, Senftenberg, Typhimurium. Esgoto bruto: Hadar, Heidelberg, Muenchen, Stanley
KINDE et al. (1996) (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> Água - Rio inteiramente formado por efluentes de uma ETE: dessedentação de animais Esgoto bruto e tratado Órgão e fezes de animais 	NE	<ul style="list-style-type: none"> 15 cepas isoladas de esgotos brutos e tratados e órgãos e fezes de animais 66 cepas isoladas de águas superficiais 	Enteritidis, Typhimurium, Tennesse, Give, Mbandaka, Panamá
PATCHANEE et al. (2010) (Carolina do Norte)	Bacias hidrográficas que passam por dentro de sistemas de produção de carne suína, residencial/industrial (<i>Jumping Run Creek</i> - JRC), florestal e agrícola	Sistemas de produção de carne suína (n = 12); residencial/industrial (JRC) (n = 34); florestal (n = 28); agrícola (n = 12). Foram coletadas duplicatas, totalizando 172 amostras.	Sistemas de produção de carne suína (41,7%), residencial/industrial (JRC) (58,8%), florestal (57,1%) e agrícola (50%).	Anatum, Bredeney, Mbandaka, Gaminara, Bullbay, Give, Miami, Montevideo, Muenchen, Gaminara, Brandenburg, Newport.
Rajabi et al. (2011) (Florida - EUA)	Parte superior do rio Suwannee: irrigação de culturas	Coletas mensais em 4 pontos (n = 110)	ND (<18) - 5400 NMP/100 mL	Braenderup, Cubana, Inverness, Johannesburg, Montevideo, Muenchen, Newport, Rubislaw
Schets (2008) (Amsterdam - Holanda)	<ul style="list-style-type: none"> Um canal com habitações no entorno (Prinsengracht) e outro sem habitações (Herengracht): ambos servem à drenagem urbana Rios: Amstel e IJmeer Cinco lagos: recreação 	Coletas realizadas 8 vezes de Junho de 2003 a Junho de 2004	<ul style="list-style-type: none"> Presente: Herengracht e Amstel Ausente: Prinsengracht e IJmeer 	Newport, Virchow
Thomas et al. (2012) (Ontario - Canada)	Riacho Canagagigue (CAN) e Rio Conestogo (CON), localizados na zona rural com agricultura intensiva. Riacho Laurel (LC), localizado na zona urbana. Ambos desagüam no rio Grand que fornece água para 86% da população local (900 000 habitantes). Também são utilizados para atividades recreacionais e agrícolas.	Coletas quinzenais (n = 116)	<ul style="list-style-type: none"> LC: 89% positivo (56/63) CAN: 82% positivo (23/28) COM: 48% positivo (12/25) 	Typhimurium, Heidelberg, Thompson, Infantis, Kentucky, Agona, Oranienburg, Kiambu, Senftenberg, Montevideo, Tennessee, Mbandaka, Berta, Putten, Uganda, 4,5,12:b-, Newport, Anatum, Hadar, Saintpaul, Derby, 4,5,12:i-, 28:y-, Indiana, Orion, Ago, Enteritidis, Give, Hartford, 19:-, 4,12:-, 23:d-, Rough-O:fgt-, Rough-O:d:l,w, Litchfield, Muenchen, Pomona, Worthington
Waage et al. (1999) (Oslo - Noruega)	<ul style="list-style-type: none"> Água bruta: Lago Maridalsvannet - ETA Oset, abastece a cidade de Oslo; Rio Akerseleva; Riachos Nilserudkleiva e Sognsvannsbekken Esgoto bruto: ETE Bekkelaget 	<ul style="list-style-type: none"> Água bruta: ETA Oset (n = 2); Rio Akerseleva (n = 9); Riachos Nilserudkleiva (n = 1) e Sognsvannsbekken (n = 1) Esgoto bruto (n = 1) 	<ul style="list-style-type: none"> Água bruta: ND (<2 CFU/100ml) Esgoto bruto: presente 	NA

Notas: ⁽¹⁾ Prevalência de *Salmonella* nas amostras analisadas

⁽²⁾ Inclui: sorotipos de *Salmonella* Não Tifóide; *Salmonella* Tifóide (*Salmonella* Paratyphi B var. Java); *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*; sorotipos não identificados (*Rough*)

NA – Não Analisado; NE – Não Especificado

ANEXO 2

Método USEPA/1200 – Protocolo Analítico para quantificação de *Salmonella* Não Tifóide em Águas Superficiais

ANEXO 3

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Flu15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
74/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
75/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis) ¹
76/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	Enteritidis
77/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
78/13	+	+	-	Enteritidis	1,2,3,4,5	5	1	
79/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
80/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
81/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
82/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
83/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
84/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
85/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
86/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
87/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
88/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
89/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
90/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
91/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
92/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
93/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
94/13	+	+	-	Enteritidis	0	0	1,2,3,4	
95/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
96/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
97/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
98/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
99/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
100/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
101/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
102/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
103/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
104/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
105/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
106/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
107/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3,4	1,2,3,4	(Enteritidis)
108/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
109/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
110/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
111/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
112/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
113/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	3	1,2,3,4	Enteritidis
114/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
115/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
116/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
117/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	1,2,3,4	(Enteritidis)
118/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	2,3,4	(Enteritidis)

