UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em vegetais
orgânicos cultivados na região metropolitana de São Paulo, SP

Erika Yamada Batalha

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em vegetais
orgânicos cultivados na região metropolitana de São Paulo, SP

Erika Yamada Batalha

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr6018

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

B329e	<p>Batalha, Erika Yamada <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga em vegetais orgânicos cultivados na região metropolitana de São Paulo, SP / Erika Yamada Batalha. -- São Paulo, 2015. 64p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Landgraf, Mariza</p> <p>1. Bromatologia 2. Microbiologia de alimentos I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.</p>
641 CDD	

Erika Yamada Batalha

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em vegetais orgânicos
cultivados na região metropolitana de São Paulo, SP

Comissão julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de mestre

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Orientador/presidente

Dra. Roxane M. F. Piazza

Dra. Beatriz E. C. Guth

São Paulo, 04 de novembro de 2015

A Deus, pois já há tempos Ele me disse:
“Porque eu bem sei os pensamentos que
tenho a vosso respeito, diz o Senhor:
pensamentos de paz, e não de mal,
para vos dar o fim de desejais”

Jeremias 29:11

Agradecimentos

À Deus, que sempre tem sonhos e planos para a minha vida maiores do que eu mesmo imagino. Ele me amou primeiro, por isso O amo, e decido servi-Lo até o fim.

À prof. Dra. Mariza Landgraf, pela confiança, pela paciência, e por ter me concedido a oportunidade e o privilégio de fazer este trabalho sob sua orientação.

À prof. Dra. Maria Tereza Destro, pela confiança, e sugestões.

À prof. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pelo incentivo e confiança.

À prof. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth, da Unifesp, pela disponibilização das cepas padrão.

À prof. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, do Instituto Butantan, pela disponibilização das cepas padrão, interesse e sugestões.

À prof. Dra. Gisele Monteiro, do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia Industrial de Microrganismos, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, pela orientação e disponibilização do laboratório para transformação das cepas de *E. coli*.

Ao Dr. Issao Ishimura, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) de Ibiúna, pela boa disposição e auxílio junto aos produtores rurais.

Aos produtores, que colaboraram para que esta pesquisa fosse realizada.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação, incentivo e confiança, sempre.

Ao meu esposo Hércules, pelo amor incondicional, incentivo, paciência e abnegação. Sem você jamais teria conseguido!

Aos meus filhos, Mikael e Elise, pelo carinho e amor, que me faziam sorrir e me sentir feliz mesmo nos momentos difíceis.

A minha irmã Mayumi, pelo incentivo, torcida, confiança e amizade.

À Katia Leani, pela amizade, ensinamentos e paciência.

À Daniele Maffei, pela amizade, carinho, parceria e sugestões.

À Rubia Olivo, pela amizade, prestatividade e colaboração.

À Vanessa e Vinicius, pela amizade, ensinamentos e paciência.

Aos amigos do laboratório Maria Crystina, Janaína, Aline, Rafael, Raquel, Lúcia, Fabiana, Daniele Faria, Natacha.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e apoio científico.

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

BATALHA, E.Y. ***Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em vegetais orgânicos cultivados na região metropolitana de São Paulo, SP.** 2015. 64f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) está entre os patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos devido ao consumo de vegetais. No entanto, até agora, os relatos sobre a presença de STEC em vegetais no Brasil são escassos. Esse microrganismo é veiculado por alimentos, contaminados direta ou indiretamente por fezes animais, sendo responsável por um amplo espectro de doenças que compreende desde diarreia leve que pode evoluir para colite hemorrágica (CH), até síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de STEC em vegetais orgânicos cultivados na região metropolitana da cidade de São Paulo, Brasil, caracterizando os fatores de virulência *stx1*, *stx2*, *eae* e *ehx*, bem como o sorotipo. Um total de 200 amostras de vegetais orgânicos (folhas verdes), obtido a partir de três produtores foi analisado quanto à presença de cepas de STEC. Caldo triptona de soja (TSB) suplementado com vancomicina (8mg/L), cefixima (50µg/L) e telurito de potássio (2,5mg/L) foi utilizado na etapa de pré-enriquecimento, com incubação a 37°C/24 h, seguido por semeadura em MacConkey Sorbitol (SMAC) e CHROMagar STEC (CHROM). Após incubação a 37°C/24 h, as colônias suspeitas foram confirmadas por testes bioquímicos e submetidas a PCR objetivando a detecção dos genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehx*, e os genes *fliCH7* e *rfbO157*. Entre as 200 amostras de vegetais orgânicos analisadas, 30 (15%) foram positivas para *E. coli*, mas nenhum isolado apresentou os genes de virulência pesquisados. Nossos resultados indicam baixo risco de infecção devido ao consumo destes produtos frescos em São Paulo, Brasil. No entanto, são necessárias mais pesquisas, abrangendo um maior número de amostras e área pesquisada, uma vez que este patógeno já foi encontrado no meio ambiente em estudos anteriores e poucas pesquisas investigaram a presença de STEC em vegetais no Brasil.

Palavras-chave: STEC, VTEC, vegetais orgânicos, hortaliças, verduras.

ABSTRACT

BATALHA, E.Y. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in organic vegetables produced in the area of São Paulo city, Brazil.** 2015. 64f. Dissertation (Master) – Faculty of Pharmaceutical Science, São Paulo University, São Paulo, 2015.

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains are among the pathogens involved in foodborne disease outbreaks due to consumption of vegetables. However, reports on the presence of STEC in vegetables in Brazil are lacking. STEC is an important pathogen transmitted by food, directly or indirectly contaminated with animal feces, responsible for a broad spectrum of diseases varying from mild diarrhea to hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). This study aimed at investigating the presence of STEC in organic vegetables in the metropolitan region of São Paulo city, Brazil, characterizing the virulence factors *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *ehx* as well as identifying the serotype. A total of 200 samples of organic vegetables (green leafy), obtained from three organic producers was analyzed for the presence of STEC strains. Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with vancomycin (8mg/L), cefixim (50µg/L) and potassium telurite (2.5mg/L) was used in the pre enrichment step with incubation at 37°C/24 h, followed by plating onto Sorbitol-MacConkey (SMAC) agar and CHROMagar STEC (CHROM). After incubation at 37°C/24 h, presumptive colonies were confirmed by biochemical tests and submitted to PCR targeting for the detection of *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *ehx* virulence genes, as well as *fliCH7* and *rfbO157*. Among the 200 organic vegetable samples analyzed for STEC strains, 30 (15%) were positive for *E. coli*, but none of them presented the virulence genes studied. These findings indicate low risk of infection due to the consumption of these fresh produce in Sao Paulo, Brazil. However, more research is required, covering a larger number of samples and area, since this pathogen has already been found in the environment in previous studies, and few investigations of STEC in vegetables have been reported in Brazil.

Keywords: STEC, VTEC, organic vegetables, green leafy, produce

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variedade e número de hortaliças coletadas em cada propriedade visitada.	16
Tabela 2	Iniciadores para realização de PCR	23
Tabela 3	Ocorrência de coliformes totais e <i>E.coli</i> nas amostras de hortaliças analisadas	27
Tabela 4	Ocorrência de <i>E.coli</i> e STEC nas amostras de hortaliças analisadas.	28
Tabela 5	Questionário aplicado aos produtores orgânicos, sobre as práticas agrícolas empregadas	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ação da toxina de Shiga	8
Figura 2	Foto do canteiro de cultivo da propriedade “A”	17
Figura 3	Detecção de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	24
Figura 4	Colônias verde fluorescentes recuperadas de alface experimentalmente contaminada	36
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose 1%: rastreamento de genes <i>stx</i> e <i>eae</i> em alface contaminada experimentalmente	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Importância do consumo vegetal e da produção orgânica	2
1.2. Fontes de contaminação microbiana das hortaliças.....	3
1.3. Microrganismos indicadores de contaminação microbiana	5
1.4. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC)	6
1.5. Mecanismos de virulência.....	7
1.6. Quadro clínico	9
1.7. Reservatórios e resistência ao meio ambiente	10
1.8. Surtos relacionados a STEC	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivos Gerais:	14
2.2. Objetivos Específicos:.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Materiais.....	15
3.1.1. Cepas Utilizadas:.....	15
3.1.2. Amostragem	15
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Avaliação da sensibilidade do método empregado para isolamento de <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga	18
3.2.2. Pesquisa de STEC	20
3.2.3. Determinação do Número Mais Provável de <i>E. coli</i>	25
3.2.4. Questionário aplicado aos produtores:	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. NMP de <i>E. coli</i>	26
4.2. Pesquisa de STEC	28
4.3. Teste de sensibilidade da metodologia empregada:.....	36
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
APENDICE	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância do consumo vegetal e da produção orgânica

Os alimentos de origem vegetal são fontes importantes de vitaminas, minerais e fibras, componentes essenciais de uma dieta saudável. O baixo consumo de frutas e hortaliças está associado a uma saúde deficiente e ao aumento de risco de doenças crônicas não transmissíveis (ou não comunicáveis), estando entre os dez principais fatores de risco global de mortalidade (WHO, 2015). A Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) tem enfatizado o aumento do consumo de frutas e hortaliças e, juntamente com representantes das indústrias e outras organizações internacionais, têm trabalhado para o aumento do consumo de vegetais visando a prevenção dessas doenças (FAO, 2012). O Brasil, como país membro da ONU (Organização das Nações Unidas), também vem seguindo essas diretrizes, através de ações da Política Nacional de Alimentação e Nutrição (BRASIL, 2011)

De acordo com o Anuário Brasileiro de Hortaliças de 2014 (Anônimo, 2014), a produção nacional foi estimada em 18 milhões de toneladas.

Os sistemas de cultivo mais frequentemente utilizados na produção nacional são o convencional, o hidropônico e o orgânico. No cultivo convencional e no orgânico, o vegetal cresce no solo, e deve receber aporte adequado de nutrientes e água. O método convencional usa tanto fertilizantes químicos quanto orgânicos na adubação, e defensivos agrícolas para controle de pragas, enquanto o método orgânico usa exclusivamente resíduos orgânicos para adubar, além utilizar somente controle biológico para a prevenção de pragas. A hidroponia, por sua vez, é o método no qual o vegetal cresce com o suporte de uma solução nutritiva em que a água é o principal componente. Não faz uso de fertilizantes orgânicos porque a planta não cresce no solo, e a quantidade de defensivos agrícolas requeridos é menor do que no sistema convencional (Fávaro-Trindade et al., 2007).

A agricultura orgânica é definida como um sistema que engloba a saúde do solo, do ecossistema e do ser humano. É fundamentada em conhecimentos da biodiversidade, sistemas e ciclos ecológicos locais, que propiciam a produção sem o uso de qualquer substância nociva ao homem ou ao meio ambiente, tais como os agrotóxicos, aditivos e organismos geneticamente modificados. (Gomiero et al., 2011; International Federation of Organic Agriculture Movements - IFOAM, 2014). Para

incentivar a produção e o consumo de alimentos orgânicos no Brasil, o governo federal lançou, em 2013, o Plano Nacional de Agroecologia e Agricultura Orgânica (Planapo), seguindo a tendência mundial de incentivo à sustentabilidade e aos hábitos saudáveis, inclusive na alimentação. (BRASIL, 2011).

Enquanto houve um progresso na regulamentação e fiscalização referente à aplicação de agrotóxicos nos alimentos vegetais, constata-se que o mesmo não aconteceu em relação aos perigos microbiológicos. O aumento do consumo de produtos vegetais é acompanhado pelo aumento de casos de doenças de origem alimentar associadas a este tipo de alimento, pois o conhecimento e os cuidados por parte dos produtores e manipuladores, com relação aos riscos microbiológicos, ainda é deficiente ao longo da cadeia produtiva de frutas e hortaliças (Kirezieva, 2015).

1.2. Fontes de contaminação microbiana das hortaliças

Os vegetais, de modo geral, são cultivados sob condições climáticas e geográficas bastante variáveis, sendo que as tecnologias agrícolas empregadas também diferem. Na produção primária, as fontes e as características da contaminação microbiana variam significativamente dependendo do tipo de cultivo, do sistema de produção, das práticas agrícolas e até mesmo de fatores externos a uma determinada propriedade agrícola. Por exemplo, a contaminação de uma produção agrícola é influenciada pela contaminação natural do solo, pelo tipo de produção e manejo das propriedades vizinhas, uma vez que a água de chuvas pode carregar contaminantes de uma área para outra (Gil et al., 2015).

Os sistemas de cultivo convencional e orgânico frequentemente utilizam dejetos animais para a adubação, o que constitui uma possível fonte de contaminação. O sistema orgânico de cultivo, em geral, representa risco maior de contaminação quando comparado ao sistema convencional, pelo fato de utilizar somente fertilizantes naturais, e por não fazer uso de tratamentos químicos que reduzam a população microbiana (Oliveira et al., 2010). Os fertilizantes orgânicos, produzidos a partir de fezes animais, podem introduzir bactérias patogênicas, vírus e parasitos nos alimentos vegetais, caso não sejam devidamente tratados antes da aplicação. A fim de reduzir os riscos de contaminação do alimento, frequentemente utiliza-se a técnica de compostagem, método fermentativo da matéria orgânica que

origina um produto enriquecedor do solo sem que ofereça prejuízo ao meio ambiente (Santos e Monteiro, 2004). Alguns dos fatores que interferem na sobrevivência do patógeno e aumentam o risco de sua transferência para os vegetais são: tipo da matéria orgânica, manejo durante a compostagem, método de aplicação, frequência de aplicação e tempo entre a aplicação e o plantio ou colheita (Gil et al., 2015). As boas práticas agrícolas recomendam o controle de temperatura durante o processo fermentativo aeróbio do adubo, que deve ser periodicamente revolvido para que cada parte da matéria atinja 60°C, garantindo, desse modo, a eliminação de patógenos (Johannessen, 2005). Em pilhas de composto estático, recomenda-se deixar o adubo fermentando por 3 a 6 meses, sem que se adicione nova matéria orgânica durante esse tempo (United States of America, 2015). As boas práticas também incluem a aplicação de adubo pelo menos 90 dias antes da colheita, com o objetivo de reduzir a contaminação fecal no tempo de colheita (Castro-Ibáñez et al., 2015).

