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

**Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* spp.
associado ao uso agrícola de lodo de esgoto: Risco de
consumo de hortaliças e ao trabalhador**

Flávio Krzyzanowski Júnior

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção
do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Saúde Ambiental

**Orientador: Profa.Dra. Maria Tereza Pepe
Razzolini**

São Paulo

2014

**Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* spp.
associado ao uso agrícola de lodo de esgoto: Risco de
consumo de hortaliças e ao trabalhador**

Flávio Krzyzanowski Júnior

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção
do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Saúde Ambiental

**Orientador: Profa.Dra. Maria Tereza Pepe
Razzolini**

São Paulo

2014

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 tese/dissertação.

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese aos meus Pais que sempre me
incentivaram no caminho do conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me guiado com Sua força ao longo desta trajetória;

À Professora Maria Tereza Pepe Razzolini pela orientação, paciência e pelo apoio sempre presente nos momentos difíceis deste caminho;

Aos Professores Marcelo Lauretto da EACH- USP e Gertjan Medema da Universidade Tecnológica de Delft – Holanda, pelas muitas horas dedicadas à discussão e contribuição no desenho dos cenários. Às Professoras Adelaide Nardocci (FSP-USP) e Maria Inez Z. Sato (CETESB) pela contribuição na obtenção de dados que contribuíram com o refinamento dos cenários;

À Professora Maria Helena Matté pelo treinamento nas técnicas moleculares e pela acolhida em seu laboratório;

Às Técnicas Dra. Solange Rocha Martone; Francisca Alzira dos Santos Peternella e Maria do Carmo de Oliveira Dora pelo treinamento e apoio durante todo o trabalho de laboratório;

Aos funcionários Pedro Daniel Blanco Alves e Renilda Maria de Figueiredo Shimono pelas inúmeras dúvidas administrativas sanadas;

Aos amigos Veridiana Karmann Bastos, Lincoln Zappelini, Bruna Breternitz, Paloma Patrício, Jéssica Santiago pelo apoio, auxílio e por ajudarem alegrar este caminho;

Aos funcionários e colegas do Instituto Federal Tecnológico de São Paulo que tanto me ajudaram no início do Doutorado;

À CAPES pela bolsa de Doutorado concedida

Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* spp. associado ao uso agrícola de lodo de esgoto: Risco de consumo de hortaliças e ao trabalhador

Introdução – A presença de *Salmonella* spp., que é um patógeno de importância clínica, tem sido detectada em lodos de esgoto gerados ao redor do mundo. O objetivo desse estudo foi o de estimar o risco anual de infecção relacionado à ingestão de alface, tomate e cenoura cultivados em solos acondicionados com o lodo de esgoto provenientes de cinco Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) da Região Metropolitana de São Paulo bem como o risco de infecção anual que trabalhadores agrícolas, através da ingestão involuntária de partículas de solo, são submetidos. Como no Brasil ainda não há o estabelecimento de valor de risco tolerável, o valor usado pela USEPA, de 1/10.000 (10^{-4}), foi utilizado para que a comparação com os resultados obtidos fosse realizada. **Métodos** – Foram coletadas 54 amostras de lodos de esgotos de cinco ETEs num período de 12 meses (janeiro a dezembro de 2011). A concentração de *Salmonella* spp nessas amostras foi obtida utilizando o método USEPA 1682/2006. Foram selecionadas 40 cepas isoladas e identificadas como *Salmonella* spp. para sorotipificação em laboratório de referência. Essas cepas foram submetidas à detecção dos genes de virulência *invA*, *ssel* e *spvC*, presença de plasmídeo por técnicas moleculares e ainda à resistência a antimicrobianos. Para a estimativa dos riscos anuais de infecção por *Salmonella* foram desenhados nove cenários diferentes considerando como fatores principais a presença ou ausência da variação da concentração de *Salmonella* spp. nos solos tratados com lodos de esgoto, a presença ou a ausência de crescimento desta bactéria nas hortaliças, a inibição do crescimento de *Salmonella* spp. nas cenouras e a ingestão involuntária de partículas de solo pelos trabalhadores agrícolas. **Resultados** – Cepas de *Salmonella* spp. estavam presentes em 38,9% (21/54) das amostras de lodos de esgoto analisadas. As maiores concentrações foram encontradas na ETE 2, sendo a maior delas de 12,19 NMP/g ST. Das 40 cepas selecionadas para sorotipificação 35 foram confirmadas como sorotipos de *Salmonella* comumente envolvidos em surtos alimentares e em casos clínicos como *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Infantis*. Destas, todas apresentaram o gene *sseL* e duas cepas de *S. Typhimurium* portavam os três genes de virulência pesquisados. Das 35 cepas 14 (40%) apresentaram plasmídeos e 14,2% (3/35) foram sensíveis a pelo menos dois antimicrobianos, 5,7% (3/35) foram identificadas como multi-droga resistentes (MDR). O maior risco anual de infecção foi obtido no cenário 9 para trabalhadores que aplicam lodos de esgoto nos solos ($9,4 \times 10^{-2}$) seguidos, em ordem decrescente, dos riscos de infecção para a ingestão de tomates e alfaces nos cenários 1 e 3 que consideravam o crescimento de *Salmonella* spp. nas hortaliças. Os menores riscos foram obtidos nos cenários 5 e 6 que envolviam o consumo de cenouras. **Conclusões:** Os riscos foram considerados elevados tendo em vista o valor utilizado como referência. O fator que mais impactou nos riscos obtidos foi o crescimento de *Salmonella* spp. nas hortaliças (alface e tomate). A variação da concentração de *Salmonella* spp. no solo teve pouco impacto nos riscos obtidos.

Palavras chaves: **Lodo de esgoto; Avaliação de Risco; *Salmonella* spp.; Hortaliças**

Risk assessment for *Salmonella* spp. infection associated with the agricultural use of sewage sludge: vegetable consumption and risk to the worker

Introduction - The presence of *Salmonella* spp., an important pathogen, has been reported in sewage sludge worldwide. The aim of this study was to estimate the annual risk of infection related to ingestion of lettuce, tomatoes and carrots grown in soil conditioned with sewage sludge from five Wastewater Treatment Plant (WWTP) in the Metropolitan Region of São Paulo. Also the annual risk of infection of farm workers through involuntary ingestion of soil particles were estimated. As in Brazil there is no establishment of the value of tolerable risk, the value used by the USEPA, 1/10,000 (10⁻⁴), was adopted in order to proceed the comparison with the results obtained. **Methods** - 54 samples of sewage sludge from the five WWTPs were collected over a period of 12 months (January to December, 2011). The concentration of *Salmonella* spp. in these samples was obtained using the method 1682/2006 USEPA. 40 strains identified as *Salmonella* spp were selected for serotyping in a reference laboratory. These strains were subjected by molecular techniques to detection of virulence genes *invA*, *sseL* and *spvC*, presence of plasmid and even resistance to antimicrobials. To estimate the annual risk of infection by *Salmonella* spp. nine different scenarios were designed considering the presence or absence of varying concentrations of *Salmonella* spp. in soils treated with sewage sludge, the presence or absence of growth of the bacteria in vegetables, the growth inhibition of *Salmonella* spp. in carrots as well as the involuntary ingestion of soil particles by agricultural workers. **Results** - *Salmonella* spp. strains were present in 38.9% (21/54) of samples of the sewage sludge analyzed. The highest concentrations were found in WWTP 2, being the highest 12.19 MPN/g TS. From the 40 previously selected strains, 35 strains were confirmed as commonly involved in food borne outbreaks and clinical cases as such *S. Typhimurium*, *S. Agona* and *S. Infantis*. All the 35 strains harbored the *sseL* gene and two strains of *S. Typhimurium* carried the three virulence genes surveyed. A total of 14 from the 35 strains (40%) had plasmids and 14.2% (3/35) were sensitive to at least two antimicrobials and 5.7% (3/35) were identified as multi-drug resistance (MDR). The highest annual risk of infection was obtained in scenario 9 for workers applying sewage sludge in soils (9,4x10⁻²) followed, in descending order of risk of infection, to the intake of tomatoes and lettuces in scenarios 1 and 3 which considered the growth of *Salmonella* spp. in the vegetables. The lowest risks were obtained in scenarios 5 involving the consumption of carrots. **Conclusions:** The risks were considered high given the value used as a reference. The factor that most impacted the annual risk of infection obtained was the growth of *Salmonella* spp. in vegetables (lettuce and tomato). The variation of the concentration of *Salmonella* spp. in soil had little effect on the risks obtained.

Key words: Sewage Sludge; Risk Assessment; *Salmonella* spp.; Crops

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CARACTERIZAÇÃO, GERAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LODO DE ESGOTO	12
1.2 REGULAMENTAÇÃO DO USO DE LODO DE ESGOTO	17
1.3 CARACTERIZAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp.	22
1.3.1 Taxonomia e Sorotipos	22
1.3.2 Genes de Virulência e Presença de Plasmídeos	24
1.3.3 Resistência a Antimicrobianos	28
1.3.4 Presença em Lodos de Esgoto	32
1.3.5 Sobrevivência em Solos Tratados com Lodos de Esgoto	33
1.3.6 Internalização e Crescimento em Vegetais	35
1.4 RISCO DE INFECÇÃO POR <i>Salmonella</i> spp.	38
1.4.1 Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico	38
1.4.2 Probabilidade de Infecção por <i>Salmonella</i> spp. Associada ao Uso de Lodos de Esgoto	46
2 OBJETIVOS	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 AMOSTRAGEM	52
3.2 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp.	54
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Salmonella</i> spp.	58
3.3.1 Extração do DNA	58
3.3.2 Amplificação do DNA	59
3.3.3 Detecção dos Genes de Virulência	60
3.3.4 Detecção dos Plasmídeos	63
3.3.5 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos	63
3.4 ESTIMATIVA DE RISCO	64
3.4.1 Concentração de <i>Salmonella</i> spp. no Solo	64
3.4.2 Diluição do Lodo de Esgoto no Solo	68
3.4.3 Taxas de Ingestão das Hortaliças	70
3.4.4 Variação na Concentração de <i>Salmonella</i> spp. nos Solos Tratados com Lodos de Esgoto	72
3.4.5 Taxas de Adesão de Solo nas Hortaliças	75
3.4.6 Temperaturas Médias por Estação do Ano	76
3.4.7 Tempo de Exposição das Hortaliças à Temperaturas de Abuso Pós-Colheita	78
3.4.8 Variação da Concentração de <i>Salmonella</i> spp. nas Hortaliças	79
3.4.9 Cálculo da Dose	83
3.4.10 Dose-Resposta	83
3.4.11 Probabilidades de Infecção Diária e Anual	84
3.4.12 Risco de Infecção para os Trabalhadores do Campo	84
3.4.13 Análise das Incertezas e Sensibilidades	86
3.4.14 Sistematização dos Cenários	86

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.1 CONCENTRAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. NOS LODOS DE ESGOTO	90
4.2 SOROTIPIFICAÇÃO, PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA, DETECÇÃO DE PLASMÍDEO E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	93
4.2.1 Identificação Sorológica	97
4.2.2 Genes de Virulência	100
4.2.3 Presença de Plasmídeos e Sensibilidade a Antimicrobianos	101
4.3 PROBABILIDADE DE INFECÇÃO POR <i>Salmonella</i> spp.	104
4.3.1 Riscos Anuais pela Ingestão de Alface, Tomate e Cenoura	105
4.3.2 Riscos Anuais de Infecção para os Trabalhadores Agrícolas	116
5 Conclusões	125
6 Recomendações	126
7 Referências	127
Anexo 1	140
Anexo 2	146
Anexo 3	162

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo com as diferentes fases da AQRM	40
Figura 2	Ponto de descarte de lodo de esgoto em uma das ETEs	53
Figura 3	Ponto de coleta de lodo de esgoto em uma das ETEs	53
Figura 4	Esquema do Método MSRV 1682 para isolamento de <i>Salmonella</i> spp não tifoide em amostras de lodo de esgoto	56
Figura 5	Ilustração do procedimento analítico para determinação de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de lodo de esgoto	57
Figura 6	Concentrações de <i>Salmonella</i> spp. nas ETEs 2 e 4	66
Figura 7	Diferentes distribuições testadas para os valores de concentração de <i>Salmonella</i> spp. na ETE 2	67
Figura 8	Diferentes distribuições testadas para os valores de concentração de <i>Salmonella</i> spp. na ETE 4	68
Figura 9	Distribuições dos fatores de incorporação de lodo de esgoto no solo para o cultivo de diferentes hortaliças	69
Figura 10	Distribuição da ingestão diária de alface	70
Figura 11	Distribuição da ingestão diária de tomate	71
Figura 12	Distribuição da ingestão diária de cenoura	71
Figura 13	Distribuição do fator de recrescimento de <i>Salmonella</i> spp. no solo	74
Figura 14	Distribuição do fator de agregação de solo nas hortaliças	76
Figura 15	Distribuição dos valores de temperatura por estação do ano	77
Figura 16	Distribuição do tempo de temperatura de abuso pós-colheita	78
Figura 17	Distribuição dos fatores de inibição de <i>Salmonella</i> spp. na cenoura	82
Figura 18	Distribuição da taxa de ingestão diária de solo/lodo pelos trabalhadores	85
Figura 19	Imagem dos géis de agarose dos PCRs	95
Figura 20	Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de alface nas ETEs 2 e 4.	108
Figura 21	Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de tomate nas ETEs 2 e 4.	112
Figura 22	Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de cenoura nas ETEs 2 e 4.	116
Figura 23	Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de partículas de solo pelos trabalhadores nas ETEs 2 e 4.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores recomendados pela OMS para a presença de patógenos em lodos de fezes	17
Tabela 2	Limites máximos de patógenos em lodos de esgoto permitidos pela USEPA (1997)	18
Tabela 3	Limites máximos permitidos de organismos patogênicos em lodo de esgoto pela Conama (2006)	19
Tabela 4	Limites máximos permitidos de patógenos em lodos de esgoto pela Semarnat (2002)	20
Tabela 5	Vazão de esgoto ($L.s^{-1}$), lodo gerado ($ton.d^{-1}$) e tratamento químico utilizado nas ETEs	52
Tabela 6	Primers utilizados para a identificação de <i>Salmonella</i> spp, <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> e Genes de Virulência <i>spvC</i> , <i>invA</i> e <i>sseL</i>	62
Tabela 7	Descrição dos diferentes cenários construídos no estudo	87
Tabela 8	Concentração de <i>Salmonella</i> spp. (NMP/gST) em amostras de lodo de esgoto coletados nas cinco ETEs em 2011	90
Tabela 9	Sorologia, identificação, presença de genes de virulência, plasmídeos e resistência a antibióticos em 40 cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas nos lodos de esgoto	96
Tabela 10	Riscos anuais de infecção por <i>Salmonella</i> spp. para a ingestão de alface e tomate nos cenários 1,2,3 e 4	106
Tabela 11	Riscos anuais para a ingestão de cenoura (cenários 5 e 6)	107
Tabela 12	Riscos anuais para os trabalhadores agrícolas	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Etapas para condução da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM).	39
Quadro 2	Síntese da caracterização das variáveis utilizadas para construção do modelo AQMR.	88

LISTA DE SIGLAS

AQRM	Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ESBL	Extended Spectrum Beta Lactamase
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
IC 95%	Intervalo de Confiança no Intervalo 95%
LD	Limite de Detecção
MCM	Método de Monte Carlo
MSRV	Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis
NMP/gST	Número Mais Provável por Grama de Sólidos Totais
OMS	Organização Mundial da Saúde
USEPA	United States Environmental Protection Agency

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO, GERAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LODO DE ESGOTO

Observa-se em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, um aumento no número de esgotos coletados e tratados (UN-HABIT, 2008).

Sendo assim, a tendência é que o aumento do número de esgotos tratados, que é benéfico para a proteção e promoção à saúde, aumente a geração de subprodutos gerados nas ETEs destacando-se, dentre estes, os lodos de esgoto ou biossólidos. A denominação de biossólido é utilizada para os lodos de esgoto que receberam tratamento prévio e, seguindo as legislações pertinentes, podem ser utilizados em solos como condicionantes e fertilizantes (GERBA et al., 2009).

O lodo de esgoto é o resultado natural da degradação biológica da matéria orgânica presente no esgoto (BETTIOL e CAMARGO, 2006). Como elemento resultante da degradação da matéria orgânica pode conter concentração significativa de diversos nutrientes, como nitrogênio e fósforo, sendo reconhecido como um elemento de grande potencial de utilização como fertilizante e condicionante de solos degradados ou que serão utilizados na agricultura. Também possui sais inorgânicos além de molibdênio e zinco e outros oligoelementos que são elementos traços importantes para o crescimento das plantas. Esta composição varia dependendo do tipo de tratamento aplicado aos esgotos bem como as principais fontes geradoras destes (CAMERON et al., 1997).

Na Europa Ocidental, segundo a *International Water Association*, em sua publicação de 2011: *Wastewater Sludge: Global Overview* (SPINOSA, 2011), foi estimada, em 2008, a produção de mais de nove milhões de toneladas de lodo de esgoto/ano. Na Europa Oriental, em 2010, a produção foi de aproximadamente 1,42 milhões de toneladas/ano.

No Japão, dados de 2008, mostram que eram produzidos cerca de 2,2 milhões de toneladas/ano de lodo e, na Austrália, em 2010, 1,5 milhão de tonelada/ano. Nos Estados Unidos estimou-se, em 2007, a geração de 6,53 milhões de toneladas deste resíduo por ano. Segundo a mesma, no México, com dados de 2010, foram produzidos 640.000 a 1.000.000 toneladas/ano e no Canadá, segundo dados de 2009, 660.000 toneladas/ano.

Diversos são os destinos que os lodos de esgotos podem ter, dentre eles podemos citar a incineração, deposição no mar, aplicação em solos agrícolas ou o envio para aterros sanitários (PAULINO et al., 2001). A destinação desses resíduos varia se considerarmos os diferentes graus de desenvolvimento tecnológico dos países e mesmo diferentes condições econômicas dentro de um mesmo país.

KELESSIDIS e STASINAKIS (2012) realizaram um estudo comparativo dos diferentes destinos e aplicações do lodo de esgoto nos países da União Europeia (UE). A maioria dos países (53%) que pertenciam à UE antes de 2004 (membros antigos) utilizam a aplicação direta em solos agrícolas, bem como a compostagem como tratamento e posterior destinação final do lodo. Já os países que passaram a compor a nova UE (a partir de 2004) utilizam apenas aterros sanitários como destino

final. Segundo os autores há uma tendência de que, até o ano de 2020, a deposição do lodo de esgoto em solos agrícolas e a incineração serão os métodos mais utilizados por todos os países que compõem a nova UE.

À exemplo da UE, a aplicação dos lodos de esgoto na agricultura tem sido adotada por diversos países, pois essa prática apresenta potencial para a recuperação de solos degradados, correção do pH, aumento da microbiota do solo além de serem ricos em nitrogênio e fósforo, substituindo assim o uso de fertilizantes químicos sintéticos (VIEIRA et al., 2005). Estima-se que nos EUA 54% do lodo de esgoto gerado seja aplicado em solo agrícola, 32% na Alemanha, 60% na França e 55% na Grã-Bretanha (BETTIOL e CAMARGO, 2006). Na China, em 2010, 44,83% do total de lodo de esgoto gerado era destinado a solos agrícolas (CHEN et al., 2012).

No entanto, devido à preocupação em relação aos impactos que compostos orgânicos presentes nos lodos de esgoto possam causar, tais como produtos farmacêuticos, hormônios e produtos de uso pessoal, há autores que estudam outras formas para a destinação e utilização dos lodos de esgotos de maneira diversa ou que venha a se somar àquelas supracitadas (SPINOSA, 2011). Existe atualmente uma tendência crescente na utilização destes de maneira alternativa, como na geração de energia, e no emprego em materiais de construção (WANG et al., 2008, CHEN et al., 2012, EGAN, 2013).

Além dos compostos orgânicos supracitados, questionamentos são levantados em relação à utilização de lodo de esgoto em solos agrícolas, devido ao fato de que, dependendo do tratamento aplicado, o lodo pode conter diversos

patógenos, como vírus, bactérias patogênicas, parasitas como helmintos e diversos protistas, bem como metais pesados e outros compostos, os quais trazem prejuízos à saúde humana (ARTHURSON, 2008).

SCOPA et al., (2001), apresentaram estudo relatando a presença de patógenos, dentre eles alguns oportunistas, que podem ser encontrados nos lodos de esgoto: vírus (poliovírus, Coxsackievirus A e B, Echovirus, Rotavirus, Adenovirus, Hepatite A, B e C); bactérias (*Aeromonas spp*, *Campylobacter spp*, *Clostridium spp*, *Escherichia coli*, *Leptospira spp*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*); fungos (*Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon*, *Aspergillus spp.*, *Tricophitum spp* e *Epidermophyton spp*); protozoários parasitas (*Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*) e ovos de helmintos cestódeos (*Taenia saginata*, *Taenia solium*), e nemátodos (*Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis* e *Trichiurus trichiura*).

A fim de minimizar os efeitos negativos à saúde, bem como ao meio ambiente, o lodo de esgoto gerado deve sofrer processo de estabilização que consista na degradação do excesso de compostos orgânicos nele presentes. Diversos métodos podem ser aplicados sendo os mais usuais a digestão anaeróbia mesofílica e termofílica (realizadas à 35°C e 55°C, respectivamente), digestão aeróbia, tratamento químico com cal e compostagem (ARTHURSON, 2008).

O Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008) está avançando na captação e tratamento dos esgotos domésticos. Comparando o número dos municípios que possuíam esgoto coletado e tratado no ano de 2000 (35,3%) com aqueles na mesma condição em 2008 (68,8%) nota-se um aumento na coleta e tratamento de 33,5%. Porém ainda há muito para ser realizado nesta área. De acordo com informações oficiais do Ministério da Saúde a coleta de esgoto no Brasil atende a 48% das residências, porém somente 38% do esgoto gerado nas residências recebe tratamento correto em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) (BRASIL, 2013).

Estima-se que a geração anual brasileira de lodo de esgoto seja de 372.000 toneladas por ano. A região Sudeste, a mais desenvolvida do País, era responsável, em 2001, pela geração de 274,7 mil toneladas de lodo/ ano (UN-HABIT, 2008). Para a Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), estima-se que, em 2015, a geração será de aproximadamente 273,3 mil toneladas /ano de lodo de esgoto (TSUTIYA, 2001). No Brasil somente 15% do lodo gerado é aplicado em solos agrícolas, sendo que 50% são destinados a aterros sanitários, sendo o restante descartado de forma irregular. No Estado de São Paulo, 90% dos lodos gerados são destinados a aterros sanitários e 10% é utilizado em terras agrícolas (UN HABIT, 2008).

Segundo ANDREOLI (2002), a ampliação dos serviços de coleta de esgoto tem um potencial para multiplicar a produção desse resíduo no Brasil em 3 a 4 vezes.

Embora estudos realizados no Brasil mostrem que há vantagens da utilização do lodo de esgoto em solos destinados à produção de cana de açúcar (SILVA et al. 2001), feijão (NOGUEIRA et al., 2007) e grama esmeralda (BACKS et al. 2009) há

que se levar em consideração os aspectos sanitários e de proteção à saúde tanto de trabalhadores em áreas agrícolas como dos consumidores de alimentos provenientes de áreas onde há a prática de utilização de lodos de esgoto como condicionantes do solo.

Apesar destas experiências exitosas faltam estudos que comprovem sua qualidade sanitária para a aplicação na agricultura brasileira (UN- HABIT, 2008)

1.2 REGULAMENTAÇÃO DO USO DO LODO DE ESGOTOS

Com o intuito de disciplinar e evitar a utilização irregular dos lodos de esgotos na agricultura e proteger a saúde da população que se utiliza de insumos agrícolas, diversas leis e normatizações foram criadas ao redor do mundo. Em 2006 Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um guia para a utilização segura de esgotos, excretas e águas cinzas na agricultura e na aquicultura (WHO, 2006). Em relação ao lodo de esgoto, como padrões a serem seguidos, a OMS adota os parâmetros descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios para o uso de lodo de esgoto de excretas na agricultura.

Patógeno	Valores recomendados
Helmintos	< 1 ovo /g ST
<i>E. coli</i>	< 1.000 NMP/g ST

Fonte: WHO, 2006

g ST: Gramas por sólidos totais

NMP: Número mais provável

Nos Estados Unidos a EPA (*Environmental Protection Agency*) criou, em 1997, a norma 40 CFR-503 que regula a qualidade que os lodos de esgotos devem apresentar antes de serem dispostos em solo agrícola. Essa norma divide os lodos de esgotos, em relação à concentração de patógenos presente naqueles, em duas classes: Classe A – são os lodos de esgoto adequadamente estabilizados cuja utilização se dá diretamente em solo agrícola sem nenhuma restrição e de classe B – lodos que possuem concentração mais elevada de patógenos em relação aos lodos de classe A e, por isso, requerem ainda tratamento adicional antes de seu uso irrestrito em solos agrícolas (USEPA, 1997). A Tabela 2 apresenta os limites de concentração dos parâmetros microbiológicos e parasitológicos estabelecidos por esta norma americana.

Tabela 2. Limites máximos de patógenos em lodos de esgoto permitidos pela USEPA (1997).