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
120/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	2,3,4	(Enteritidis)
121/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	0	2,3,4	(Enteritidis)
122/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp. ²	1,3,4,5	2,4	2,4,5	
123/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	2,3	5	2,4,5	Agona
124/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	2,3	5	2,4,5	Agona
125/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	2,3	5	2,4,5	Agona
126/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	2,3,5	5	2,4,5	
127/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4,5	
128/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4,5	
129/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
130/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4,5	2,4,5	
131/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
132/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
133/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
134/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
135/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
136/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
137/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,4,5	2,4,5	
138/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2	2,4,5	
139/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4,5	
140/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4,5	
141/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4	2,4,5	
142/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4,5	2,4,5	
143/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4,5	2,4	
144/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4,5	2,4	
145/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	2,3,5	2,4,5	2,4	
146/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4,5	2,4,5	
147/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	4,5	2,4,5	
149/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
151/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
152/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
153/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
154/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
155/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
156/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
157/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	0	2	2,4	
159/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4	1,2,4,5	(Typhimurium)
160/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4	1,2,4,5	(Typhimurium)
161/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2,3,4	2,4	2,4	
162/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg
163/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg
164/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg
165/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
166/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg
167/13	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
169/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg
170/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
171/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
172/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
173/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
174/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
175/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2	2,4	Bradenburg
176/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
177/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
178/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
179/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
180/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2,4	2,4	
181/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
182/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
183/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
184/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
185/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2	2,4	2,4	
186/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2,4	2,4	
188/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2,4	2,4	
189/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	4,5	2,4	
190/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	4	2,4	
191/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
192/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
193/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
194/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
195/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
196/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
197/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
198/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
199/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
201/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	1,2,4,5	Typhimurium
202/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
203/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
204/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
205/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
206/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
207/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
208/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
209/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
210/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
211/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
212/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
213/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
214/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
215/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
217/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
218/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
219/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
220/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
221/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
222/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
223/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
224/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
225/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
226/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
227/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
228/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
229/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
230/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
231/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
232/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
233/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
234/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	1,2,4,5	Typhimurium
235/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
236/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
237/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
238/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
239/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
240/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
241/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
242/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
243/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
244/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
246/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
247/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	2	2,4,5	
248/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4	1,2,4,5	(Typhimurium)
249/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
250/13	+	+	-	Enteritidis	1,2,3,4,5	2,5	2,4,5	
251/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	4	2,4,5	
252/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4	4,5	2,4	
253/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
254/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4	2,4	2,4,5	
255/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	4	2,4,5	
256/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	
257/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,4	2,4,5	
258/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	2,5	2,4,5	
259/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,5	4	2,4,5	
260/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	2,4	2,4,5	Bareilly
261/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	4	2,4,5	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
263/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4	1,2,4,5	(Typhimurium)
264/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	0	2,4,5	Braenderup
265/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	2,4	2,4,5	Bareilly
266/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	4	2,4,5	
267/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4,5	
268/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,4	2,4,5	
272/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	0	2,4,5	Braenderup
273/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	2,4,5	(Typhimurium)
274/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,5	0	2,4,5	Braenderup
279/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	2,3	1,2,3,4,5	
280/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,5	2,3	1,2,3,4,5	
281/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	2,4	1,2,3,4,5	
282/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	2,3,4	1,2,3,4,5	
283/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	2,3	1,2,3,4,5	
284/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	2,3,4	1,2,3,4,5	
285/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	2,3,4	1,2,3,4,5	
286/13	+	+	-	Enteritidis	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,3,4	
287/13	+	+	-	Enteritidis	2,3,4,5	3,4	1,2,3,4,5	
288/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	0	2,4,5	Saintpaul
289/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	0	2,4,5	Saintpaul
290/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
291/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
292/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	3,5	2,4,5	
293/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	3,4,5	2,4,5	
294/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	0	2,4,5	Saintpaul
300/13	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
302/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
303/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
304/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
305/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
306/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
307/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
308/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
309/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
310/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
311/13	+	+	+	(Typhimurium)	1,2,3,4,5	2,4,5	1,2,4,5	(Typhimurium)
330/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
331/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
332/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
333/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
334/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
335/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
336/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
337/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
339/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
340/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
375/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
376/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
377/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
378/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
379/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
380/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
381/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
382/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
383/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
384/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
385/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
386/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
387/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
388/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
389/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
390/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
391/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
392/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
393/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
394/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
395/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
396/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5		2,4	
397/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
398/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
399/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
400/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
401/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
402/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
403/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
404/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
405/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
406/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
407/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
408/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