Tanto os seres humanos como os animais, sejam domésticos (bovinos, ovinos, equinos, aves, cães) ou silvestres, são responsáveis pela contaminação do ambiente e também das fontes de águas, utilizadas na irrigação dos vegetais. A probabilidade de contaminação através da água é ainda aumentada quando ocorrem chuvas, pois nesta condição as fezes dos animais são espalhadas e carregadas pela água para as fontes de irrigação, como rios e lagos. A água de irrigação é apontada como uma das principais fontes de contaminação fecal e, conseqüentemente, por patógenos em vegetais frescos (Castro-Ibáñez, 2015; Gorman, 2014; Ceuppens, 2014; Park, 2013; Abreu, 2010).

A prevenção da contaminação dos alimentos vegetais deve ser enfocada por todos os envolvidos tanto na fase de pré colheita como na de pós colheita, até que o alimento chegue ao consumidor. As Boas Práticas Agrícolas consideram 5 categorias como sendo as mais importantes, e que devem ser cuidadosamente monitoradas para minimizar os riscos de contaminação na produção primária: solo e fertilizantes, água de irrigação, trabalhadores agrícolas, equipamento e manejo (Doyle, 2012).

1.3. Microrganismos indicadores de contaminação microbiana

Grupos de microrganismos ou espécies definidas, denominados indicadores, são utilizados para estabelecimento de critérios aplicáveis em alimentos, a fim de se obter informações sobre sua qualidade higiênico-sanitária.

Entre esses indicadores tem-se o grupo de coliformes termotolerantes ou coliformes a 45°C (Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA, 2001). *Escherichia coli*, no entanto, é comumente utilizado como o melhor indicador de contaminação fecal, uma vez que seu habitat é o intestino grosso de mamíferos de sangue quente. Além disso, não sobrevive bem fora do trato intestinal, o que lhe confere a propriedade de indicador de contaminação fecal recente ou práticas sanitárias inadequadas no processamento de alimentos (Tortorello, 2003). Esse microrganismo é eliminado nas fezes, contamina solos e águas, podendo assim ser detectado em alimentos crus indicando contaminação fecal direta ou indireta (Ray, 2004). O grupo dos coliformes termotolerantes, incluindo *E. coli*, é facilmente destruído pelo calor e pode ser destruído durante o congelamento (Doyle, Beuchat e Montville, 2001).

A legislação brasileira tolera o limite máximo de coliformes a 45°C em 10²UFC/g para hortaliças (Brasil, 2001). Pesquisas feitas no Brasil, analisando a presença de coliformes termotolerantes em hortaliças obtidas do comércio, revelaram as seguintes taxas de desacordo com os limites estabelecidos: 32% no Paraná (Nakagawa et al., 2014), 20% em Minas Gerais (Santos et al., 2011) e 25% no Rio Grande do Sul (Toniazzi, 2011). Santana et al. (2006) constataram baixos padrões de higiene em amostras de alfaces comercializadas em Salvador, Bahia, independente da forma de cultivo, sendo que a alta concentração de coliformes termotolerantes foi mais frequente nas amostras de cultivo orgânico, seguido do tradicional e hidropônico. No interior de São Paulo, em Ribeirão Preto, Takayanagui et al. (2000) analisaram amostras obtidas de 129 propriedades rurais da região, e encontraram alta concentração de coliformes termotolerantes em hortaliças provenientes de 24 propriedades.

1.4. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

Apesar de a maioria dos isolados de *E. coli* ser considerada inócua, existem isolados patogênicos. Estes são classificados em seis categorias, de acordo com seus fatores de virulência: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), *E.coli* de aderência difusa (DAEC) e produtora de toxina de Shiga (STEC) (Kaper et al., 2004).

STEC é um importante patógeno veiculado por alimentos, contaminados direta ou indiretamente por fezes animais, sendo responsável por um amplo espectro de doenças que compreende desde diarreia leve que pode evoluir para colite hemorrágica (CH), até síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (Nataro e Kaper, 1998).

No início da década de 1980, um surto nos Estados Unidos, originado da ingestão de hambúrguer mal passado, foi associado a STEC. Foi isolado um sorotipo até então pouco conhecido, *E. coli* O157:H7, confirmando sua relação com um quadro de severa diarreia sanguinolenta denominada colite hemorrágica (CH) (Riley, 1983).

Nesta mesma época, Karmali et al. (1983) descreveram a associação desta cepa causadora de colite hemorrágica, à capacidade de produzir citotoxinas causadoras de lesões irreversíveis em células Vero (células renais de macaco verde africano), primeiramente descrita por Konowalchuk et al. (1977), e ao desenvolvimento de síndrome hemolítico-urêmica nos indivíduos infectados. Enquanto isso, O'Brien et al. (1983) caracterizaram a citotoxina, e verificaram alto grau de similaridade estrutural e funcional da toxina de *Escherichia coli* O157:H7 com a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, definindo o termo *Shiga like toxin*, ou toxina de Shiga (Stx).

Mais de 400 sorogrupos de *E. coli* já foram descritos como produtores de toxina de Shiga, e mais de 100 destes já foram associados a surtos diarreicos em seres humanos (Byrne et al., 2014; Johnson et al., 2006). A relevância epidemiológica de cada sorogrupo, de acordo com a região geográfica, é variável. Nos Estados Unidos, embora seja crescente a importância dos sorogrupos não O157 (como O26, O111, O103, O121, O45 e O145), a *E. coli* O157:H7 ainda é considerada a mais importante. O sorogrupo O157 também é o mais predominante no Canadá, Reino Unido e Japão. Na Europa continental e na Austrália, os sorogrupos O157 e não-O157 são igualmente importantes, e na América do Sul os sorogrupos não-O157 são

considerados de maior importância do que o sorogrupo O157 (Donnenberg, 2013), com exceção da Argentina, onde o sorogrupo O157 é o mais importante (Rivas et al., 2006).

1.5. Mecanismos de virulência

A toxina de Shiga (Stx) é o principal fator de virulência de STEC. É codificada pelo gene *stx* cujas toxinas produzidas são subdivididas em dois tipos (Stx1 e Stx2), de acordo com o gene que as codifica (*stx1* e *stx2*) (Paton e Paton, 2002). Stx consiste de 5 subunidades B, responsáveis pela ligação ao receptor glicolipídico (Gb3) presente na superfície de células eucarióticas, e uma subunidade A, composta dos fragmentos A1 (fração enzimática) e A2. Este serve para ligar a subunidade A ao pentâmero B. Stx1 e Stx2 possuem aproximadamente 55% de homologia entre seus aminoácidos (Kaper, Nataro e Mobley, 2004). Enquanto Stx1 constitui um grupo mais homogêneo de toxinas, Stx2 apresenta diversas variantes (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g). A diversidade do grupo Stx2 resulta em variações antigênicas, observadas no fato de que o nível de gravidade da doença está associado à variante de toxina produzida por STEC (Guth, 2008). Por exemplo, sabe-se que a produção de Stx2 e a presença do gene *eae* estão associadas ao aumento da virulência de STEC e, conseqüentemente, a severo quadro clínico. As variantes dos grupos Stx1 e Stx2 podem se apresentar em diversas combinações nos isolados de STEC (Beutin, 2006).

As toxinas são produzidas no cólon, absorvidas pelo epitélio intestinal e alcançam a circulação sanguínea, onde se ligam a leucócitos polimorfonucleares. Stx liga-se ao receptor Gb3, é transportada para o complexo de Golgi e, a seguir, para o retículo endoplasmático. A subunidade A é translocada para o citoplasma, onde age na subunidade 60S dos ribossomos, inibindo a síntese protéica e resultando em morte celular (Fig. 1). Os receptores Gb3 são encontrados em maior concentração principalmente nas células endoteliais do rim, intestino e cérebro (Guth, 2008). Nos rins, a toxina causa lesões que levam à necrose. Tais lesões podem levar à SHU, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e, potencialmente, falência renal aguda. Stx também provoca lesões no cólon, podendo resultar em diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal (Kaper, Nataro e Mobley, 2004).

Fonte: Pacheco e Esperandio, 2012.

Figura 1. Mecanismo de ação da toxina de Shiga.

A fixação de cepas de STEC LEE positivas nas células hospedeiras se dá pela interação entre a proteína intimina e Tir (*Translocated intimin receptor*), como ocorre com as EPEC. A proteína intimina é codificada pelo gene *eae*, localizado na ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), e leva ao desenvolvimento da lesão do tipo “*attaching and effacing*” (A/E) (Nataro e Kaper, 1998) - “*attaching*” significa íntima adesão ao enterócito, e “*effacing*”, desaparecimento das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal (Willshaw et al., 1994). Empregando o sistema de secreção tipo III (T3SS), codificado pela ilha de patogenicidade LEE, o microrganismo consegue inserir uma série de proteínas efetoras na célula hospedeira, afetando diversas vias e processos fisiológicos (Clements, 2012).

Outros importantes fatores de virulência são:

- entero-hemolisina (Ehx), codificada pelo gene *hly* (Fagan et al., 1999), cuja produção está associada ao plasmídeo pO157 (Beutin et al., 1995). É uma proteína que se insere na membrana celular provocando a formação de poros e lise do eritrócito (Schdmit et al., 1999). A produção de entero-hemolisina é associada a doenças humanas como CH e SHU (Cookson et al., 2007; Guth, 2008).

- adesina Saa (STEC *autoagglutination adhesin*) foi identificada pela primeira vez por Paton e colaboradores em 2001, em cepa O113:H21 isolada de paciente de um surto de SHU. A presença de Saa foi encontrada somente em cepas LEE-negativas que também carregavam o plasmídeo *ehx*.

A capacidade das cepas de *E. coli* de adquirir fatores de virulência a partir da transferência de genes promove a geração de novos patótipos, com novas características de patogenicidade. Por exemplo, estudos do agente causador do grave surto ocorrido na Alemanha, em 2011, identificaram uma cepa altamente virulenta de *E. coli* O104:H4, que possuía características de *E. coli* enteragregativa (adesina AAF – *aggregative adherence fimbriae*) e de STEC, uma vez que produziu toxina de Shiga (Brzuszkiewicz et al., 2011; Beutin et al, 2012). Esta cepa híbrida tornou-se conhecida como *Escherichia coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC) ou enteroagregativa produtora de toxina de Shiga (STEAEC).

1.6. Quadro clínico

A transmissão desse microrganismo ocorre através da ingestão de produtos cárneos mal passados e derivados lácteos não pasteurizados, contaminados diretamente com fezes de animais durante o processo de abate ou durante a ordenha, respectivamente; ou ainda pela ingestão de frutas e verduras cruas contaminadas durante a irrigação ou adubação (Hilborn et al., 1999).

A dose infectante é pequena. Somente 10 a 100 células são capazes de causar doença. O período médio de incubação de STEC é de 3,7 dias, podendo variar de 1 a 10 dias. Os sintomas se iniciam com diarreia não sanguinolenta por 1 a 3 dias, seguida de diarreia sanguinolenta em 90% dos casos, devido a colite hemorrágica. Fortes dores abdominais também são sintomas comuns. Geralmente os pacientes não desenvolvem bacteremia e, portanto, não apresentam febre (Donnenberg, 2013). Entre 5 e 10% dos casos evoluem para síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (Centers of Disease and Control and Prevention, 2012). A tríade anemia hemolítica, plaquetopenia ou trombocitopenia e insuficiência renal aguda compõe a SHU, que é responsável por grande parte da morbidade e mortalidade causada por STEC. A taxa de mortalidade em crianças varia de 3 a 5%, e 12 a 30% desenvolvem lesões renais permanentes (Johnson et al., 2006, Guth, 2008). Além da

SHU, outras complicações podem ser observadas, como a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica, sintomas neurológicos e febre. A PTT é também reconhecida por afetar mais adultos do que crianças (Guth, 2008).

1.7. Reservatórios e resistência ao meio ambiente

A presença de STEC é descrita em diversas espécies animais incluindo bovinos, ovinos, caprinos, suínos, cães, cavalos, coelhos e aves, sendo o bovino o principal reservatório em importância para humanos (Caprioli et al., 2005).

No Brasil, existem relatos da presença desse microrganismo em bovinos e carcaças (Ferreira et al, 2014; Laskowski, 2013a); Carvalho et al., 2012; Alvares, 2011; Von Lauer, 2009). Em fezes de bovinos, também há comprovação da presença de STEC, sendo que a prevalência encontrada é bastante variável: 49% em Pelotas, Rio Grande do Sul (Moreira et al., 2003); 57% no Paraná (Farah et al., 2007); 25,5% (Irino et al., 2005), 59,9% (Vicente et al., 2005) e 15,7% (Stella et al., 2012) no estado de São Paulo.