Indicador e Classe	Limite Padrão
Classe A	
<i>Salmonella</i> spp.	3 NMP/4g ST
Coliformes fecais	1000 NMP/g
Vírus entéricos	1 UFP/4g
Ovos viáveis de Helmintos	1 ovo / 4g ST
Classe B	
Coliformes fecais	2×10^6 NMP/g ST

Fonte: USEPA (1997)

UFP: Unidade formadora de placa

g ST: Gramas por sólidos totais

NMP: Número mais provável

Para os lodos de classe B várias restrições são exigidas como, por exemplo, a proibição da entrada de pessoas no local onde o lodo de esgoto foi aplicado durante

os primeiros 30 dias após a aplicação e ainda a restrição do cultivo de alimentos cujas partes crescem embaixo do solo antes de 38 meses após a aplicação.

No Brasil, o Ministério do Meio Ambiente, através do Conselho Nacional de Meio Ambiente, regula e restringe a utilização de lodos de esgotos através da Resolução CONAMA 357 de 2006 (BRASIL, 2006) que estabelece que, para que um lodo seja classificado como classe A ou B, este deve apresentar padrões específicos no que concerne à concentração de microrganismos presentes no mesmo. A Tabela 3 descreve estas concentrações.

Tabela 3. Limites máximos permitidos de organismos patogênicos em lodo de esgoto pela CONAMA (2006)

Indicador	Lodo Classe A	Lodo Classe B
Coliformes termotolerantes	1000NMP/g ST	10 ⁶ NMP/g ST
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 10g/ST	Não Aplicável
Ovos viáveis de Helminto	0,25 ovos/g ST	10 ovos /g ST
Vírus entéricos	0,25 UFP	Não Aplicável

Fonte: Brasil (2006)

g ST: Gramas por sólidos totais

NMP: Número mais provável

Segundo a Resolução CONAMA 357, os lodos de esgoto classe A podem ser utilizados em solos nos quais as partes comestíveis dos vegetais não entrem em contato com o mesmo. Caso partes comestíveis entrem em contato com o solo tais como oleícolas, tubérculos, raízes e cultivos inundáveis há a restrição de um período mínimo de 48 meses entre a última aplicação do lodo de esgoto e o cultivo destes vegetais. No caso de lodos classe B o seu uso fica restrito ao cultivo de café, silvicultura, bem como em culturas de produção de fibras e óleos.

No México, o lodo de esgoto é dividido em três classes distintas: A, B e C, que se distinguem pelas diferentes concentrações de coliformes fecais e ovos de helmintos encontrados no lodo de esgoto. A Tabela 4 apresenta as concentrações de patógenos padrões para cada uma dessas classes.

Tabela 4. Limites máximos permitidos de patógenos em lodos de esgoto pela SEMARNAT (2002)

Classe	Coliformes Fecais (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)	Ovos de Helmintos (Ovos/g ST)
A	1000	3	1
B	1000	3	10
C	2×10^6	300	35

Fonte: México (2002)

As três classes de lodo podem ser utilizados em solos agrícolas, solos florestais ou para melhoramento de solos. Os lodos de classe A podem ter uso urbano e contato direto com o aplicador/manipulador. Já os de classe B também podem ter uso urbano, porém o contato direto com o manipulador é proibido.

Na Nova Zelândia, a legislação adota um sistema de duas letras. A primeira letra está relacionada aos processos de estabilização utilizados e a segunda aos contaminantes químicos presentes no lodo de esgoto. Para que um lodo seja classificado como Aa, o que lhe dá a permissão para uso irrestrito, podendo inclusive ser vendido diretamente aos consumidores como qualquer outro fertilizante de uso agrícola, este deverá ser submetido a um processo de redução de patógenos juntamente com outro processo que assegure a redução de vetores. Os valores

especificados pela legislação neozelandesa são os seguintes: *E. coli* < 100 NMP/g , *Salmonella* spp e *Campylobacter* spp < 1/25 NMP/g., vírus entéricos < 1 UFP/4g e ovos de helmintos < 1/4g. Para que o lodo seja classificado como B o mesmo deve, ao menos, ter passado por processo que garanta a redução de vetores além de possuir algumas restrições como, por exemplo, após sua aplicação ser respeitado um período de um ano antes que culturas que são ingeridas cruas possam ser plantados ou de seis meses para as demais culturas (NZWWA, 2003).

Como observado nas legislações supracitadas, *Salmonella* spp. faz parte dos padrões bacteriológicos de qualidade desses resíduos devido a sua presença bem como por potenciais prejuízos à saúde humana e animal já bem documentados pela literatura. O gênero *Salmonella* também é considerado como patógeno de importância na avaliação sanitária de águas servidas para irrigação agrícola. Tal importância se dá pelo fato de que esta bactéria é encontrada frequentemente nestas águas.

Vale destacar ainda que *Salmonella* spp. possui larga distribuição (tanto em países temperados como tropicais), significativa resistência a adversidades ambientais, alberga-se tanto em seres humanos quanto animais homeotermos, sendo ainda capazes de se multiplicarem fora de seus hospedeiros (STRAUSS, 1986). Tais características corroboram a inclusão deste patógeno nas legislações supracitadas.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* spp.

1.3.1 Taxonomia

Salmonella spp. são bacilos gram-negativos presentes no intestino humano bem como em outros mamíferos e répteis. Esse grupo é formado por mais de 2.400 sorotipos ou sorovares tornando, por este motivo, sua taxonomia bastante complexa.

As primeiras tentativas de se criar uma taxonomia para *Salmonella* spp. iniciaram-se com KAUFFMANN citado por BRENNER et al. (2000). Em seu livro “Bacteriology of *Enterobacteriaceae*” este autor propôs que cada sorotipo de *Salmonella* spp., identificados com base nos antígenos somático O e flagelar H, fossem considerados como uma espécie diferente. De acordo com o esquema taxonômico de Kauffmann existiriam 2.463 espécies diferentes de *Salmonella* spp. (BRENNER et al., 2000).

CROSA et al. (1973), compararam os diferentes genótipos de *Salmonella* spp. e observaram, por hibridização de DNA-DNA, que os subgêneros I, II, IV, bem como os sorotipos de *Arizona*, formavam somente uma espécie, sendo *S. bongori* o único subgênero a formar uma espécie separada.

Após esses estudos moleculares uma nova proposta taxonômica surgiu a qual recebeu o nome de esquema de Kauffmann – White (POPOFF et al., 2000). Nessa nova proposta o grupo *Salmonella* spp. passou a ser formada por duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* sendo que *S. enterica* passou a se subdividir em sete subgêneros: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica*

subsp. *houtenae* (IV), *S. enterica* subsp. *indica* (VI), *S. bongori* (V). Finalmente, LE MINOR e POPOFF (1987) propuseram que os subgêneros do esquema de Kauffmann-White passassem a ser denominados de subespécies.

Atualmente, o Centre for Disease Control (CDC), nos Estados Unidos, adota o seguinte esquema taxonômico citado e recomendado por BRENNER et al (2000) e adotado neste trabalho: O gênero *Salmonella* possui duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que cada uma delas possui muitos sorotipos. *S. enterica* passa a possuir seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), *S. enterica* subsp. *indica* (VI).

Em relação à nomenclatura, o gênero e a espécie devem ser escritos em itálicos ex. *Salmonella enterica*. Já os diferentes sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* (I) os quais, na sua maioria, possuem os nomes dos locais onde foram originalmente isoladas as primeiras cepas, devem ser grafados com inicial maiúscula e não italizados. Neste caso, a subespécie não necessita ser grafada como, por exemplo, *Salmonella Agona*. Para as demais subespécies (II, IIIa, IIIb, IV e VI) as fórmulas antigênicas são utilizadas para a sua nomenclatura como segue: S.IIIb 60:k:z.

Alguns sorotipos causam intoxicação alimentar devido à liberação de enterotoxinas. Estes sorotipos estão presentes no meio ambiente e são nele introduzidos, principalmente, pelas fezes de animais (MADIGAN et al., 2010). Também podem causar septicemias quando presentes na corrente sanguínea além de

febres entéricas ou febre tifoide quando, a partir da corrente sanguínea, multiplicam-se no tecido linfoide do intestino, podendo causar hemorragia e perfuração intestinal com taxa de mortalidade variando entre 10 a 15%. Neste último caso bactérias como *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* e *Salmonella Paratyphi B* são as responsáveis pelas febres tifoides e são adquiridas unicamente por contato humano (BROOKS et al., 2009).

Os sorotipos que causam gastroenterites como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são comumente denominadas de *Salmonella* spp. não tifoides (SNT). Estimativas sobre a incidência de gastroenterite por SNT mostram que todos os anos ocorrem cerca de 93 milhões de casos novos em todo o mundo, dos quais 155 mil evoluem para óbito (MAJOWICZ et al., 2010).

1.3.2 Genes de Virulência e Presença de Plasmídeos

Para expressar virulência, cepas de *Salmonella* spp. possuem diferentes genes presentes em DNA cromossômico ou plasmidial. Várias ilhas de patogenicidade (IP) são reconhecidas e estudadas em cepas de *Salmonella* spp. (ZOU et al. 2011). As ilhas de patogenicidade mais estudadas são as ilhas SPI-1 e SPI-2. A primeira contém genes responsáveis pela invasão bacteriana como *InvA*, *prgR*, *iagAB* e *sipEBCDA* (DAIGLE, 2008). *InvA* é um gene encontrado em várias cepas patogênicas e tem sido utilizado como um identificador do grupo *Salmonella* spp. (LAVALETT et al., 2009). Os genes presentes na ilha SPI-2 têm papel central na sobrevivência microbiana dentro dos macrófagos. Os genes mais comumente envolvidos na

patogenicidade desta ilha são *sip BCA*, *spi A*, *sip BCD* e *sseL* (CHEN et al., 2005). Alguns plasmídeos portam o gene *spvC* que codifica a enzima fosfotreonineliase que possui a capacidade de inibir a sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) inativando, assim, o mecanismo de resistência da célula hospedeira (GUINEY e FIERER, 2011).

Segundo RYCHLIK et al. (2006), cepas de *Salmonella* spp. podem portar plasmídeos de baixo e elevado peso molecular. Estes últimos (com pesos superiores a 20 Kb) estão geralmente relacionados com os genes de virulência supracitados, ou com a resistência a agentes anti-microbianos. Os genes de beta lactamases de espectro expandido (ESBL - Extended Spectrum Beta Lactamase), por exemplo, estão comumente inseridos nos plasmídeos de elevado peso molecular; já a função dos plasmídeos de baixo peso molecular não foi ainda totalmente compreendida, no entanto, alguns deles podem estar relacionados com a resistência a metais pesados bem como a outras substâncias tóxicas encontradas no ambiente.

Alguns estudos têm demonstrado que o sorotipo mais prevalente de cepas de *Salmonella* spp. em todo o mundo é *S. enterica* subsp. *entérica*, grupo que é formado por, aproximadamente, 1500 serovares (BRENNER et al., 2000). Em uma pesquisa global realizada em 1995, os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* e *S. Infantis* foram os mais isolados nos diversos países pesquisados (HERIKSTAD et al., 2002). Em um estudo epidemiológico realizado em 2009 na Europa foi demonstrado que os dois sorotipos de *Salmonella* spp mais frequentemente relacionados a salmonelose humana foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, estando presentes em 57% e 25%, respectivamente, de todos os casos (ECDC, 2011). Durante investigação

de surtos realizada pela HPA (Health Protection Agency), o sorotipo Newport foi encontrado em diferentes alimentos responsáveis por surtos no Reino Unido - o maior deles foi em 2004, tendo sido associado ao consumo de alface em restaurantes e alimentos para pronta entrega (HPA, 2012).

Em sua tese de doutorado MARTINS (1979) isolou *Salmonella* spp. de diferentes fontes ambientais na cidade de São Paulo. Foram coletadas 39 amostras de esgotos brutos das quais foram isoladas 1 545 cepas de *Salmonella* spp. As cepas que foram isoladas com maior frequência foram *S. Agona* (17,4%), *S. Typhimurium* (14,6%), *S. Anatum* (11,7%) e *S. Infantis* (10,7%). *S. enteritidis* foi isolada somente em 0,8% das cepas sorotipificadas. No mesmo estudo foram coletadas 214 amostras de água doce bruta (sem tratamento) onde foram isoladas 908 cepas de *Salmonella* spp. O sorotipo que foi isolado com maior frequência foi *S. Quiniela* seguido de *S. Agona* (20,3%), *S. Infantis* (13,4%), *S. Anatum* (12%) e *S. Typhimurium* (6,9%). Nenhuma cepa de *S. Enteritidis* foi isolada nas águas doces brutas pesquisadas.

Em um estudo de vigilância realizado na cidade de São Paulo por TAVECHIO et al., (1996) para a detecção e identificação de *Salmonella* spp. presentes em fontes humanas e não humanas, de 1991 a 1995, foram isoladas 5.490 cepas, sendo 2.254 provenientes de infecção humana e 3.236 isoladas a partir de fontes não-humanas sendo as principais dentre estas carne de frango, alimentos humanos, rações de animais e filhotes de ovelhas e aves. As cepas mais frequentes isoladas a partir de fontes humanas foram *S. Enteritidis* (29,6%), *S. Typhimurium* (8,8%), *S. Agona* (8,2%), *S. Infantis* (6,3%), *S. Hadar* (4,5%) e *S. Dublin* (3,8%). Das fontes não-humanas as mais frequentes foram: *S. Enteritidis* (16,9%), *S. Havana*

(4,7%), *S. Typhimurium* (4,7%), *S. Infantis* (3,7%), *S. Hadar* (3,6%) e *S. Agona* (3,5%). Quando estes resultados foram comparados pelos autores deste estudo com estudos anteriores, também realizados na cidade de São Paulo, aqueles constataram que a frequência *S. Enteritidis* aumentara de 1,2% para 64,9% (TAVECHIO et al., 1996).

MEDEIROS et al. (2001) estudaram os principais sorotipos que causaram diarreia em 1.836 crianças menores de 10 anos de idade entre os anos de 1994 a 1997, na cidade de Ribeirão Preto (SP). Dentre as cepas de *Salmonella* spp detectadas, 12 sorotipos diferentes foram encontrados, sendo a maior prevalência de *S. Enteritidis* (36,6%); seguido por *S. I 4,5,12: i: -*, *S. Braenderburg*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Agona*, *S. Indiana*, *S. Braenderup*, *S. Javiana*, *S. Dar*, *S. Worthington* e *S. Typhimurium*.

No período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000, TAVECHIO et al. (2002), sorotiparam 4.581 cepas de *Salmonella* spp isoladas a partir de fontes não-humanas na cidade de São Paulo, incluindo alimentos associados a surtos envolvendo *Salmonella* spp., carne de galinha, filhotes de frango e fontes ambientais como esgoto bruto. Dentre os 123 sorotipos isolados *S. Enteritidis* foi o mais prevalente (32,7%). Outros sorotipos foram também encontrados, tais como *S. Senftenberg* (10,3%); *S. Hadar* (6,8%); *S. Agona* (5,1%) e *S. Typhimurium* (2,4%). Os sorotipos *S. enterica* subsp. *arizonae*; *S. enterica* subsp. *diarizonae* e *S. enterica* subsp. *houstenae* também foram detectados, mas representaram menos de 1% do total das cepas isoladas. Em relação aos sorotipos isolados no esgoto bruto a cepa mais

frequentemente isolada foi *S. Agona* (38,6%) seguida de *S. Ohio* (14,6%). *S. Enteritidis* foi isolada com baixa frequência (1,63%).

Em outro estudo realizado por MEDEIROS et al. (2011), *Salmonella* spp. e outros patógenos foram isolados de carcaças de frangos congelados no varejo em 15 estados brasileiros e identificaram que as cepas de *Salmonella* spp. isoladas com maior frequência foram a *S. Enteritidis* (48,8%), *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%), *S. Heidelberg* (6,4%), *S. Mbandaka* (4,8%) e *S. Agona* (3,6%). Demais sorotipos foram isolados em um valor igual ou inferior a 2%.

1.3.3 Resistência a Antimicrobianos

Segundo SU et al. (2004) está ocorrendo um aumento na resistência a antimicrobianos por *Salmonella* spp. não tifoides no mundo inteiro. Estes autores relatam que um dos principais fatores que contribuem para este quadro é a utilização indiscriminada desses agentes em rações de animais. Também relatam que os plasmídeos transmissíveis são os principais elementos relacionados à transferência de resistência entre os diversos sorotipos de *Salmonella* spp.

CHEN et al. (2013) descreveram duas importantes mudanças observadas em relação à resistência de *Salmonella* spp. a antimicrobianos na Europa e nos Estados Unidos entre o século 20 e 21: Na segunda metade do século 20 foi detectada a presença de cepas de *Salmonella* Typhimurium multidrogas resistentes (MDR) e no século 21, por sua vez, o surgimento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a fluoroquinolonas, bem como a cefalosporinas de terceira geração.

Diferentes estudos realizados no Brasil também vêm demonstrando aumento na resistência a antimicrobianos utilizados na criação de animais e no tratamento de infecções em seres humanos (OLIVEIRA et al., 2002; GHILARDI et al. 2006; MEDEIROS et al., 2011). OLIVEIRA et al. (2002) realizaram um estudo em abatedores de porcos na cidade de Jaboticabal no Estado de São Paulo. A partir de 1.026 amostras coletadas de bebedouros, solo, alimentos dos animais e fezes, 17 cepas foram isoladas de seis sorotipos diferentes (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Sandiego*, *S. Rissen* e *S. Senftenberg*). Todas as 17 cepas apresentaram resistência à tetraciclina, estreptomicina e ao ácido nalidíxico.

Em São Paulo, GHILARDI et al. (2006) analisaram a susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *S. Typhimurium*, de origem humana e ambiental, isoladas entre 1990 e 2001. Das 238 cepas analisadas 38% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 15% foram MDR. Os antibióticos aos quais as cepas apresentaram os maiores índices de resistência foram: tetraciclina (37,5%), estreptomicina (24,3%) e sulfonamida (19,4%).

FONSECA et al. (2006), no Rio de Janeiro, estudaram a susceptibilidade de 35 cepas de *S. Infantis* isoladas de fezes de crianças com gastroenterites internadas em hospitais no período de 1996 a 2001. Das 35 cepas, 34 (97,1%) apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos e 32 (91,4%) foram classificadas como cepas beta lactamases de espectro estendido (ESBL). Cepas ESBL foram primeiramente isoladas na Europa e, desde então, têm se espalhado pelo mundo todo. Estas cepas apresentam resistência, comumente, contra cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e carbapenêmicos. Seu surgimento é preocupante uma vez

que estas cepas têm sido associadas à alta mortalidade no mundo todo (TANSARLI et al., 2014).

VAZ et al. (2010) realizaram, no Rio Grande do Sul, testes de resistência a antimicrobianos em cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves e de alimentos envolvidos em surtos e de amostras clínicas. Das 96 cepas isoladas, 54 (56,2%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico. Resistências a uma duas ou três drogas foram observadas nas amostras retiradas de aves (69,8%), alimentos (44,83%) e pacientes (28,6%) e, dentre os antibióticos utilizados, aqueles que apresentaram os maiores índices de resistência foram sulfonamida (34,4%), trimetoprim-sulfometoxazol (25%) e ácido nalidíxico (14,6%).

RIBEIRO et al. (2010) avaliaram a resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de camarões criados em cativeiros no Estado do Rio de Janeiro. Amostras foram coletadas de camarões adultos, de alevinos e do meio ambiente (água e vegetais). Das 33 cepas isoladas de *Salmonella* spp., 15,1% eram resistentes a um ou mais dos agentes antimicrobiano testados; nenhuma cepa MDR foi encontrada neste estudo.

MEDEIROS et al. (2011), em estudo envolvendo quinze capitais brasileiras a fim de avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de frangos abatidos para consumo, isolaram, a partir de 2.679 frangos, 250 cepas de *Salmonella* spp. nas quais foram identificados 18 sorotipos. Dessas, 133 (53,2%) foram identificadas como MDR. Dezoito cepas foram identificadas como *S. Typhimurium*, dentre estas 10 (55,6%) apresentaram resistência a um ou mais

antimicrobianos e 8 (44,4%) eram MDR. Ainda em relação a este sorotipo 100% apresentaram resistência à estreptomicina, 83,3% à ampicilina, 61,1 % ao florfenicol, 50% à sulfonamida e 38,9% à tetraciclina. Os autores deste trabalho comentam que é prática corrente no Brasil a utilização de antimicrobianos como agentes profiláticos e como agentes estimulantes de crescimento em frangos. Esta prática poderia explicar a grande incidência encontrada de cepas MDR (53,2%). Ainda comentam que a ingestão destes frangos poderia contribuir para o aumento observado de cepas MDR em humanos, devido à ingestão de sub-doses terapêuticas de antimicrobianos presentes nos frangos.

Em estudo mais recente (CARVALHO et al., 2013) também envolvendo *Salmonella* spp. encontradas em sistema de aquicultura para a criação de lagostas de água doce no nordeste brasileiro, constatou-se que 23 % das cepas isoladas apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 20% a ao menos dois antimicrobianos. Três cepas, sendo duas *S. Braenderup* e uma *S. Madelia*, foram classificadas como MDR para ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina e nitrofurantoína.

Os estudos supracitados evidenciam que cepas de *Salmonella* spp. MDR podem ser encontradas e permanecem viáveis no meio ambiente representando um risco à saúde tanto de animais quanto de seres humanos.

1.3.4 Presença em Lodos de Esgoto

A presença de *Salmonella* spp. em lodos de esgotos já foi bem relatada em diversos trabalhos (IRANPOUR e COX, 2006; HORSWELL et al., 2007; SIDHU e TOZE, 2009). Sua concentração pode variar muito, dependendo dos processos e técnicas de tratamento de esgoto empregadas nas ETEs.

TSAI et al, (1998) encontraram concentração média de $5,5 \times 10^4$ UFC/g ST de *Salmonella* spp. em lodos de esgoto bruto gerados em nove hospitais de Taiwan. GALE (2003) utilizou dados de concentração de *Salmonella* spp. em esgotos brutos calculados por YAZIZ e LLOYD (1979) para chegar a média de 201 UFC/g ST do mesmo patógeno em lodos de esgotos tratados gerados no Reino Unido.

SIDHU e TOZÉ (2009) realizaram revisão da literatura e encontraram valores variando de 1,2-3,2 NMP/g ST para a concentração de *Salmonella* spp em lodo de esgoto tratado gerado em Nantes na França e $5,9 \times 10^3$ NMP/g ST em lodo de esgoto bruto em uma ETE da Austrália. Estes autores declaram que, em geral, *Salmonella* spp. é encontrada, em lodos de esgoto tratados, com valores na ordem de 1-52 UFC/g ST que é um valor diversas ordens de magnitude menor do que o observado para coliformes fecais (10^5 - 10^6 UFC/g ST). WONG et al. (2010) encontraram concentrações ainda mais baixas do que as citadas nos estudos acima, isto é, com valores variando de 0,487 NMP/4g a 0,954 NMP/4g (ou 1,22 NMP/g - 0,238 NMP/g) em lodos de esgoto tratados de uma ETE em Michigan (EUA).

No Brasil poucos estudos, concentrados principalmente no Estado de São Paulo, foram realizados a fim de detectar a concentração de *Salmonella* spp. nos lodos gerados. MARTINS et al (1986) em estudo realizado na ETE de Vila Leopoldina, na Cidade de São Paulo, detectaram *Salmonella* spp. em duas amostras de lodos de esgoto, das 67 analisadas, encontrando *Salmonella* spp. em uma concentração de 0,02 NMP/g. MARQUES et al. (2000), em 1999, detectaram concentração de 36,5 NMP/4g (9,12 NMP/g) de *Salmonella* spp. na ETE Barueri verificando, no entanto, sua ausência nos anos de 1997 e 1998. VANZO et al. (2000) obtiveram uma concentração de 0,78 NMP/g na ETE Franca. TSUTYIA et al. (2001) relataram ausência destas bactérias nas ETES Barueri e Suzano e, na ETE Franca, relataram concentração de 3,1 NMP/4g (0,77 NMP /g). SANTOS et al. (2011), não encontraram este grupo na ETE Rio das Antas, no Município de Irati, no Estado do Paraná.

Aliado à presença dessa bactéria em lodos de esgotos, mesmo que em baixas concentrações, deve-se enfatizar que, como relatado por VOUGHT e TATINI (1998), a dose infecciosa de *Salmonella* Enteritidis pode ser menor que 25 células em adultos e menor ainda para criança (10 células viáveis).

1.3.5 Sobrevivência em Solos Tratados com Lodos de Esgoto

Diversos estudos foram realizados a fim de avaliar a sobrevivência de *Salmonella* spp. em lodos de esgoto, bem como em solos com aplicação de lodo

(GIBBS et al., 1997, MARSH et al. 1998, BRANDL et al., 2005, EAMENS et al., 2006, JIANG et al. 2013).

GIBBS et al., (1997) e EAMENS et al., (2006) avaliaram o recrescimento de *Salmonella* spp. em solos tratados com lodo de esgoto. Ambos os trabalhos foram realizados na Austrália, país no qual as condições climáticas são semelhantes às do Brasil (verões muito quentes e úmidos e invernos frios e secos). Como resultado, obtiveram recrescimento de *Salmonella* spp. de cerca de 3,0 log e 2,16 log, mesmo após este microrganismo já ter atingido o limite de detecção. EAMENS et al. (2006) observaram ainda que *Salmonella* spp. apresentaram recrescimento após 68 semanas.