409/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
410/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
411/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
422/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
423/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
424/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
425/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
426/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
428/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
429/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
430/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
431/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
432/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
433/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
434/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
435/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
436/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
437/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
438/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
439/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
440/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
441/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
442/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
443/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
444/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
445/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
446/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
447/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
448/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
449/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
450/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
451/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
452/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
453/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
454/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
455/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
456/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
457/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
458/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
459/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
460/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
461/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
462/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
463/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
464/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
465/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
466/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
467/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
468/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
469/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
470/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
471/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
473/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
474/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
475/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
476/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
477/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
478/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
479/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
480/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
481/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
482/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
483/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
484/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
485/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
486/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
487/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
488/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4	Mbandaka
489/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	2,5	2,4	
490/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	5	2,4	
491/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3	2,5	2,4	
492/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3	2,5	2,4	
493/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3	2,5	2,4	
494/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	5	2,4	
495/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	2,5	2,4	
496/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
497/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,5	5	2,4	
498/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
499/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,5	5	2,4	
500/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,5	2	2,4	
501/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
502/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
503/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
504/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
505/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
506/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
507/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,5	2,5	2,4,5	
508/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	5	2,4,5	
509/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
510/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
511/13	+	+	+	(Typhimurium)	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
512/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
513/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
514/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
515/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
516/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
518/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
519/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
520/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4,5	2,5	2,4,5	
543/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	2,5	2,4,5	
544/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,5	2,5	2,4,5	
545/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,5	2,5	2,4,5	
546/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4,5	
547/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4,5	
548/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4,5	
549/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
550/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2	2,4	
551/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
552/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
553/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
554/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
555/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
556/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
557/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
558/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
559/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
560/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
561/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
562/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	0	
563/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
564/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
565/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
566/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
567/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
568/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
569/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
570/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
571/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
572/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
573/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
574/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
575/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,5	2,4	
576/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
577/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
578/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
579/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
580/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
581/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
582/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
583/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
585/13	-	+	-	Salmonella sp.	2	2,5	2,4	
586/13	-	+	-	Salmonella sp.	2	2,5	2,4	
587/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
588/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
589/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
590/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
591/13	-	-	-	NEGATIVO	0	0	0	NEGATIVO
592/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
593/13	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,4	0	2,4	
594/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4	2,3,5	2,4	
595/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
596/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
597/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
598/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
599/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
600/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
601/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3	2	2,4	
602/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,3	0	2,4,5	
603/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
604/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
605/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
606/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
607/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
608/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
609/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
610/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
611/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
612/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
613/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
614/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
615/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
616/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
617/13	-	+	-	Salmonella sp.	1,3	0	2,4,5	
618/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
619/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
620/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
621/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
622/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,4	5	2,4	
623/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,4	5	2,4	
624/13	-	+	-	Salmonella sp.	3,4	5	2,4	
625/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
626/13	-	+	-	Salmonella sp.	4	0	2,4	
627/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
628/13	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
2/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
3/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
4/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
5/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
6/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
7/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
8/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
9/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
10/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	5	2,4,5	
11/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	5	2,4,5	
12/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,3,5	0	2,4	
13/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,3,5	0	2,4	
14/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,3,5	0	2,4	
15/14	-	-	-	NEGATIVO	0	0	0	NEGATIVO
16/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
17/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
18/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
19/14	-	-	-	NEGATIVO	0	0	0	NEGATIVO
20/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,3,5	0	2,4,5	
21/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,3,5	0	2,4,5	
22/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,3,5	0	2,4,5	
23/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
24/14	-	+	-	Salmonella sp.	0	0	2,4	
25/14	-	+	-	Salmonella sp.	3	0	2,4	
26/14	-	+	-	Salmonella sp.	3	0	2,4	
27/14	-	+	-	Salmonella sp.	3	0	2,4	
28/14	-	+	-	Salmonella sp.	3	0	2,4	
29/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,5	2,4	2,4	
30/14	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	2,4,5	(Typhimurium)
31/14	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	2,4,5	(Typhimurium)
32/14	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	2,4,5	(Typhimurium)
33/14	-	+	+	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	2,4,5	(Typhimurium)
34/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	4	2,4,5	(Typhimurium)
35/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	0	2,4,5	Saintpaul
36/14	-	+	-	Salmonella sp.	1,2,3,4,5	4	2,4,5	
37/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
38/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
39/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
40/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
41/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
42/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
43/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	2,5	2,4,5	
44/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	
45/14	-	+	-	Salmonella sp.	2,3,5	5	2,4,5	