Diversas pesquisas destacam a capacidade de sobrevivência deste microrganismo em ambientes extra intestinais. Consequentemente, há risco de contaminação dos vegetais no campo, uma vez que se constata a eliminação de STEC através das fezes de animais.

E. coli O157:H7 sobrevive de 49 a 126 dias nas fezes bovinas, enquanto o sorotipo O26:H11 e sorogrupo O111 sobrevivem 112 e 70 dias, respectivamente, em fezes mantidas a 15°C (Fukushima et al., 1999; Duffy, 2003). Fremaux et al. (2007) estudaram a capacidade de sobrevivência de STEC não-O157:H7 em fezes bovinas, adaptando as condições de preparo do adubo às práticas agrícolas adotadas. O experimento foi capaz de detectar STEC por 42 dias no adubo revolvido, e por 90 dias no adubo estático.

E. coli O157:H7 tem grande capacidade de sobrevivência em água: 13 semanas em água de lagoa a 15°C (Wang e Doyle, 1998); 15 dias em água do mar, tendo sido observada até mesmo sua multiplicação em solução de cloreto de sódio em concentração de 5% (Miyagi et al., 2001).

A habilidade de STEC em sobreviver em fezes e no meio ambiente pode ser significativa na contaminação e recontaminação de vegetais folhosos

(Fremaux et al., 2008). Os vegetais podem ser contaminados em todas as etapas de produção, sendo que o contato com fezes de animais excretores desse microrganismo, água e adubo contaminados são considerados os mais importantes (Franz e van Bruggen, 2008).

Em vegetais, Brandl (2006) relata forte aderência de *E. coli* O157:H7 em brotos de alfafa. Outros estudos descrevem a capacidade deste patógeno de penetrar em tecidos vegetais a profundidades superiores a 45 µm em diversas espécies, tais como rabanete (Itoh et al., 1998) e alface (Solomon et al., 2002). Também é descrita a capacidade de STEC em colonizar os estômatos e os tecidos mais internos de vegetais (Saldaña et al., 2011, Erickson et al.; 2010; Franz et al.; 2007). Consequentemente, a bactéria fica protegida de microrganismos antagonistas ou competidores, e ainda fica imune aos efeitos de tratamentos químicos, tais como soluções a base de cloro, aumentando sua taxa de sobrevivência (Fremaux et al., 2008).

1.8. Surtos relacionados a STEC

O sorotipo O157:H7 é classicamente associado à maioria dos surtos historicamente descritos. Mas, segundo dados do CDC, estima-se que ocorram cerca de 265 mil casos de infecções por STEC por ano nos Estados Unidos, sendo 36% atribuídos ao sorogrupo O157, e o restante a não-O157. Esses dados são considerados subestimados, por diversas razões: pessoas que não buscaram tratamento médico, infectados assintomáticos, casos em que o agente etiológico não é determinado, por problemas laboratoriais como por exemplo não identificar os sorogrupos de STEC não-O157, ou ainda por indefinição do sorogrupo (CDC, 2012).

Majowics et al. (2014) estimaram 2.801.000 casos de infecção por STEC no mundo, entre 1990 e 2012, 3.890 casos de HUS e 230 mortes anuais.

Durante a década de 1980, a maior parte dos surtos envolvendo *E. coli* O157:H7 era atribuída à ingestão de carne mal passada e derivados lácteos (Caprioli et al., 2005). No entanto, a partir do ano 2000 observa-se um aumento dos relatos de surtos originários de contaminação ambiental, através de ingestão de água e vegetais contaminados secundariamente (Fremaux et al., 2008). Um levantamento realizado a partir de dados do CDC, entre 1973 e 2012, aponta que, em média, o

número de surtos associados ao consumo de vegetais folhosos foi maior do que os associados a outros tipos de alimentos. O norovírus foi o principal agente infeccioso envolvido nos surtos (55%), e STEC foi o agente bacteriano mais comum (18%), seguido de *Salmonella* sp. (11%) (Herman et al., 2015).

O maior surto envolvendo STEC ocorreu em 1996 no Japão, na cidade de Sakai. Esse surto, causado por *E. coli* O157:H7 a partir da ingestão de broto de rabanete cru servido na refeição escolar, atingiu mais de 8000 pessoas, sendo a maioria crianças. Cento e seis crianças desenvolveram SHU, e 3 vieram a óbito (Karch et al., 1999).

Em 2006, um surto decorrente da ingestão de espinafre fresco embalado, contaminado com *E. coli* O157:H7, afetou 205 pessoas, em 26 estados norte-americanos. Entre os pacientes que desenvolveram SHU, 29% eram crianças, 8% eram adultos entre 18 e 59 anos, e 14% tinham 60 anos ou mais. Três pacientes vieram a óbito (Grant et al., 2008)

Em 2011, um surto registrado na Alemanha envolveu *E. coli* O104:H4, também a partir da ingestão de vegetais crus – brotos de feno grego. Um total de 2987 casos de diarreia aguda foi registrado, com 855 casos de SHU e 53 óbitos (35 entre pacientes com SHU, e 18 entre os com gastroenterite) (Robert Koch Institute, 2011).

Nos Estados Unidos, em março de 2012, foi reportado um surto em que 58 pessoas foram infectadas com *E. coli* O157:H7 devido ao consumo de alface contaminada, sendo que 3 delas desenvolveram SHU. Broto de alface cru foi o veículo em surtos ocorridos em 2012 e em 2014. No primeiro, o sorogrupo envolvido foi o O26, com 29 casos e 7 deles com SHU. Já no surto de 2014, 19 pessoas apresentaram gastroenterite, e nenhuma desenvolveu SHU. Entre outubro e novembro de 2013, 33 pessoas foram envolvidas em surto de *E. coli* O157:H7 após terem ingerido salada pronta para consumo. Dois pacientes desenvolveram SHU (CDC, 2014).

No ano de 2014, dois casos de crianças norte americanas, infectadas por STEC, que vieram a óbito, foram bastante divulgados na mídia americana. Foi relatado que os casos provavelmente estavam relacionados à ingestão de melancia oriunda da rede de mercados Walmart®, mas os dados foram inconclusivos. Ao todo, 9 crianças de 3 diferentes estados podem ter sido infectadas pelo mesmo alimento (Gillespie, 2014). Já na Inglaterra, a mídia local divulgou que 10 pessoas foram

infectadas por STEC O55. Nenhum paciente veio a óbito, mas sete desenvolveram quadro clínico renal (Blandford, 2014).

A Argentina é considerada região endêmica para SHU e apresenta as maiores taxas anuais de incidência dessa doença no mundo: 12,2/100mil crianças menores de 5 anos (Rivas et al., 2006). As províncias do centro e sul deste país apresentam taxas ainda maiores de casos de SHU, chegando a registros de 20/100 mil crianças menores de 5 anos (Rivero et al., 2011). Essa síndrome lidera as causas de falência renal crônica entre crianças no país, e é responsável por 20% dos transplantes renais em crianças e adolescentes nesse país (Exeni, 2001; Rivas, 2008).

No Brasil, inicialmente observou-se o registro de *E.coli* O157:H7 em um estudo retrospectivo das cepas da coleção de *E. coli* isoladas entre os anos 1976 e 1999 pelo Instituto Adolfo Lutz. A cepa havia sido isolada de um paciente HIV positivo em 1990, mas não foi estabelecida a origem da infecção (Irino et al., 2002). Estudos conduzidos pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) de São Paulo mostram a ocorrência de 93 casos de SHU entre 1998 e 2011. No mesmo período, o Instituto Adolfo Lutz identificou *E. coli* O157:H7 em 8 pacientes no Estado, dos quais um evoluiu para SHU (São Paulo, 2012). Em 2011, Souza et al. publicaram uma pesquisa que analisou a ocorrência de SHU em crianças internadas em unidades de terapia intensiva pediátrica na cidade de São Paulo. Os sorotipos O26:H11, O157:H7 e O165:H- foram isolados de 3 pacientes, e os resultados microbiológicos associados aos sorológicos evidenciaram infecção por STEC em 92,3% dos casos de SHU estudados. Entretanto, em nenhum destes casos de isolamento de STEC de pacientes em São Paulo foi possível comprovar a associação da SHU com ingestão de alimentos contaminados por este microrganismo.

Raras são as pesquisas sobre a presença de STEC em vegetais em nosso país e, tendo em vista que os mais recentes surtos causados por STEC no mundo estão relacionados a consumo de vegetais crus, este estudo objetivou a pesquisa de STEC em hortaliças, a fim de fornecer informações que auxiliem em futura avaliação do risco que o patógeno pode oferecer à população brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- Avaliar a presença de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em hortaliças cultivadas no sistema orgânico, na região de Ibiúna, estado de São Paulo.

2.2. Objetivos Específicos:

- Detectar a presença de *E. coli* em alimentos vegetais
- Detectar a presença dos genes de virulência de STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*, *ehx*)
- Identificar a presença de *E. coli* O157:H7 através do rastreamento dos genes *uid*, *fliCH7* e *rfbO157*.
- Avaliar a sensibilidade da metodologia empregada, através de contaminação experimental de alface com *E. coli* EDL 933 transformada para expressar Proteína Verde Fluorescente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Cepas Utilizadas:

As cepas *E. coli* O157:H7 EDL 933, cedida pela Dra. Roxane M. F. Piazza (instituto Butantã – SP), e *E. coli* O26, cedida pela Dra. Beatriz E. C. Guth (Unifesp – SP), foram utilizadas como controle positivo.

3.1.2. Amostragem

As amostras de hortaliças orgânicas foram obtidas em três propriedades rurais (denominadas neste trabalho pelas letras A, B e C), sendo duas localizadas no município de Ibiúna, SP, e outra no de Vargem Grande Paulista. Estes municípios fazem parte do “Cinturão Verde”, principal fornecedor de hortaliças para a região metropolitana de São Paulo, Brasil. Um total de 200 amostras foi coletado, compreendendo 17 variedades de hortaliças, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Variedade e número de hortaliças coletadas em cada propriedade visitada.

Variedade de hortaliça	Número de amostras analisadas		
	A	B	C
Acelga (<i>Beta vulgaris</i> L.)	1	0	0
Agrião (<i>Barbarea verna</i> (Mill.) Asch.)	2	0	2
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) crespa	6	5	11
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) lisa	0	3	7
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) mimosa	5	0	1
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) romana	0	1	0
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) roxa	3	4	1
Almeirão (<i>Cichorium intybus</i> L.)	11	7	12
Azedinha (<i>Rumex acetosa</i> L.)	0	2	0
Catalonia (<i>Cichorium intybus</i> var. <i>foliosum</i> Hegi)	2	4	10
Chicória (<i>Cichorium endivia</i> L.)	7	6	0
Coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	4	0	0
Couve (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> D.C.)	0	0	1
Escarola (<i>Cichorium endivia</i> L. var. <i>latifolium</i> Lamk.)	6	2	6
Espinafre (<i>Tetragonia tetragonoides</i> (Pall.) Kuntze)	11	8	17
Rúcula (<i>Eruca sativa</i> Mill.)	0	6	1
Salsa (<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex A.W.Hill)	7	10	8
Total	65	58	77

3.1.2.1. Coleta das amostras

Para compor uma amostra, três unidades da verdura foram coletadas diretamente do canteiro de cultivo (Figura 2), sem sofrer nenhuma lavagem, e foram acondicionadas em embalagem plástica, sendo assim transportadas ao laboratório em

caixas de material isolante com gelo. No laboratório, as embalagens foram abertas e as folhas foram cortadas com lâmina de bisturi estéril, de maneira a se amostrar folhas tanto internas quanto as mais externas, de todas as 3 unidades da verdura. Foram pesados assepticamente 100g de folhas para pesquisa de STEC. Outros 25g da amostra foram pesados e colocados em um segundo saco estéril, para detecção de *E. coli*.

Figura 2. Foto de canteiro de cultivo da propriedade “A”.

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação da sensibilidade do método empregado para isolamento de *E. coli* produtora de toxina de Shiga

3.2.1.1. Transformação de *E. coli* O157 EDL 933

A cepa de *E. coli* O157 EDL 933 foi transformada para expressar Proteína Verde Fluorescente, segundo Sambrook et al. (1989). O procedimento de transformação foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia Industrial de Microrganismos, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. O uso de transformantes visa facilitar a identificação do microrganismo em estudo em um ambiente naturalmente contaminado.

Uma cultura de *E. coli* O157 mantida a -70°C foi descongelada e uma alíquota de 100µL foi inoculada em 10mL de TSB (Caldo Triptona de Soja, Oxoid, Basingstoke, UK), seguida de incubação a 37°C/18-24h. A seguir, a cultura foi semeada por estriamento em placas contendo TSA (Ágar Triptona de soja, Oxoid, Basingstoke, UK), e incubada a 37°C/18-24h. Cinco colônias foram inoculadas em 10mL de TSB, e incubadas a 37°C por 18 horas, sob agitação a 170rpm. A seguir, a cultura foi diluída em caldo TSB até atingir DO_{600nm} (densidade óptica) de 0,2, e novamente incubada nas mesmas condições. Ao atingir a $DO_{600nm} = 0,5$, a cultura foi resfriada por 20 minutos em recipiente contendo gelo, e foi centrifugada a 4°C, 3000xg, por 15 minutos na centrífuga Sigma 6-16K (Alemanha). Na sequência, o sedimento foi ressuspensão em água esterilizada gelada (7°C) e centrifugado novamente. Mais duas lavagens foram feitas de igual modo, e o *pellet* final foi ressuspensão em 1mL de glicerol 10% gelado. Esta suspensão bacteriana foi distribuída em alíquotas de 40µL, que foram estocadas a -80 °C.