MARSH et al. (1998) observaram que *Salmonella* spp. podem se encontrar em estado descrito como viável mas não cultivável (VBNC em inglês), em que algumas bactérias entéricas podem conservar a sua patogenicidade por longos períodos. Em um estudo realizado por JIANG et al. (2013), os autores observaram que a digestão anaeróbia pode causar este estado em *Salmonella* Typhimurium. Neste mesmo estudo os autores calcularam o que denominaram de índice de incidência, o qual se baseia na taxa de divisão das células viáveis mas não cultiváveis pelo número de células viáveis multiplicado por 10^5 . Os valores deste índice para *Salmonella* Typhimurium variaram de $2,48 \times 10^5$ a $43,65 \times 10^6$, demonstrando assim, que um elevado número de células deste sorotipo ainda estão viáveis mesmo não sendo detectadas pelos métodos clássicos de cultivo.

FU et al., (2014) detectaram a reativação de células de *E. coli* em estado viável mas não cultivável logo após o processo de secagem do lodo de esgoto. Os

autores desse estudo chegaram à conclusão de que a digestão anaeróbia altera os estado metabólico celular de cepas de *E. coli* ao invés de eliminá-las. (JIANG et al., 2013) observaram o mesmo fenômeno em bactérias do gênero *Salmonella*.

BRANDL et al., (2005), por outro lado, demonstraram que *Salmonella* Enterica pode ter uma sobrevivência aumentada em vesículas liberadas no solo pelo protozoário *Tetrahyma* spp ou pode também viver em simbiose e se multiplicar dentro desses organismos. Solos ricos em matéria orgânica constituem o principal fator para a multiplicação deste protista bem como o crescimento intracelular de *Salmonella* spp. Logo, a aplicação de lodo de esgoto poderia, naturalmente, contribuir para a multiplicação de ambos os seres.

Todos esses fatores, em conjunto, poderiam favorecer a longa sobrevivência e o fenômeno de recrescimento observado de *Salmonella* spp. em solo agrícolas, como encontrados na Austrália. Os fenômenos supracitados também poderiam explicar o que foi observado em estudo realizado por NICHOLSON et al., (2005), que demonstraram que células de *Salmonella* spp. podem permanecer viáveis por até 968 dias em solo.

1.3.6 Internalização e Crescimento em Vegetais.

Alguns estudos recentes têm evidenciado que *Salmonella* spp. podem se internalizar em tecidos vegetais. A entrada se dá através das raízes, lesões presentes nos diversos órgãos da planta, lenticelas e estômatos dentre outras estruturas vegetais (BRANDL, 2005, DEERING et al., 2012; HIRNEISEN et al., 2012).

Outros estudos têm demonstrado que *Salmonella* spp. apresentam capacidade de crescerem em diferentes órgãos da planta. Porém, antes que *Salmonella* spp. possam alcançar os tecidos internos das hortaliças e se multiplicarem, as mesmas devem ser capazes de passar pelo processo de internalização. Esse fenômeno foi estudado por GOLBERG et al. (2011) utilizando duas variedades de alface, *iceberg* e romana, consumidas no Brasil. Os autores verificaram que *Salmonella* spp. se internalizaram nas folhas do vegetal através dos estômatos, principalmente na variedade *iceberg*. KROUPITISKI et al. (2011), estudando a internalização de *S. Typhimurium* em folhas de alfaces, relataram que este sorotipo se fixa mais em estômatos da variedade *iceberg* do que na variedade romana.

A internalização pode ocorrer mesmo quando *Salmonella* spp. estão presentes em baixas concentrações, como mostrou o estudo de MANIOS et al. (2013), no qual, partindo de uma baixa concentração de *Salmonella* Typhimurium (1 a 4 células) os autores observaram a internalização e a multiplicação destas cepas em folhas de alface atingindo a concentração final de aproximadamente 10^4 UFC/g de alface. SANT'ANA (2012), em um estudo realizado na cidade de São Paulo, que partindo de uma concentração inicial de *Salmonella* spp. de 10^3 /g inoculadas em folhas de salada verde para pronto consumo, observou crescimento de $2,6 \pm 1,6$ log/g, mantidas à temperatura de 15°C por 6 h.

Em outros dois estudos realizados para avaliar a internalização e crescimento de *Salmonella* spp., ASPLUND e NURMI (1991) observaram o crescimento de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis e *Salmonella* Typhimurium em pedaços de tomate mantidos à temperatura de 21°C por 24 h partindo de concentrações

iniciais de $1,2 \times 10^{-1}$, $0,7 \times 10^1$ e $0,5 \times 10^1$ células/g para $2,0 \times 10^6$, $2,3 \times 10^6$ e $7,1 \times 10^6$ células/g, respectivamente. BEUCHAT e MANN (2008) demonstraram que, partindo de um inóculo de *Salmonella* Typhimurium com concentração inicial de 1-2 célula/g em tomates mantidos a uma temperatura de 21°C, observaram que após 14 dias a concentração final desta bactéria foi de aproximadamente 10^8 células/g.

A microbiota presente nos vegetais, denominada de filosfera (composta tanto por fitopatógenos como por microbiota epifítica natural), também possui papel importante na internalização. HEATON e JONES (2007), em extensa revisão sobre esse fenômeno, relatam que fitopatógenos podem aumentar a internalização de enterobactérias uma vez que esses destroem tecidos vegetais permitindo acesso a nutrientes bem como vias de entradas alternativas para a infecção das plantas. Corroborando esses achados, DEERING et al. (2012), também em uma revisão, citaram diversos estudos em que a microbiota epifítica pode favorecer o estabelecimento de enterobactérias nos vegetais por meio da liberação de metabólitos secundários que podem ser aproveitados pelas enterobactérias, além da presença de biofilmes sintetizados pela microbiota epifítica que passam a fornecer proteção contra dissecação servindo também como fonte de nutrientes. Mas os mesmos autores ponderam que algumas bactérias epifíticas podem competir por nutrientes com as enterobactérias dificultando, assim, seu estabelecimento e sua internalização nos vegetais.

1.4 RISCO DE INFECÇÃO POR *Salmonella* spp.

1.4.1 Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico

A avaliação de risco microbiológico é definida como a estimativa, qualitativa ou quantitativa, dos efeitos ou potenciais efeitos adversos à saúde associados à exposição de um indivíduo ou uma população a microrganismos patogênicos ou suas toxinas (HAAS et al., 1999).

Ao contrário dos estudos epidemiológicos, que requerem uma grande amostragem de indivíduos para uma associação de causa-efeito, além da necessidade de acompanhamento desta população por longos períodos, o que pode ser oneroso e ainda sofrer com a desistência ou óbito de participantes, a avaliação quantitativa de risco microbiológico (AQRM) não necessita de longos períodos, prescinde da necessidade de um grande número de indivíduos permitindo a construção de diferentes cenários de exposição (VIAU et al., 2011).

Poder explorar estes cenários com baixo custo e em curto espaço de tempo são algumas das riquezas desta ferramenta.

A AQRM é uma ferramenta útil à medida que permite a expressão do risco de uma forma quantitativa em termos de infecção, doença ou morte. Com as informações geradas, os atores sociais envolvidos na tomada de decisões relacionadas à proteção da saúde e ao meio ambiente, passam a ter embasamento científico para a criação de novas leis ambientais e para uma melhor tomada de decisões em políticas de saúde pública (HAAS et al., 1999). Reforçando sua

importância nos tempos atuais a USEPA (2012) declarou que a AQRM é de grande utilidade para as organizações responsáveis por compreender, reduzir e prevenir os riscos gerados por microrganismos patogênicos tanto de fontes naturais quanto antropogênicas, intencionais ou não. A mesma agência declarou ainda que o aumento da globalização tem intensificado estes riscos com a expansão e rápida distribuição das doenças. Para a condução da AQRM são contempladas as etapas que estão indicadas no Quadro 1.

Quadro 1: Etapas para a condução da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQMR).

Etapas	Objetivo
Identificação do perigo	Descrição dos efeitos, agudos e crônicos, à saúde associados a um microrganismo específico, incluindo desde as vias de transmissão até o hospedeiro.
Avaliação da dose-resposta	Caracterização da relação entre as várias doses administradas e a incidência dos efeitos à saúde.
Avaliação da exposição	Determinação do tamanho e natureza da população exposta e; rotas, concentração e duração da exposição.
Caracterização do risco	Integração das informações obtidas nas etapas anteriores para estimar-se a magnitude de problemas de saúde pública e para avaliar-se a variabilidade e incertezas.

Fonte: Adaptado de HAAS et al. (2014)

A Figura 1 enfatiza os fatores que devem ser considerados durante a fase de avaliação da exposição.

Figura 1. Esquema ilustrativo com as diferentes fases da AQRM adaptado de MARKS *et al.*, (1998) por RAZZOLINI e NARDOCCI (2006).

Na primeira etapa, denominada de identificação do perigo, é selecionada uma situação que causa uma preocupação como a presença de organismos patogênicos em um meio onde haja uma população que esteja exposta ou possa a vir a ser exposta àqueles patógenos. Para a escolha dos microrganismos patogênicos são consideradas sua patogenicidade, sua virulência, bem como sua capacidade de sobrevivência no meio estudado. (WESTRELL, 2004).

Na fase denominada de avaliação da exposição estima-se a dose a qual a população está ou será submetida. Para isto é realizado um levantamento das possíveis rotas de exposição onde devem ser traçadas as diferentes formas de transmissão e contato do patógeno com a população exposta. Exemplos de rotas de exposição são: o contato do solo ou da água com a pele; ingestão de solo, alimento e água; inalação de partículas ou gotículas contaminadas pelo patógeno (SOLLER, 2006). Nesta fase a frequência de exposição aos agentes patogênicos deve ser estabelecida. Para que estes dados sejam fidedignos um detalhado levantamento dos hábitos e costumes da população, como a quantidade de água e alimentos ingeridos, devem ser pesquisados. A sobrevivência dos patógenos nos diferentes ambientes naturais e ou artificiais bem como a duração das exposições àqueles também devem ser levantadas nesta fase (CAMRA, 2014).

Durante a etapa da avaliação da dose-resposta visa-se obter uma relação matemática entre a quantidade (concentração) de um microrganismo ao qual uma população está exposta e o risco de se produzir efeitos adversos a partir dessa concentração (RAZZOLINI e NARDOCCI, 2006). Colocando de outra forma, a avaliação da dose-resposta busca responder a seguinte pergunta: se uma população entra em contato com uma determinada dose de um patógeno, quantas pessoas apresentarão sinais de infecção, doença ou morte? Logo, o intuito é conhecer qual seria a resposta de uma determinada população quando exposta a uma dose conhecida de um determinado patógeno (CAMRA, 2014).

Para a obtenção dos parâmetros do modelo de dose-resposta são utilizados dados provenientes de estudos epidemiológicos que descrevem surtos alimentares e

outras formas de surtos como, por exemplo, uma comunidade que bebe água de uma fonte contaminada. Ensaios desenvolvidos em animais de laboratório também são utilizados. A partir dos dados obtidos estima-se o modelo que melhor representa a relação entre dose e resposta, estimando-se, inclusive, a dose infecciosa média (N_{50}), que é a dose de um determinado patógeno que seria capaz de infectar a metade dos indivíduos expostos àquele patógeno, também são utilizados para a obtenção dos parâmetros acima referidos. A utilização de seres humanos em experimentos controlados para a obtenção destes dados não é mais oficialmente praticada ao redor do mundo e o seu retorno tem sido cada vez mais criticado sob o ponto de vista ético.

É possível, a partir dos dados obtidos das fontes supracitadas, serem geradas curvas de dose-resposta que são ajustadas e comparadas a diferentes funções matemáticas a fim de encontrar as que melhor as represente. As distribuições escolhidas serão aquelas que apresentarem os menores desvios quando comparadas às curvas de dose resposta previamente geradas.

Diversos modelos podem representar estas curvas sendo, os mais comumente utilizados para microrganismos, os modelos Exponencial e de Beta-Poisson (HAAS et al., 1999). O modelo Exponencial considera que a distribuição dos organismos entre as doses é randômica e que estes possuem a mesma probabilidade de sobrevivência (r). Já o modelo de Beta-Poisson considera a variabilidade de sobrevivência que pode haver quando diferentes microrganismos e hospedeiros interagem. Esta variabilidade assume, segundo este modelo, que r varia conforme uma distribuição de probabilidade.

Finalmente, na fase de caracterização do risco, estima-se o risco de infecção, levando-se em consideração a integração dos três passos anteriores. Apesar do risco de infecção ser o valor mais rotineiramente calculado, conhecendo-se o percentual de infecções que resultam em doenças clínicas torna-se possível calcularmos o risco de doença e, de forma semelhante, conhecendo-se o percentual de casos clínicos que resultam em morte é possível calcularmos o número de indivíduos de uma determinada população que viriam a óbito. Nesta fase da AQMR ocorre a integração da informação sobre qual dose foi recebida (informação obtida na avaliação de exposição) com quanto risco está associado a diferentes doses (informação obtida na avaliação da dose-resposta).

Para o cálculo do risco de infecção, são utilizados os modelos com os melhores ajustes. A Equação 1 representa o modelo exponencial e a Equação 2, o modelo de beta Poisson:

$$P_i = 1 - \exp(-r.d) \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

r = Probabilidade de um organismo sobreviver e iniciar uma infecção

d= dose

$$P_i = 1 - \left(1 + \frac{d}{N_{50}} (2^{1/\alpha} - 1) \right)^{-\alpha} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

N_{50} = dose infectante média.

α = Parâmetro do modelo dose-resposta que representa a interação patógeno-hospedeiro e é característica para cada patógeno.

Para o cálculo do risco anual, que considera a combinação de sucessivas exposições diárias como eventos independentes, utiliza-se a Equação 3:

$$P_i(A) = 1 - \prod_{j=1}^{365} (1 - P_i^{(j)}) \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

$P_{I(A)}$ = Risco de infecção anual

n = Número de vezes no ano nos quais a população é exposta

As incertezas inerentes aos dados devem ser consideradas em todas as fases da AQRM. Como exemplo de fontes de incertezas podemos citar as inerentes aos modelos utilizados, a extrapolação de resultados de experimentos realizados em animais para humanos, bem como as limitações dos métodos analíticos (RAZZOLINI e NARDOCCI, 2006).

Um dos métodos utilizados para a análise das incertezas e da variabilidade é o método Simulação de Monte Carlo (SMC), o qual assume que todos os parâmetros são aleatórios e seguem determinadas distribuições. Assim, ao invés de variar cada um desses parâmetros separadamente, este se utiliza de um *software* o qual seleciona os dados aleatoriamente distribuídos e utiliza as funções matemáticas a cada tempo repetidas vezes. O resultado obtido corresponde, então, às distribuições dos valores que permitem calcular os riscos anuais de infecção e seus intervalos de confiança.

Diferentes *softwares* podem ser utilizados para a análise de Monte Carlo como o ambiente computacional R, @Risk® (Palisade), CrystalBall® (Oracle) e ModelRisk® (Vosesoftware). Com o emprego destes, além do cálculo do risco de infecção, também é possível calcularmos a sensibilidade, que é uma técnica de avaliar as incertezas por meio da qual se busca aferir como as variáveis em torno de uma variável de entrada impactam as variações do parâmetro de saída. Os riscos de infecção anual gerados por estes programas seriam um exemplo de variável de saída. Uma vez conhecendo-se quais foram as variáveis de entrada que mais impactaram os riscos anuais de infecção, novos esforços podem ser realizados a fim de que as mesmas sejam melhor definidas e, as incertezas, sejam diminuídas.

Internacionalmente, a OMS utiliza e valida a abordagem da AQRM em seu *Guideline for the safe use of wastewater, excreta and greywater in agriculture* (WHO, 2006) bem como nos *Guidelines for Drinking Water* (WHO, 2011). A USEPA, em 2012, publicou o documento *Microbial Risk Assessment Guideline: Pathogenic microorganisms with focus on food and water* no qual é exemplificada e discutida a correta utilização da AQRM para a construção de cenários envolvendo alimentos e água. Diversas agências da Europa, assim como Austrália e Nova Zelândia, também utilizam e validam a AQRM como ferramenta no cálculo de risco envolvendo água de consumo humano e alimento (USEPA 2012).

No Brasil a Portaria 2.914/2011, do Ministério da Saúde, que estabelece a qualidade da água para consumo humano, também considera a utilização da abordagem AQRM como metodologia aceita e recomendada para a vigilância da qualidade da água (BRASIL, 2011).

1.4.2 Probabilidade de Infecção por *Salmonella* spp. Associada à Utilização de Lodos de Esgoto

Diversos trabalhos envolvendo a prática de uso de lodos de esgoto e a abordagem da AQRM foram realizados nos últimos anos a fim de avaliar o risco de infecção em diferentes situações.

MARA et al. (2002) utilizaram a abordagem da AQRM a fim de questionarem os parâmetros altamente restritivos exigidos para a utilização de lodos de esgoto na Inglaterra (ausência de *Salmonella* spp no lodo de esgoto bem como dez meses de espera entre a aplicação do lodo de esgoto e o início do plantio de cultivos). Para a construção do cenário de exposição foram utilizados os dados descritos por GALE (2001), citado por MARA et al. (2002), para o consumo de batatas, a saber: concentração *Salmonella* spp de 54.000 células/100 mL de lodo bruto, decaimento de 2 log durante o tratamento, taxa de adesão de 0,02 tonelada de solo por 1 tonelada de batata, taxa de ingestão de 100g de batata durante 365 dias do ano. Os autores estimaram risco anual de 2×10^{-4} . Usando os mesmos dados para alface excetuando-se a quantidade de solo aderido no vegetal, que se assumiu ser dez vezes menor do que o assumido para a batata, obtiveram risco anual de 2×10^{-5} .

Com os resultados obtidos, que segundo os autores, são considerados seguros e semelhantes aos padrões exigidos para patógenos presentes em água para consumo humano, os mesmos argumentam que as restrições impostas pela lei para o início do plantio não se sustentam, uma vez que o decaimento bacteriano no solo ocorre

durante algumas semanas e não meses. Logo, concluem que a utilização de lodo de esgoto é segura mesmo utilizando normas menos restritivas.

WESTRELL et al., (2004), na Suécia, aplicaram AQRM para estimar o risco de infecção por *Salmonella* em operadores da ETE em diferentes locais de operação: sistema de pré-aeração (ingestão de 1g de lodo por dia), nos filtros prensa (ingestão de 5g de lodo por dia), bem como os trabalhadores que aplicam esse resíduo em solo agrícola (ingestão de 2g de lodo por dia). Consideraram também a ingestão de lodo de esgoto por crianças que supostamente estariam brincando no local de armazenamento (ingestão de 5 g de lodo por evento) e, finalmente consumo de vegetais crus cultivados em solo acondicionado com lodo de esgoto (ingestão de 1 g de lodo pela ingestão de morangos numa frequência de duas vezes ao ano). Neste estudo não foi considerado nenhum decaimento ou recrescimento de *Salmonella* spp.. Os maiores riscos de infecção anuais encontrados foram aqueles nos quais os trabalhadores realizavam a aplicação de lodo de esgoto no solo bem como pelos operadores dos filtros prensa (2×10^{-2}).

No Reino Unido, GALE et al. (2005) utilizaram AQRM para avaliar o risco de infecção aos consumidores de tubérculos como raízes e batatas. Os mesmos autores assumiram, a partir de dados oficiais do governo, o consumo diário de 35g de tubérculos por dia, aderência de solo aos tubérculos igual a 2 % do peso dos tubérculos e que 90 % do solo aderido seria eliminado durante a lavagem dos mesmos. Para a taxa de decaimento de *Salmonella* spp no solo consideraram duas situações: a) de 2,53 log durante seis meses e b) de 21,94 log resultado de uma extrapolação do decaimento, considerando-o linear durante todo o período, atingindo

decaimento total. Como resultado obtiveram, para o primeiro cenário menos conservador e admitindo nenhuma falha operacional da estação de tratamento de esgoto (eficiência de 100%) um risco de infecção anual de 7.9×10^{-9} ou, considerando a população do Reino Unido na época de $1,15 \times 10^6$ pessoas, ocorreria uma infecção por *Salmonella* spp a cada 111 anos.

No Brasil, BASTOS et al. (2009) também construíram um modelo teórico a fim de avaliar o risco de infecção por diferentes patógenos a que trabalhadores de ETEs, trabalhadores que manipulam a mistura solo/lodo e consumidores de cultivos crescidos em solos acondicionados com lodos. Para isto construíram dois cenários utilizando lodos de classe A e B segundo a legislação brasileira (CONAMA 357, 2006). Assumiram ainda: concentração de 10 células de *Salmonella* spp./g de sólidos totais no lodo, taxas de ingestão de 0,49 g/dia de alface e de 1,33g/dia de cenoura (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística do censo 2002-2003), adesão de solo de 2g de solo/kg de alface e 20g de solo/kg de cenoura, bem como a ingestão involuntária de 10mg de solo e biossólido/dia pelos trabalhadores. Os autores estimaram, utilizando o cenário no qual lodo de esgoto de classe B é considerado, os seguintes riscos anuais de infecção por *Salmonella* spp: $1,7 \times 10^{-5}$ para a ingestão de alface, $4,6 \times 10^{-4}$ para a ingestão de cenoura, $2,4 \times 10^{-2}$ para ingestão acidental de partículas de lodo de esgoto pelos trabalhadores do campo que o aplicam no solo e o risco anual de $5,6 \times 10^{-5}$ para os trabalhadores do campo que trabalham com solo já tratado com lodos. Os autores deste estudo também confrontaram a legislação vigente (CONAMA 357) com os resultados obtidos em seu trabalho concluindo que esta é muito restritiva tanto em relação à utilização de lodos de classe A, quanto em

relação aos lodos de esgoto da classe B, quando assume o completo banimento de sua utilização em solos agrícolas.

A fim de avaliar o risco de infecção que trabalhadores estariam expostos durante a aplicação de lodos de esgoto, TANNER et al. (2008) utilizaram como via de exposição a inalação de partículas ou bioaerossóis contaminadas com *Salmonella* spp., as quais se formam durante o carregamento e a aplicação do lodo de esgoto em solo agrícola. Assumiram cenários nos quais a concentração de *Salmonella* spp. era de 10, 100 e 1000 células/g seca de lodo de esgoto, uma frequência de exposição de 251 dias por ano (dias de trabalho nesta atividade), que 10 % de todas as partículas inaladas eram ingeridas e que a eficiência dos filtros de ar dentro dos tratores poderiam variar entre 98 %, 50 % e 0 % de eficiência. Os autores demonstraram que os maiores riscos estavam relacionados com os trabalhadores que realizam o carregamento do lodo em tratores. Considerando o pior cenário (1000 células da bactéria /g seca de lodo de esgoto e 0% de eficiência dos filtros de ar nos tratores) o risco anual para os trabalhadores foi de $2,6 \times 10^{-3}$.

VIAU et al. (2011) revisaram diversos estudos envolvendo a transmissão de patógenos durante a aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas. Observaram que os maiores riscos de infecção apresentaram-se nesta ordem decrescente: ingestão de partículas, ingestão de bioaerossóis, ingestão de água subterrânea contaminada e ingestão de alimentos cultivados nos solos tratados com lodo de esgoto. No mesmo estudo, a fim de avaliar o risco de infecção por *Salmonella* spp. em pessoas residentes a diferentes distâncias (5 m, 30 m, 65 m, 165 m) de uma ETE baseado no estudo de TANNER et al. (2008), encontraram riscos anuais de infecção variando de

10^{-7} a 10^{-9} , dependendo das distâncias consideradas, deste modo concluem que é mais eficaz e seguro realizar um tratamento eficiente dos lodos de esgoto do que aumentar as distâncias dos moradores das ETEs.

HIPÓTESE

Considerou-se a hipótese de haver o risco de infecção por *Salmonella* spp. para trabalhadores em campos agrícolas com adição de lodos de esgotos, bem como para os consumidores das culturas de alface, tomate e cenoura cultivadas em solos agrícolas acondicionados com lodo de esgoto.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da qualidade microbiológica dos lodos de esgoto bem como seu uso potencial na agricultura, o presente estudo tem como objetivos:

- 1- Caracterizar o lodo de esgoto gerado, em relação à presença e concentração de *Salmonella* spp. nas cinco diferentes ETEs avaliadas;
- 2- Estimar o risco anual de infecção por *Salmonella* a trabalhadores de campos agrícolas e em consumidores de alface, tomate e cenoura utilizando a abordagem da AQRM;
- 3- Identificar, através das análises de sensibilidade, quais variáveis mais contribuíram para as incertezas na estimativa dos riscos anuais de infecção obtidos neste estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Amostras (n=54) de lodo de esgoto foram coletadas mensalmente em cada uma das em cinco ETEs localizadas na Região Metropolitana de São Paulo durante o período de janeiro a dezembro de 2011. O processo de tratamento utilizado em todas as ETEs analisadas é o de lodo ativado. A Tabela 5 descreve as características operacionais de cada ETE, tais como suas vazões ($L.s^{-1}$), lodo gerado ($ton.d^{-1}$), bem como o tratamento químico empregado em cada uma delas. As Figuras 2 e 3 mostram os locais de amostragem em duas das ETEs avaliadas.

Tabela 5. Vazão de esgoto ($L.s^{-1}$), lodo gerado ($ton.d^{-1}$) e tratamento químico utilizado nas ETEs.