Continua...

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

Quadro. Padrões de PCR das cepas isoladas de esgotos brutos (Taboão da Serra e São Lourenço da Serra) e águas superficiais (represa Guarapiranga e Manancial São Lourenço), de janeiro a dezembro de 2013.

Continuação...

Cepa n°	Conjunto de iniciadores			Identificação	Conjuntos de iniciadores			Identificação
	S1/S4 (250 pb)	ST11/ST15 (429 pb)	Fli15/Typ04 (620 pb)		STM	STY	STV	
47/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2,3,5	5	2,4,5	
48/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2,3,5	5	2,4,5	
49/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	1,2,3,5	5	2,4,5	
50/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	3,5	0	2,4,5	Hadar
51/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	3,5	0	2,4,5	Hadar
52/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	3,5	0	2,4,5	Hadar
53/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	3,5	0	2,4,5	Hadar
54/14	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.	3,5	0	2,4,5	Hadar

Notas: ⁽¹⁾ Sorotipos entre parênteses apresentaram padrões atípicos de PCR, segundo padrões divulgados por SEONGHAN KIM et al. (2006) e PETERSON et al. (2010)

⁽²⁾ Sorotipo não identificado

REFERÊNCIAS

- ANA – Agência Nacional de Águas [homepage na internet. Atlas Brasil. Abastecimento Urbano de Água: Região Metropolitana de São Paulo. 2010 [acesso em 19 jul 2014]. Disponível em: <http://atlas.ana.gov.br/atlas/forms/analise/RegiaoMetropolitana.aspx?rme=24>
- Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1993;7:171–8.
- Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. J Microbiol Methods. 2011;85:9-15.
- Alves RMS. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Apresentado no VI Congresso Latino Americano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 2013; Gramado, BR. [acesso em 15 de jul 2014]. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/audiencias-publicas/audiencia-publica-2013/crueldade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais/apresentacoes/apresentacao-da-sra-rejane-alves/view>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária [homepage na internet]. Manual de Microbiologia Clínica Para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas. Brasília (DF): Anvisa; 2013 [acesso em 22 maio 2014]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/servicosdesaude/!ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwN3f1dLA0__IEvLUE9DYwN3Q_2CbEdFAE_6R7kl/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/inicio/servicos+de+saude/publicacao+servicos+de+saude/manual+de+microbiologia+clinica+para+o+controle+de+infeccao+relacionada+a+assistencia+a+saude
- Angulo FJ, Tippen S, Sharp DJ, Payne BJ, Collier C, Hill JE, Barrett TJ, Clark RM, Geldreich EE, Donnell HD Jr, Swerdlow DL. A Community Waterborne Outbreak of Salmonellosis and the Effectiveness of a Boil Water Order. Am J Public Health. 1997;87(4):580-4.
- Arvanitidou M, Kanellou K, Vagiona DG. Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. Environ Res. 2005;99:278-84.
- Arvanitidou M, Tsakris A, Constantinidis TC, Katsouyannopoulos VC. Transferable Antibiotic Resistance Among *Salmonella* Strains Isolated From Surface Waters. Wat Res. 1997;31(5):1112-6.

- Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, Lebaron P. Diversity of *Salmonella* Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions. *Appl Environ Microb*. 2000;66(4):1544–52.
- Bessong PO, Odiyo JO, Musekene JN, Tessema A. Spatial Distribution of Diarrhoea and Microbial Quality of Domestic Water during an Outbreak of Diarrhoea in the Tshikuwi Community in Venda, South Africa. *J Health Popul Nutr*. 2009;27(5):652-9.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica [homepage na internet]. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília (DF): Editora do Ministério da Saúde; 2010 [acesso em 18 jun 2014]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2000;38(7):2465-7.
- Bonadonna L, Briancesco R, Donia D, Ottaviani M, Veschetti E, Divizia M. Aspetti igienico-sanitari delle acque del fiume Tevere: presenza di protozoi patogeni e rapporti di correlazione con parametri microbiologici e chimico-fisici. *Ann Ig*. 2003;16:273-80.
- Bonadonna, L., Filetici, E., Nusca, A., & Paradiso, R. Controlli ambientali sulla diffusione di sierotipi di *Salmonella* spp in acque fluviali. *Microbiol Med*. 2006;21(4):311-315.
- Brettar I, Höfle MG. Molecular assessment of pathogens—a contribution to drinking water safety. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(3):274-80.
- Castro FA de, Santos VR dos, Martins CHG, Fernandes SA, Zaia JE, Martinez R. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Serotypes in Patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. *Braz J Infect Dis*. 2002;6(5):244-51.
- CDC - Center for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating roma tomatoes – United States and Canada, 2004. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:325-8.
- CDC - Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella* serotype SaintPaul infections associated with multiple raw produce itens - United States, 2008. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2008;57(34):929-34.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2013.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo 2013 [recurso eletrônico]. São Paulo; 2014 [acesso em 16 set 2014]. Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>

- Chagas FF, Crispim BA, Oliveira KMP de, Grisolia AB. Identification and detection of *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and environmental sources in Dourados, MS, Brazil. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7(25):3222-8.
- Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G, Falkow S. Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray. *J Bacteriol*. 2003; 185(2): 553-563.
- Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001;68:11-20.
- Chen S, Zhao S, McDermott PF, Schroeder CM, White DG, Meng J. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol Cell Probe*. 2005;19:195-201.
- Chiu Cheng-Hsun, Ou JT. Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. *J Clin Microbiol*. 1996;34(10):2619-22.
- Clark GM, Kaufmann A, Gangarosa E. Epidemiology of an International Outbreak of *Salmonella* Agona. *The Lancet*. 1973:490-3.
- Coombes BK, Lowden MJ, Bishop JL, Wickham ME, Brown NF, Duong N, Osborne S, Gal-Mor O, Finlay BB. SseL Is a *Salmonella*-Specific Translocated Effector Integrated into the SsrB-Controlled *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System. *Infectd Immun*. 2007;75(2):574-80.
- Cračiunaș C, Keul Anca-Livia, Flonta M, Cristea M. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hlyA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. *J Environ Manage*. 2012;95:15-8.
- Craun GF, Brunkard JM, Yoder JS, Roberts VA, Carpenter J, Wade T, et al. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971–2006. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(3):507-28.
- David OM, Wandili S, Kakai R, Waindi EN. Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. *J Infect Developing Countries*. 2009;3(2):99-104.
- DDTHA/CVE/SES-SP – Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar / Centro de Vigilância Epidemiológica / Secretaria de Estado da