Para o procedimento de eletroporação, as alíquotas de 40µL foram descongeladas, e 1µL de suspensão de plasmídeo pGFPuv (Clontech) foi acrescentado e homogeneizado com o pipetador e ponteira estéril, por aspiração e expiração. A suspensão foi transferida para cubetas de eletroporação resfriadas. A transformação foi feita no eletroporador (Eletroporador MicroPulser

BioRad), sob pulsos a 2,5kV/cm, a fim de permitir a incorporação do plasmídio pelas bactérias. A seguir, 1mL de caldo TSB foi adicionado à cubeta e, após homogeneização com o pipetador, o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio estéril e incubado a 37°C, com agitação a 100rpm, durante uma hora. A seguir, 100µL da suspensão bacteriana foram semeados em placa contendo ágar TSA adicionado de carbenicilina (50µg/mL) (Sigma-Aldrich), que foi incubada a 37°C por 18-24h.

As células transformadas foram testadas quanto à estabilidade do plasmídio incorporado. Para tanto, 2 a 3 colônias foram inoculadas em tubos contendo 10mL de TSB+carbenicilina e, após incubação a 37°C por 18-24h, foi feita a semeadura em placa de TSA+carbenicilina. As células que foram eficientemente transformadas mostraram-se fluorescentes sob luz ultra-violeta (366nm). Três a cinco colônias fluorescentes foram inoculadas em TSB acrescido de carbenicilina (50µg/mL), e incubado a 37°C por 18-24h. Alíquotas de 1mL foram congeladas em glicerol 10% a -80°C até o momento do uso na contaminação experimental de alface.

3.2.1.2. Preparo do inóculo

Uma alíquota de 150µL de *E. coli* transformada foi inoculada em 100mL de TSB acrescido de 50mg/mL de carbenicilina, e incubada a 37°C por 18 a 24h. O meio de enriquecimento (TSB) foi transferido para tubos tipo *falcon* (50mL), que foram centrifugados a 3000xg por 5 minutos a 4°C. A seguir, o *pellet* foi ressuspenso em água peptonada 0,1% e novamente submetido à centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, e a densidade óptica (D.O.) da suspensão bacteriana foi ajustada para 1.0, previamente determinada para uma densidade de células viáveis de 10⁹ UFC/mL.

3.2.1.3. Contaminação da alface

A suspensão bacteriana foi submetida a diluições decimais subsequentes em água peptonada 0,1%, e uma alíquota de 400µL das diluições 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ foram utilizadas em 3 frascos (tipo Schott) contendo 4L de água

destilada estéril, a fim de se obter concentrações de 1000, 100 e 10UFC/g, respectivamente. Cada frasco foi então agitado vigorosamente, e o conteúdo foi transferido para um saco plástico, acondicionado dentro de um balde. Folhas de alface (140g) foram imersas na água contaminada, e foram assim mantidas durante 30 minutos, para que os microrganismos fossem aderidos à superfície da folha do vegetal.

3.2.1.4. Análise microbiológica

Para verificar se a capacidade da *E. coli* transformada de aderir às folhas de alface foi proporcional ao inóculo aplicado, foram pesados assepticamente 25g de folhas, que foram acondicionado em saco plástico estéril. Neste, foram acrescentados 225mL de água peptonada 0,1%, e homogeneizado em *Stomacher* 400 Lab-blender (Seward Medical, London, England). Uma alíquota de 100µL foi semeada em placa contendo TSA+carbenicilina, que foi incubada a 37°C por 24h.

Para testar a sensibilidade do método, procedeu-se de maneira análoga à descrita no item 3.2.2.(descrita a seguir), que descreve a metodologia empregada nesta pesquisa para detecção de STEC. Para tanto, os meios utilizados foram acrescidos de carbenicilina 50mg/mL, tanto o TSB quanto o ágar SMAC (Oxoid, Basingstoke, UK) e CHROMagar STEC (CHROMagar Microbiology, Paris, France), com a finalidade de conservar o plasmídeo pGFPuv nas bactérias transformadas e para reconhecimento das células das colônias sob luz ultravioleta. Para reconhecimento das colônias de bactérias transformadas foi utilizada a Lâmpada UV 366nm para Microbiologia (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2.2. Pesquisa de STEC

3.2.2.1. Etapa de enriquecimento

Às porções de 100g de amostra de cada hortaliça foram acrescentados 500mL de TSB (caldo triptona de soja modificado) suplementado com vancomicina (8mg/L) (Sigma-Aldrich), cefixima (50µg/L) (Invitrogen) e telurito de potássio (2,5 mg/L) (Sigma-Aldrich) (Catarame et al., 2003). O material foi massageado manualmente por

5 minutos com a finalidade de liberar os microrganismos aderidos à sua superfície, e incubado a 37°C por 24h.

3.2.2.2. Etapa de isolamento

Após o período de incubação do caldo de enriquecimento, foi realizado o isolamento de colônias através da semeadura em meios MacConkey sorbitol (SMAC) e CHROMagar STEC.

Colônias típicas de STEC em SMAC são esféricas, e pequenas. Algumas cepas, como *E. coli* O157:H7 não fermentam sorbitol e se apresentam transparentes, e outras, por fermentarem esse açúcar, são de coloração rósea, como *E. coli* O26. Em CHROMagar STEC as colônias são esféricas, pequenas e violetas.

Colônias com essas características foram inoculadas em meios EPM, MiLi e Citrato de Simmons (Toledo, Fontes e Trabulsi, 1982a,b). Após a inoculação, os meios EPM e MiLi foram incubados a 37°C/24h, e o meio Citrato de Simmons foi incubado a 37°C/3 a 5 dias. As colônias com características bioquímicas de *E. coli* foram inoculadas em TSB, incubadas a 37°C/24h e, posteriormente, acrescidas de 20% de glicerol e armazenadas a -70°C até serem submetidas a testes para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *rfbO157*, *fliCH7*, *ehx* e *uid*.

3.2.2.3. Pesquisa das sequências genéticas para os genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehx*, *uid*, *rfbO157* e *fliCH7*

3.2.2.3.1. Preparo do DNA a partir das colônias de *E. coli*

Uma alíquota de 100µL das colônias mantidas a -70°C foi inoculada em tubos contendo TSB, e incubadas a 37°C/24h. Um mL desta cultura foi submetido à extração de DNA através do kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi, então, quantificado, utilizando o aparelho Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e, a seguir, mantido a -20°C até o momento da amplificação de DNA.

3.2.2.3.2. Preparo do DNA a partir do caldo de enriquecimento

Em 50 das 200 amostras analisadas, uma alíquota de 1mL foi retirada do caldo de enriquecimento, após o período de incubação, e submetida a extração de DNA (como descrito anteriormente) seguida de PCR, para rastreamento dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

3.2.2.3.3. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

O DNA obtido a partir do meio de enriquecimento foi submetido a PCR *multiplex* para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*, segundo Feng e Monday (2000).

O DNA obtido das colônias isoladas foi submetido a duas reações *multiplex*, uma para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*, e outra para os genes *rfbO157* (Paton e Paton, 1998) e *fliCH7* (Gannon et al., 1997). As reações para detecção dos genes *ehx* e *uid*, foram simplex (Feng e Monday, 2000).

Os iniciadores utilizados estão apresentados na Tabela 2. A 12,5 µL de reagente do kit Go Taq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA) foram adicionados 300 nM de cada iniciador (IDT, USA), e de 100 a 200 ng do DNA teste. Água deionizada esterilizada foi adicionada para obter um volume final de reação de 25 µL.

A amplificação para os genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *uid*, e *ehx* foi realizada através de aquecimento inicial a 95°C por três min, seguida de 25 ciclos de um min a 94°C; um min a 56°C e um min a 72°C e uma extensão final por sete min a 72°C (Feng e Monday, 2000). Para os genes *rfbO157* e *fliCH7*, a amplificação foi feita com aquecimento inicial a 95°C por um min seguida de 30 ciclos de 15 s a 95°C; 15 s a 50°C e 30 s a 72°C e uma extensão final por oito min a 72°C (Cobbaut et al., 2009). As duas reações foram realizadas em termociclador Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Alemanha).

Os produtos amplificados foram mantidos a -20°C até o momento da realização da eletroforese.

Tabela 2. Iniciadores para realização de PCR

Iniciador	Sequência	Tamanho do Fragmento(pb)	Referência
<i>stx1</i>	*F: cag tta atg tgg cga agg **R: cac cag aca atg taa ccg ctg	348	Feng e Monday, 2000
<i>stx2</i>	F: atc cta ttc ccg gga gtt TAC g R: gcg tca tcg tat aca cag gag c	584	Feng e Monday, 2000
<i>eae</i>	F: att acc atc cac aca gac ggt R: aca gcg tgg ttg gat caa cct	397	Feng e Monday, 2000
<i>ehx</i>	F: gtt tat tct ggg gca ggc tc R: ctt cac gtc acc ata cat at	158	Feng e Monday, 2000
<i>uid</i>	F: gcg aaa act gtg gaa ttg gg R: tga tgc tcc atc act tcc tg	252	Feng e Monday, 2000
<i>rfb</i> <i>O157</i>	F: cgg aca tcc atg tga tat gg R: ttg cct atg tac agc taa tcc	259	Paton e Paton, 1998
<i>fliC_{H7}</i>	F: gcg ctg tcg agt tct atc gagc R: caa cgg tga ctt tat cgc cat tcc	625	Gannon <i>et al.</i> , 1997

*F: Foward; **R: Reverse

3.2.2.3.4. Análise do produto amplificado

O produto amplificado foi analisado através de eletroforese, em gel de agarose 1%, realizada em cuba horizontal Gel XL Ultra V-2 (Labnet, EUA) contendo TBE (tampão borato EDTA – pH 8,2) 0,5X a 100 V.

A seguir, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 mg.mL⁻¹) (Pharmacia, USA), e visualizado no aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)

Figura 3. Detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

3.2.3. Determinação do Número Mais Provável de *E. coli*.

3.2.3.1. Preparo das amostras

Os sacos contendo as amostras foram abertos, e folhas internas e externas de cada uma das 3 unidades de verdura foram cortadas com lâmina de bisturi estéril. Porções de 25 gramas foram pesadas assepticamente, e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, England) em *Stomacher* por 60 segundos. A partir desta primeira diluição, foram realizadas diluições decimais subsequentes.

3.2.3.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *E. coli* (Kornacki e Johnson, 2001)

Um mL de cada uma das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foi acrescentado a tubos contendo 9 mL de Fluorocult® Caldo LMX modificado, segundo Manafi e Ossmer (Merck, Darmstadt, Germany), em triplicata, incubados a 37°C por 24h. Após o período de incubação, tubos com meio de cultura de cor azulada foram considerados positivos para coliformes, e examinados sob a Lâmpada UV 366nm para Microbiologia. Os tubos que apresentaram fluorescência foram considerados positivos para *E. coli*. A leitura dos tubos foi realizada utilizando a tabela de Número Mais Provável, segundo Blodgett (2010) (apêndice).

3.2.3.3. Análise Estatística

O resultado obtido pela determinação do NMP de *E. coli* foi convertido para logaritmo na base 10 e submetido à ANOVA e teste de Tukey, para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o nível de contaminação das hortaliças orgânicas produzidas pelas três propriedades visitadas. O software Sigma Stat versão 3.11 (Systat Software Inc., USA) foi utilizado para essas análises.

3.2.4. Questionário aplicado aos produtores:

Um questionário (Apêndice) foi aplicado aos 3 produtores, com o objetivo de se avaliar as técnicas gerais de cultivo, espécies vegetais cultivadas, composição e forma de produção do adubo utilizado, e outras informações pertinentes que pudessem interferir na qualidade microbiológica das hortaliças.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. NMP de *E. coli*

Das 200 amostras analisadas, 67 (33,5%) foram positivas para presença de *E. coli*. Destas, 26 (40.0%) eram provenientes da propriedade A, 28 (48.2%) da propriedade B e 13 (16.8%) da propriedade C (Tabela 3). A população variou de <1 a >3 log NMP/g para as hortaliças oriundas das propriedades A e B, e de <1 a 3 log NMP/g para as hortaliças oriundas da propriedade C. A média da população foi de 1.6 ± 0.9 log NMP/g (propriedade A), 1.6 ± 0.8 log NMP/g (propriedade B) e 1.2 ± 0.7 log NMP/g (propriedade C). A legislação brasileira não apresenta limite máximo para presença de *E. coli* em vegetais. No entanto, estabelece o limite máximo de 10^2 para coliformes a 45°C (Brasil, 2001). Considerando que *E. coli* está inclusa no grupo dos coliformes termotolerantes, sete amostras da propriedade A, oito amostras da propriedade B e duas amostras da propriedade C, ou seja, 17 (8,5%) do total de amostras, estariam fora desse padrão, com resultados superiores ao limite estabelecido de 10^2 /g. Ademais, foi possível observar que na propriedade C a prevalência de *E. coli* nas hortaliças foi menor, em relação às demais propriedades. Mora et al. (2011) avaliaram 200 amostras de vegetais na Espanha, e 100% delas foram consideradas de qualidade satisfatória, pois apresentaram contagens de *E. coli* menores do que 100 UFC/g.