ETE	Vazão ($L.s^{-1}$)	Lodo Gerado ($ton.d^{-1}$)	Tratamento Químico
1*	1,89	69,0	cal+ cloreto férrico
2	10,19	316,0	cloreto férrico+ polímeros
3	2,48	73,7	cal+ cloreto férrico + polímeros
4	0,80	14,3	cloreto férrico+ polímeros
5*	0,85	41,0	cal + cloreto férrico

Sabesp, 2011

* Digestão anaeróbia

Figura 2. Ponto de descarte de lodo de esgoto tratado seco em uma das ETEs

Figura 3. Ponto de coleta de lodo de esgoto em uma das ETEs

A amostragem foi realizada de acordo com o método EPA-821-R-06-14: *Method 1682: Salmonella in sewage sludge (Biosolids) by modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium* (USEPA, 2006). Foram coletados, aproximadamente, 500g de lodo em sacos plásticos previamente esterilizados os quais foram mantidos refrigerados durante o transporte e analisados dentro de 24 horas.

A determinação dos sólidos totais (% de peso seco) também foi realizada de acordo com a metodologia EPA-821-R-06-14 supracitada (USEPA, 2006), utilizando-se a Equação 4 para calcular o NMP/g de peso seco:

$$\% \text{ Sólidos totais} = [\text{amostra seca (g)}/\text{amostra (g)}] \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

3.2 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp.

O isolamento de *Salmonella* spp. e sua quantificação foram realizados de acordo com o Método EPA (USEPA, 2006): *Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis* (MSRV). Este método baseia-se na técnica do "número mais provável" (NMP). Resumidamente, 30 g de lodo de esgoto foram diluídas em 270 mL de água tamponada e homogeneizadas em liquidificador durante dois minutos e, a seguir, volumes de 20, 10 e 1 mL foram inoculados em três séries de cinco tubos contendo Caldo de Soja Tríplico (TSB) (Difco ®, Detroit, MI, EUA) os quais foram incubados a 36° C por 24 horas.

Após o período de incubação, seis gotas (30 µL) de cada tubo de TSB foram transferidas para uma placa de Petri contendo o meio seletivo *Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis* (MSRV) (Difco ®, Detroit, MI, EUA), suplementado com novobiocina (Difco ®, Sparks MD, EUA) e verde malaquita, a fim de inibir o crescimento de outras enterobactérias. As placas inoculadas de MSRV foram incubadas a 42°C durante 18 horas. Após este período, colônias com halo esbranquiçado foram transferidas para placas de Petri contendo o meio Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD) (Difco ®, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 36°C durante 24 horas. Após o período de incubação as colônias típicas foram confirmadas como gênero *Salmonella* pelo uso das provas bioquímicas utilizando-se os meios Ágar Lisina-Ferro (LIA) (Difco ®, Detroit, MI, EUA), meio Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) (Difco ®, Detroit, MI, EUA) e do caldo de ureia. As colônias que apresentaram perfil bioquímico condizente com o gênero *Salmonella* foram submetidas a tipagem sorológica utilizando antissoro somático (O) e flagelar (H).

A Figura 4 apresenta, de maneira esquemática, todos os passos utilizados para a identificação de *Salmonella* spp. supracitados anteriormente. A Figura 5 traz sequência analítica para isolamento de *Salmonella* spp. a partir das amostras de lodo. O anexo 1 apresenta a composição química dos meios bem como a função de cada componente químico na diferenciação das enterobactérias..

A concentração de *Salmonella* spp. foi calculada seguindo a Equação 5 abaixo e expressa em NMP/g de peso seco:

$$\text{NMP/g(peso seco)} = \frac{\text{índice de NMP/mL}}{\% \text{ sólidos totais (em decimais)}} \quad \text{Eq. 5}$$

O índice de NMP/ml é um número proveniente de testes estatístico gerados pelo próprio método que varia conforme o número de amostras positivas para *Salmonella* spp.

Figura 4. Esquema do método MSRV para isolamento de *Salmonella* spp em amostras de lodo de esgoto.

(a) Caldo TSB inoculado com lodo de esgoto

(b) Meio semi-sólido Rappaport com colônias típicas de *Salmonella* spp.

(c) Meio sólido XLD com colônias típicas para *Salmonella* spp.

(d) Testes bioquímicos (TSI, LIA, Urease) característicos para *Salmonella* spp.

(e). Sorologia positiva para *Salmonella* spp.

Figura 5. Ilustração do procedimento analítico para determinação de *Salmonella* spp. em amostras de lodo de esgoto.

A fim de determinar os sorotipos circulantes no lodo de esgoto, 40 das 307 cepas isoladas, representativas de todas as amostras previamente examinadas, foram selecionadas a partir da menor e maior diluição das amostras positivas das cinco ETEs. Para proceder a sorotipagem, essas 40 cepas foram enviadas para o Laboratório de Enteropatógenos do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, laboratório de referência na sorotipificação desse gênero. Esses mesmos isolados foram submetidos a ensaios moleculares para a verificação da presença de genes de virulência (*invA*, *sseL* e *spvC*), presença de plasmídeo e também à confirmação do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Typhimurium e Enteriditis

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella* spp.

Para a confirmação do gênero *Salmonella* e dos sorortipos *S. Typhimurium* e *S. Enteriditis* utilizou-se o método descrito por SOUMET et al. (1999).

3.3.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo CHAPMANN et al. (2001). As cepas com sorologia positiva específica para o grupo *Salmonella* spp. foram inoculadas em 10 mL de caldo Lúria e incubadas por 18 a 24 horas a 35°C. A seguir, o crescimento bacteriano obtido foi transferido para tubo de Falcon, com capacidade de 50 mL, e submetido a centrifugação de 5.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* resultante foi ressuspenso com 1 mL de água ultra pura (Mili

Q) estéril, homogeneizado e transferido para microtubo com tampa, com capacidade de 1,5 mL (tipo “Eppendorff”). Efetuou-se nova centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos a temperatura de 24 °C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso com 200 µL de água ultra pura (Mili Q) estéril e submetido a uma temperatura de 95°C por 10 minutos e imediatamente a uma temperatura de -20 °C por 30 minutos. Após o processo de choque térmico as amostras foram submetidas a 65 °C por 1 minuto, e para alcançar temperatura ambiente efetuou-se nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 24 °C. O sobrenadante obtido contendo o DNA foi transferido a um novo microtubo. Quando a amplificação em cadeia pela polimerase (PCR) não foi realizada logo após o término da extração de DNA , as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

3.3.2-Amplificação do DNA

A amplificação foi realizada com o conjunto de primers iniciadores descritos por SOUMET et al. (1999). Resumidamente, as amplificações foram realizadas utilizando 5 µl de amostras de DNA que foram extraídos anteriormente. Estas amostras foram adicionadas a um mix (20 µl) formado por 5 µl de tampão 5x GoTaq, 0,6 µmol de cada iniciador (Invitrogen Corp - Califórnia, EUA), 200 µmol de dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc.), e 1U de Polimerase GoTaq (Promega Inc. - Madison, WI).

Para a reação de PCR foram utilizados três conjuntos de iniciadores: ST11-ST15, específico para gênero *Salmonella* spp; S1-S4 específico para genes de

virulência *Salmonella* Enteritidis e Fli15-Typ04, que é um iniciador específico utilizado para identificar os genes *fliC* que se encontram apenas em *Salmonella* Typhimurium. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf - Hamburgo, Alemanha). Os ciclos utilizados bem como as condições utilizadas durante a reação estão descritas na Tabela 6.

Como controles positivos foram utilizados cepas de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis obtidas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

3.3.3-Detecção dos Genes de Virulência

A partir das 40 cepas isoladas previamente, 35, confirmadas como pertencentes ao grupo *Salmonella* spp., tanto por PCR quanto por sorotipificação pelo IAL, foram também testadas a fim de detectar a presença dos genes de virulência *spvC*, *invA* e *sseL*, segundo o método descrito por PETERSON et al. (2010). Em um volume de reação total de 25 µl, foram adicionadas as seguintes quantidades de reagentes: 5 µl de DNA, 5 µl de tampão 5x GoTaq, 0,3 µmol de cada um dos iniciadores (Bioneer Oligo Synthesis Report - Coreia), 200 µmol de dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc.) e 1U de GoTaq polimerase (Promega Inc. - Wisconsin-EUA) (Tabela 6).

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese utilizando um gel de agarose a 3,0% preparado com tampão TAE 1X e as bandas coradas com brometo de etídio. Um DNA de 100 pb Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) foi incluído como marcador de tamanho. As imagens do gel foram obtidas através de

transiluminação com UV e capturadas por um sistema de documentação de gel (Epi Chemi II Darkroom e Software Labworks - UVP).

Tabela 6. Primers utilizados para a identificação de *Salmonella* spp.(1), *Salmonella* Enteritidis(2), *Salmonella* Typhimurium(3) e Genes de Virulência *spvC*, *invA* and *ssel*.

Alvo	Gene	Sequência dos Primers	Condições do PCR						Tamanho das Bandas	Referências
			DI	NC	D	A	E	EF		
<u>Identificação</u>	ST11	GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA							429pb (1)	
	ST15	GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG								
	Fli15	CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT	94°C	35	94°C	56°C	72°C	72°C	620pb (3)	Soumet et al., 1999
	Typ04	ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT	5 min		30 seg	1.30 min	30 seg	10 min		
	S1	AGGTTTCAGGCAGC GGT TACT							250pb (2)	
	S4	GGGACATTTAGCGTTTCTTG								
<u>Virulência</u>	SPVC-1	ACTCCTTGACAAACCAATGCGGA							571pb	
	SPVC-2	TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA								
	INVA-1	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT				62°C			244pb	
	INVA-2	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT				45 sec				
	PT4 F	GGCGATATAAGTACGACCATCATGG	94°C	35	94°C	step down	72°C	72°C	225pb	Peterson et al., 2010
	PT4 R	GCACGCGGCACAGTTAAAA	15 min		30 seg		1 min	5 min		
	<i>ssel</i> F	TTCCGCGACAACCGACCTTTCTAA				58°C			169pb	
	<i>ssel</i> R	TTCTTGAACCAGACCTTGCGTTGC				45 seg				
	STM2150F	CATAACCCGCCTCGACCTCAT							101pb	
	STM2150R	AGATGTCGTGAGAAGCGGTGG								

DI- Denaturação inicial; NC-Número de Ciclos; D-Denaturação, A-Anelamento, E-Extensão; EF- Extensão Final PT4- Sequências de amplificação de *Salmonella* Enteritidis Fago tipo 4; STM215- Sequências de amplificação de *Salmonella* Typhimurium.

3.3.4 Detecção dos Plasmídeos

As mesmas 35 cepas utilizadas para a detecção dos genes de virulência foram submetidas à extração dos plasmídios utilizando o kit de extração comercial denominado Assistant Plus SV Minipreps DNA (Promega Inc. - Wisconsin-EUA), utilizando 2 mL de cultura de *Salmonella* crescida overnight de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídios foram recuperados em 100 mL de água isenta de nuclease e armazenados a 20°C. Antes da separação dos plasmídios por eletroforese, o material foi aquecido durante 15 minutos a 65°C e em seguida mantido em banho de gelo durante cinco minutos. O mesmo processo foi realizado com o marcador de peso molecular Hind III.

Os plasmídios foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% durante 3 horas a 3,0 V/cm, juntamente com um marcador de peso molecular Hind III (Thermo Fisher Scientific, Inc.). O gel foi corado usando brometo de etídio (10mg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e capturado por Epi Chemi II Darkroom e UVP Bioimaging Systems.

3.3.5 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos

As cepas identificadas como *Salmonella* spp. foram submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica empregando-se a técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Os antibióticos utilizados foram os seguintes: ciprofloxacina (5µg); tetraciclina (30µg); sulfametoxazol-trimetoprim (25µg); cefotetano (30µg); cefotaxima (30µg); ceftazidima

(30µg); cefepima (30µg); aztreonam (30µg); imipenem (10µg); meropenem (10µg); e ertapenem (10µg). No caso da resistência à β -lactâmicos foram realizados mais testes para a detecção da produção da enzima β -lactamase (DROPA et al., 2009). Para a interpretação de zonas de inibição foram utilizados os critérios da CLSI (2012).

3.4 ESTIMATIVA DE RISCO

A probabilidade de infecção por *Salmonella* spp. pelo consumo de hortaliças (alface, tomate e cenoura) cultivadas em solo acondicionados com lodos de esgoto assim como para trabalhadores nos campos agrícolas foram calculadas considerando as seguintes variáveis: concentração de *Salmonella* spp. nas amostras de lodos de esgoto; diluição do lodo de esgoto no solo; taxa de ingestão das culturas por sexo e idade; variação da concentração de *Salmonella* spp. no solo (recrescimento ou não); variação da temperatura média durante as estações do ano; tempo de exposição à temperatura ambiente (temperatura de abuso) após a colheita; variação da concentração de *Salmonella* spp. nas hortaliças; taxa de adesão de lodo nas hortaliças bem como taxa de ingestão acidental de partículas de solo pelos trabalhadores.

3.4.1 Concentração de *Salmonella* spp. no Lodo

Observou-se variação dos valores de concentração de *Salmonella* dentre as ETEs estudadas. O primeiro passo foi o de realizar agrupamentos para se definir padrões de concentração encontrados nas cinco ETEs. Isto foi realizado utilizando o teste pareado entre as diferentes concentrações encontradas. Um dos procedimentos de teste mais

comuns é o teste t de Student (DE GROOT, 2011), que assume que as diferenças entre as observações seguem uma distribuição normal. Devido à elevada ocorrência de amostras com concentrações abaixo do limite de detecção (LD), o pressuposto de normalidade não foi observado e, por conseguinte, o teste t de Student não foi utilizado por não ser considerado adequado para estas situações. Assim, foi aplicado o teste de sinal proposto por PUTTER (1955), denominado teste assintótico não randomizado uniformemente de maior poder (ANU), que é conceitualmente simples e apresenta bons resultados empíricos (COAKLEY & HEISE, 1996).

Para o cálculo dos riscos de infecção anuais as concentrações de *Salmonella* spp. obtidas nas ETEs 1,3,e 5 não foram utilizadas, uma vez que a maior parte dos resultados estavam abaixo do limite de detecção

Os valores de concentração obtidos nas ETEs que apresentaram níveis de significância (valor-p) maiores do que 0,1 foram considerados equivalentes. As ETEs 2 e 4 não apresentaram semelhanças entre si sendo, portanto, tratadas separadamente.

Para conjuntos de dados com cinco ou mais amostras positivas, como foram os casos de das ETEs 2 e 4, os dados de concentrações foram modelados considerando inicialmente quatro distribuições: triangular, lognormal, gama e Weibull.

Estas foram ajustadas pelo método de máxima verossimilhança, adaptado aos dados esquerdo censurado (amostras com concentrações abaixo do limite de detecção). Distribuições lognormal, gama e Weibull foram geradas usando o pacote "fitdistrplus" R (DELIGNETTE-MULLER et al., 2014). A distribuição triangular foi desenvolvida em R (R Core Team, 2012). Para as ETEs 2 e 4, a distribuição que produziu a máxima verossimilhança foi a gama cujos parâmetros são apresentados na Quadro 2. A Figura 6

ilustra as concentrações de *Salmonella* spp. nas ETE 2 e 4 e as Figuras 7 e 8 apresentam as distribuições das concentrações de *Salmonella* spp. nas ETEs 2 e 4.

Figura 6. Concentrações de *Salmonella* spp. nas ETE 2 e 4

Figura 7. Diferentes distribuições testadas para os valores das concentrações de *Salmonella* spp. na ETE 2

Figura 8. Diferentes distribuições testadas para os valores de concentração de *Salmonella* spp. na ETE 4

3.4.2 Diluição do Lodo de Esgoto no Solo

Para a diluição do lodo de esgoto no solo adotamos como fatores de diluição as distribuições triangulares calculadas por MAGALHÃES (2012) (Quadro 2). O autor utilizou, como base para os seus cálculos, as recomendações de aplicação de nitrogênio, fósforo e potássio em cultivos, de hortaliças tuberosas, folhosas e frutosas propostas por NOVAIS (2010) e RIBEIRO et al. (1999), ambos citados por MAGALHÃES (2012) e solo de $1,5 \text{ g/cm}^3$ como descrito ANDREOLI et al. (2001). A Figura 9 traz as

distribuições dos fatores de incorporação de lodo de esgoto no solo para as diferentes hortaliças.

Figura 9. Distribuições dos fatores de incorporação de lodo de esgoto no solo para o cultivo de diferentes hortaliças

3.4.3 Taxas de Ingestão das Hortaliças

As taxas de ingestão diárias de alface, tomate e cenoura para adultos (homens e mulheres) foram obtidas da pesquisa realizada por CARLOS et al. (2008) a partir de recordatório aplicado na cidade de São Paulo. Nesta pesquisa, 1.562 adultos foram convidados a relatar o que haviam comido nas últimas 24 horas. Distribuições triangulares foram aplicadas com os respectivos parâmetros descritos no Quadro 2.

Para crianças as taxas ingeridas foram obtidas por comunicação pessoal com a Doutora Betzabeth Slater Villar, pesquisadora do departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP, que nos relatou os dados obtidos em uma pesquisa dos hábitos alimentares de crianças e adolescentes da cidade de Piracicaba. Nesse caso, nenhuma distribuição foi aplicada, uma vez que os dados apresentavam somente um valor diário para a ingestão de alface, tomate e cenoura. (Quadro 2). As Figuras 10, 11 e 12 apresentam, em gráficos, as distribuições das taxas diárias de ingestão destas hortaliças.

Figura 10. Distribuição da ingestão diária de alface - adultos

Figura 11. Distribuição da ingestão diária de tomate

Figura 12. Distribuição da ingestão diária de cenoura

3.4.4 Variação da Concentração de *Salmonella* spp. nos Solos Tratados com Lodo de Esgoto

EAMENS et al (2006) e GIBBS et al. (1997) realizaram estudos na Austrália, país no qual as condições climáticas são semelhantes às do Brasil (verões muito quentes e úmidos e invernos frios e secos), nos quais obtiveram variação na concentração de *Salmonella* spp de cerca de 3 log e 2,16 log, respectivamente, em solo tratado com lodo de esgoto. Esses autores demonstraram que mesmo quando este microrganismo já havia alcançado o limite de detecção em suas amostras houve recrescimento de *Salmonella* spp. Este ocorreu após 68 semanas desde a aplicação de o lodo de esgoto no solo.

NICHOLSON et al. (2005), constataram que *Salmonella* spp podem sobreviver em solo até 968 dias e MARSH et al. (1998) observaram que mesmo que esta bactéria não possa ser detectada usando os métodos de cultivo comuns, podem se encontrar em estado descrito como viável, mas não cultivável (VBNC) inclusive conservando seu potencial patogênico por longos períodos. Por sua vez, BRANDL et al. (2005) mostraram que a *Salmonella* spp. podem sobreviver mutualisticamente dentro do protozoário *Tetrahyma* spp., garantindo assim proteção contra fatores ambientais estressantes.

Nesse estudo, a variação da concentração de *Salmonella* spp. após aplicação de lodo de esgoto no solo baseou-se nos experimentos realizados por EAMENS et al (2006), no qual avaliaram os padrões de sobrevivência e o recrescimento de *Salmonella* spp., dentre outras enterobactérias, tanto em lodos de esgoto quanto em solos acondicionados com aqueles. O experimento consistiu na aplicação de amostras de lodos desidratados produzidos na ETE Cronulla, localizada em Sydney, em um terreno

agrícola em Gouburn, NSW. A medição das concentrações destes organismos foi realizada mensalmente durante 68 meses. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2x2, considerando-se duas taxas de aplicação do resíduo (10 e 30 t / ha) e dois métodos de aplicação (deixando o lodo na superfície do solo ou incorporando-o ao solo dentro de 36 h após a aplicação daquele). Para cada dia de amostragem e condição, duas sub-amostras foram recolhidas. As diferenças na concentração entre as taxas de aplicação dos lodos foram consideradas como não significativas e, portanto, as amostras correspondentes foram agrupadas, perfazendo quatro medidas por dia, e por método de aplicação. A nosso pedido, o Dr Eamens e seus colaboradores gentilmente forneceram as medidas de concentração brutas experimentais nas quais se observou recrescimento bacteriano, ou seja, recrescimento após atingirem baixos níveis de concentração no solo.

De posse desses dados foi calculada a média geométrica correspondente para cada conjunto de medidas de concentração por dia e método de aplicação. A variação da concentração da bactéria foi obtida dividindo-se a média geométrica das concentrações em cada dia de amostragem pela média geométrica das concentrações iniciais nos lodos, imediatamente antes da sua aplicação no solo. Esses dados foram ajustados considerando as quatro distribuições via método da máxima verossimilhança: triangular, gamma, log-normal e Weibull. A distribuição que resultou na máxima verossimilhança foi a log-normal cujos parâmetros estão descritos na Quadro 2.

O nosso estudo é o primeiro a considerar a variação na concentração de *Salmonella* spp. no solo em um cenário com a abordagem da AQRM. Vale ressaltar que a cepa *S. Typhimurium* não estava presente nos dois trabalhos australianos nos quais o fenômeno da variação no crescimento destas bactérias foi observado. GIBBS et al.

(1997) isolaram o sorotipo *S. Mbandaka* em seus experimentos de recrescimento e EAMENS et al. (2006) não encontraram *S. Typhimurium* nos lodos de esgoto empregados em seus ensaios. Outros sorotipos foram encontrados por estes últimos autores como *S. Cubana*, *S. Havana*, *S. Ohio*, *S. Senftenberg* e *S. Tennessee*.

Apesar da ausência de *S. Typhimurium* nos estudos citados, assumimos que este sorotipo também possui a habilidade de recrescimento observado em outros sorotipos de *Salmonella* uma vez que o mesmo é um dos sorotipos mais comumente encontrado em amostras ambientais. A Figura 13 apresenta a distribuição dos fatores de recrescimento de *Salmonella* spp. no solo.

Figura 13. Distribuição dos fatores de recrescimento de *Salmonella* spp. no solo.

3.4.5 Taxas de Adesão de Solo nas Hortaliças

Dois estudos diferentes avaliaram a quantidade de solo que se adere à alface e cenouras. GALE (2003) assume valores obtidos a partir de pareceres de agricultores. Já MAGALHÃES (2012), a partir de experimentos conduzidos pelo próprio autor, descreve quantidades menores de solo aderidas a essas hortaliças. Ambos os trabalhos foram considerados, sendo os respectivos valores utilizados como parâmetros da distribuição uniforme (Quadro 2).

Nosso estudo é o primeiro a construir um cenário onde é considerada a contaminação de tomates por meio da transferência de *Salmonella* spp. pelo solo acondicionado com lodos de esgotos. A principal dificuldade encontrada, diferentemente do que ocorreu em relação à alface e cenoura, foi obter dados das taxas de transferência de solo para os tomates. Frente a esta lacuna, assumimos uma transferência de 1,0 log menor do que ocorre em relação às cenouras, ou seja, 0,3g de solo aderido no vegetal. CEVALLOS e CEVALLOS (2012) realizaram um experimento no qual comprovaram a transferência de *Salmonella* spp. presente no solo para o tomate através de gotículas de água oriundas de águas de irrigação ou mesmo de chuva. Há também a possibilidade dessas bactérias alcançarem os tomates, bem como outras plantas, através de carreamento mecânicos por insetos e vento (BRANDL, 2006). Nesse estudo consideramos a transferência de *Salmonella* spp. a partir do solo como única forma de contaminação para todos os cenários propostos. A Figura 14 apresenta a distribuição dos fatores de agregação de solo nas hortaliças.

Figura 14. Distribuição dos fatores de agregação de solo nas hortaliças

3.4.6 Temperaturas Médias por Estação do Ano

Os dados de temperaturas médias diárias dos anos de 2011 e 2012 foram obtidos junto ao Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG, 2013). As temperaturas médias diárias destes dois anos foram separadas pelas diferentes estações do ano e uma distribuição normal foi aplicada (Quadro 2). A Figura 15 apresenta a distribuição das temperaturas por estações do ano.

Figura 15. Distribuição da variação das temperaturas por estações do ano

3.4.7 Tempo de Exposição das Hortaliças à Temperatura de Abuso Pós-Colheita

Em pesquisa realizada por comunicação oral com funcionários do Centro de Estadual de Abastecimento de São Paulo (CEAGESP- SP), departamento do governo do Estado de São Paulo que recebe e distribui todas as culturas que são comercializadas na Região Metropolitana de São Paulo, fomos informados que, considerando o transporte do campo para CEAGESP e daí às feiras públicas se gastam, em média, de 24h a 29h. Estas horas foram utilizadas como valor mínimo e máximo em distribuição uniforme para se estimar o tempo de exposição no qual os cultivos são expostos quando não refrigeradas (abuso) pós-colheita (Quadro 2). A Figura 16 apresenta os tempos de abuso pós-colheita.

Figura 16. Distribuição do tempo de temperatura de abuso pós-colheita

3.4.8 Variação da Concentração de *Salmonella* spp. nas Hortaliças

SANT'ANA et al. (2012b), realizaram estudo no qual avaliaram o crescimento de *Salmonella* spp. em alface. Utilizando a equação desenvolvida por BARANYI e ROBERTS (1994) (Equação 10) para o crescimento de microrganismos estes autores obtiveram a equação da taxa de crescimento (μ) (Equação 6) bem como o crescimento na fase lag (λ) (Equação 7) de *Salmonella* spp. em alface. A fim de calcularmos em nosso estudo o crescimento de *Salmonella* spp., em alface, utilizamos as taxas de crescimento e de fase lag obtidas no trabalho de SANT'ANA et al. (2012b). Já para o tomate a taxa de crescimento foi obtida a partir do estudo de WENJING (2010), onde não foi apresentada uma equação para a fase lag, sendo este valor obtido a partir de outro estudo realizado pela USFDA (2007) sobre a segurança alimentar e crescimento de *Salmonella* spp. em tomates.