- Saúde de São Paulo SP, Brasil. Surtos de diarreia no estado de São Paulo, 1992 a 2003. REV NET - DTA *Online*. 2004;4(6):196-200.
- Dhanao A, Fatt QK. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: Epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2009;8:15.
- Diana JE, Pui CF, Son R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in fruit juices. Int Food Res J. 2012;19(1):51-56.
- DIFCO & BBL MANUAL: Manual of Microbiological Culture Media. Maryland (USA): BD; 2003. Section III: Culture Media and Ingredients. p. 31-642.
- Diniz-Santos DR, Santana JS, Barretto JR, Andrade MGM, Silva LR. Epidemiological and Microbiological Aspects of Acute Bacterial Diarrhea in Children from Salvador, Bahia, Brazil. Braz J Infect Dis. 2005;9:77-83.
- Dolejská, M., Bierosová, B., Kohoutová, L., Literák, I., & Cízek, A. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. J Appl Microbiol. 2009;106(6):1941-50.
- Eduardo MBP, Katsuya EM, Bassit NP. Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no estado de São Paulo, 1999-2002. REV NET - DTA *Online*. 2004;4(2):48-57.
- EFSA/ECDPC - European Food Safety Authority and the European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal. 2014;12(2):3547.
- Espigares E, Bueno A, Espigares M, Gálvez, R. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk. Int J Hyg Environ Health. 2006;209:103-7.
- Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. Lancet. 2012;379:2489-99.
- Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi ÂCR, Dias ÂMG, Almeida IAZC de, Melo Leyva CV de. *Salmonella* Serovars Isolated From Humans In São Paulo State, Brazil, 1996-2003. Rev Inst Med trop S Paulo. 2006;48(4):179-84.
- Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci. 2008;86:183-7.
- Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect Genet Evol. 2009;9:430-40.
- FUNDAÇÃO SEADE - Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados [homepage na internet]. Portal de Estatísticas do Estado de São Paulo:

São Lourenço da Serra. São Paulo; 2014a [acesso em 15 ago 2014]. Disponível em: <http://produtos.seade.gov.br/produtos/perfil/perfilMunEstado.php?loc=616>

FUNDAÇÃO SEADE - Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados [homepage na internet]. Portal de Estatísticas do Estado de São Paulo: Taboão da Serra. São Paulo; 2014a [acesso em 15 ago 2014]. Disponível em: <http://produtos.seade.gov.br/produtos/perfil/perfilMunEstado.php?loc=616>

Gaertner JP, Garres T, Becker JC, Jimenez ML, Forstner MRJ, Hahn D. Temporal analyses of *Salmonellae* in a headwater spring ecosystem reveals the effects of precipitation and runoff events. *J Water Health*. 2009;7(1):115-21.

Galán JE. *Salmonella* Interactions with Host Cells: Type III Secretion at Work. *Annu. Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:53-86.

Galanis E, Wong DMALF, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC. Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(3):381-8.

Guiney DG, Fierer J. The role of the *spv* genes in *Salmonella* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2011;2:10.

Hall G, Yohannes KE, Raupach J, Becker N, Kirk M. Estimating Community Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, Shiga Toxin–producing *Escherichia coli* Infections, Australia. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14(10):1601-9.

Haley JB, Cole DJ, Lipp EK. Distribution, Diversity, and Seasonality of Waterborne *Salmonellae* in a Rural Watershed. *Appl Environ Microb*. 2009;75(5):1248-55.

Harris LJ, Farber JN, Beuchat LR, Parish ME, Suslow TV, Garrett EH, Busta FF. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Compr Rev Food Sci F*. 2003;2(Suppl):79-141.

Hendriksen RS, Mikoleit M, Carlson VP, Karlsrose S, Vieira AR, Jensen AB, Seyfarth AM, DeLong SM, Weill François-Xavier, Lo Fo Wong DMA, Angulo FJ, Wegener HC, Aarestrup FM. WHO Global Salm-Surv External Quality Assurance System for Serotyping of *Salmonella* Isolates from 2000 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2729-36.

Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RR. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect*. 2002;129:1-8.

Ho BSW, Tam T-Y. Rapid Enumeration of *Salmonella* in Environmental Waters and Wastewater. *Wat Res*. 2000;34(8):2397-9.

Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*. 2001;32:263-9.

- Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. BMC Microbiol. 2008;178:8.
- Hsu Li-Chung, Park JM, Zhang K, Luo Jun-Li, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG, Karin M. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. Nature. 2004;428:341-5.
- Hsu Bing-Mu, Huang Kuan-Hao, Huang Shih-Wei, Tseng Kuo-Chih, Su Ming-Jen, Lin Wei-Chen, Ji Dar-Der, Shih Feng-Cheng, Chen Jyh-Larng, Kao Po-Min. Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. Sci Total Environ. 2011;409: 4435-41.
- Hyun-Joong Kim, Park Si-Hong, Kim Hae-Yeong. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 and Non-LT2 *Salmonella* Genomic Sequences, and Genotyping of *Salmonellae* by Using PCR. Appl Environ Microb. 2006;72(9):6142-51.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Atlas de Saneamento 2011 [homepage na internet]. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Ministério das Cidades; c2011 [acesso em 16 set 2012]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. São Paulo. São Lourenço da Serra. Infográficos:dados gerais do município. 2014 [acesso em 18 set 2014]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?lang=&codmun=354995&search=%7Csao-lourenco-da-serra>
- INFRAESTRUTURA URBANA – Projetos, custos e construção [homepage na internet]. Saneamento. 2014 [atualizado em 14 abr 2014; acesso em 22 jun 2014]. Disponível em: <http://infraestruturaurbana.pini.com.br/solucoes/tecnicas/Saneamento/comecam-as-obras-do-sistema-produtor-sao-lourenco-em-sao-310784-1.aspx>.
- Jean-Gilles Beaubrun J, Cheng C-M, Chen K-S, Ewing L, Wang H, Agpaoa MC, Huang M-CJ, Dickey E, Du JM, Williams-Hill DM, Hamilton B, Micallef SA, Rosenberg Goldstein RE, George A, Joseph SW, Sapkota AR, Jacobson AP, Tall BD, Kothary MH, Dudley K, Hanes DE. The evaluation of a PCR-based method for identification of *Salmonella enterica* serotypes from environmental samples and various food matrices. Food Microbiol. 2012;31:199-209.
- Jenkins MB, Endale DM, Fisher DS. Most probable number methodology for quantifying dilute concentrations and fluxes of *Salmonella* in surface Waters. J Appl Microbiol. 2008;104:1562-8.

- Jimenez M, Chaidez C. Improving *Salmonella* determination in Sinaloa rivers with ultrafiltration and most probable number methods. *Environ Monit Assess.* 2012;184:4271-7.
- Jokinen C, Edge TA, Ho S, Koning W, Laing C, Mauro W, Medeiros D, Miller J, Robertson W, Taboada E, Thomas JE, Topp E, Ziebell K, Gannon VPJ. Molecular subtypes of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 isolated from faecal and surface water samples in the Oldman River watershed, Alberta, Canada. *Water Res.* 2011;45:1247-57.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:519-20.
- Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Hart CA. Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiol.* 2006;6(101):10.
- Kinde H, Read DH, Ardans A, Breitmeyer RE, Willoughby D, Little HE, Kerr D, Gireesh R, Nagaraja, KV. Sewage Effluent: Likely Source of *Salmonella enteritidis*, Phage Type 4 Infection in a Commercial Chicken Layer Flock in Southern California. *Avian Diseases.* 1996;40(3):672-676.
- Krzyzanowski Jr F, Zappellini L, Martone-Rocha S, Dropa M, Matté MH, Nacache F, Razzolini MTP. Quantification and characterization of *Salmonella* isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. *BMC Microbiol.* 2014;14:263.
- Laupland KB, Schonheyder HC, Kennedy KJ, Lyytikäinen O, Valiquette L, Galbraith J, Collignon P, The International Bacteremia Surveillance Collaborative. *Salmonella enterica* bacteraemia: a multi-national population-based cohort study. *BMC Infect Dis.* 2010;10(95):10.
- Leader BT, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Boyle DS. High-Throughput Molecular Determination of *Salmonella enteric* Serovars by Use of Multiplex PCR and Capillary Electrophoresis Analysis. *J Clin Microbiology.* 2009;47(5):1290-9.
- Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Res Int.* 2012;45:587-602.
- Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E, Guiney DG. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol.* 2000;2(1): 49-58.

- Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. Environmental Microbiology. In: Gerba CP. Environmentally Transmitted Pathogens. 2. ed. Cidade: Academic Press; 2009. p. 446-8.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010; 50: 882-9.
- Malkawi HI, Gharaibeh R. Rapid and Simultaneous Identification of Two *Salmonella enterica* Serotypes, Enteritidis and Typhimurium from Chicken and Meat Products by Multiplex PCR. Biotechnol. 2004;3(1):44-8.
- Martone-Rocha. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de poluição na represa Guarapiranga – SP [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de São Paulo da USP; 1999.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 [carta]. Nature. 2011;413:852-6.
- McEgan R, Chandler JC, Goodridge LD, Danyluk MD. Diversity of *Salmonella* Isolates from Central Florida Surface Waters. Appl Environ Microbiol. 2014;80(21):6819-27.
- Medeiros MIC, Neme SN, Silva P da, Capuano DM, Errera MC, Fernandes SA, Valle GR do, Avila FA de. Etiology of Acute Diarrhea Among Children In Ribeirão Preto-Sp, Brazil. Rev Inst Med trop S Paulo. 2001;43(1):21-4.
- Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodrigues DP, Freitas DRC. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):555-60.
- Mertes F, Biens K, Lehrach H, Wagner M, Dahl A. High-throughput Universal Probe *Salmonella* Serotyping (UPSS) by nanoPCR. Journal of Microbiological Methods. 2010;83:217-23.
- Metzger JP, Alves LF, Goulart W, Teixeira AMG, Simões SJC, Catharino EL. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. Biota Neotrop. 2006;6(2):33.
- Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Broz DK, Warming S, Roose-Girma M, Bumann D, Kayagaki N, Takeda K, Yamamoto M, Broz P. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases [carta]. Nature. 2014;509:366-70.
- Nillian E, Ching CL, Fung PC, Robin T, Anyi U, Chilek TZT, Radu S, Nishibuchi M. Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in Raw Salad Vegetables and Vegetarian Burger Patties. Food and Nutrition Sciences. 2011;2:1077-81.

- Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? *Nutr Rev.* 2010;68(5):257-69.
- O'Reilly CE, Bowen AB, Perez NE, Sarisky JP, Shepherd CA, Miller MD, Hubbard BC, Herring M, Buchanan SD, Fitzgerald CC, Hill V, Arrowood MJ, Xiao LX, Hoekstra RM, Mintz ED, Lynch MF, Outbreak Working Group. A Waterborne Outbreak of Gastroenteritis with Multiple Etiologies among Resort Island Visitors and Residents: Ohio, 2004. *Clin Infect Dis.* 2007;44:507-12.
- Oliveira SD, Santos LR, Schucha DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. Detection and identification of *Salmonellas* from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol.* 2002;87:25-35.
- Park SH, Kim HJ, Cho WH, Kim JH, Oh MH, Kim SH, Lee BK, Ricke SC, Kim HY. Identification of *Salmonella enterica* subspecies I, *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis and Typhi using multiplex PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;301:137-46 .
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall KL, Bentley SD, Holden MTG, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connerton P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Kroghk A, Larsenk TS, Leather S, Moule S, Ó'Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG. Complete genome sequence of amultiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 [carta]. *Nature.* 2001;413:848-52.
- Patchanee P, Molla B, White N, Line DE, Gebreyes WA. Tracking *Salmonella* Contamination in Various Watersheds and Phenotypic and Genotypic Diversity. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(9):1113-20.
- Peterson G, Gerdes B, Berges J, Nagaraja TG, Frye JG, Boyle DS, Narayanan S. Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:559-69.
- PMSN – Plano Municipal de Saneamento Básico de São Lourenço da Serra. [homepage na internet]. São Paulo; 2010 [acesso em 14 jul 2014]. Disponível em: http://www.saneamento.sp.gov.br/PMS/UGRHI11/PMS_SAOLLOURENCODASERRA.pdf
- Porwollik S, McClelland M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect.* 2003;5:977-89.
- Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M. Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovarsby Use of Microarrays. *J Bacteriol.* 2004;186(17):5883-98.

- Pui CF, Wong WC, Chai LC, Nillian E, Ghazali FM, Cheah YK, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Radu S. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. Food Control. 2011;22:337-42.
- Rahn K, Grandis SA de, Clarke RC, McEwen SA, Galin JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probe. 1992;6:271-9.
- Rajabi M, Jones M, Hubbard M, Rodrick G, Wright AC. Distribution and Genetic Diversity of *Salmonella enterica* in the Upper Suwannee River. Int J Microbiol. 2011;9.
- Rodpai E, Moongkarndi P, Tungrugsasut W, Phisannoradej R, Kanarat S. Comparison of multiplex polymerase chain reaction and immunoassay to detect *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, and *S. Enteritidis* in Thai chicken meat. Science Asia. 2013;39:150-9.
- Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella enteritidis* : a new pandemic?. Epidemiol Infect. 1990;105:21-7.
- Rytönen A, Poh J, Garmendia J, Boyle C, Thompson A, Liu M, Freemont P, Hinton JCD, Holden DW. SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. PNAS. 2007;104(9): 3502-7.
- Salem IB, Aouni M, Mzoughi R. Two five-plex PCRs methods for identification of common *Salmonella* spp. serotypes. Ann Microbiol. 2010; 60:135-41.
- SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Mananciais: Região Metropolitana de São Paulo. São Paulo, SP: SABESP; 2007. p.62-85.
- SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Investimentos: O desafio da Universalização. Índice de Atendimento Sabesp. Índices da Diretoria Metropolitana [homepage da internet]. São Paulo; c2013 [acesso em: 16 set 2013] Disponível em: www.pnqs.com.br/arquivos/missoes/12-ppa-sabesp-geral.pdf
- São Paulo (Estado). Lei nº 898, de 1º de novembro de 1975. Disciplina o uso de solo para a proteção dos mananciais, cursos e reservatórios de água e demais recursos hídricos de interesse da Região Metropolitana da Grande São Paulo e dá providências correlatas. (acesso em 29 jun 2014). Disponível em: <http://governo-sp.jusbrasil.com.br/legislacao/215043/lei-898-75>
- São Paulo (Estado). Lei nº 1.172, de 17 de novembro de 1976. Delimita as áreas de proteção relativas aos mananciais, cursos e reservatórios de água, a que se refere o artigo 2º de Lei nº 898, de dezembro de 1975, estabelece normas de restrição de uso do solo em tais áreas e dá providências correlatas. (acesso em 29 jun 2014). Disponível em: <http://governo-sp.jusbrasil.com.br/legislacao/213026/lei-1172-76>