Tabela 3. Ocorrência de *E.coli* nas amostras de hortaliças analisadas.

Intervalo de contagem (log NMP/g)	<i>E.coli</i> n (%)		
	A	B	C
< 1	7 (10.7)	7 (12.0)	8 (10.3)
1 – 2	12 (18.4)	13 (22.4)	3 (3.9)
2 -3	1 (1.5)	5 (8.6)	2 (2.6)
> 3	6 (9.2)	3 (5.2)	0 (0.0)
Total	26	28	13

A presença de *E. coli* é tida como indicação de contaminação fecal direta ou indireta, e possível existência de patógenos entéricos (Ray, 2004). Em vegetais frescos, a detecção de *E.coli* é considerada o indicador mais adequado de contaminação fecal, já que os demais indicadores podem estar naturalmente presentes nestes alimentos (Franco e Landgraf, 2008).

A taxa de positividade encontrada neste estudo foi maior do que a relatada por Maistro et al. (2012) que, avaliando amostras de vegetais minimamente processados vendidos no comércio de Campinas, SP, encontraram ocorrência de *E. coli* em 13,9% das amostras.

Oliveira et al. (2011) e Nascimento et al. (2005) detectaram 53,1% e 69%, respectivamente, de amostras de verduras positivas para o microrganismo. Maffei et al. (2013) observaram maior frequência entre amostras de verduras orgânicas do que entre as convencionais, que foi de 41,5% e 40%, respectivamente.

Brandão et al. (2014) conduziram uma pesquisa que comparou a contaminação microbiológica em alface fresca e minimamente processada adquiridas do comércio, e alface pronta para consumo coletadas de restaurantes. Foi observada a ocorrência de *E. coli* em 70%, 6,7% e 30%, respectivamente. Portanto, a ocorrência do microrganismo em alface fresca foi maior do que no presente estudo.

Na Espanha, Oliveira et al. (2010) encontraram maior frequência de *E. coli* em amostras de alface orgânica (22,2%) do que em alface convencional (12,5%).

Presume-se que vegetais produzidos nos sistemas de cultivo convencional e orgânico apresentem populações microbianas maiores do que no sistema hidropônico, devido ao contato direto com o solo. Além disso, o uso de fezes como fertilizantes e a qualidade da água de irrigação contribuem para aumentar o nível de contaminação (Neto et al., 2012).

As pesquisas que apresentam a população de *E. coli* em verduras consumidas cruas auxiliam na avaliação do risco de presença de organismos potencialmente patogênicos, uma vez que as etapas de lavagem e sanitização podem ser insuficientes para reduzir uma alta contaminação inicial para níveis considerados seguros.

4.2. Pesquisa de STEC

Das 200 amostras analisadas, 30 (15%) foram positivas para *Escherichia coli*. Destas, 19 (9,5%) eram provenientes da propriedade “A”, 7 (3,5%) da “B” e 4 (2%) do produtor “C” (Tabela 4).

Tabela 4. Ocorrência de *E.coli* e STEC nas amostras de hortaliças analisadas.

	<i>E. coli</i>			STEC		
	A	B	C	A	B	C
n positivas	19/65	7/58	4/77	0/65	0/58	0/77
(%)	(29,2)	(12,1)	(5,2)	(0)	(0)	(0)
n do total de amostras	19/200	7/200	4/200	0/200	0/200	0/200
(%)	(9,5)	(3,5)	(2)	(0)	(0)	(0)

Cento e quarenta e cinco isolados foram submetidos a PCR com o objetivo de verificar a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *rfbO157*, *fliCH7*, *ehx* e *uid*. Sete desses isolados apresentaram o gene *fliCH7*, sendo seis provenientes de uma mesma amostra coletada na propriedade “A”, e o outro

isolado foi de uma amostra da propriedade “B”. No entanto, nenhum deles apresentou quaisquer dos genes de virulência pesquisados.

Esses dados estão de acordo com o obtido quando da pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* por PCR a partir de alíquota do caldo de enriquecimento, que também foi negativo.

Os outros dois únicos estudos reportados no Brasil envolvendo a pesquisa de STEC em vegetais obtiveram resultados semelhantes. Em 2003, Silva et al. pesquisaram a presença de *E. coli* O157:H7 em 869 amostras de alface, rúcula e chicória adquiridas de 3 fornecedores de hortaliças do CEASA de Campinas, SP. Nenhuma amostra apresentou o microrganismo.

Recentemente, de Quadros Rodrigues et al. (2014) avaliaram as diversas etapas da cadeia produtiva de alface orgânica no Rio Grande do Sul. Amostras de água de irrigação e de lavagem das verduras no campo, adubo, solo, mudas de alface e alface adquiridas de três propriedades certificadas como orgânicas foram submetidas à análise para detectar a presença de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* O157:H7. Uma amostra de água de irrigação e outra da água de lavagem foram positivas para *E. coli* O157:H7. Os resultados obtidos concordam com os relatados na presente pesquisa, uma vez que o microrganismo não foi detectado no vegetal.

As pesquisas citadas, realizadas no Brasil, limitaram-se à detecção de *E. coli* O157:H7, enquanto nosso estudo abrangeu o grupo de STEC. Sugere-se que a frequência deste microrganismo em nosso país seja baixa em hortaliças, mas deve-se levar em consideração a extensão do território nacional, bem como o tamanho da produção agrícola, as diversas condições climáticas, diferentes composições de solo e formas de cultivo. Estas variáveis tornam necessárias mais pesquisas, considerando as diferentes condições de plantio, que afetam diretamente as populações e as espécies microbianas que sobrevivem e/ou se multiplicam no alimento.

Com relação a outras pesquisas de STEC em vegetais, conduzidas em outras partes do globo, os resultados obtidos são bastante variáveis, assim como as taxas de ocorrência de *E. coli*. Vale ressaltar que também nestes estudos as condições das pesquisas diferem entre si, quando considerados as condições de cultivo, número de amostras, etapas na cadeia produtiva nas quais as amostras são coletadas e as diferentes metodologias utilizadas.

Como na presente pesquisa, Wood et al.(2015) e Saeed et al. (2013) não encontraram STEC em amostras vegetais. No primeiro estudo, realizado no Canadá, 13% das 68 amostras de alface analisadas apresentaram *E. coli*. No segundo, a ocorrência de *E. coli* foi de 19,5% (39/200) entre vegetais servidos em restaurantes e cafeterias da cidade de Duhok, no Iraque. Ryu et al. (2014) obtiveram resultados negativos para a presença de STEC em 300 amostras de verduras analisadas na Coreia. STEC também não foi encontrada por Oliveira et al. (2010), na Espanha, e por Skocková et al. (2013), na República Checa. Nos Estados Unidos, Marine et al. (2015) coletaram 369 amostras de verduras, sendo 178 delas orgânicas e 191 convencionais, e também não detectaram STEC.

Por outro lado, Khalil et al.(2014), no Egito, encontraram *E. coli* em 100% das 486 amostras analisadas, e detectaram *E. coli* O157 contendo gene de virulência *stx* em duas delas. Na Turquia, Özpınar (2013) isolou STEC em 13 das 60 amostras de vegetais orgânicos obtidos no comércio. Mazaheri et al. (2013), no Irã, também detectaram o microrganismo em 8 das 100 amostras de alface analisadas. Na Espanha, dentre as 200 amostras vegetais coletadas do comércio de Lugo, somente em uma delas STEC foi identificada (Mora et al., 2011).

Além desses, STEC já foi detectada também nos Estados Unidos (Cooley et al., 2013) e em alguns países da União Européia, como Portugal, Nova Zelândia, Suíça e Espanha (European Centre for Disease Prevention and Control; European Food Safety Authority, 2011).

Pesquisas de STEC em outros tipos de alimentos também estão descritas. Na Coreia, este microrganismo não foi identificado entre as 416 amostras de produtos vegetais diversos que foram analisadas (Kim et al., 2014). Laidler et al. (2014) descreveram a contaminação por *E. coli* O157:H7 em morangos, cujo consumo ocasionou um surto em 2011, nos EUA. STEC foi ainda encontrada em frutas, verduras e salsichas de carne suína na Itália (Bardasi et al., 2015) e em produtos cárneos na Espanha (Diaz-Sanchez, 2012).

Apesar de o número de relatos sobre a presença de STEC em vegetais não ser extenso, muitos são os trabalhos sobre a presença em outros alimentos, principalmente em carnes e derivados (Mohammed et al., 2014;

Wasilenko et al., 2014; Llorente et al. 2014; Brusa et al., 2013; Kagambèga et al., 2012; Bosilevac et al., 2011; Mora et al., 2007; Brooks et al., 2001).

No Brasil, genes de virulência de STEC foram identificados em amostras de leite cru (Moraes et al., 2011; Vendramin et al., 2014), em carcaças bovinas (Laskowski, 2013 a; Carvalho et al., 2012; Von Lauer, 2009), em carne moída (Lucatelli, 2012) e em água para consumo humano (Laskowski et al., 2013 b).

Em concordância com o nosso estudo, outras pesquisas não encontraram o microrganismo em alimentos. STEC não foi encontrada em queijos (Silva et al., 2014; Leite Júnior, 2014), em leite pasteurizado (Hoffmann et al., 2014) ou em carcaças suínas (Machado, 2014). Beraldo (2011) não detectou STEC em leite de búfala, apesar de sua detecção em amostras de fezes, no interior de São Paulo.

Em 2013, Caldorin et al. publicaram um artigo de revisão sobre a ocorrência de STEC no Brasil, tendo constatado taxas de positividade em fezes bovinas que variaram de 1,4 a 71%. Nos alimentos, foi observada baixa ocorrência, mas os autores salientam o risco à saúde da população por ingestão de alimentos contaminados devido à confirmação de presença de STEC nos animais. Também relatam a predominância de STEC não-O157 no rebanho bovino e ovino, nos alimentos, e nos casos clínicos descritos em seres humanos, apontando para a importância da pesquisa de STEC não-O157 no Brasil.

A confirmação da presença de STEC em fezes de animais (Caldorin et al., 2013), frequentemente utilizadas como adubo do solo, e a detecção deste patógeno em água de irrigação e água de lavagem de hortaliças (de Quadros Rodrigues et al. 2014) comprovam o risco de contaminação direta e indireta nas diversas etapas da cadeia de produção dos alimentos de origem vegetal.

Sabe-se que bactérias de origem fecal, incluindo a STEC, têm grande capacidade de sobrevivência no ambiente. *Escherichia coli* O157:H7 pode sobreviver por semanas em alface, permanecendo viável ainda que numa população pequena. Segundo Moyne et al. (2013), a população deste patógeno declina rapidamente logo após sua liberação no ambiente, possivelmente devido a fatores como radiação, calor e quantidade de água, sugerindo que os eventos iniciais após o contato com a planta são determinantes para a sobrevivência do

microrganismo. Uma vez que o microrganismo consegue se adaptar ao ambiente em que foi liberado, pode sobreviver por longos períodos no tecido vegetal. O estudo conduzido por Saldaña et al. (2011) comprovou a existência de agregados celulares de STEC O157 em compartimentos internos de folhas de espinafre, como nos estômatos, espaços intercelulares, xilema e floema. A aptidão deste microrganismo de se abrigar nas camadas mais internas das folhas explica sua resistência aos agentes bactericidas e consequente potencial para causar surtos associados ao consumo de hortaliças cruas.

A localização do Brasil em zona tropical pode ser um fator que interfere na baixa prevalência de STEC em alimentos, apesar de sua constatação no ambiente, como por exemplo em fezes de bovinos (Stella, 2009; Farah, 2007; Pigatto, 2004) e ovinos (Ayala, 2009; Vetoratto, 2008;), adubo (Puño-Sarmiento et al., 2014) e água de irrigação (de Quadros Rodrigues, 2014).

Características do solo, geografia, clima e intensidade das precipitações interferem na prevalência e sobrevivência dos patógenos entéricos, tendo sido observado que o aumento de temperatura e o clima tropical estão associados à menor capacidade de sobrevivência de *E. coli* O157 (Jung, Jang e Matthews, 2014). De acordo com Sodha et al. (2015), a latitude, por interferir diretamente nas características climáticas, também parece estar relacionada à transmissão de STEC e sua eliminação através das fezes bovinas. Estes autores verificaram, nos Estados Unidos, que a frequência de surtos é maior nos estados do norte, quando comparados aos do sul. Na Europa, a ocorrência de casos é mais relatada nos países também ao norte, como Alemanha e Países Baixos, quando comparados a países mais ao sul, como Espanha e Itália. Já no hemisfério sul, a incidência de STEC é maior nos países mais ao sul, como Argentina e África do Sul.

Entre as pesquisas de STEC em hortaliças, as amostragens diferem com relação ao número de amostras analisadas e a etapa ao longo da cadeia produtiva em que são coletadas. Os alimentos vegetais podem ser contaminados com microrganismos em várias etapas desde o campo até a mesa do consumidor. Eles podem ser contaminados através da água de irrigação, fertilizantes, fômites, insetos, animais silvestres, manipulação pelos trabalhadores rurais, nas plantas de processamento, por caixas de transporte, manuseamento no varejo ou outras superfícies com as quais entrem em contato.

No entanto, a irrigação e a adubação são considerados os mais críticos e as principais fontes de contaminação (Franz e Bruggen, 2008).