Esses dados foram utilizados para calcular a concentração final da bactéria no tempo t utilizando a equação proposta por BARANYI e ROBERTS (1994), (Equação 9).

3.4.8.1 Taxas de Crescimento e Fase lag para *Salmonella* spp. em Alface

(SANT'ANA et al, 2012b):

$$\sqrt{\mu} = 0,0178 (T + 4.6) \quad \text{Eq. 6}$$

$$\ln (\lambda) = - 0,0118 (T - 32.3) \quad \text{Eq. 7}$$

3.4.8.2 Taxas de Crescimento e Fase lag para *Salmonella* spp. em Tomates

(WENJING, 2010):

$$\sqrt{\mu} = 0,026 * T - 0,107 \quad \text{Eq. 8}$$

$$\lambda = 3,4 \text{ (USFDA, 2007)}$$

Onde:

μ = Taxa de crescimento (Log UFC/g/ h)

T = Temperatura (°C)

Equação de crescimento de microrganismos em hortaliças (BARANYI e ROBERTS, 1994):

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right]$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{\max} t)} + q_0}{1 + q_0} \right)$$

Eq. 9

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{\mu_{\max}}$$

Onde:

$\mu_{\max}$ = crescimento exponencial de *Salmonella* spp.

λ = lag time (h)

t = tempo (h). Esta variável foi descrita no item 3.4.7 desta seção.

$\ln(N_0)$ = concentração inicial de *Salmonella* spp. nas hortaliças¹ (g solo aderido/g hortaliça²)

$\ln(N_{\max})$ = concentração máxima de *Salmonella* spp. nas hortaliças³ (bactérias/g hortaliça²)

$\ln(N(t))$ = log da concentração de *Salmonella* spp. no tempo t (bactérias/g hortaliça²)

¹A fim de calcularmos a concentração inicial de bactérias transportadas pelo solo que se aderem às diferentes hortaliças utilizou-se distribuição de Poisson tendo em vista ser este um fenômeno estocástico como segue: Poisson ($[Sal.]_{no\ lodo} \times Dil. Sal. no\ solo \times Solo aderido\ ao\ vegetal$) $\times Sal. variação\ no\ solo /$ peso das hortaliças***

²Pé de Alface: 400g; 1 tomate: 100g e uma cenoura: 150g

³Para alface: Segundo MANIOS et al. (2013), partindo de uma baixa concentração de 1 a 4 células de *Salmonella* Typhimurium e atingindo o máximo de aproximadamente 3000 UFC/g em salada de folhas verdes.

³Para tomates: Segundo BEUCHAT e MANN (2008) e ASPLUND e NURMI (1991) (diversos sorotipos de *Salmonella* spp.), partindo de uma concentração de 0,08 log UFC/g de tomate e atingindo a concentração final de até 10⁸ UFC/g de tomate.

Estudos têm relatado que a cenoura apresenta fator de inibição microbiana (SANT'ANA et al., 2012a., LIAO et al., 2007., VISWANATHAN e KAUR, 2001). LIAO et al., (2007) contribuíram no esclarecimento dessa questão ao relatarem que os mecanismos responsáveis pela atividade inibitória microbiana nas cenouras estão relacionados tanto com a atividade antimicrobiana do próprio tecido vegetal quanto à microbiota antagonica a enterobactérias presentes na superfície daquelas.

Outros autores já haviam descrito que substâncias presentes nos tecidos das cenouras, como diferentes compostos fenólicos, possuem um elevado potencial de inibição em relação à bactéria *Listeria monocytogenes* (NGUYEN e LUND; 1991; NORIEGA et al., 2010; SANT'ANNA et al., 2012a). Porém, os estudos de LIAO et al. (2007) esclareceram que, para *Salmonellas* spp., a inibição não se encontra em compostos presentes nos tecidos vegetais e sim na inibição promovida pela microbiota epifítica presente nas cenouras.

Portanto, diferentemente do que foi considerado em relação à alface e ao tomate, nesse estudo assumimos um decaimento na concentração de *Salmonella* spp. quando o solo entra em contato com as cenouras. Os parâmetros para este decaimento foram obtidos a partir do estudo de LIAO et al. (2007) onde é descrita, através de um experimento de co-cultura com *Salmonella* spp. e a microbiota epifítica da cenoura cultivadas em diferentes concentrações, a inibição que a microbiota epifítica exerce em relação a *Salmonella* spp. Estes valores foram aplicados em uma distribuição uniforme (Quadro 2). A Figura 17 traz a distribuição dos fatores de inibição de *Salmonella* spp. na cenoura.

Figura 17. Distribuição dos fatores de inibição de *Salmonella* spp. na cenoura

HIRNEISEN et al. (2012), descreveram que a internalização de *Salmonella* spp. também ocorre via raízes dos vegetais. Em nosso estudo não consideramos esta rota pois os estudos de internalização via raiz são realizados com elevadas concentrações iniciais de *Salmonella* spp. (10^6 - 10^9 UFC/mL) diferentemente do que ocorre em nossos cenários.

Devido ao fenômeno da internalização, alguns estudos demonstraram que lavar as hortaliças após a colheita e antes do consumo não é um método eficaz na redução da contaminação por microrganismos (BEUCHAT et al., 2002; BERGER et al., 2010; DEERING et al., 2012). Por esta razão, não se considerou, em nenhum dos cenários de exposição o decaimento bacteriano devido à lavagem ou descamação superficial das hortaliças. Logo, a lavagem não seria uma das barreiras sanitárias mais eficientes na diminuição dos riscos de infecção.

3.4.9 Cálculo da Dose

Para o cálculo da dose (d) foi utilizada distribuição de Poisson uma vez que as bactérias presentes nas hortaliças não se encontram distribuídas uniformemente. As Equações 10, 11 e 12 mostram o cálculo da dose em função da hortaliça consumida, como segue:

$$\textbf{Alface: } \text{Poisson } (N(t) \times \text{Ingestão de alface}) \quad \text{Eq. 10}$$

$$\textbf{Tomate : } \text{Poisson } (N(t) \times \text{Ingestão de tomate}) \quad \text{Eq. 11}$$

$$\textbf{Cenoura: } \text{Poisson } (N(t) \times \text{Ingestão de cenoura}) \quad \text{Eq. 12}$$

Onde:

$\ln (N(t)) = \log$ da concentração de *Salmonella* spp. no tempo t (bactérias/g hortaliça)

3.4.10 Dose – resposta

A dose-resposta para *Salmonella* spp. é uma distribuição Beta Poisson cujos parâmetros são $\alpha = 0,3126$ e $N_{50} = 2,36 \times 10^4$ (HAAS et al., 1999).

3.4.11 Probabilidade de infecção diária $P_i(d)$ e anual $P_i(A)$.

$$P_i(d) = 1 - [1 + (d/N_{50}) * (2^{1/\alpha} - 1)]^{-\alpha} \quad \text{Eq. 13}$$

$$P_i(A) = 1 - \prod_{j=1}^{365} (1 - P_i^{(j)}) \quad \text{Eq. 14}$$

Onde:

$P_i(d)$ = Probabilidade de infecção diária

$P_i(A)$ = probabilidade de infecção anual

d = Dose

$\alpha = 0,3126$

$N_{50} = 2,36 \times 10^4$

n = Número de evento ($n = 365$ dias)

3.4.12 Risco de infecção para os Trabalhadores Agrícolas

Para o cálculo do risco de infecção dos trabalhadores no campo que manipulam tanto os lodos de esgoto (aplicando-os aos solos) bem como daqueles que entram em contato direto com solo acondicionado com lodos de esgoto, utilizamos uma taxa de ingestão acidental de partículas sólidas descritas no *Exposure Factors Handbook: 2011 Edition* (USEPA, 2011), assumindo, para os dados apresentados neste documento, distribuição uniforme das taxas de ingestão de solo (Quadro 2). A Figura 18 apresenta as distribuições das taxas diárias de ingestão de solo/lodo pelos trabalhadores.

Figura 18. Distribuição da taxa de ingestão diária de solo/lodo pelos trabalhadores

Para ambos os casos assumimos o pior cenário onde os mesmos não utilizariam equipamentos de proteção individual (EPIs) ou os utilizando de forma inadequada.

Em relação aos dias de trabalho para ambos os cenários adotamos a frequência descrita no estudo de BASTOS et al. (2009), sendo 240 dias para trabalhadores que lidam com o solo acondicionado e 120 dias para trabalhadores que aplicam os lodos de esgoto nos solos. As doses para estes trabalhadores foram calculadas como se segue:

A-Manipulador de solo acondicionado: $[Sal.]_{no\ solo} \times Dil. Sal. no\ solo \times Sal. variação\ no\ solo \times$
 $Ingestão_{solo}$

B-Aplicador de lodo de esgoto: $[Sal.]_{no\ lodo\ esgoto} \times Ingestão_{lodo\ de\ esgoto}$

Em relação à diluição de lodos de esgoto nos solos (item A) utilizamos o cenário mais conservador que foi a diluição utilizada para o plantio de alface (ver item 3.4.4 e Quadro 2).

3.4.13 Análise das Incertezas e Sensibilidades

A simulação de Monte Carlo (SMC) usando o programa R foi utilizada para tratar as incertezas e variabilidade, fornecendo 50.000 iterações. O resultado obtido corresponde, então, aos valores de exposição ou risco correspondente a uma probabilidade específica com grau de confiança de 95%.

3.4.14 – Sistematização dos Cenários

Para a melhor sistematização de todas as variáveis apresentadas nos itens anteriores foram construídos nove cenários diferentes, considerando, principalmente, a presença ou ausência do crescimento de *Salmonella* spp. no solo e nas hortaliças. A Tabela 7 apresenta todos os cenários e o Quadro 2 mostra as variáveis e parâmetros dos ajustes das distribuições utilizadas em cada um destes.

Tabela 7. Descrição dos diferentes cenários construídos neste estudo.

	Risco de Infecção relacionado a	Variação da contração de <i>Salmonella</i> spp. presente no solo	Crescimento de <i>Salmonella</i> spp. na hortaliça
Cenário 1	alface / tomate	presente	presente
Cenário 2	alface / tomate	presente	ausente
Cenário 3	alface / tomate	ausente	presente
Cenário 4	alface / tomate	ausente	ausente
Cenário 5	cenoura	presente	inibição
Cenário 6	cenoura	ausente	inibição
Cenário 7	trabalhador do campo*	presente	NA
Cenário 8	trabalhador do campo*	ausente	NA
Cenário 9	trabalhador do campo**	NA	NA

NA: não se aplica.

* trabalha diretamente com solo acondicionado com lodos de esgoto

** trabalha aplicando lodo de esgoto em solos agrícolas

Quadro 2: Síntese da caracterização das variáveis utilizadas para construção do modelo AQMR

Variáveis	Detalhamento das Variáveis	Sexo e Idade	Distribuições	Parâmetros			Referências
Concentração de <i>Salmonella</i> spp. nos lodos (NMP/4g)	ETE 2	NA	Gamma	$\alpha = 0,71677494$	$\beta = 23,9758921$		Autor
	ETE 4	NA	Gamma	$\alpha = 0,27977392$	$\beta = 8,5920457$		
Diluição de <i>Salmonella</i> spp. no solo	Alface	NA	Triangular	mín. = 0,0018	moda = 0,0044	máx. = 0,0128	MAGALHÃES (2012) ANDREOLI et al. (2001)
	Cenoura	NA	Triangular	mín. = 0,0012	moda = 0,0036	máx. = 0,0094	
	Tomate	NA	Triangular	mín. = 0,0015	moda = 0,0039	máx. = 0,0121	
Taxas de ingestão das hortaliças (g/dia)	Alface	Adultos	Triangular	mín. = 20	moda = 30	máx. = 50	CARLOS et al. 2008
		Crianças*	NA	NA	NA	NA	VILLAR (2013)
	Cenoura	Homens	Triangular	mín. = 24	moda = 25	máx. = 56	CARLOS et al. 2008
		Mulheres	Triangular	mín. = 10	moda = 22	máx. = 48	
		Crianças*	NA	NA	NA	NA	VILLAR (2013)
	Tomate	Homens	Triangular	mín. = 30	moda = 55	máx. = 91	CARLOS et al. 2008
		Mulheres	Triangular	mín. = 30	moda = 45,5	máx. = 60	
		Crianças*	NA	NA	NA	NA	VILLAR (2013)

(*) alface=32,3g/dia; cenoura=43,3g/dia; tomate= 44,0g/dia

Quadro 2: continuação

Variáveis	Detalhamento das Variáveis	Sexo e Idade	Distribuições	Parâmetros		Referências
Variação da concentração de <i>Salmonella</i> spp. no solo	NA	NA	Lognormal	$\mu = 0,7367$	$\sigma = 4,2121$	EAMENS et al. 2006; Autor
Temperaturas médias das estações do ano (°C)	Verão	NA	Normal	$\mu = 22,252$	$\sigma = 1,9929$	IAG, 2013
	Primavera	NA	Normal	$\mu = 20,127$	$\sigma = 3,1102$	
	Outono	NA	Normal	$\mu = 18,682$	$\sigma = 3,1826$	
	Inverno	NA	Normal	$\mu = 17,205$	$\sigma = 2,886$	
Horas de exposição das hortaliças às temperaturas de abuso pós-colheita (h)	NA	NA	Uniforme	mín. = 24	máx. = 29	CEAGESP
Concentração inicial de <i>Salmonella</i> spp. nas hortaliças ($g_{\text{solo aderido}}/g_{\text{hortaliça}}$)	NA	NA	Poisson	$(Sal_{\text{conc.solo}} \times Solo_{\text{aderido ao vegetal}}) \times Sal_{\text{variação no solo}}$		Autor
Inibição de crescimento de <i>Salmonella</i> spp. em cenouras (1/log)	Cenoura	NA	Uniforme	mín. = 2	máx. = 3	LIAO et al., 2007
Taxa de fixação do solo nos cultivos (g)	Alface	NA	Uniforme	mín. = 0,55	máx. = 0,8	GALE, 2003 ; MAGALHÃES, 2012
	Cenoura	NA	Uniforme	mín. = 1,7	máx. = 3,0	
	Tomate	NA	Uniforme	mín. = 0,1	máx. = 0,3	Autor
Cálculo da Dose	NA	NA	Poisson	$(N(t) \times \text{Ingestão})$	NA	Autor
Ingestão de lodo de esgoto e solo tratado com lodo por trabalhadores (g/dia)	Ingestão de partículas	NA	Uniforme	mín. = 0,1	máx. = 0,625	EPA, 2011
Diluição de lodo no solo no cenário de ingestão de solo por trabalhadores	Diluição de lodo no solo	NA	Triangular	mín. = 0,0018	moda = 0,0044/máx. = 0,0128	MAGALHÃES, 2012

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONCENTRAÇÃO DE *Salmonella* spp. NOS LODOS DE ESGOTO

No total, 54 amostras foram coletadas em cinco ETEs ao longo dos 12 meses e analisadas para a detecção de *Salmonella* spp. A Tabela 8 mostra as concentrações de *Salmonella* spp. obtidas das amostras de lodo de esgoto de cada ETE avaliada.

Tabela 8: Concentrações de *Salmonella* spp. (NMP/gST) em amostras de lodo de esgoto coletadas nas 5 ETEs em 2011.

Data	ETE 1 (NMP/gST)	ETE 2 (NMP/gST)	ETE 3 (NMP/gST)	ETE 4 (NMP/gST)	ETE 5 (NMP/gST)
Jan	< 0,2012	< 0,1828	< 0,2080	0,43	< 0,2008
Fev	< 0,2004	1,74	NR	0,49	0,43
Mar	< 0,1716	3,72	< 0,1804	< 0,2084	< 0,1668
Abr	< 0,1848	6,03	< 0,2048	0,21	< 0,1732
Mai	< 0,1848	4,81	< 0,2196	< 0,3	< 0,1576
Jun	< 0,1712	5,63	< 0,2792	NR	< 0,2132
Jul	< 0,2100	2,28	NR	1,32	< 0,1928
Ago	< 0,2236	12,20	NR	< 1,1828	< 0,1412
Set	< 0,2484	3,29	NR	0,69	< 0,2368
Out	< 0,2228	1,66	< 0,2036	0,76	< 0,2112
Nov	0,75	5,74	NR	0,85	< 0,1882
Dez	< 0,1912	4,45	< 0,1844	1,86	< 0,2020

NR= Não Realizado

Cepas de *Salmonella* spp. foram detectadas em 38,9% (21/54) de todas as amostras analisadas. A concentração mais elevada foi encontrada na ETE 2, na qual as concentrações variaram desde o limite de detecção (LD) até 12,19 NMP/g. As menores concentrações de *Salmonella* spp. foram encontradas na ETE 1 (0,75 NMP/g) e ETE 5 (0,43 NMP/g), e na ETE 3 todas as amostras se apresentaram sempre abaixo do limite de detecção (LD).

Observando a Tabela 8 podemos notar diferenças nas concentrações de *Salmonella* spp. entre as cinco ETEs avaliadas. Nas ETEs 1, 3, e 5 foram realizadas aplicações de cal como agente condicionante no lodo de esgoto que, de acordo com BEAN et al. (2007), pode ser considerado como um método de estabilização alcalina uma vez que eleva os valores de pH acima de 13, eliminando, assim, a maioria das bactérias presentes no lodo de esgoto. Já nas ETEs 2 e 4, onde a estabilização de cal não foi realizada, a concentração de *Salmonella* spp. foi mais elevada.

Comparando os resultados deste estudo (Tabela 8) com trabalhos realizados no Estado de São Paulo e no Estado do Paraná, percebe-se que os mesmos são similares em relação à concentração desta bactéria nos lodos de esgoto. MARQUES et al. (2000) obtiveram ausência de *Salmonella* spp. em amostras de lodo de esgotos na ETE Barueri em estudo realizado nos anos de 1997 e 1998. Mais tarde, estes mesmos autores avaliaram a concentração de *Salmonella* em amostras de lodo de esgoto da mesma ETE e encontraram valores de 9,12 NMP/g. VANZO et al. (2000), em estudo realizado na ETE Franca, encontraram concentração dessa bactéria de 0,78 NMP/g nas amostras de lodo. Já TSUTYIA et al. (2001) obtiveram ausência desse gênero nas amostras das ETEs de Barueri e Suzano. No Estado do Paraná, SANTOS et al. (2011) não detectaram

Salmonella spp. nas amostras de lodo analisadas na ETE Rio das Antas, no Município de Irati.

A ausência de *Salmonella* spp. nas ETEs de Barueri e Suzano nos estudos relatados anteriormente poderia ser explicada pelo fato de que a ETE Barueri, desde a sua criação até o ano 2000, utilizava cal como condicionante do lodo de esgoto (TSUTYIA et al. 2001); já a ETE Suzano ainda utiliza dessa prática (SABESP, 2011).

Quando comparamos a frequência da presença de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas neste estudo assim como os valores de concentração dessa bactéria com estudos realizados em outros países verificamos elevada variabilidade nestes dois parâmetros. No presente estudo a frequência de amostras positivas (acima do LD) foi de 38,9% (21/54) das amostras. Já estudos realizados por JONES et al. (1980) e SAHLSTRÖM et al. (2004), registraram frequência positiva de 92-100% (n = 91) e 58% (n = 24), respectivamente. Em nosso estudo a concentração mais elevada de *Salmonella* spp. foi encontrada na ETE 2 ($1,2 \times 10^1$ NMP/gST), resultado semelhante com as menores concentrações apresentadas em uma revisão da literatura por SIDHU e TOZE (2009), onde as concentrações de *Salmonella* spp. variaram de $1,1 \times 10^1$ NMP/gST (Nantes, França) a $5,9 \times 10^3$ NMP/gST (Austrália).

WONG et al. (2010) constataram concentrações mais baixas de *Salmonella* spp. do que as apresentadas nos estudos acima, variando de 0,122NMP/gST a 0,238 NMP/gST em lodos de esgoto de uma ETE em Michigan (EUA). Já JIMENEZ et al. (2000) encontraram concentrações de *Salmonella* spp. em ETEs na Cidade do México, da ordem de $1,1 \times 10^{10}$ NMP/gST.

Tais diferenças poderiam ser explicadas pela presença de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos encontrados nos lodos de esgoto, que podem atuar como inibidores ou mesmo como promotores do crescimento bacteriano, também o tipo de tratamento empregado, além do perfil epidemiológico da população, que varia conforme o país analisado. Todos estes fatores devem ser considerados para a compreensão de diferenças tão marcantes na concentração de *Salmonella* spp. nos lodos de esgoto produzido ao redor do mundo (SAHLSTRÖM, 2004).

Os nossos resultados demonstram que *Salmonella* spp continua presente nos lodos de esgoto e circulando nos diferentes sistemas de tratamento de esgoto das ETEs da Região Metropolitana de São Paulo, mantendo-se em concentração estável quando comparandos com os resultados de estudos realizados anteriormente.

4.2 SOROTIPIFICAÇÃO, PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA, DETECÇÃO DE PLASMÍDEO E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Das 40 cepas que foram submetidas para a identificação sorológica, 35 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Salmonella*; o mesmo resultado foi obtido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a técnica descrita por SOUMET et al. (1999). A Figura 19 (A) ilustra os resultados obtidos a partir dos ensaios moleculares, evidenciando a presença do fragmento de 429bp esperada para todas as cepas do gênero *Salmonella* spp., e do fragmento de 620bp característica de *Salmonella* Typhimurium. Nenhuma cepa de *Salmonella* Enteritidis foi identificada na reação da

PCR. Como demonstrado na Figura 19(A) três cepas (4, 28 e 468) apresentaram, além do fragmento de 429 pb o fragmento de 620bp.

Os resultados relativos à detecção de genes de virulência e presença de plasmídeos das 35 cepas previamente selecionadas são apresentados na Figura 19 (B e C). Já os resultados relacionados à suscetibilidade a antimicrobianos são apresentados na Tabela 9.

Figura 19: Imagem dos géis de agarose de PCR com os resultados obtidos para a identificação de *Salmonella* spp. isoladas de lodo de esgoto, presença de genes de virulência e perfil plasmidial. **A-** Identificação de *Salmonella* spp. Cepas 397 e 398: controle positivo para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, respectivamente. **B-** Detecção dos genes de virulência: *sseL* (169pb), *invA* (244pb) e *sdvC* (571 pb). **C-** Perfil plasmidial: **M-** Marcadores de peso molecular.

Tabela 9: Sorologia, presença de genes de virulência, plasmídeos e resistência a antibióticos em 40 cepas de *Salmonella* spp isoladas em lodos de esgoto.

Fonte da Amostra	Sorovares	Presença de Genes Virulência			Plasmídeos	Resistência a Antibióticos
		<i>invA</i>	<i>sseL</i>	<i>spvC</i>		
ETE 2	Infantis	+	+	-	+	S
ETE 2	Infantis	+	+	-	-	S
ETE 2	Infantis	+	+	-	-	S
ETE 2	Infantis	+	+	-	-	S
ETE 4	Infantis	+	+	-	-	S
ETE 4	Infantis	+	+	-	-	S
ETE 2	Agona	+	+	-	-	S
ETE 2	Agona	+	+	-	-	AMP, CIP
ETE 2	Agona	+	+	-	-	S
ETE 2	Agona	+	+	-	-	S
ETE 4	Agona	+	+	-	-	S
ETE 2	Anatum	+	+	-	+	TET, SUT
ETE 2	Anatum	+	+	-	+	TET, SUT
ETE 2	Anatum	+	+	-	-	S
ETE 4	Corvalis	+	+	-	+	S
ETE 4	Corvalis	+	+	-	+	S
ETE 4	Corvalis	+	+	-	+	S
ETE 2	Mbandaka	+	+	-	-	S
ETE 4	Mbandaka	+	+	-	-	S
ETE 4	Mbandaka	+	+	-	-	S
ETE 4	Typhimurium	+	+	-	+	TET, AMP, SUT
ETE 5	Typhimurium	+	+	+	+	S
ETE 5	Typhimurium	+	+	+	+	S
ETE 1	München	+	+	-	+	CAZ,TET,ATM,CTT,COM
ETE 2	München	-	+	-	+	S
ETE 4	Salamae	+	+	-	-	S
ETE 4	Salamae	+	+	-	-	S
ETE 4	Give	+	+	-	-	S
ETE 4	Javiana	+	+	-	-	S
ETE 2	Minnesota	+	+	-	-	S
ETE 2	Molade	-	+	-	+	S
ETE 4	Newport	+	+	-	-	S
ETE 2	Ohio	+	+	-	+	S
ETE 2	Oranienburg	+	+	-	-	S
ETE 2	Ouakan	+	+	-	+	S

(+) presença,(-) ausência; S-susceptível; AMP: ampicilina; CTT: cefotetan; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; SUT: sulfametoxazol; CAZ: ceftazidime; ATM: aztreonam; COM: cefepime.

4.2.1 Identificação Sorológica

O sorotipo mais prevalente entre as cepas identificadas como *Salmonella* spp. (n=35) foi *Salmonella* Infantis, representando 17,1% (6/35) das cepas sorotipadas. Em segundo lugar *S. Agona* com frequência de ocorrência de 14,3% (5/35), seguida de *S. Anatum*, *S. Corvallis*, *S. Mbandaka* e *S. Typhimurium* com frequência de 8,6% (3/35) cada uma. *S. München* e *S. Salamae* ambas com 5,7% (2/35) e, finalmente, frequência de 2,8% (1/35) para cada um dos sorotipos restantes: *S. Javiana*, *S. Minnesota*, *S. Molade*, *S. Newport*, *S. Ohio*, *S. Oranienburg* e *S. Ouakam*.