- São Paulo (Estado). Lei nº 9.866, de 28 de novembro de 1997. Dispõe sobre diretrizes e normas para a proteção e recuperação das bacias hidrográficas dos mananciais de interesse regional do Estado de São Paulo e dá outras providências. (acesso em 29 jun 2014). Disponível em: <http://governo-sp.jusbrasil.com.br/legislacao/170520/lei-9866-97>
- Schets FM, Wijnen JH van, Schijven JF, Schoon H, Husman AM de R. Monitoring of Waterborne Pathogens in Surface Waters in Amsterdam, The Netherlands, and the Potential Health Risk Associated with Exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in These Waters. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(7):2008.
- Seonghan Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Gautom R, Boyle DS. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(10):3608-15.
- Shin SP, Yang HJ, Kim JH, Choresca Jr. CH, Han JE, Jun JW, Han SY, Park SC. Rapid detection and isolation of *Salmonella* sp. from amphibians and reptiles. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(3):682-6.
- Sidhu JPS, Toze SG. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environ Int*. 2009;35:187-201.
- Silva AM. Avaliação da qualidade do rio São Lourenço, SP, sob influência de estações de tratamento de água e estações de tratamento de esgotos. Tese de doutorado apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo; 2008.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. São Paulo, SP: VARELA; 2010. *Salmonella*; p. 287-320.
- Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. Evaluation of a Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol*. 1999;28:113-7.
- Su Lin-Hui MS, Chiu Cheng-Hsun MD. *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Chang Gung Med J*. 2007; 30(3): 210-9.
- Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing Patterns of *Salmonella* Serovars: Increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 1996;38(5):315-28.
- Tavechio AT, Ghilardi ACR, Peresi JTM, Fuzihara TO, Yonamine EK, Jakabi M, Fernandes SA. *Salmonella* Serotypes Isolated from Nonhuman Sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *J Food Protect*. 2002;65(6):1041-4.

- Tennant SM, Diallo S, Levy H, Livio S, Sow SO, Tapia M, Fields PI, Mikoleit M, Tamboura B, Kotloff KL, Nataro JP, Galen JE, Levine MM. Identification by PCR of Non-typhoidal *Salmonella enterica* Serovars Associated with Invasive Infections among Febrile Patients in Mali. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(3):e621.
- Thomas JL, Slawson RM, Taylor WD. *Salmonella* serotype diversity and seasonality in urban and rural streams. J Appl Microbiol. 2012;114:907-22.
- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Bacteriol. 2005;55:521-4.
- Tierrez A, García-del Portillo F. New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. Cell Microbiol. 2005;7(7):901-9.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. Doenças Microbianas do Sistema Digestório;p.705-42.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. Method 1200: Analytical Protocol for Non-Typhoidal *Salmonella* in Drinking Water and Surface Water [homepage na internet]. Washington – DC: USEPA; maio 2012 [acesso em 11 nov 2012]. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerclcwwww/1200ap01.pdf>
- Van Asten AJAM, Van Dijk JE. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol Med Mic. 2005;44:251-9.
- Voetsh AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV. FoodNet Estimate of Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. Clin Infect Dis. 2004 Supl 3;38:127-34.
- Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperud, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. J Appl Microbiol. 1999;87:418-28.
- Wagner VR, Silveira JB, Tondo EC. Salmonellosis in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil, 2002 to 2004. Braz J Microbiol. 2013;44(3):723-9.
- WHO - World Health Organization. Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods. Londres: International Water Association - IWA; 2003.
- WHO - World Health Organization. Guidelines For The Safe Use Of Wastewater, Excreta And Greywater. Wastewater Use In Agriculture. Geneva: World Health Organization; 2006. 2 v.
- WHO - World Health Organization. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9. ed. Paris, Instituto Pasteur: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*; 2007.

- WHO - World Health Organization/UNICEF - United Nations Children's Fund. Progress on Drinking Water and Sanitation. Nova Iorque: World Health Organization; 2012.
- Winn Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P. Koneman Diagnóstico Microbiológico. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2010. As *Enterobacteriaceae*; p. 208-99.
- Wood MW, Mahon J, Lax AJ. Development of a probe and PCR primers specific to the virulence plasmid of *Salmonella enteritidis*. Mol Cell Probes. 1994;8:473-9.