No caso da adubação, o controle do binômio tempo-temperatura no processo de compostagem é crucial para prevenir a contaminação microbiana das hortaliças durante o cultivo, já que a utilização de composto orgânico como fertilizante do solo é uma prática comum tanto na agricultura orgânica quanto na convencional. As boas práticas agrícolas incluem um tempo mínimo de fermentação do composto, e este fator interfere diretamente na contagem de *E. coli* e na sobrevivência de patógenos entéricos (Ceuppens, et al., 2014). Johannessen (2005) propõe um período mínimo de 40 dias para a compostagem e temperatura de 60°C mantida por 5 dias para eliminar STEC. Em processos aeróbios de fermentação, recomenda-se garantir que o composto seja revolvido e que todas as partes dele atinjam 60°C; ou se o processo for estático, a pilha deve permanecer por 3 a 6 meses sob fermentação, sem que se adicione mais matéria orgânica durante este tempo (USA, 2015).

Em nosso estudo observamos, a partir do questionário cujos resultados encontram-se na Tabela 5, que os produtores seguem as recomendações para a produção do composto animal, que deve sofrer fermentação por, no mínimo, 2 meses antes da sua aplicação. A composição é variável, pois um deles (B) utiliza osso de peixe, enquanto os outros dois (A e C) usam dejetos de aves e bovinos. *E. coli* foi detectada em maior frequência na propriedade “A”, seguida da “B” e, com menor frequência, na propriedade “C” (Tabela 4). Pelos resultados obtidos nesta pesquisa quanto à frequência de *E. coli* nas amostras avaliadas, constata-se que nem o uso de fezes animais no composto nem o tempo de compostagem foram os fatores responsáveis pela ocorrência dessa bactéria nos vegetais coletados nessas propriedades, visto que “B” não utiliza dejetos animais, e “C”, além de fazer uso desta matéria, aplica o menor tempo de fermentação no composto (2 meses). O menor tempo de fermentação utilizado pela propriedade “C” parece ter sido igualmente eficaz para reduzir a população deste microrganismo.

Tabela 5. Dados obtidos através de questionário aplicado aos produtores orgânicos, sobre as práticas agrícolas empregadas no cultivo das hortaliças.

Produtor	A	B	C
Variedades cultivadas	Repolho, vagem, pepino, batata, radite, nabo, berinjela, jiló, quiabo, folhosas, cenoura	Abobrinha, cenoura, chuchu, vagem, pepino, repolho, tomate, folhosas	Beterraba, pimentao, berinjela, jiló, morango, salsação, folhosas
Origem das sementes	Comercial e cultivos anteriores	Comercial e cultivos anteriores	Cultivos anteriores
Local de cultivo	Canteiros no solo	Canteiros no solo	Canteiros no solo
Tipo de adubação	Orgânica	Orgânica	Orgânica
Composição do adubo	Mamona, farinha de osso, esterco de galinha	Víscera e osso de peixe, farinha de mamona, farinha de osso, melado, pó de carvão, farelo de arroz	Esterco de galinha e de bovinos, restos de vegetais
Tempo de fermentação do adubo	3 a 4 meses	3 meses	2 a 3 meses
Frequência de aplicação do adubo	A cada plantio	A cada plantio	120 a 150 dias
Presença de animais na propriedade	Galinhas, uma mula	Somente um cão doméstico	Galinhas, bovinos, cães domésticos
Origem da água de irrigação	Rio	Lagoa, água de chuva	Lagoa
Periodicidade da análise microbiológica da água	Anual	Anual	Anual
Origem da água da pré-lavagem das verduras	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano
Destino das hortaliças	Comércio (supermercados, feira)	Comércio (feira), restaurantes da região	Comércio (feira)

Nossos resultados são compatíveis com os encontrados por Loncaveric et al. (2005), que investigaram a qualidade microbiológica de alfaces

orgânicas na Noruega. *E. coli* foi isolada em 8,9% das amostras, enquanto *E. coli* O157 e *Salmonella* não foram encontradas. Seis dos doze produtores foram arguidos sobre a forma de produção do composto usado como adubo, bem como a forma de aplicação. *E. coli* foi detectada em amostras colhidas de quatro desses seis produtores, sendo que dois deles não haviam utilizado adubo animal recentemente, e 2 deles o haviam aplicado em variadas composições. Portanto, os pesquisadores não garantem que exista relação entre a aplicação do composto e a detecção de *E. coli*.

As diferentes fontes de água de irrigação podem ser a causa da diferença na presença de *E. coli* na presente pesquisa. O uso de águas de poço artesiano, rios, lagoas ou tanques é mais comum por ser mais barato que a água tratada. As principais fontes de patógenos para os vegetais frescos são os humanos e os animais, que por sua vez são frequentemente incriminados por contaminar as fontes das águas (Gorman, 2014). Estudos apontam a água de irrigação como uma importante fonte de contaminação fecal e, conseqüentemente, de patógenos em vegetais frescos (Castro-Ibáñez, 2015; Ceuppens, 2014; Park, 2013; Abreu, 2010).

Os surtos mais recentes e significativos envolvendo vegetais consumidos crus apresentaram STEC como o agente causador, como o registrado na Alemanha, em 2011, quando aproximadamente 3000 pessoas foram acometidas de diarreia após consumirem broto de feno grego (Robert Koch Institute, 2011). Em 2006, um surto decorrente da ingestão de espinafre fresco embalado, contaminado com *E. coli* O157:H7, afetou 205 pessoas, em 26 estados norte-americanos (Grant et al., 2008; CDC, 2014). Herman et al. (2015) revisaram os surtos registrados pelo CDC, no período de 1973 a 2012, associados ao consumo de vegetais folhosos contaminados por STEC, e somaram 20.003 casos de doença, 1030 hospitalizações e 19 mortes. STEC foi o segundo agente causador mais frequente (18%), ficando atrás somente do norovírus (55%).

O desenvolvimento e a popularização dos alimentos prontos para consumo, concomitante à emergência de novos microrganismos virulentos e de grande impacto na saúde pública constituem novos desafios no que se refere ao estudo destes patógenos, sua prevalência e na prevenção de agravos à saúde do consumidor.

O fato dos estudos realizados no Brasil em busca de STEC terem conseguido obter diferentes taxas de ocorrência deste microrganismo em amostras de solo, água, fezes de diferentes espécies animais, frente à baixa frequência em produtos alimentícios, evidencia a necessidade de estudos que tentem explicar a razão da baixa ocorrência de STEC nos alimentos, uma vez que se constata sua presença no ambiente.

4.3. Teste de sensibilidade da metodologia empregada:

A técnica de isolamento em ágar SMAC e CHROMagar STEC foi eficiente para detecção de STEC na contaminação da alface a 100 e 1000 UFC/g (Figura 4).

A técnica de PCR a partir de alíquota do meio de enriquecimento (TSB) foi capaz de rastrear os genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* em todas as concentrações de inóculo testadas (Figura 5).

Figura 4. Colônias verde fluorescentes recuperadas de alface experimentalmente contaminada. 1: SMAC, com colônias fluorescentes na contaminação de 10^3 UFC/g; 2: SMAC, com colônias fluorescentes na contaminação de 10^2 UFC/g; 3: CHORMagar STEC, com colônias fluorescentes na contaminação de 10^2 UFC/g.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; 1a, 2a, 3a : alface contaminada com 10^3 UFC/g; 1b, 2b, 3b : alface contaminada com 10^2 UFC/g; 1c, 2c, 3c : alface contaminada com 10 UFC/g.

A detecção de STEC em alimentos constitui-se um desafio, devido a fatores como: número de células de STEC que geralmente é reduzida na amostra, sendo que elas ainda podem estar estressadas ou injuriadas; alto nível de microbiota nativa; distribuição heterogênea das células bacterianas, comprometendo a detecção do microrganismo alvo durante a amostragem; diferentes constituições da matriz do alimento que pode conter substâncias inibidoras da multiplicação da célula bacteriana; falta de características fenotípicas de cepas não-O157, que as diferencie de outras células de *E.coli* (Wang et al., 2013). Tzschoppe et al. (2012) relatam que o maior problema da detecção de pequeno número de células de STEC presentes em amostras de saladas prontas para consumo e brotos foi a grande quantidade de microrganismos, principalmente da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas*, presentes na microbiota.

Assim, o meio de enriquecimento constitui uma importante etapa para se atingir o sucesso no isolamento de STEC pois, quando adequado, permite o crescimento de STEC e, ao mesmo tempo, inibe a proliferação dos microrganismos que são contaminantes ambientais (Cooley et al., 2013). Os

meios de enriquecimento mais frequentemente utilizados nas pesquisas de STEC não-O157 são o TSB (Tryptic soy broth), BPW (buffered peptone water) e EC (*E. coli* broth), os quais são comumente suplementados com antibióticos como novobiocina, cefixima, telurito de potássio, vancomicina, acriflavina e cefsulodina (Wang et al., 2013).

Devido aos fatores acima descritos, esta pesquisa utilizou em sua metodologia uma amostragem de 100g, ao invés das usuais 25g, a fim de aumentar a probabilidade de se encontrar a STEC. Como meio de enriquecimento, foi utilizado o TSB suplementado com cefixima, telurito de potássio e vancomicina, descrito por Catarama et al. (2003) como um meio ótimo para recuperação de *E. coli* O26 (ou seja, uma cepa não-O157).

Na etapa de isolamento, Wang et al. (2013) descrevem os meios seletivos: Mac Conkey Sorbitol (SMAC), Mac Conkey Ramnose (RMAC) e os ágaros cromogênicos comerciais mRBA (modified Rainbow Agar; Biolog, Inc., Hayward, CA), e CHROMagar STEC (CHROMagar Microbiology, Paris, France) como os tradicionalmente usados. Tzschoppe et al. (2012) compararam os meios CHROMagar STEC, CHROMagar O157 e CHROMagar O26/O157 para detectar STEC, e concluíram que CHROMagar STEC foi o mais indicado para pesquisar este microrganismo em amostras de saladas.

Metodologias que empregam o rastreamento dos genes de virulência de STEC por PCR, a partir de alíquota do meio de enriquecimento, têm sido empregada em outras pesquisas (Delbeke et al., 2015; Holvoet et al., 2014; Gorman, 2014; Laskowski, 2013). Em 2012 foi publicado o método ISO (ISO, 13136:2012) para rastreamento de STEC (sorotipos O157, O111, O26, O103 e O145) a partir de PCR tempo real (RT-PCR), que está sendo considerado um método seguro, eficaz e rápido para detecção do patógeno (Delbeke et al., 2015).

Após o mais grave surto causado por STEC já documentado, o ocorrido na Alemanha em 2011, as pesquisas sobre métodos eficientes e rápidos para a detecção deste patógeno em alimentos vegetais tem evoluído significativamente. Outros meios de cultura, como o meio Possé, SHIBAM ágar (STEC heart infusion washed blood agar with mitomycin C), métodos imunológicos e moleculares, além de kits comerciais têm sido desenvolvidos e testados (Wang et al., 2013). As diferentes características das centenas de

sorogrupos de STEC existentes, bem como a complexidade da microbiota natural, das características e influência da matriz alimentar, e fatores que interferem na sobrevivência do patógeno, tornam o desenvolvimento de uma metodologia eficiente, rápida e aplicável na cadeia de produção dos vegetais um grande desafio.

5. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos nesta pesquisa e a discussão apresentada, podemos concluir que:

- a metodologia empregada foi adequada;
- os vegetais orgânicos produzidos pelos produtores que participaram deste estudo apresentam baixo risco de causar infecção por *E. coli* produtora de toxina de Shiga, quando consumidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológico para alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 12 jan 2015.

ALVARES, P.P. **Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da Grande São Paulo**, 2011. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

ANÔNIMO. **Anuário Brasileiro de Hortaliças 2014 – Brazilian Vegetabel Yearbook**, Editora Gazeta Santa Cruz, p. 8, 2014.

AYALA, C.O. Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras de Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene flic por PCRRFLP [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009

BARDASI, L.; TADDEI, R.; NOCERA, L.; RICCHI, M.; MERIALDI, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat and vegetable products in Emilia Romagna Region, years 2012-2013, **Italian Journal of Food Safety**, v.4, n.1, 2015.

BLANDFORD Blandford *E. coli* 'cluster of cases' investigated. **BBC News**. 26 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.bbc.com/news/uk-england-dorset-30207083>> Acesso em 15 de abril de 2015.

BERALDO, L.G. Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) isoladas de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2011.

BEUTIN, L.; HAMMERL, J. A.; STRAUCH, E.; REETZ, J.; DIECKMANN, R.; KELNER-BURGOS, Y.; MARTIN, A.; MIKO, A.; STROCKBINE N. A.; LINDSTEDT, B. A.; HORN D.; MONSE, H.; HUETTEL, B.; MULLER, I.; STUBER, K.; REINHARDT, R. Spread of a distinct Stx2-encoding phage prototype among *Escherichia coli* O104:H4 strains from outbreaks in Germany, Norway and Georgia. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10444-10455, 2012.

BEUTIN, L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 299-305, 2006.

BEUTIN, L; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence markers of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 631-635, 1995.

BLODGETT, R.J. Appendix 2 – Most Probable Number from serial dilutions. In: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), **Laboratory methods**, 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tables>> Acesso em 16 de julho de 2013.

BOSILEVAC, J.M.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground

beef in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.6, p.2103-2112, 2011.

BRANDÃO, M. L. L.; ALMEIDA, D. O.; BISPO, F. C. P.; BRÍCIO, S. M. L.; MARIN, V. A.; MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. 961-966, 2014.

BRANDL, M.T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety **Annual Review of Phytopathology**, v.44, pp. 367–392, 2006.