Nenhuma cepa de *S. Enteritidis* foi identificada no presente estudo mesmo sendo esse sorotipo o mais frequentemente isolado tanto de fontes humanas quanto não humanas no Brasil (MEDEIROS et al., 2001; TAVECHIO et al., 2002; MEDEIROS et al., 2011).

Os estudos de MARTINS (1979) e TAVECHIO et al., (2002) já haviam encontrado resultados semelhantes quando analisaram o esgoto bruto da RMSF tendo sido encontrado *S. Enteritidis* com baixas frequências (0,8% e 1,63%, respectivamente).

Outros estudos realizados no exterior apresentaram resultados semelhantes ao nosso evidenciando ausência ou baixa frequência de isolamento de *S. Enteritidis* em lodos de esgoto, mesmo quando este sorotipo era um dos mais frequentemente isolado da população. Em estudo realizado na Grécia, MAVRIDOU et al. (2001), analisaram os sorotipos de *Salmonella* spp. em 13 ETEs do país. Identificaram 14 sorotipos diferentes porém nenhum foi identificado como *S. Enteritidis*. Na Suécia, SAHLSTRÖM et al. (2004) investigaram a diversidade de sorotipos de *Salmonella* em amostras de lodos de

esgoto a partir de oito ETEs. O sorotipo *S. Enteritidis* foi isolado com baixa frequência (somente em 4 amostras). Posteriormente, SAHLSTRÖM et al. (2006) compararam esses resultados prévios com frequência de ocorrência dos diferentes sorotipos desta bactéria na população sueca. Observaram então que, apesar de *S. Enteritidis* ser o sorotipo mais isolado na população, o mesmo sorotipo fora, posteriormente, identificado com baixa frequência nos lodos de esgoto das oito ETEs.

SAHLSTRÖM et al. 2006 chegaram a apresentar algumas hipóteses para explicarem a baixa frequência de isolamento de *S. Enteritidis* nos lodos, sendo as mais importantes o fato de talvez este sorotipo não estar adaptado a suportar as condições adversas encontradas durante o processo de tratamento em uma ETE, além do fato de que os diferentes métodos empregados para o isolamento de cepas clínicas e ambientais poderiam estar selecionando sorotipos diferentes.

Os dados desse estudo são semelhantes aos resultados encontrados por SAHLSTRÖM et al. (2004) na Suécia e por MAVRIDOU et al. (2001) na Grécia. Ainda poderíamos citar, como possível causa da ausência deste sorotipo em nosso estudo, o pequeno número de cepas (40) que foram submetidas à sorotipagem.

Não obstante não termos encontrado cepas de *S. Enteritidis*, que é o sorotipo mais frequentemente isolado em surtos no Brasil, os demais sorotipos encontrados tais como *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Javiana*, *S. Oranienburg*, *S. Mbandaka*, *S. Anatum*, *S. München*, e *S. Typhimurium*, além de serem transmitidos por alimentos de origem animal também estão relacionados com surtos em humanos causados pela ingestão de frutas e verduras frescas (BEUCHAT et al., 2002; HARRIS et al., 2003; HEATON e JONES al., 2008). Além disso, os sorotipos *S. Newport* e *S. Typhimurium* possuem

capacidade de formarem biofilmes em tecidos vegetais e, assim, de invadirem os mesmos (KROUPITSKI et al., 2009; HIRNEISEN et al., 2012).

BEUCHAT (2002), BRANDL (2006) e HEATON e JONES (2008) relatam que *S. Typhimurium* é um dos principais sorotipos de *Salmonella* spp. envolvidos em surtos onde o consumo de vegetais está presente assim como múltiplas rotas de contaminação, como água de irrigação contaminada, excrementos de animais que atingem o solo agrícola, contaminação cruzada durante o transporte ou mesmo durante a manipulação da hortaliça. A contaminação por lodos de esgoto, dada a tendência global de seu uso, não deveria ser descartada como uma importante fonte de contribuição aos surtos supracitados.

De acordo com a literatura consultada, não foram encontrados trabalhos realizados no Brasil onde tivesse sido realizada a sorotipagem de *Salmonella* spp. isoladas a partir de lodos de esgoto. Desta forma, o nosso estudo é o primeiro a identificar os diferentes sorotipos presentes em lodos de esgoto no Brasil. Estes resultados demonstram que diversos sorotipos de importância clínica são capazes de sobreviver a condições adversas encontradas ao longo do processo de tratamento do esgoto. Além disso, podem apresentar a capacidade de se multiplicar em tecidos vegetais, reforçando a necessidade de se utilizar um tratamento adequado dos lodos além de barreiras sanitárias eficientes antes de utilizá-los como condicionantes de solos agrícolas.

4.2.2 Genes de Virulência

Os resultados referentes à detecção de genes de virulência revelaram que todas as cepas de *Salmonella* spp. apresentaram pelo menos um dos genes de virulência - *spvC*, *invA* e *sseL*. Duas cepas (*Salmonella* Molade e *Salmonella* Muenchen) apresentaram resultados negativos para o gene *invA* e somente duas cepas de *Salmonella* Typhimurium apresentaram o gene *spvC*. O gene *sseL* foi encontrado em todas as cepas analisadas. Essas duas cepas de *S. Typhimurium* também abrigavam os genes *invA* e *sseL* (Tabela 9). PETERSON et al. (2010) relataram que, até aquele momento, o gene *spvC* havia sido encontrado apenas em cinco sorotipos de *Salmonella* spp: *S. Cholerasuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, similar aos obtidos no presente estudo e que a presença deste gene é um ótimo fator preditivo de que a cepa possui patogenicidade.

A presença destes três genes de virulência em cepas de *S. Typhimurium*, encontrados mesmo após todo o processo de tratamento em uma ETE que representa um ambiente hostil para as bactérias, é um fator de preocupação pois, cada um destes genes trabalha sinergisticamente para a expressão da virulência desse sorotipo uma vez que são responsáveis pela invasão das células do hospedeiro (*invA*), sobrevivência dentro destas células (*sseL*), além da inativação, no hospedeiro, da fagocitose que é um importante mecanismos de resistência a células invasoras (*spvC*). (CHEN et al., 2005; GUINEY e FIERER, 2011).

Duas cepas (*Salmonella* Molade e *Salmonella* München), não apresentaram o gene de virulência *invA*. Esse gene é reconhecido como um marcador genético de *Salmonella* spp. Como pode ser encontrado em quase todos os sorotipos desse grupo é

frequentemente utilizado para a identificação de *Salmonella* spp. pela reação da PCR (CHIU et al., 1996). Entretanto RAHN et al. (1992), ao avaliarem 630 cepas de *Salmonella* spp., revelaram que 0,6% delas não apresentaram o gene *invA*, portanto esse gene pode não estar presente em todas as bactérias do gênero.

Em relação ao gene de virulência *sseL*, PETERSON et al. (2010) também o encontraram em todas as cepas pesquisadas (n=42) e declaram que esse gene é encontrado em cepas altamente virulentas. Já RYTKONEN et al. (2007), demonstraram que cepas de *S. Typhimurium* não portadoras deste gene (mutantes) foram ineficientes no processo sistêmico de invasão dos macrófagos. Esses autores ainda relatam que, por possuírem a capacidade de invadirem macrófagos, cepas portadoras desse gene podem ser espalhadas em diferentes órgãos e sistemas. Logo, a presença desse gene em todas as cepas isoladas de fontes ambientais é um fator de preocupação do ponto de vista de saúde pública, tendo em vista seu importante papel na patogenicidade das cepas de *Salmonella* spp.

4.2.3 Presença de Plasmídeos e Suscetibilidade a Antimicrobianos

Das 35 cepas submetidas à extração plasmidial, 14 (40%) apresentaram pelo menos um plasmídeo (Tabela 9).

A presença de plasmídeos em bactérias patogênicas que se encontram no meio ambiente pode estar relacionada, não obrigatoriamente, à existência de genes de resistência a antimicrobianos, bem como a genes que conferem resistência a produtos recalcitrantes e tóxicos para estas bactérias presentes em um ambiente hostil. A

presença de plasmídeos, nas cepas isoladas neste estudo, não seria incomum, uma vez que metais pesados e altas concentrações de enxofre são comumente encontrados nas águas residuais do esgoto de São Paulo bem como em lodos de esgoto (RANGEL et al, 2006;. SÍGOLO e PINHEIRO, 2010). As bactérias patogênicas possuem capacidade de trocar plasmídeos entre sorotipos diferentes dentro do mesmo gênero, bem como entre bactérias de gêneros diferentes (MADIGAN et al. 2010). A presença destes elementos em 40% das cepas isoladas pode representar uma preocupação tendo em vista a capacidade natural que as bactérias possuem de compartilhá-los com outras cepas mais patogênicas obtendo, como resultado final, diversos novos genes que podem conferir resistência a diversos antimicrobianos além da aquisição de novos genes de virulência.

Uma cepa do sorotipo *S. Agona*, que não possuía plasmídeo, apresentou resistência a dois antimicrobianos (Tabela 9). Resultados similares foram obtidos por SINGH et al. (2010), que verificaram que a presença de plasmídeos não é obrigatória para a ocorrência de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp. uma vez que genes de resistência presentes nesse grupo também podem se localizar em seus cromossomos.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos mostraram que 14,2% (3/35) das cepas foram resistentes a dois agentes antimicrobianos, e apenas duas cepas de 2/35 (5,7%) eram MDR. Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos cefotetan, imipenem, meropenem e ertapenem (Tabela 9).

Resultados semelhantes foram encontrados por SAHLSTRÖM et al. (2004) onde 12% (12/101) das cepas isolados de *Salmonella* spp se mostraram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, e 7% (7/101) eram MDR. Estes resultados são

bastante diferentes de outros estudos realizados no Brasil, nos quais cepas de *Salmonella* spp., tanto de origem humana e não-humana, apresentaram maiores índices de resistência aos agentes antimicrobianos. No Rio de Janeiro, FONSECA et al. (2006) isolaram 35 amostras de *Salmonella* Infantis de fezes de crianças hospitalizadas e descobriram que 34 cepas (97,1%) eram resistentes a pelo menos dois agentes antimicrobianos. Estudos realizados por OLIVEIRA et al (2002) e MEDEIROS et al. (2011) detectaram, em resíduos de animais de fazenda, isolados de *Salmonella* spp. resistentes a vários antibióticos sendo que todas eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, em ambos os estudos.

Embora, no presente estudo, a maioria das cepas (85,8%) foi sensível aos antibióticos testados, ressalta-se que uma cepa de *Salmonella* Agona foi considerada ESBL, pois apresentou resistência à ciprofloxacina. Esse fato chama a atenção, uma vez que SAHLSTRÖM et al. (2006) demonstraram que cepas de *Salmonella* spp. podem se multiplicar durante o tratamento mesofílico, o que poderia, eventualmente, causar aumento no número de cepas ESBL no ambiente bem como o favorecimento da transferência horizontal de genes que mediam a resistência a beta-lactâmicos a outros patógenos. A resistência a essa classe de antibióticos, bem como a prevalência de cepas ESBL tem aumentado em todo o mundo (PARRY e THRELFALL, 2008) e, uma vez que este é o antibiótico alternativo para o controle de cepas MDR, as opções de tratamento estão se tornando cada vez mais limitadas.

Dois isolados de *S. Typhimurium* foram identificados como MDR o que pode ser um achado que corrobora os dados, em nível mundial, dos estudos realizados por SU

et al. (2004), e CHEN et al. (2013), que relataram aumento, ao longo dos anos, de cepas de *Salmonella* Typhimurium MDR.

Em relação ao elevado número de cepas sensíveis aos antimicrobianos detectadas neste estudo 85,7% (30/35) poderíamos sugerir que, bactérias presentes em um ambiente onde não estão expostas aos agentes antimicrobianos, deixam de expressar os genes responsáveis pela expressão de resistência aos mesmos (MADIGAN et al. 2010).

Os sorotipos *S. Typhimurium* juntamente com *S. Enteritidis* são os principais contaminantes de vegetais e são também relatados como os principais agentes etiológicos de surtos alimentares envolvendo a ingestão desses alimentos ao redor do mundo (BRANDL, 2006). Deste modo, a presença de cepas de *S. Typhimurium* MDR e carreadoras de três genes de virulência nas amostras de lodos de esgoto pesquisadas demonstram que, em determinadas condições, *Salmonella* pode, sim, constituir perigo microbiológico relevante, associado ao uso agrícola de lodos de esgotos.

4.3 PROBABILIDADE DE INFECÇÃO POR *Salmonella* spp.

Estimou-se a probabilidade anual de infecção por *Salmonella* spp. pela ingestão de hortaliças cultivadas em solo com adição de lodos de esgoto, por ingestão involuntária de lodo de esgoto no momento de sua aplicação no solo e pela ingestão do solo já acondicionado com esses lodos.

Pelo fato de não termos ainda no Brasil estudos que tenham estabelecido o valor de risco anual tolerável adotou-se, neste estudo, o valor estabelecido pela USEPA cujo valor é de 10^{-4} (USEPA, 1990).

4.3.1 Riscos Anuais de Infecção por *Salmonella* spp. pela Ingestão de Alface, Tomate e Cenoura

As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados da estimativa de risco anual de infecção por *Salmonella* spp. com a ingestão de hortaliças cultivadas em solos tratados com lodos de esgoto das ETEs 2 e 4 e de acordo com gênero (feminino e masculino) e por faixa etária – crianças e adultos calculados de acordo com os modelos de exposição descritos no item 3.4.14.

O anexo 2 traz os mesmos resultados em gráficos que mostram os riscos de infecção anuais.

Tabela 10: Riscos anuais de infecção por *Salmonella* spp. para ingestão de alface e tomate nos cenários 1,2,3 e 4.

		Medianas				IC 95%				
		Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3	Cenário 4	Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3	Cenário 4	
Alface	ETE 2	Homens	1,29x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	1,31x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	4,15x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴	4,76x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴
		Mulheres	1,29x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	1,31x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	4,15x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴	4,76x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴
		Crianças	1,26x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	1,29x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	3,93x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴	4,59x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴
	ETE 4	Homens	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	3,25x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	8,23x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴	1,12x10 ⁻²	1,08x10 ⁻⁴
		Mulheres	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	3,25x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	8,23x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴	1,12x10 ⁻²	1,08x10 ⁻⁴
		Crianças	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	3,25x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	9,14x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴	1,09x10 ⁻²	1,08x10 ⁻⁴
Tomate	ETE 2	Homens	1,51x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	6,41x10 ⁻³	1,1x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻²	3,25x10 ⁻⁴	8,43x10 ⁻²	4,33x10 ⁻⁴
		Mulheres	1,13x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	4,85x10 ⁻³	<10 ⁻⁴	4,98x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴	7,40x10 ⁻²	3,25x10 ⁻⁴
		Crianças	1,13x10 ⁻²	<10 ⁻⁴	4,20x10 ⁻³	<10 ⁻⁴	5,06x10 ⁻²	2,17x10 ⁻⁴	6,54x10 ⁻²	3,25x10 ⁻⁴
	ETE 4	Homens	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	1,02x10 ⁻²	1,08x10 ⁻⁴	1,21x10 ⁻²	1,08x10 ⁻⁴
		Mulheres	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	6,63x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴	9,03x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴
		Crianças	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	5,79x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴	9,87x10 ⁻³	1,08x10 ⁻⁴

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% superior.

Cenário 1: variação da conc. de *Salmonella* spp. no solo e na hortaliçaCenário 2: variação da conc. de *Salmonella* spp. no solo e sem variação na hortaliçaCenário 3: sem variação da conc. de *Salmonella* spp. no solo e com variação na hortaliçaCenário 4: sem variação da conc. de *Salmonella* spp. no solo e na hortaliça

Tabela 11. Riscos anuais por infecção por *Salmonella* spp. para ingestão de cenário no 5 e 6.

		Cenário 5		Cenário 6	
		Medianas	IC 95 %	Medianas	IC 95 %
ETE 2	Homens	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
	Mulheres	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
	Crianças	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
ETE 4	Homens	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
	Mulheres	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
	Crianças	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

Cenário 5: variação da concentração de *Salmonella* spp. no solo e inibição na cenoura

Cenário 6: sem variação da concentração de *Salmonella* spp. no solo e inibição na hortaliça

Observando a Tabela 11 podemos notar que os riscos obtidos nos diferentes cenários para a ingestão de alface cultivados em lodos de esgoto provenientes da ETE 2 foram maiores nos **cenários 1 e 3** quando comparados com o valor preconizado pela USEPA de 10^{-4} .

Os valores de risco anual de infecção foram da ordem de 10^{-2} tanto para os valores das medianas como os valores do IC95% superior para ambos os cenários, sendo estes 2 logs superiores do valor de risco anual tolerável da USEPA.

Os **cenários 1 e 3** consideram o crescimento de *Salmonella* spp. nas hortaliças cuja variável foi, comparando-se as diferenças nos riscos de infecção anuais gerados nestes cenários com os dos **cenários 2 e 4**, respectivamente, o fator mais determinante dos riscos mais elevados obtidos nos **cenários 1 e 3**. Esta importante variável não pode ser expressa nos gráficos de sensibilidade obtidos uma vez que a mesma é gerada a partir de uma equação de crescimento e não de uma distribuição. Nos **cenários 1 e 3** observa-se que os riscos estimados são similares, não sendo observadas diferenças entre os riscos calculados para homens, mulheres e crianças. A variação da concentração de

Salmonella spp. no solo é o único fator que difere entre estes dois cenários estando esta presente no **cenário 1** e ausente no **cenário 3**. Esta variável, depois do crescimento de *Salmonella* spp. em alfaces, foi a que teve o maior impacto nos riscos obtidos, tanto para as ETEs 2 e 4, seguida pelas diferentes concentrações de *Salmonella* spp. nos lodos de esgoto das diferentes ETEs, como pode ser observado na Figura 20. Os gráficos de sensibilidades para as crianças, tanto para a ETE 2 quanto para a ETE 4, são semelhantes a estes e podem ser visualizados no anexo 3.

Figura 20. Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de alface nas ETEs 2 e 4.

(*) Com alteração no solo – Com alteração no vegetal.

Ressalta-se que não se observou diferença entre os riscos calculados para adultos (homens e mulheres) e crianças.

Os **cenários 2 e 4** apresentaram resultados de risco anual de infecção menores do que os encontrados para os **cenários 1 e 3**. A mediana dos valores de risco anual foi negligenciável, ou seja, abaixo do estabelecido pela USEPA. No entanto, os valores de IC95% superior de riscos anuais foram maiores que o valor de 1/10.000. Da mesma forma que para os **cenários 1 e 3** não se observou diferença nos valores calculados de risco entre os expostos.

Em relação aos cenários concernentes à ETE 4 nota-se, em relação às medianas, que os riscos para os **cenários 1, 2 e 4** foram menores que os limites toleráveis diferentemente do observado no **cenário 3** cujos resultados foram de $3,25 \times 10^{-4}$ para todos os expostos. Essa diferença deve-se ao fato que nesse cenário não foi considerada a variação da concentração de *Salmonella* no solo, pois de acordo com os resultados obtidos por EAMENS et al (2006), a variação na concentração dessa bactéria no solo tende a diminuir em torno de 1 log ao longo do tempo embora com picos esporádicos. Já observando os valores de IC95% superior os mesmos foram da ordem de 10^{-3} para o **cenário 1** sendo levemente maior para as crianças sendo o mesmo constatado para o **cenário 3**, embora com valores de risco anual maiores, da ordem de 10^{-2} . Para os **cenários 2 e 4** os valores de IC95% superior foram os mesmos ($1,08 \times 10^{-4}$) não havendo diferenças entre homens, mulheres e crianças. Logo, tanto para os cenários relacionados à ETE 2 quanto à ETE 4 foram observados, em relação à ingestão de alface, riscos anuais elevados de infecção por *Samonella*.

Há que se ressaltar que a variação da concentração de *Salmonella* spp. nas hortaliças foi a variável que mais influenciou os valores dos riscos obtidos. Logo, o transporte de alface e tomate com temperaturas controladas configurar-se-ia em uma

barreira sanitária importante para a diminuição dos riscos de infecção anuais relacionados à ingestão destas hortaliças.

Comparando os resultados obtidos dos riscos anuais de infecção por ingestão de alface neste estudo com o trabalho de MARA et al., (2002), no qual foi calculado um risco anual de infecção por *Salmonella* spp. pela ingestão de alface de 2×10^{-5} , nota-se que os valores obtidos por MARA et al. (2002) foram 3 log menores que os obtidos neste estudo para os cenários 1 e 3 da ETE 2. Mesmo observando-se os cenários menos conservativos deste estudo (cenários 2 e 4) da ETE 2, e considerando-se os valores superiores de IC 95%, foram encontrados maiores riscos anuais na ordem de 1,0 log de magnitude que o observado por MARA et (2002).

Esta diferença pode ter sido devido ao fato de que no cenário de exposição considerado por aquele grupo levou-se em conta o decaimento de 2 log na concentração de *Salmonella* spp. no solo, além do fato de que o mesmo não considerou, como feito neste estudo, o crescimento de *Salmonella* spp. nos pés de alface pós-colheita. Neste presente estudo também foi levada em conta a variação da concentração de *Salmonella* no solo, a qual, como mencionado anteriormente, tende a diminuir em torno de 1 log ao longo do tempo embora com picos esporádicos.

No Brasil, BASTOS et al. (2009), realizaram estudo de simulação a fim de estimarem os riscos (diário e anual) de infecção por *Salmonella* relacionados à ingestão de alface e cenoura e à ingestão acidental de partículas de solo acondicionado com lodos de esgoto. Obtiveram risco anual de infecção por *Salmonella* spp. para a ingestão de alface de $1,7 \times 10^{-5}$, da mesma ordem de magnitude do valor obtido por MARA et. (2002) pois os cenários de exposição avaliados por ambos os autores são similares.

Em relação aos tomates, assim como observado para a ingestão de alface, os maiores riscos também foram encontrados nos **cenários 1 e 3** tanto em relação às medianas quanto em relação aos valores superiores de IC 95%. A variação da concentração de *Salmonella* spp. no tomate também foi o fator que mais contribuiu com os riscos elevados, em torno de 2 log acima do estabelecido pela USEPA, assim como o observado para os riscos estimados para a ingestão de alface. Os valores da mediana dos riscos estimados, tanto para a ETE 2 quanto para a ETE 4, foram menores que os limites toleráveis nos **cenários 2 e 4** exceto para a população masculina no **cenário 3** da ETE 2. O IC 95% superiores dos riscos calculados para o **cenário 1 e 3** foram da mesma ordem de grandeza (10^{-2}), mesmo considerando-se a variação da concentração do patógeno no solo.

Analisando os riscos obtidos para os quatro cenários propostos relativos à ETE 4 observamos que os mesmos foram menores que os limites toleráveis para os valores das medianas de probabilidade de infecção por *Salmonella*. Porém, os valores superiores de IC 95% foram da ordem de 10^{-2} para o gênero masculino nos **cenários 1 e 3** e para mulheres e crianças, foi da ordem de 10^{-3} . Já nos **cenários 2 e 4** não se evidenciou diferença para os valores de riscos estimados (Tabela 11).

Da mesma forma que foi anteriormente observado para o alface nas ETEs 2 e 4, após o crescimento da bactéria no tomate, o fator que mais impactou nos riscos também foi a variação da concentração de *Salmonella* spp. no solo seguido pelas diferentes concentrações deste patógenos nas ETEs. A Figura 21 traz dois gráficos das sensibilidades que corroboram esta afirmação. Os gráficos de sensibilidades para

mulheres e crianças, tanto da ETE 2 quanto da ETE 4, são semelhantes a estes e podem ser visualizados no anexo 3.

Figura. 21 Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de tomate nas ETEs 2 e 4.

(*) Com alteração no solo – Com alteração no vegetal.

Comparando os resultados dos riscos anuais obtidos para a ingestão de alface e tomate notamos que, para os valores das medianas, a ingestão de alface para o **cenário 3** apresenta os maiores valores de risco. Porém, quando são observados os resultados do IC 95%, os maiores riscos são para a ingestão de tomate em todos os cenários concernentes à ETE 2. Relativo ao gênero, nos **cenários 1 e 3** da ETE 4, verificou-se que o risco anual de infecção de ingestão de tomate foi maior para o gênero masculino.

Nesta mesma ETE os valores de riscos anuais de infecção para os **cenários 2 e 4** são iguais para os riscos observados na ingestão de alface.

Os riscos anuais obtidos tanto para a ingestão de alface quanto de tomates apresentam valores de 1 a 2 log superiores ao recomendado pela USEPA como valor tolerável de risco de infecção anual (10^{-4}).

Os valores dos riscos anuais de infecção se apresentaram similares entre os homens e mulheres expostos. Nos cenários das ETEs 2 e 4, para a ingestão de alface, os riscos anuais para homens e mulheres foram iguais e levemente menores para as crianças. Este resultado pode ser devido as taxas de ingestão de alface serem as mesmas tanto para homens quanto para mulheres, enquanto que, para as crianças, esta taxa de ingestão é menor (Tabela 8).