BRASIL. Política Nacional de Alimentação e Nutrição (Min. da Saúde). Portaria n. 2.715 de 17 de novembro de 2011. Disponível em: <<http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/pnan2011.pdf>> Acesso em 05 de mai de 2015.

BROOKS, H.J.L.; MOLLISON, B.D.; BETTELHEIM, K.A.; MATEJKA, K.; PATERSON, K.A.; WARD, V.K. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, p. 118-122, 2001.

BRUSA V.; ALIVERTI, V.; ALIVERTI, F.; ORTEGA, E.E.; la TORRE, J.H.; LINARES, L.H.; SANZ, M.E.; ETCHEVERRÍA, A.I.; PADOLA, N.L.; GALLI, L.; GARCÍA, P.P.; COPES, J.; LEOTTA, G.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.2:171, 2012.

BRZUSZKIEWICZ, E.; THURMER, A.; SCHULDES J.; LEIMBACH, A.; LIESEGANG, H.; MEYER, F. D.; BOELTER J.; PETERSEN, H.; GOTTSCHALK G.; DANIEL, R. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EAHEC). **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 883-891, 2011.

BYRNE, L.; VANSTONE, G.L.; PERRY, N.T.; LAUNDERS, N.; ADAK, G.K.; GODBOLE, G.; GRANT, K.A.; SMITH, R.; JENKINS, C. Epidemiology and microbiology of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England, 2009-2013. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, 1181-1188, 2014.

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; ALVES, E. C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista** (online), v. 10, n. 110, 2013.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 289-311, 2005.

CARVALHO, A.F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C.; NODA, A.; GABRIEL, D.T.; BALDASSI, L. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n.4, 2012.

CASTRO-IBÁÑEZ, I.; GIL, M.I.; TUDELA, J.A.; IVANEK, R.; ALLENDE, A. Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production of baby spinach in the southeast of Spain. **Food Microbiology**, v. 49, p. 173-181, 2015.

CATARAMÉ, T.M.G.; O'HANLON, K.A.; DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. Optimization of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. **Journal of Applied Microbiology Methods**, v.38, p.33-43, 2003.

CDC – Centers of Diseases Control and Prevention; Health Topics A-Z – *E. coli* (*Escherichia coli*). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>> Acesso em 05 de fev, 2014.

CDC – Centers of Diseases Control and Prevention; Health Topics A-Z – *E. coli* (*Escherichia coli*). Reports of selected *E.coli* outbreak investigations, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/outbreaks.html>> Acesso em 08 de nov, 2012.

CEUPPENS, S.; HESSEL, C. T.; RODRIGUES, R. Q.; BARTZ, S.; TONDO, E. C.; UYTENDAELE, M. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.181, p. 67-76, 2014.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J.C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v.3, issue 2, 2012.

COBBAUT, K.; BERKVEN, D.; HOUF, K.; DE DEKEN, R.; DE ZUTTER, L. *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors, **Journal of Food Protection**, v. 72, n.9, p. 1848-1853, 2009.

COOKSON, A.L.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G.T. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 73: 6360-6369, 2007.

COOLEY, M.B.; JAY-RUSSEL, M.; ATWILL, E.R.; CARYCHAO, D.; NGUYEN, K.; QUIÑONES, B.; PATEL, R.; WALKER, S.; SWIMLEY, M.; PIERRE-JEROME, E.; GORDUS, A.G.; MANDRELL, R.E. Development of a robust method for isolation of Shiga-toxin positive *Escherichia coli* (STEC) from fecal, plant, soil and water samples from a leafy greens production region in California, **Plos One**, publicado em 6 de junho, 2013. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065716>>

De QUADROS RODRIGUES, R.; LOIKO, M. R.; de PAULA, C. M. D.; HESSEL, C.T.; JACXSENS, L.; UYTENDAELE, M.; BENDER, R.J.; TONDO, E.C. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 152-164, 2014.

DÍAZ-SANCHEZ, S.; SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, M.; HERRERA-LEÓN, S.; HANNING, I.; VIDAL, D. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in game meat and ready-to-eat meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 179-182, 2012.

DONNENBERG, M. *Escherichia coli*: Pathotypes and Principles of Pathogenesis, 2nd ed., p.121-155, **Academic Press**, 2013.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. Food Microbiology: fundamentals and frontiers, ASM Press, Washington DC, 2nd ed., p. 80, 2001

DOYLE, M.P.; ERICKSON, M.C. Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 54-74, 2012.

DUFFY, G. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries **J. Appl. Microbiol.**, v 94 , pp. 94S–103S, 2003.

ERICKSON, M.C.; WEBB, C.C.; DIAZ-PEREZ, J.C.; PHATAK, S.C.; SILVOY, J.J.; DAVEY, L. Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water, **Journal of Food Protection**, 73(6), p.1023-1029, 2010.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC); EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA**,

with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Technical Report. Stockholm: ECDC, p.8, 2011.

EXENI R. Síndrome urémico hemolítico. **Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica**. 1:35–56, 2001.

FAGAN, P. K; HORNITZKY, K. M. A.; BETTELHEIM, K. A.; DJORDJEVIC, S. P. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1* e *stx2*), Intimin (*eaeA*), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *ehxA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 868-872, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Increasing fruit and vegetable consumption becomes a global priority**. Disponível em: <www.fao.org/english/newsroom/focus/2003/fruitveg1.htm>, Acesso em 8 de nov de 2012.

FARAH, S. M. S. S.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 607-612, 2007.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; MARTELLO, L.S.; MARCATTI, B.; MORETI, T.S.; PETRUS, R.R.; ALMEIDA, E.; FERRAZ, J.B.S. Efeitos dos sistemas de cultivo orgânico, hidropônico e convencional na qualidade da alface orgânica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.10, p.111-115, 2007.

FENG, P; MONDAY, S.R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Molecular and Cellular probes**, v.14, p.333-337, 2000.

FERREIRA, M.R.A.; FREITAS FILHO, E.G.; PINTO, J.F.N.; DIAS, M.; MOREIRA, C.N. Isolation, prevalence and risk factors for infection by shiga toxin-

producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, issue 4, p. 635-639, 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, Ed. Atheneu, São Paulo, p. 27 – 31, 2008.

FRANZ, E.; VISSER, A.A.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; KLERKS, M.M.; TERMORSHUIZEN, A.J.; VAN BRUGENN, A.H. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Food Microbiology**, 24(1), p.106-112, 2007.

FRANZ, E.; VAN BRUGGEN, A.H. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in primary vegetable production chain. **Critical Review Microbiology**. 34, 143-161, 2008.

FREMAUX, B.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; PRIGENT-COMBARET, C.; GLEIZAL, A.; VERNZOY-ROZAND, C. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 89-99, 2007.

FREMAUX, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; VERNZOY-ROZAND, C. Long term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.1-18, 2008.

FUKUSHIMA, H.; HOSHINA, K.; GOMYODA, M. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces **Appl. Environ. Microbiol.**, 65 , pp. 5177–5181, 1999.

GANNON, V.P.J.; D´SOUZA, S.; GRAHAM, T.; KING, R.K.; THAN, K.; READ, S. Use of flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.656-662, 1997.

GIL, M.I.; SELMA, M.V.; SUSLOW, T.; JACXSENS, L.; UYTENDAELE, M.; ALLENDE, A. Pre and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55:4, p. 453-468, 2015.

GILLESPIE, C. Diaper full of blood, *E. coli* HUS strikes 3rd child in Oregon. **Food Poisoning Bulletin**, 13 de setembro de 2014. Disponível em <<http://foodpoisoningbulletin.com/2014/diaper-full-of-blood-e-coli-hus-strikes-3rd-child-in-oregon/>> Acesso em 15 de abril de 2015.

GOMIERO, T.; PIMENTEL D.; PAOLETTI, M.G. Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, p. 95-124, 2011.

GORMAN, S. J. Transfer and survival of microorganisms to produce from surface irrigation water. Master Thesis, University of Tennessee, 2014.

GRANT, J.; WENDELBOE A. M.; WENDEL, A.; JEPSON, B.; TORRES, P.; SMELSER, C.; ROLFS, R. T. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n 10, 2008.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds). **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo, 5ª Ed., 289-293, 2008.

HERMAN, K. M.; HALL, A. J.; GOULD, L. H. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. **Epidemiology and Infection**, Cambridge University Press, Feb., 2015.

HILBORN, E.D.; MERMIN, J.H.; MSHAR, P.A.; HADLER, J.L.; VOETSCH, A.; WOJTKUNSKI, C.; SWARTZ, M.; MSHAR, R.; LAMBERT-FAIR, M.A.; FARRAR, J.A.; GLYNN, M.K.; SLUTSKER, L. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. **Arch. Intern. Med.**, 159 , pp. 1758–1764, 1999.

HOFFMANN, S.A.; PIERETTI, G.G.; FIORINI, A.; PATUSSI, E.V.; CARDOSO, R.F.; MIKCHA, J.M.G. Shiga-toxin genes and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from pasteurized cow milk in Brazil, **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1175-1180, 2014.

IFOAM – International Federation of Organic Agriculture Movements. Definition of organic agriculture. Disponível em: <<http://www.ifoam.org/en/organic-landmarks/definition-organic-agriculture>> Acesso em 17 de fev de 2014.

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.S.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n.4, p.446-447, 2002.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 29-36, Jan. 2005.

ITOH, Y.; SUGITA-KONISHI, Y.; KASUGA, F.; IWAKI, M.; HARA-KUDO, Y.; SAITO, N.; NOGUCHI, Y.; KONUMA, H.; KUMAGAI, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64. pp. 1532–1535, 1998.

JOHANNESSEN, G.S.; JAMES, C.E.; ALLISON, H.E.; SMITH, D.L.; SAUNDERS, J.R.; MCCARTHY A.J. Survival of a Shiga-toxin-encoding bacteriophage in a compost model. **FEMS Microbiology Letters**, v.245, p. 369-375, 2005.

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L.; The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 1587–1595, 2006.

JUNG, Y.; JANG, H.; MATTHEWS, K.R. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence, **Microbial Biotechnology**, v.7, p. 517-527, 2014

KAGAMBÈGA, A.; MARTIKAINEN, O.; LIENEMANN, T.; SIITONEN, A.; TRAORÉ, A.S.; BARRO, N. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 154-158, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140. Feb, 2004.

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.34 (3), p. 229-243, 1999.

KARMARLI, M.A.; STEELE, B.T.; PETRIC, M.; LIM C. Sporadic cases of haemolytic –uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, Mar 19; 1(8325):619-20, 1983.

KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 15-38, 1989.

KHALIL, R. K.S.; GOMAA, M.A.E.; KHALIL, M.I.M. Detection of shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) in leafy greens sold at local retail markets in Alexandria, Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 58-64, 2015

KIM, H.J.; KOO, M.; JEONG, A.; BAEK, S.; CHO, J.; LEE, S.; HWANG, I. Occurrence of pathogenic *Escherichia coli* in commercially available fresh

vegetable products in Korea. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.57, p. 367-370, 2014.

KIREZIEVA K.; LUNING P.A.; JACKSENS, L.; ALLENDE, A.; JOHANNESSEN, G.S.; TONDO, E.C.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M.; van BOEKEL, M.A.J.S. Factors affecting the status of food safety management systems in the global fresh produce chain. **Food Control**, v.52, p.85-97, 2015.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, 18, p. 775-779, 1977.

KORNACKI J.L.; JOHNSON J. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001.

LAILER, M.R.; TOURDJMAN, M.; BUSER, G.L.; HOSTETLER, T.; REPP, K.K.; LEMAN, R.; SAMADPOUR, M.; KEENE, W.E. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer, **Clinical Infectious Disease**, v.57(8):1129-34, 2013.

LASKOWSKI, K. **Avaliação da ocorrência e pesquisa das características de virulência e diversidade genética de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga em couro e carcaças bovinas**. 2013. viii, 136f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2013a.

LASKOWSKI, K.; GUTH, B.E.C.; MARTINS, F.H.; ROCHA, S.P.D.; IRINO, K.; PELAYO, J.S. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil, **Journal of Applied Microbiology**, v.114, issue 4, p.1230-1239, 2013b.

LEITE JÚNIOR, B.R.C. ; OLIVEIRA, P.M.; SILVA, F.J.M.; GOMES, A.P.; MARTINS, M.L.; SANTOS, M.T.; MORAES, C.A.; JÚNIOR, A.S. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine feces, feed, water, raw

milk, pasteurized milk, Minas Frescal cheese and groun beef samples colected in Minas Gerais, Brazil. **International Food Research Journal**, v.21, n.6, p. 2481-2486, 2014.

LLORENTE P.; BARNECH, L.; IRINO, K.; RUMI, M.V.; BENTANCOR, A. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef collected in different socioeconomic strata markets in Buenos Aires, Argentina. **Biomed Research International**, v. 2014, ID795104, 2014.

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

LUCATELLI, A. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP [dissertação de mestrado], Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2012.

MACHADO, L.A.P.; LUCCA, F.; ALVES, J.; POZZOBON, A.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. Prevalência e genotipagem de *Escherichia coli* patogênica em carcaças de suínos abatidos em frigoríficos comerciais na Região Sul do Brasil, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.1, 2014.

MAFFEI, D.F.; SILVEIRA, N.F.A.; CATANOZI, M.P.L.M.. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil, **Food Control**, v. 29, p. 226-230, 2013.

MAISTRO, L.C.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP – Brazil, as assessed by traditional and alternative methods, **Food Control**, p.258-264, 2012.

MAJOWICZ, S.E.; SCALLAN, E.; JONES-BITTON, A.; SARGEANT, J.M.; STAPLETON, J.; ANGULO, F.J.; YEUNG, D.H.; KIRK, M.D. Global incidence of human Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a

systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n.6, p.447-455, 2014.

MARINE, S.C.; PAGADALA, S.; WANG, F.; PAHL, D.; MELENDEZ, M.V.; KLINE, W.L.; ONI, R.A.; WALSH, C.S.; EVERTS, K.L.; BUCHANAN, R.L.; MICALLEF, S.A. The growing season, but not the farming system, is a food safety risk determinant for leafy greens in the Mid-Atlantic region of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.8, n.7, p.2395-2407, 2015.

MAZAHERI, S.; AHRABI, S.S.; ASLANI, M.M. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from lettuce samples in Tehran, Iran. **Jundishapur J. Microbiol.** , v. 7(11), e 12346, 2014.

MIYAGI, K.; OMURA, K.; OGAWA, A.; HANAFUSA, M.; NAKANO, Y.; MORIMATSU, W.; SANO, K. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. **Epidemiology and Infection**, 126, pp. 129–133, 2001.

MOHAMMED, M.A.; SALLAM, K.I.; ELDALY, E.A.Z.; AHDY, A.M.; TAMURA, T. Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. **Food Control**, v.37, p.182-187, 2014.

MORA, A.; HERRERA, A.; LÓPEZ, C.; DAHBI, G.; MAMANI, R.; PITA, J.M.; ALONSO, M.P.; LLOVO, J.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Characteristics of the Shiga-toxin producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreakstrain and of STEC strains isolated in Spain. **International Microbiology**, v.14, n. 3, 2011.

MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; JUSTEL, P. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. **BMC Microbiology**, v.7, p.13, 2007.

MORAIS, L.C.S.; FREITAS FILHO, E.G.; FERREIRA, M.R.A.; PINTO, J.F.N., MOREIRA, Â.N.; MOREIRA, C.N. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on dairy farms in southwest Goiás during dry time, **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, p.693-696, 2011.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHO J. B.; ALEIXO, J. A. G. Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.93, n 3, p.179-183, 2003.

MOYNE, A. L.; HARRIS, L. J.; MARCO, M.L. Assessments of total and viable *Escherichia coli* O157:H7 on field and laboratory grown lettuce. **PLoS ONE** 8(7): e70643. Doi:10.1371/journal.pone.0070643, 2013.

NAKAGAWA, D.H.; PRATES, K.V.M.C.; DEMETRIO, L.F.F.; CAETANO, M.I.; FURLANETO-MAIA, L. Análise da qualidade microbiológica de vegetais folhosos provenientes de agricultura familiar. **XI Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas**, 2014.

NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; MOUCKREK FILHO, V.E.; MARTINS, A.G.A.L.; BAYMA, A.B.; GOMES, S.V.; MARINHO, S.C.; CARVALHO, P.A.B.; GARCIAS JUNIOR, A.V. Incidência de *Escherichia coli* e *Salmonella* em alface (*Lactuca sativa*). **Higiene Alimentar**, v.19(128), p.121-124, 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan. 1998.

NETO, N.J.G.; PESSOA, R.M.L.; QUEIROGA, I.M.B.N.; MAGNANI, M.; FREITAS, F.I.S.; SOUZA, E.L.; MACIEL, J.F. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, p.47-51, 2012.

O'BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHEN, M.E.; ROTHMAN, S.W.; FORMAL, S.B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**, v.1, p.702, 1983.

OLIVEIRA, M.A.; SOUZA, V.M.; BERGAMINI, A.M.M.; MARTINIS, E.C.P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v.22, p.1400-1403, 2011.

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

ÖZPINAR, H.; TURAN, B.; TEKINER, I.H.; TEZMEN, G.; GÖKÇE, I.; AKINEDEN, Ö. Evaluation of pathogenic *Escherichia coli* occurrence in vegetable samples from district bazaars in Istanbul using real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 362-367, 2013.

PARK, S.; NAVRATIL, S.; GREGORY A.; BAUER A.; SRINATH, I.; JUN, M.; SZONYI, B.; NIGHTINGALE, K.; ANCISO, J.; IVANECK, R. Generic *Escherichia coli* contamination of spinach at the preharvest level: the role of farm management and environmental factors. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 79, p. 4347-4358, 2013.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by Locus of Enterocyte Effacement-negative Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v.69(11), p. 6999-7009, 2001.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 271-274, 2002.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Patogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n.3, p. 450-479, 1998.

PIGATTO, C. P. **Isolamento e freqüência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no estado do Paraná**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PUÑO-SARMIENTO, J.; GAZAL, L.E.; MEDEIROS, L.P.; NISHIO, E.K.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, p. 8924-8939, 2014.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**, CRC Press, Florida, 3rd. ed.,p. 429 – 437, 2004.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT., R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE. P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, Mar. 1983.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.S.; CHINEN, I.; ROLDÁN, C.D., BALBI, L.; GARCÍA B.; FIORILLI, B.; SOSA-ESTANI, S.; KINCAID, J.; RANGEL, J.; GRIFFIN, P.M. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. **Foodborne pathogens and disease**, v. 3, n.1, p. 88-96, 2006.

RIVAS, M.; SOSA-ESTANI, S.; RANGEL, J. Risk factors for sporadic shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, p. 763-771, 2008.

RIVERO M. A.; PASSUCCI J. A.; RODRIGUEZ, E. M.; SIGNORINI M. L.; TARABLA, H. D.; PARMA, A. E. Factors associated with sporadic verotoxigenic *Escherichia coli* infection in children with diarrhea from the central eastern area of Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 901-906, 2011

ROBERT KOCH INSTITUT. Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak. Germany, 2011. Disponível em: <http://www.rki.de/EN/Home/EHEC_final_report.html> Acesso em 12 de fev, 2013.

RYU, J.H.; KIM, M.; KIM, E.G.; BEUCHAT, L.R.; KIM, H. Comparison of the microbiological quality of environmentally friendly and conventionally grown vegetables sold at retail markets in Korea. **Journal of Food Science**, v.79, p. M1739-M1744, 2014.

SAEED, A. Y.; MAZIN, H. SAADI, A.A.; HUSSEIN, S. O. Detection of *Escherichia coli* O157 in vegetables. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 6 (2), p. 16-18, 2013.

SALDAÑA, Z.; SÁNCHEZ, E.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; PUENTE, J.L.; GIRÓN, J. A. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, article 119, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. (2nd ed.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

SANTANA L. R. R.; CARVALHO, R.D.S.; LEITE, C. C.; ALCÂNTARA, L. M.; OLIVEIRA, T. W. S. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.2. Campinas, 2006.

SANTOS, G.C.; MONTEIRO, M. Sistema Orgânico de produção de alimentos. Alimentos e Nutrição – **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 73-86., 2004.

SANTOS, L.C.; FARIA, L.A.; SIMM, E.M.; BECHTLUFFT, M.P. Avaliação da Qualidade microbiológica da alface (*Lactuca Sativa*) comercializada na cidade de Pará de Minas, MG. **Higiene Alimentar**, v. 25, p.194/195, 2011.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”. **Doenças transmitidas por água e alimentos: *Escherichia coli* O157:H7 – enterohemorrágica (EHEC).**

Disponível em:

<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/10EHEC_rev2011.pdf

Acesso em 08 de nov de 2012.

SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P. I.; FROSCH, M.; KARCH, H.; Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence of clonality. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 115-123, 1999.

SILVA, L.C.; FONSECA, C.R.; QUEIROZ, S.R.A.; ALENCAR, A.L.F.; GODOY, S.H.S.; MUNIN, F.S.; SOUZA, R.L.M.; FERNANDES, A.M. Ocorrência de *Escherichia coli* potencialmente causadora de toxi-infecções alimentares em Queijo Coalho e Ricota comercializados no Sudeste do Brasil. **XII Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**, novembro, v. 1, n.1, 2014. Disponível em: < <http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/ocorrncia-de-escherichia-coli-potencialmente-causadoras-de-toxi-infeces-alimentares-em-queijos-coalho-e-ricota-comercializados-no-sudeste-do-brasil-11648>>. Acesso em 21 de junho de 2015.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F; OKAZADI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção em verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SKOCKOVÁ, A.; KARPÍSKOVÁ, R.; KOLÁCKOVÁ, I.; CUPÁKOVÁ, S. Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic, **International Journal of Food Microbiology**, v.167, p.196-201, 2013.

SODHA, S.V.; HEIMAN, K.; GOULD, L.H.; BISHOP, R.; IWAMOTO, M.; SWERDLOW, D.L.; GRIFFIN, P.M. National patterns of *Escherichia coli* O157 infections, USA, 1996-2011. **Epidemiol. Infect.**, v.143, p. 267-273, 2015.

SOLOMON, E. B.; YARON, S.; MATTEWS, K. R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 397-400, 2002.

SOUZA, R.L.; CARVALHAES, J.T.A.; NISHIMURA, L.S.; ANDRADE, M.C.; GUTH, B.E.C. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. **Open Microbiology Journal**, v.5, 76-82, 2011.

STELLA, A.E.; MALUTA, R.P.; RIGOBELLO, E.C.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Virulence genes in isolates of *Escherichia coli* from samples of milk and feces from dairy cattle. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1698-1700, 2012.

TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H. P.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, M. G. T.; CASTRO E SILVA, A. A. M. C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.2. Uberaba, 2000.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. Mili – Um meio para realização dos testes de Motilidade, Indol e Lisina Descarboxilase. **Revista de Microbiologia**, v. 13, n. 3, p. 230-235, 1982 a.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**, v. 13, n. 4, p. 309-315, 1982 b.

TONIAZZO, G.; BOBCO, S. E.; PEIROZANB, M.K.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, D.; PINHEIRO, T.L.F. Condições higiênicas de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Erechim-RS. **Brazilian Journal of Food & Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 301-305, 2011.

TORTORELLO, M.L. Indicator organisms for safety and quality – uses and methods for detection: minireview. **Journal of AOAC International**, v. 86, n.6, p. 1208-1217, 2003.

TZSCHOPPE, M.; MARTIN A.; BEUTIN, L. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.152, p.19-30, 2012.

UNITED STATES OF AMERICA. Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/wastes/conservation/composting/types.htm#win>> Acesso em 07 de abr de 2015.

VENDRAMIN, T.; KICH, D.M.; MOLINA, R.D.; SOUZA, C.F.V.; SALVATORI, R.U.; POZZOBON, A.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. Molecular Screening of bovine raw milk for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on dairy farms, **Food Science and Technology**, v.34, n.3, 2014.

VETTORATO, M.P. Estudo da frequência e caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga (STEC) isoladas de ovinos no Estado de São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008

VICENTE, H.I.G.; DO AMARAL, L. A.; CERQUEIRA, A. D. F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 217-222, 2005.

VON LAUER, A.E. **Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas carcaças dos animais abatidos**.2009. Tese (doutorado em Ciência e Tecnologia do Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, 2009.

WANG, F.; YANG, Q.; KASE, J.A.; MENG, J.; CLOTILDE, L.M.; LIN, A.; GE, B. Current trends in detecting non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n.8, p. 665-677, 2013.

WANG, G.; DOYLE, M. P.; Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 662-667, 1998.

WASILENKO, J.L.; FRATAMICO, P.M.; SOMMERS, C.; DeMARCO, D.R.; VARKEY, S.; RHODEN, K.; TICE, G. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145, and *Salmonella* in retail raw ground beef using the DuPont™ BAX® system. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4:81, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food Safety Unit. **Surface Decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review**. Beuchat, L. R., 1998. 42p. (Food Safety Issue, WHO/FSF/FOS/98.2). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2pdf?ua=1> Acesso em 15/03/2015.

WILLSHAW, G. A.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; THOMAS, A.; ROWE, B. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog

from a Vero cytotoxinproducing strain of *E. coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 897-902, 1994.

WOOD, J.L.; CHEN, J.C.; ELSIE, F.; DELAQUIS, P.; ALLEN, K.J. Microbiological survey of locally grown lettuce sold at farmer's markets in Vancouver, British Columbia, **Journal of Food Protection**, n.1, 0. 203-208, 2015.

APENDICE

Table 1
For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.

Pos. Tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

QUESTIONÁRIO
Práticas agrícolas empregadas na produção de hortaliças

Propriedade:

Variedades cultivadas:

1. Origem das sementes

☐ mercado local ☐ cultivos anteriores ☐ doações

2. Local de cultivo

☐ canteiros no solo ☐ canteiros suspensos ☐ latas/caixas ☐ outro (qual?)

3. Tipo de adubação

☐ químico ☐ orgânico ☐ ambos

Composição:

4. Frequência de aplicação dos adubos

☐ diário ☐ semanal ☐ quinzenal

5. Presença de animais no campo

☐ sim ☐ não Em caso positivo, quais?

6. Origem da água de abastecimento

☐ rio ☐ lago ☐ poços ☐ rede pública de abastecimento

7. Realizada análise da qualidade microbiológica da água?

☐ sim ☐ não. Qual periodicidade e quais critérios?

8. Realizada pré-lavagem das hortaliças antes de serem destinada à comercialização?

☐ sim ☐ não. Em caso positivo, qual o procedimento? Aplicado algum produto sanitizante?

9. Destino das hortaliças produzidas

☐ consumo ☐ doações ☐ comercialização