Em relação a todos os cenários da ETE 4, para a ingestão de tomate, os riscos calculados foram maiores para a população masculina e similares para as mulheres e crianças. As taxas de ingestão para homens são, em média, 55 g/dia (mínimo de 30g/dia e máximo de 90 g/dia) maior que as taxas observadas para as mulheres de 45,5 g/dia (mínimo de 30g/dia e máximo de 60g/dia) cujas taxas são bastante similares à taxa das crianças que é de 44g/dia (Tabela 8).

Os maiores riscos anuais de infecção relacionados à ingestão de tomate podem ser ocasionados tanto pelas maiores taxas de ingestão desta hortaliça, especialmente pela população masculina, bem como pela maior taxa de crescimento máximo de *Salmonella* spp. observada para esse vegetal (10^8 UFC/g) que é maior quando comparada com a mesma taxa para o alface (10^3 UFC/g) (SANT'ANNA et al. 2012b; MANIOS et al., 2013)

Estes riscos elevados, obtidos tanto em relação ingestão de tomate quanto de alface, são consistentes com a literatura (BEUCHAT 2002; BRANDL, 2006; HEATON et JONES, 2008). Estes autores destacam a ingestão de tomates e alface como uma das principais hortaliças relacionadas aos surtos de *Salmonella* spp em todo o mundo. BRANDL (2006) compilou e analisou dados de surtos alimentares cujo agente etiológico foram bactérias do gênero *Salmonella* e concluiu que alface e tomate eram um dos alimentos mais relacionados a ocorrência desses surtos. Ainda relatou que há uma maior incidência de contaminação quando hortaliças frutosas são ingeridas.

Observando-se a Tabela 12, notamos que os riscos de infecção anuais para a ingestão de cenoura foram menores que os limites toleráveis para os cenários **5 e 6**, tanto para a mediana quanto para o IC 95% superior, independentemente do sexo e faixa etária considerados.

Os baixos riscos obtidos envolvendo a ingestão de cenouras estão de acordo com os dados de surtos envolvendo esta hortaliça, que são raros (BEUCHAT, 2002; HEATON e JONES., 2008; BERGER e al., 2010). Estudos já previamente citados (NGUYEN e LUND; 1991; LIAO et al., 2007; NORIEGA et al., 2010; SANT'ANNA et al., 2012a) que investigaram o crescimento de *Salmonella* spp. em cenouras já haviam detectado uma inibição no crescimento desta bactéria em relação a esta hortaliça. Este fenômeno poderia influenciar os valores de riscos anuais de infecção obtidos para a ingestão de cenouras.

GALE et al. (2005) utilizaram a abordagem da AQRM para estimarem os riscos de infecção anual por *Salmonella* relacionado à ingestão de tubérculos e raízes, e obtiveram o valor de $7,9 \times 10^{-9}$. Estes autores não consideraram a inibição que a

microbiota epifítica da cenoura exerce sobre *Salmonella* spp. Logo, o baixo valor de risco anual que os mesmos obtiveram pode ser devido ao fato de que GALE et al. (2005) consideraram o decaimento da concentração de *Salmonella* spp. no solo tratado com lodo de esgoto de 2,53 log, além de terem também considerado redução de 90% do solo agregado quando as raízes e tubérculos são lavados pós-colheita.

BASTOS et al. (2009), em estudo já citado, também estimaram os riscos anuais de infecção pela ingestão de cenoura cultivada em solos acondicionados com lodo de esgoto com concentrações de *Salmonella* spp. no lodo semelhantes às encontradas neste estudo. O valor de risco anual estimado foi de $4,6 \times 10^{-4}$. Vale ressaltar que BASTOS et al. (2009), diferentemente do que feito neste presente estudo, não consideraram o fator de inibição que a microbiota epifítica exerce na população de *Salmonella* spp. presente nas cenouras obtendo, assim, valores mais elevados para o risco anual pela ingestão de cenoura.

Da mesma forma que já observado para a ingestão de alface e tomate, o fator que mais contribuiu para os riscos envolvendo a ingestão de cenoura foi, tanto para a ETE 2 quanto para a ETE 4, a variação da concentração de *Salmonella* no solo seguido, nos cenários nos quais esta está presente, pelo fator de inibição microbiana presente nas cenouras. A concentração de *Salmonella* spp. nos lodos também foi um importante fator na composição do risco. A Figura 22 traz as análises das sensibilidades para esta hortaliça nos cenários das ETEs 2 e 4 onde os homens a consomem. Resultados semelhantes foram obtidos para as mulheres e crianças e são apresentados no anexo 3.

Figura 22. Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de cenoura nas ETEs 2 e 4.

(*) Com alteração no solo – Com alteração no vegetal.

4.3.2 Risco de Infecção Anual para os Trabalhadores Agrícolas

Para a estimativa da probabilidade anual de infecção por *Salmonella* spp. em trabalhadores foram definidos três cenários os quais consideram a variação, ou ausência da mesma, para os trabalhadores do campo que lidam com solos acondicionados com lodos de esgoto (**cenários 7 e 8**, respectivamente) bem como a ingestão acidental de lodo de esgoto por trabalhadores do campo que o aplicam no solo (**cenário 9**).

Observando a Tabela 13 nota-se que os maiores riscos anuais de infecção por *Salmonella* spp. obtidos para os trabalhadores foram encontrados no **cenário 9**, onde o trabalhador do campo ingeriria lodo de esgoto durante a aplicação do mesmo em solos agrícolas. Os valores obtidos foram da ordem de 2 log superiores em relação ao risco tolerável recomendado pela USEPA. O maior risco anual observado neste trabalho foi $9,36 \times 10^{-2}$, valor obtido no IC 95% para a ETE 2 do **cenário 9**.

Tabela 12. Riscos anuais para os trabalhadores agrícolas.

	Cenário 7		Cenário 8		Cenário 9	
	Mediana	IC 95%	Mediana	IC 95%	Mediana	IC 95%
ETE 2	$5,14 \times 10^{-4}$	$9,74 \times 10^{-4}$	$5,41 \times 10^{-4}$	$9,74 \times 10^{-4}$	$7,72 \times 10^{-2}$	$9,36 \times 10^{-2}$
ETE 4	$<10^{-4}$	$2,16 \times 10^{-4}$	$<10^{-4}$	$2,16 \times 10^{-4}$	$1,11 \times 10^{-2}$	$1,54 \times 10^{-2}$

Cenário 7: variação de *Salmonella* spp. no solo - ingestão durante trabalho com solo acondicionado com lodo de esgoto

Cenário 8: sem variação de *Salmonella* spp. no solo - ingestão durante trabalho com solo acondicionado com lodo de esgoto

Cenário 9: ingestão de lodo de esgoto durante aplicação do mesmo

Estes valores elevados de riscos anuais de infecção evidenciam que os aplicadores de lodos de esgoto nos solos são, dentre os expostos, os que estão submetidos a um maior risco de infecção. O mesmo resultado já fora anteriormente observado por Bastos et al., (2009) e Westrell et al. (2004).

A Figura 23 apresenta a análise das sensibilidades relacionadas aos trabalhadores agrícolas

ETE 2**Lodo+solo - S Alt Solo*** **Lodo+solo - C Alt Solo*** **Somente lodo - S Alt Solo***

Figura 23. Gráficos de sensibilidades das diferentes variáveis consideradas nos cenários para a ingestão de partículas de solo pelos trabalhadores nas ETEs 2 e 4.

(*) Com alteração no solo – Com alteração no vegetal.

Observando-se estes gráficos percebe-se, para ambas as ETEs, que a ingestão de partículas de solo não foi o fator preponderante concernente aos riscos obtidos. Para o **cenário 7**, que considera a variação na concentração de *Salmonella* spp. no solo, este foi o fator mais relevante, concordando com o que fora observado para as hortaliças. Já

no **cenário 8**, que não considera esta variação, a concentração de *Salmonella* spp. nos diferentes lodos de esgoto foi o fator de maior impacto nos riscos observados.

De maneira geral, os gráficos das análises de sensibilidade apontam a elevada relevância que a variação da concentração de *Salmonella* spp no solos tratados com lodos de esgoto, bem como a concentração da mesma nestes possuem em todos os riscos obtidos neste estudo. Logo estas variáveis constituem, juntamente com o fenômeno de crescimento de enteropatógenos nos vegetais, aspectos importantes para a construção de barreiras sanitárias que visem diminuir os riscos anuais de infecção.

Estes cenários foram desenhados sem considerar a utilização ou uso inadequado dos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) pelos trabalhadores. Estes riscos anuais poderiam ser minimizados com a utilização de EPIs ou ainda com a adoção de aplicação mecanizada de lodos de esgoto no solo.

WESTRELL et al., (2004) estabeleceram diferentes cenários envolvendo diferentes microrganismos e estimaram o risco de infecção pelos mesmos. Consideraram como expostos os trabalhadores da ETE e os trabalhadores que aplicam estes lodos em campos agrícolas da Suécia. No caso de infecção por *Salmonella* spp. relacionado à ingestão acidental de lodos de esgoto, por ambos os expostos, os riscos anuais obtidos para os trabalhadores no campo foram os maiores em todos os cenários de exposição avaliados, sendo a média de 2×10^{-2} e o IC 95% superior de $3,6 \times 10^{-1}$. O valor da média é da mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos neste estudo no **cenário 9**, para as ETEs 2 e 4. Vale ressaltar que no estudo desses autores não foi considerado, como nesse estudo para o **cenário 9**, o decaimento na concentração de *Salmonella* spp. nos lodos de esgoto. O elevado valor obtido por WESTRELL et al.

(2004) de $3,6 \times 10^{-1}$ para o IC 95% superior, poderia ser devido a uma elevada taxa de ingestão acidental adotada no estudo de 2g/dia.

BASTOS et al. (2009) calcularam os riscos anuais de infecção por *Salmonella* em trabalhadores expostos no campo. O cenário de exposição desenhado considerou ingestão acidental de lodo (10mg/dia) e de solo acondicionado com lodos de esgoto (10mg/dia). Estimaram risco anual de infecção para aplicadores de lodos de esgoto de $2,4 \times 10^{-2}$ e para os trabalhadores que trabalham com o solo acondicionado o risco estimado foi de $5,6 \times 10^{-5}$. Nesse estudo, o maior valor de risco anual obtido, em relação aos cenários que consideravam *Salmonella* spp., foi para os trabalhadores que aplicam o resíduo no solo, sendo o mesmo resultado obtido em nosso estudo.

Tanto TANNER et al., (2008) quanto VIAU et al., (2011) realizaram estudos nos quais a inalação de bioaerossois foi considerada como veículo de transporte de *Salmonella* spp. a partir dos lodos de esgoto. TANNER et al., (2008), partindo de uma concentração inicial de *Salmonella* spp. nos lodos de 10 NMP/g ST, obtiveram o risco anual de $2,0 \times 10^{-6}$. Já VIAU et al., (2011) obtiveram o risco anual de infecção variando de 10^{-7} a 10^{-9} , dependendo das distâncias dos moradores em relação às ETEs.

Os valores inferiores de riscos anuais obtidos por ambos os autores, em relação a este presente estudo, pode se devido ao fato que os autores consideraram que somente uma parte das partículas inaladas são ingeridas. Para TANNER et al (2008) esse valor é de 10% e VIAU et al. (2011) consideraram uma variação de 10 a 50%.

Finalmente, VIAU et al (2011) realizaram uma revisão de trabalhos que utilizaram a abordagem AQRM para o levantamento de riscos envolvendo *Salmonella* spp. Como conclusão estes autores relataram que as probabilidades anuais de infecção

por *Salmonella* em ordem decrescente foram: ingestão acidental direta de lodo de esgoto, inalação de aerossóis contaminados de lodos, ingestão de água subterrânea contaminada, ingestão de alimentos contaminados. Para a ingestão direta de lodo de esgoto a probabilidade anual de infecção foi da ordem de 10^{-3} e muito baixa para a ingestão de alimentos.

A primeira observação concorda com os nossos resultados, porém a última, que associa riscos anuais abaixo dos limites toleráveis para a ingestão de alimentos, entra em divergência com os elevados riscos estimados para a ingestão de alface e tomate estimados neste trabalho. Esta diferença poderia ser explicada pelo fato de que nenhum dos trabalhos revisados por VIAU et al. (2011) consideraram, a exemplo dos estudos comentados anteriormente nesta seção, o recrescimento deste gênero bacteriano nas diferentes hortaliças avaliadas.

De acordo com a literatura consultada, se evidenciaram-se riscos de infecção menores que os limites toleráveis (GALE et al., 2005; TANNER et al., 2008; VIAU et al., 2011) assim como riscos elevados (WESTRELL et al., 2004; BASTOS et al., 2006) tendo como referência o valor de 10^{-4} estabelecido pela USEPA. Há que se ressaltar que foram desenhados diferentes cenários para cada estudo descrito na literatura o que demonstra que a construção de cada cenário deve refletir as especificidades regionais e assim contribuir com o estabelecimento de critérios e geração de dados de exposição a fim de se ter cenários cada mais refinados. A OMS (WHO 2006) enfatiza que a utilização da abordagem da AQRM é fundamental na tomada de decisão para o estabelecimento de barreiras a fim de diminuir a probabilidade de infecção por

patógenos presentes nos lodos de esgotos e assim proteger a saúde das populações expostas.

No Brasil, a Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2006), que define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, na Seção III intitulada “Requisitos Mínimos de Qualidade do Lodo de Esgoto ou Produto Derivado Destinado a Agricultura” considera *Salmonella* spp. como um dos itens do padrão de qualidade dos lodos de esgotos e de classificação dos mesmos (Tabela 1). Os resultados obtidos nesse estudo mostram que essas bactérias estão presentes nos lodos analisados, inclusive revelando sorotipos envolvidos em surtos de origem alimentar.

A presença desta bactéria como um dos padrões desta resolução que, trata sobre a utilização dos lodos de esgoto, foi corroborada por este estudo, uma vez que elevados riscos anuais de infecção foram obtidos para a ingestão de alface e tomate, devido à presença daquela, principalmente nos **cenários 1 e 3** das ETEs 2 e 4. Ainda a mesma resolução cita a avaliação de risco como ferramenta útil para a geração de novos dados científicos que, juntamente com os dados epidemiológicos, nortearão a tomada de decisões em relação às recomendações adotadas naquele documento.

Também ficou demonstrado neste estudo que a utilização de lodos de esgoto gerados atualmente nas ETEs da RMSP em solos agrícolas onde serão cultivadas hortaliças como o alface e tomate, sem as devidas barreiras sanitárias, representa riscos elevados para a população. Logo, barreiras sanitárias devem ser implementadas não só para diminuir os riscos de infecção relacionados a ingestão *Salmonella* spp. como também aos demais fatores que representam riscos à saúde humana tais como metais

pesados, compostos orgânicos carcinogênicos bem como outros patógenos não pesquisados no presente estudo.

Este estudo intenta, com os diferentes cenários desenhados bem como com os resultados estimados gerados, contribuir com o fortalecimento do uso dessa ferramenta em subsidiar a elaboração de leis que norteiem a prática do uso dos lodos de esgotos em solos agrícolas. Também o presente estudo contribui demonstrando como é complexa a construção de cenários e como diversos dados são necessários para que a abordagem da AQRM possa ser utilizada.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos verificou-se que diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. estão presentes nos lodos de esgoto e circulando no ambiente, como observado em estudos anteriores. Sorotipos de importância clínica como *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Infantis* foram encontrados nos lodos de esgoto das ETEs avaliadas, evidenciando a capacidade dessas bactérias sobreviverem a condições adversas encontradas ao longo do processo de tratamento do esgoto;

A presença de 35 cepas isoladas portando o gene de virulência *sseL*, de cepas de *S. Typhimurium* portando os três genes de virulência pesquisados (*invA*, *sseL* e *spvC*), de uma cepa de *S. Agona* ESBL bem como de duas cepas MDR, sendo uma delas *S. Typhimurium*, demonstram que genes de virulência bem como genes de resistência a antimicrobianos podem permanecer ativos em cepas circulantes no ambiente;

A presença de cepas de *S. Typhimurium* com o perfil de patogenicidade e virulência descritos acima nos lodos de esgoto avaliados somando-se ao fato deste ser o sorotipo mais comumente envolvido em surtos alimentares pela ingestão de vegetais, pode representar elevado risco à população que ingerir hortaliças como alface e tomate cultivadas em solo tratados com lodos de esgotos gerados nas ETEs estudadas.

Em relação aos riscos anuais de infecção por *Salmonella* spp. verificou-se que o maior risco anual observado ($9,4 \times 10^{-2}$) foi obtido no **cenário 9**, onde trabalhadores agrícolas aplicam os lodos de esgoto no solo. Os maiores riscos anuais relacionados à ingestão das hortaliças foram observados nos **cenários 1 e 3**, para a ETE 2 para a ingestão de tomate e alface, respectivamente. A ingestão de cenouras apresentaram os menores riscos anuais deste estudo.

A variável que mais contribuiu para os riscos observados neste estudo, em relação à ingestão de alface e tomate, foi o crescimento de *Salmonella* spp. nas hortaliças mas a mesma não pode ser representada nas análises de sensibilidade. A variação da concentração de *Salmonella* spp. nos solos tratados com lodos de esgoto bem como as diferentes concentrações deste patógeno naqueles representaram, respectivamente, fatores de relevante impacto nos riscos anuais estimados.

6 RECOMENDAÇÕES

- 1- Estudos são necessários a fim de se refinar os modelos de exposição uma vez que os mesmos poderiam ter sido super estimados neste trabalho. Alguns exemplos seriam: a frequência de ingestão das hortaliças, o número de dias que os trabalhadores agrícolas efetivamente trabalham tanto aplicando lodos de esgoto quanto em atividades nas quais se exponham aos solos acondicionados com lodos de esgoto.
- 2- Estudos que venham a melhor esclarecer o fenômeno da internalização de enterobactérias em plantas vivas também são necessários a fim de subsidiarem a construção de cenários mais realistas.
- 3- A taxa de solo que se adere ao tomate em situações reais também é um fator que necessita de melhor elucidação.
- 4- A taxa de variação de *Salmonella* spp. ao longo do tempo e, sobre condições climáticas diversas, é um assunto que deve ser esclarecido a fim de averiguar se aquela é similar aos estudos realizados na Austrália. A sobrevivência desta bactéria em diferentes solos brasileiros também deveria ser investigada.

7 REFERÊNCIAS

- Andreoli CV, Pegorini ES, Fernandes F. Disposição do lodo no solo. In: ANDREOLI C V, SPERLING M, FERNANDES F. Lodos de esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, Companhia de Saneamento do Paraná, 2001. p.319-397.
- Andreoli CV, A gestão de biossólidos no Paraná. In: Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária. AMEVE, 2002, Curitiba. Anais. Curitiba: 2002. p . 43-46.
- Arthurson V. Proper sanitization of sewage sludge: a critical issue for a sustainable society. *Appl and Environ Microbiol.* 2008; 74 (17): 5267-5275.
- Asplund K, Nurmi E. The growth of *Salmonellae* in tomatoes. *Int J Food Microbiol.* 1991; 13: 177-182.
- Backs C, Büll LT, Godoy LJG, Bôas RLV, Lima CP, Pires EC. Uso de lodo de esgoto na produção de tapetes de grama esmeralda. *Ciência Rural, Santa Maria.* 2009; 39 (4): 1045-1050.
- Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* 1994; 23: 277-294.
- Bastos, RXX, Becilacqua PD, Dias GMF, Barony FJA. Critical analysis of the Brazilian legislation for agricultural use of sewage sludge to the assessment of quantitative microbiological risk. *Revista de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica.* 2009; 2 (1): 143-159.
- Bean CL, Hansen JJ, Margolin AB, Balkin H, Batzer G, Widmer G. Class B Alkaline Stabilization to Achieve Pathogen Inactivation. *Int J Environ Res Public Health* 2007; 4(1): 53-60.
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand Paul, Frankel Gad. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol.* 2010; 12 (9): 2385-2397.
- Bettiol W, Camargo AO. Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2006. v. 1.
- Beuchat LR, Mann DA. Survival and growth of acid-adapted and unadapted *Salmonella* in and on raw tomatoes as affected by variety, stage of ripeness, and storage temperature. *J Food Prot.* 2008; 71(8):1572-1579.
- Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 2002; 4: 413-423.

Brandl MT, Rosenthal BM, Haxo AF, Berk SG. Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne Tetrahymena species. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(3):1562-1569.

Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annu Rev Phytopathol. 2006; 44: 367-392.

Brasil. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde recomenda o consumo de alimentos frescos em novo guia alimentar. 2014. [acessado em 12 de Agosto de 2014]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sas/sas-noticias/9684-ministerio-da-saude-recomenda-consumo-de-alimentos-frescos>

Brasil. Ministério da Saúde. Plano de Segurança da Água – Garantindo a qualidade e promovendo a saúde – Um olhar do SUS. Brasília, DF; 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. 2011. Brasília, DF [Acessado em 11 Dezembro 2013]. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/12/pais-tera-plano-nacional-de-saneamento-basico>.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 375, de 26/08/2006, define os critérios e procedimentos para uso agrícola de lodos de esgotos gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário. Brasília, DF; 2006. [Acessado em 9 Março 2010]. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol. 2000; 38 (7): 2465–2467.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Microbiologia médica. 24 edição. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2009.

Cameron KC, Di HJ, McLaren RG. Is soil an appropriate dumping ground for our waste? Australian Journal of Soil Research. 1997; 35 (5): 995-1035.

Camra. Center for Advancing Microbial Risk Assessment. QMRA Wiki [homepage da internet]. Michigan State University and Drexel University. 2014 [Acesso em 03 de Julho de 2014]. Disponível em: http://qmrawiki.msu.edu/index.php?title=Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_%28QMRA%29_Wiki

Carlos JV, Rolim S, Bueno MB, Fisber RM. Portion sizes of the main foods and preparations consumed by adults and elderly living in the city of São Paulo, Brazil Rev Nutr. 2008; 21(4): 383-39.

Carvalho FCT, Sousa OV, Carvalho EMR, Hofer E, Vieira RHSF. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from shrimp farming freshwater environment in northeast region of Brazil. J Pathog. Volume 2013. [Acessado em 11 de Junho de 2014]. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1155/2013/685193>.

- Cerniglia CE, Nayak R. Microarray analyses of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/ food animal environment. J. Infect. Dev. Ctries. 2011; 5(2): 94-105.
- Cevallos-Cevallos JM, Gu G, Danyluk MD, Dufault NS, Bruggen AHC. *Salmonella* can reach tomato fruits on plants exposed to aerosols formed by rain. Int J Food Microbiol. 2012; 158: 140–146.
- 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 H, Yan SH, Ye ZL, Meng HJ, Zhu YG. Utilization of urban sewage sludge: Chinese perspectives. Environ Sci Pollut Res. 2012; 19:1454–1463.
- Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. Pediatr Neonatol. 2013; 54:147-152.
- Chen S, Zhao S, McDermott PF, Schroeder CM, White DG, Meng JA. DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. Mol Cell Probes. 2005; 19: 195-201.
- Chiu CH, 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): 2619–2622.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. 2009. CLSI Publication M100-S19, Wayne, PA: CLSI; 2009.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. 2012. CLSI Publication M100-S21, Wayne, PA: CLSI; 2012.
- Coakley CW, Heise MA. Versions of the sign test in the presence of ties. Biometrics 1996; 52: 1242-1251.
- Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the salmonellae. J. Bacteriol. 1973; 115:307–315.
- Daigle F. Typhi genes expressed during infection or involved in pathogenesis. J Infect Dev Ctries. 2008; 2 (6): 431-7.
- De Groot MH, Schervish MJ. Probability and Statistics. 4 th Edition. Boston: Pearson. 2011.
- Deering AJ, Mauer LJ, Pruitt RE. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. Food Res Int. 2012; 45: 567–575.

Delignette-Muller ML, Pouillot R, Denis JB, Dutang C. Fitdistrplus: help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data. 2014. [Acessado em 22 de Julho de 2014]. Disponível em: <http://cran.r-project.org/web/packages/fitdistrplus/fitdistrplus.pdf>

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, Franco F, Guida SM, Balabakis AJ, Passadore LF, Santos SR, Matté GR, Matté MH. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2009; 51(4):203-209.

Eamens GJ, Waldron AM, Nicholls PJ. Survival of pathogenic and indicator bacteria in biosolids applied to agricultural land. Australian Journal of Soil Research 2006; 44: 647-659.

ECDC. European center for Disease Prevention and Control. 2011. Annual Epidemiological Report - Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. p.101-104 [Acessado em 22 Novembro de 2012]. Disponível em http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf.

Egan M. Biosolids management strategies: an evaluation of energy production as an alternative to land application. Environ Sci Pollut Res. 2013; 20:4299–4310.

Fonseca EL, Mykytczuk OL, Asensi MD, Reis EMF, Ferraz LR, Paula FL, Ng LK, Rodrigues DP. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 2006; 44 (8): 2767–2772.

Fu B, Jiang Q, Liu H, Liu H. Occurrence and reactivation of viable but non-culturable *E. coli* sewage sludge after mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. Biotechnol Lett 2014; 36:273–279.

Gale P. Land application of treated sewage sludge: quantifying pathogen risks from consumption of crops. J Appl Microbiol. 2005; 98: 380–396.

Gale P. Using event trees to quantify pathogen levels on root crops from land application of treated sewage sludge. J Appl Microbiol. 2003; 94: 35–47.

Ge Chongtao, Lee C, Lee J. The impact of extreme weather on lettuce and green onion. Food Res Int. 2012; (45): 1118-1122.

Gerba CP, Pepper IL, Maier RM. Environmental Microbiology. 2ª Edição. EUA: Academic Press. 2009

Ghilardi ACR, Tavechio AT, Fernandes SA. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101(3): 281-286.

Gibbs RA, Hu CJ, Ho GE, Unkovich I. Regrowth of faecal coliforms and *Salmonellae* in stored biosolids and soil amended with biosolids. *Water Sci Technol.* 1997; 11-12: 269-275.

Golberg D., Kroupitski Y, Belausov E., Pinto R., Sela S. *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int J Food Microbiol.* 2011; 145: 250-257.

Guiney DG, Fierer J. The role of the *spv* genes in *Salmonella* pathogenesis. *Front Microbiol.* 2011; 2: 1-10.

Haas CN, Rose JB, Gerba CP. *Quantitative Microbial Risk Assessment.* 2nd Edition. New York: John Wiley&Sons. 2014.

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 Food Saf.* 2003; 79-141.

Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J Appl Microbiol.* 2008; 104: 613-626.

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

Hirneisen, KA, Sharma M, Kniel, KE. Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9 (5): 396-405.

Horswell J, Ambrose V, Clucas L, Leckie A, Cinton P, Speir TW. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. after application of sewage sludge to a *Pinus radiata* forest. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 1321- 1331.

HPA. Health Protection Agency. Public Health England. Outbreak of *Salmonella* Newport.2012.[Acessado em 9 de Setembro de 2012] Disponível em: <http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2012PressReleases/120202SalmonellaNewportoutbreak/>.

IAG. Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas. Serviços Técnicos. Seção de Meteorologia. Universidade de São Paulo. 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Rio de Janeiro; 2008 [Acessado em 25 de Abril de 2014]. Disponível em

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf

Iranpour R, Cox H. Recurrence of fecal coliforms and *Salmonella* species in biosolids following thermophilic anaerobic digestion. *Water Environ Res.* 2006; 78 (9): 1005-1012.

Jiang Q, Fu B., Chen Y, Wang Y., Liu H. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97: 6043-6050.

Jimenez B, Barrios JA, Maya C. Class B biosolids production from wastewater sludge with high pathogenic content generated in an advanced primary treatment. *Water Sci Technol.* 2000; 42 (9): 103-100.

Jones PW, Rennison LM, Lewin VH, Redhead DL. The occurrence and significance to animal health of salmonellas in sewage sludges. *J Hyg Camb.* 1980; 84:47-62.

Kroupitski Y, Pinto R, Brandl MT, Belausov E, Sela S. Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *J Appl Microbiol.* 2009; 106: 1876-1885.

Lavalett L, Sánchez MM, Muñoz N, Moreno J, Cardona-Castro, N. Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella entérica*. *Biomedica.* 2009; 29: 244-252.

Le Minor L, Popoff M.Y. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987; 37:465–468.

Liao CH. Inhibition of foodborne pathogens by native microflora recovered from fresh peeled baby carrot and propagated in cultures. *J Food Sci.* 2007; 72: 134-139.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock.* 12ª Edição. Porto Alegre: Artmed; 2010.

Magalhães TB. Uso agrícola de biossólidos: análise crítica da resolução CONAMA 375/2006 na perspectiva da metodologia de avaliação quantitativa de risco microbiológico [dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2012.

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: 882-889.

Manios SG, Konstantinidis N, Gounadaki AS, Skandamis PN. Dynamics of low (1 to 4 cells) vs high populations of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in

fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified Extracts. Food Control 2013; 29 (2): 318-327.

Mara DD, Horan NJ. Sludge to Land: Microbiological double standards. Journal CIWEM. 2002; 16: 249-252.

Marks M.M. Coleman ME, Lin CT, Roberts T. Topics in microbial risk assessment: dynamic flow tree process. Risk Analysis. 1998; 18(3): 309-328.

Marques MO, Tsutyia MT, Melo WJ, Souza AHCB. Desempenho de plantas de milho cultivadas em solos acrescidos de biossólido oriundo da estação de tratamento de esgoto de Barueri, localizada na região metropolitana de São Paulo. In: 27º Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental; 3 a 8 de Dezembro de 2000; Porto Alegre-RS. AIDIS, ABES, 2000 (CD ROM).

Marsh P, Morris NZ, Wellington, EMH. Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. FEMS Microbiol Ecol. 1998; 27: 351-363.

Martins MT, Sanchez PS, Marques E. Eficácia do tratamento químico e térmico na destruição de patógenos em lodo digerido. Rev Microbiol. 1986; 17 (2): 148-154.

Mavridou A, Kouloubis P, Vassalou E, Rigas F, Vakalis N. Microbiological quality of sewage sludge in Greece disposed for agricultural use. Int J Environ Health Res. 2001; 11 (3): 275-279.

Medeiros MAN, Neme PS, Capuano DM, Errera MC, Fernandes GR, Avila FA. 2001. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto, SP, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2001; 43 (1): 21 – 24.

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.

México. Secretaria de Medio Ambiente e Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002; Protección ambiental-Lodos y biosólidos.-Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. [Acessado em 15 de Junho de 2014]. Disponível em:<http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2251.pdf>

Nguyen-the C., Lund B M. The lethal effect of carrot on *Listeria* species. J Appl Bacteriol. 1991; 70: 479–488.

Nicholson FA, Groves SJ Chambers BJ. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. Biores Technol. 2005; 96: 135-143.

Nogueira TA, Sampaio RA, Fonseca IM, Ferreira CS, Santos SE, Ferreira LC et al. Metais pesados em milho e feijão caupi consorciados, adubados com lodo de esgoto. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2007; 11 (3): 331-338.

Noriega E., Newman J., Saggars E., Robertson J., Laca A., Díaz M., Brocklehurst T.F. Antilisterial activity of carrots: effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Res Int.* 2010; 43: 2425–243.

NZWWA. New Zeland Waste Water & Wastes Association. Guidelines for the safe application of biosolids to land in New Zealand. Ministry for the Environment. August 2003.[Acessado em 23 de Junho de 2014]. Disponível em: http://www.waternz.org.nz/Folder?Action=View%20File&Folder_id=101&File=biosolids_guidelines.pdf

Oliveira CJB, Carvalho LFS, Aparecida SF, Tavechio AT, Menezes CCP, Domingues FJJ. Antimicrobial Resistance *Salmonella* Serotypes Isolated from Slaughter-Age Pigs and Environmental Samples. *Microb Drug Resist.* 2002; 8(4): 407-411.

Parry CM, Threlfall EJ: Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21: 531-538.

Paulino RC, Castro EA, Soccol VT. Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34 (5): 421-428.

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 serotypes and virulence genes in *Salmonella* Enterica of human or animal origin. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22(4): 559-69.

Popoff MYJ, Bockemuhl J, Brenner FW. Supplement 1998 (no.42) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 2000; 151:63–65.

Putter J. The treatment of ties in some nonparametric tests. *Annals of Mathematical Statistics.* 1955; (26): 368-386.

R Core Team (2012). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rahn K, De Grandis SA, 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 Probes.* 1992; 6: 271-279.

Rangel OJP, Silva CA, Bettiol W, Dynia JF. Efeito de aplicações de lodos de esgoto sobre os teores de metais pesados em folhas e grãos de milho. *Revista Brasileira de Ciências do Solo.* 2006; 30: 583-594.

Razzolini MTP, Nardocci AC. Avaliação de risco microbiológico: etapas e sua aplicação na análise da qualidade da água. 2006 [Acessado em 04 de Julho de 2014].

Disponível em: <http://www3.sp.senac.br/hotsites/blogs/InterfacEHS/wpcontent/uploads/2013/07/2006-v2-art3-portugues.pdf>].

Ribeiro RV, Reis EMF, Reis CMF, Freitas-Almeida, AC, Rodrigues DP. Incidence and antimicrobial resistance of enteropathogens isolated from an integrated aquaculture system. *Lett Appl Microbiol*. 2010; 51: 611–618.

Russ CF, Yanko WA. Factors affecting salmonellae repopulation in composted sludges. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981; 41, 597–602.

Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol*. 2006; 112: 1-10.

Rytönen A, Poh J, Garmendia J. SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104:3502–3507.

Sabesp. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Área Técnica. 2011.

Sahlström L, Aspan A, Bagge E, Danielsson-Tham ML, Albiñ A. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res*. 2004; 38 (8):1989-1994.

Sahlström L., Jong B, Aspan A. *Salmonella* isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis. *Lett Appl Microbiol*. 2006; (43): 46–52.

Sant'Ana AS, Franco BDGM, Schaffner DW. Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Food Microbiol*. 2012b; 30: 267 -273.

Sant'Ana AS, Barbosa MS, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *Int J Food Microbiol*. 2012a; 157: 52–58.

Sant'Ana AS, Barbosa MS, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *Int J Food Microbiol* 2012; 157: 52–58.

Santos LM, Leite WC, Luz FMM, Saab SC. Determinação do potencial agrícola do lodo de esgoto por meio de análises físico-químicas e microbiológicas. *Synergismus scyentifica UTFPR*. 2011; 06 (1).

Scaglia B, D'Imporzano G, Garuti G, Negri M, Adani F. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci Total Environ*. 2014; (466-467): 888–897.

Scopa SD, Kerje S, Krovacek K. The importance of pathogenic organisms in sewage and sewage sludge. *J Air Waste Manag Assoc.* 2001; 51: 848-860.

Sidhu PS, Toze SG. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ Int.* 2009; 35: 187-201.

Sígolo JB, Pinheiro CHR. Lodo de esgoto da ETE Barueri - SP: Proveniência do enxofre elementar e correlações com metais pesados associados. *Revista do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo.* 2010; 10 (1): 39-51.

Silva FC, Boaretto AE, Berton RS, Zotelli HB, Pexe CA, Bernardes EM. Efeito de lodo de esgoto na fertilidade de um argissolo vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar. *Pesqui Agropecu Bras.* 2001; 36 (5): 831-840.

Singh BR, Agarwal M, Chandra M, Verma M, Sharma G, Verma JC, Singh VP: Plasmid profile and drug resistance pattern of zoonotic *Salmonella* isolates from Indian buffaloes. *J Infect Dev Ctries.* 2010; 4(8): 4477-4483.

Sinha RK, Herat S, Bharambe G, Brahambhatt A. Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. *Waste Manag Res.* 2010; 28: 872-881.

Soller JA. Use of microbial risk assessment to inform the national estimate of acute gastrointestinal illness attributable to microbes in drinking water. *J Water and Health.* 2006; 4(2):165-186.

Soumet C, Ermel G, Rose N, 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; 28:113-117.

Spinosa L. Wastewater sludge: a global overview of the current status and future prospects. Segunda Edição. Water 21 Market Briefing Series. International Water Association, 2011.

Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou T. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 546-51.

Tanner BD, Brooks JP, Gerba CP, Haas CN, Josepheson KL, Pepper IL. Estimated Occupational Risk from Bioaerosols Generated during Land Application of Class B Biosolids. *J. Environ. Qual.* 2008; 37:2311-2321.

Tansarli GS, Poulikakos P, Kapaskelis A, Falagas ME. Proportion of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge evaluation of the evidence-systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 1177–1184.

Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias, AM, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1996; 38 (15): 315-322.

Tavechio AT, Ghilardi ACR, Peresi JTM, Fuzihara EK, Jakaba M, Fernandes AS, 2002. *Salmonella* Serotypes Isolated from Nonhuman Sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *J. Food Prot.* 2002; 65 (6): 1041–1044.

Tsai CT, Lai JS, Lin ST. Quantification of pathogenic micro-organisms in the sludge from treated hospital wastewater. *J Appl Microbiol.* 1998; (85): 171–176.

Tsutiya MT. Qualidade de biossólidos produzidos em Estações de Tratamento de Esgoto. In 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental; 16 a 21 de Setembro de 2001; João Pessoa-PB. ABES. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, Trabalhos Técnicos: II-073.

UN-HABITAT. United Nation Human Settlements Programme. Global atlas of excreta, wastewater, sludge and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource. Nairobi; 2008

USEPA United States Environmental Protection Agency. Risk assessment, management and communication of drinking water contamination. EPA/625/4-89/024. 1990. [Acessado em 15 de Julho de 2013] Disponível em: www.epa.gov/nrmrl/pubs/625489024.html.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water. Washington DC 20460. Method 1682: *Salmonella* in sewage sludge (Biosolids) by modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium. EPA-821-R-06-14; 2006. [Acessado em 11 de Julho de 2009]. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerclcw/1682ap01.pdf>.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. A guide to the biosolids risks assessments for the EPA Part 503 rule. 1997. [Acessado em 22 de Agosto de 2010] Disponível em: http://water.epa.gov/scitech/wastetech/biosolids/503rule_index.cfm.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Exposure Factors Handbook: 2011 Edition. 2011. Available: [acessado em 28 de Julho]. Disponível em: <http://www.epa.gov/ncea/efh/pdfs/efh-complete.pdf>

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for water reuse. Washington D.C. USA, 1992. [Acessado em 28 de Abril de 2014]. Disponível em: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNABM586.pdf

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Microbial Risk Assessment Guideline: Pathogenic microorganisms with focus on food and water. 2012 [Acessado em 03 de Julho de 2014]. Disponível em: <http://www.epa.gov/raf/files/mra-guideline-july-final.pdf>

USFDA. United States Food and Drug Administration. Program Information Manual, Storage and Handling of Tomatoes, October 5, 2007, Appendix B, Growth of *Salmonella* spp. In Beefsteak and Roma Tomatoes at Room (72°F) and Refrigeration Temperature (41°F). [Acessado em 02 de Setembro de 2014]. Disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/IndustryandRegulatoryAssistanceandTrainingResources/ucm113843.htm>

Vanzo, J. E.; Macedo, L. S.; Tsutiya, M. T. ETE franca: uma estação que além de tratar os esgotos produz insumos agrícolas. In: 27º Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental; 3 a 8 de Dezembro de 2000; Porto Alegre-RS. AIDIS, ABES, 2000 (CD ROM).

Vaz CSL, Streck AF, Michael GB, Marks FS, Rodrigues DP, Reis EMF, Cardoso MRI, Canal CW. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult Sci*. 2010; 89: 1530–1536.

Viau E, Bibby K, Paez-Rubio T, Peccia J. Toward a consensus view on the infectious risks associated with land application of sewage sludge. *Environ. Sci. Technol*. 2011; 45: 5459-5469.

Vieira RF, Vieira RF, Tanaka RT, Tsai SM, Pérez DV, Silva CMMS. Disponibilidade de nutrientes no solo, qualidade de grãos e produtividade da soja em solo adubado com lodo de esgoto. *Pesqui Agropecu Bras*. 2005; 40 (9): 919-926.

Villar, B.S. Comunicação pessoal. Pesquisadora do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2013.

Viswanathan P, Kaur R. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *Int J Hyg Environ Health*. 2001; 203: 205-213.

Vought KJ, Tatini SR. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *J Food Prot*. 1998; 61 (1): 5-10.

Wang H, Brown SL, Magesan GN, Slade AH, Quintern M, Clinton PW, Payn TW. Technological options for the management of biosolids. *Environ Sci Pollut Res*. 2008; 15:308–317

Wenjing Pan. Modeling the growth of *salmonella* spp. on cut tomatoes. [Master Dissertation]. Graduate School-New Brunswick Rutgers. The State University of New Jersey. 2010.

Westrell T. Microbial Risk Assessment and its implications for risk management in urban water systems. [Tese de Doutorado]. Linköping University, Faculty of Arts and Science. Sweden. 2004.

WHO. World Health Organization. Guideline for the safe use of wastewater, excreta and greywater in agriculture. Volume 4: Wastewater use in Agriculture. Guideline. Geneva; 2006. [acessado em 03 de Julho de 2014]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546824_eng.pdf

WHO. World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. 4th Edition. 2011.[acessado em 17 de Julho de 2014]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_toc.pdf?ua=1.

Wong K, Onan BM, Xagorarakis I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and *Salmonella* bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. Appl Environ Microbiol. 2010; 76 (19): 6441–6448

Yaziz MI, Lloyd BJ. The removal of salmonellas in conventional sewage treatment processes. J Appl Bacteriol. 1979; 46: 131–142.

You D, Wardlaw T, Salama P, Jones G. Levels and trends in under-5 mortality 1990-2008. Lancet. 2010; 375: 100-103.

Zou W, Al-Khalidi SF, Brahan WS, Han T, Fuscoe J.C, Han J, Foley SL, Xu J, Fang H, Cerniglia C.E, Nayak R. Microarray analyses of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/ food animal environment. J. Infect. Dev. Ctries. 2011; 5(2): 94-105.

ANEXO 1

MEIOS DE CULTURA

1- Caldo TSB (Tryptic Soy Broth)

É um meio de enriquecimento prévio utilizado para a multiplicação e recuperação de células estressadas, principalmente em amostras de lodo, solo e de águas residuárias antes do enriquecimento seletivo. Meio de baixa seletividade, onde o pH se mantém constante durante o período de incubação.

A caseína e a soja digeridas por enzimas são as fontes de nitrogênio do caldo TSB. A glicose é a fonte de energia que facilita o crescimento do organismo. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico e o dipotássio de fosfato é um agente tamponador.

Fórmula aproximada para 1 litro:

Caseína digerida com enzimas pancreáticas	17,0 g
Soja digerida com papaína	3,0g
Dextrose	2,5g
Cloreto de Sódio	5,0g
Fosfato dipotássico	2,5g

2-Meio Semi-Sólido Rappaport- Vassiliadis (MSRV)

O meio Modificado Semi-Sólido Rappaport Vassiliards (MSRV) é usado com suplemento de Novobiocina para rápida detecção de *Salmonella* spp. tanto em fezes quanto em produtos alimentares. Este meio é uma modificação do caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis para a detecção de *Salmonella* spp. móveis em fezes e alimentos. O trabalho original sobre o meio MSRV mostrou que um meio semi-sólido em placas de Petri poderia ser utilizado como um meio rápido e sensível de

isolamento em produtos alimentares na sequência do pré-enriquecimento ou enriquecimento seletivo. O meio semi-sólido permite a mobilidade de cepas de *Salmonella* spp. e, são assim detectadas, por formarem halos de crescimento ao redor do ponto inicial de inoculação. Este meio ainda contém peptonas como fontes de carbono e nitrogênio. O cloreto de magnésio aumenta a pressão osmótica no meio. A novobiocina e o verde de malaquita inibem outros organismos que não sejam *Salmonella* spp. O baixo pH do meio, combinado com novobiocina, verde malaquita e cloreto de magnésio, ajudam a seleccionar *Salmonella* spp mais resistentes. O ágar em baixa concentração é o agente de solidificação.

Tanto a triptose quanto a caseína hidrolisadas enzimaticamente fornecem o carbono e nitrogênio essenciais ao crescimento microbiano. O fosfato presente tampona o meio e o oxalato de verde de malaquita, bem como a novobiocina, inibem muitas bactérias gram-positivas. O diferencial deste meio está baseado na habilidade das espécies de *Salmonella* spp. de migrarem em meio seletivo, competindo com outros organismos que também apresentam motilidade, desta forma produzindo halos opacos de crescimento. Este meio não é adequado para a detecção de cepas de *Salmonella* spp. sem motilidade. Finalmente o meio MSRV detecta mais cepas de *Salmonella* spp. do que os procedimentos de enriquecimento rotineiros.

Fórmula aproximada para 1 litro:

Triptose	4,59g
Caseína Hidrolisada	4,59g
Cloreto de Sódio	7,34g
Fosfato Monopotássico	1,47g
Cloreto de Magnésio	10,39g
Oxalato de Verde Malaquita	37mg
Ágar	2,7g
Novobiocina (2%)	1,0 mL

3-Meio Sólido XLD (Xilose, Lisina e Desoxicolato)

O meio XLD é um meio seletivo e diferencial para o isolamento de bactérias enteropatogênicas, especialmente do gênero *Salmonella*. As cepas de *Salmonellas* spp. utilizam a xilose, acidificando o meio e, a seguir, descarboxilam a lisina produzindo a cadaverina, uma diamina capaz de reverter o pH para alcalino. Em geral, reduzem o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio (H₂S) apresentando-se sob a forma de colônias vermelhas com centro escuro, excetuando-se os sorotipos *S. Choleraesuis*, *S. Paratyphi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, cujas colônias são inteiramente vermelhas, semelhantes à *Shigella* spp., *Providencia* spp. bem como *Proteus rettgeri*.

Fórmula aproximada para 1 litro:

Extrato de levedura	3,0g
L-lisina	5,0g
Xilose	3,5g
Lactose	7,5g
Sacarose	7,5g
Desoxicolato de Sódio	2,5g
Citrato de Amônio Férrico	0,8g
Ágar	13,5g
Vermelho de Fenol	0,08g

4-Meio Líquido – TSI (Tríplice açúcar e Ferro)

O meio TSI é utilizado para a diferenciação de bacilos Gram-negativos entéricos baseada na fermentação de carboidratos e na produção de sulfeto de hidrogênio. O mesmo contém três açúcares (lactose, dextrose e sacarose), vermelho de fenol para a detecção de fermentação de carboidratos e sulfato ferroso amoniacal para a detecção da produção de sulfeto de hidrogênio (indicado pelo escurecimento na parte interior do fundo do tubo). A fermentação de carboidratos é indicada pela produção de gás e na mudança na cor do indicador de pH de vermelho para amarelo.

Para facilitar a detecção de organismos que metabolizam exclusivamente a dextrose, a concentração de glicose é um décimo da concentração de lactose ou sacarose. A pequena quantidade de ácidos produzidos na rampa do tubo, durante a fermentação da glicose, oxida-se rapidamente, fazendo com que o meio permaneça vermelho ou se reverta a um pH alcalino. Ao contrário, a reação ácida (amarelo) é mantida no fundo do tubo, pois a tensão do oxigênio neste local é menor. Após o esgotamento limitado da glicose, os organismos são capazes de utilizar a lactose ou sucrose. Para melhorar a condição alcalina da rampa, a troca livre de ar deve ser permitida, deixando a tampa do tubo frouxa. Se o tubo é bem fechado, uma reação ácida (causada exclusivamente pela fermentação da glicose) ocorrerá também nesta região.

Fórmula aproximada para 1 litro:

Extrato de Bife	3,0g
Extrato de Levedura	3,0g
Caseína digerida com enzimas pancreáticas	15,0g
Protease de Peptona N. 3	5,0g
Dextrose	1,0g
Lactose	10,0g
Sucrose	10,0g
Sulfato ferroso	0,2g
Cloreto de Sódio	5,0g
Tiossulfato de Sódio	0,3g
Ágar	12,0g
Vermelho de Fenol	0,024g

5-Meio Líquido - LIA (Lysine Iron Agar)

O meio LIA é usada para diferenciar os organismos entéricos com base na sua capacidade de descarboxilar e diaminizar a lisina e formar sulfeto de hidrogênio. A glicose é incorporada ao meio em uma concentração de 0,1%. O organismo é transferido com o auxílio de uma alça de inoculação flambada e inoculado na porção final do tubo de ensaio e incubado a 35°C por 18-24 horas com as tampas frouxas. Para organismos que fermentam a glicose, ocorrerá a produção de ácidos, muitas vezes

acompanhada da produção de gás (em bolhas ou rachaduras no meio). Para organismos que são capazes de descarboxilar lisina, haverá a produção de subprodutos, os quais reverterem à cor do meio para uma cor roxa. Para organismos que não descarboxilam a lisina, haverá a liberação de ácidos no fundo do tubo resultando na cor amarela. A porção oblíqua pode conservar-se alcalina devido à descarboxilação oxidativa de proteínas, proteoses e aminoácidos no meio. Espécies de *Proteus* desaminam a lisina na presença de oxigênio produzindo uma mudança de cor vermelha na parte inclinada. O H_2S produzido por microrganismos reage com tiosulfato de sódio liberando gás. Este reage com os sais de ferro com o sulfato ferroso bem como o citrato férrico de amônio, produzindo um precipitado insolúvel de ferro de coloração escuro no centro.

Fórmula aproximada para 1 litro:

Peptona	5,0g
Extrato de Levedura	3,0g
Dextrose	1,0g
L-Lisina HCl	10,0g
Citrato de Amônio Férrico	0,5g
Tiosulfato de Sódio	0,04g
Púrpura de Bromocresol	0,02g
Ágar	15,0g

6- Meio Líquido Urease

O Caldo Uréia é recomendado para a identificação de bactérias com base na utilização de uréia, especialmente para a diferenciação das espécies *Proteus* spp. das espécies de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. O caldo uréia é utilizado para detectar a presença da enzima urease. Esta degrada a uréia em amônia, água e dióxido de carbono. A amônia reage com o indicador vermelho de fenol tornando o caldo cor de rosa. O Caldo Uréia pode ser usado para a determinação de atividade da urease em enterobactérias, assim como em microrganismos do gênero *Brucella*, *Bacillus*, *Micrococcus*, e *Mycobacterium*. Desenvolvido por Rustigian e Stuart, este meio

altamente tamponado reage com a intensa liberação de amônia por *Proteus* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. nas primeiras 24 horas após a incubação. A presença de amônia, que é alcalina, produz uma coloração roxa na presença de indicador fenol.

Fórmula aproximada para 1 litro:

Extrato de Levedura	0,1g
Fosfato Monopotássico	9,1g
Fosfato Dipotássico	9,5g
Ureia	20,0g
Vermelho de Fenol	0,01g

ANEXO 2

Gráficos com os riscos anuais de infecção por ingestão de hortaliças e riscos anuais para a ingestão de partículas pelos trabalhadores

ETE 2

ETE 4

Anexo 3

Gráficos das sensibilidades de todos os cenários deste estudo

ETE 2

ETE 4