

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

***Salmonella* e outras *Enterobacteriaceae* em hortaliças
convencionais e orgânicas: ocorrência, diversidade e impacto da
cadeia produtiva no risco de salmonelose**

Nicolle Ferraz de Arruda Padovani

Tese para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2024**

Nicolle Ferraz de Arruda Padovani
Engenheira de Alimentos

***Salmonella* e outras *Enterobacteriaceae* em hortaliças convencionais e orgânicas: ocorrência, diversidade e impacto da cadeia produtiva no risco de salmonelose**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **DANIELE FERNANDA MAFFEI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Padovani, Nicolle Ferraz de Arruda

Salmonella e outras *Enterobacteriaceae* em hortaliças convencionais e orgânicas: ocorrência, diversidade e impacto da cadeia produtiva no risco de salmonelose / Nicolle Ferraz de Arruda Padovani. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

61 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Avaliação quantitativa de risco microbiológico 2. Hortaliças
3. MALDI-TOF MS 4. PCR em tempo real 5. Segurança microbiológica I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Sofia, Lorenzo, Enrico e Aurora
que me ensinam sobre amor, resiliência e simplicidade diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado e abençoado minha jornada ao longo do curso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei, pela orientação, pelos ensinamentos, por me motivar e permitir desenvolver este trabalho.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa da tese, por toda contribuição feita para melhorar este trabalho.

Ao Dr. Schaffner, pela parceria na construção do modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico.

Ao DEMPSTER Mass Lab da USP, por permitir o uso do equipamento para a realização das análises utilizando a técnica MALDI-TOF MS.

À Profa. Dra. Aline Cesar, pelo auxílio, e, também, disponibilização do equipamento para realização da PCR em tempo real.

À ESALQ/USP, por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP pela infraestrutura concedida para desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes e funcionários da ESALQ/USP, principalmente, do LAN e da Pós-graduação, que contribuíram com este trabalho ao longo do curso.

À técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Denise, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pelos cafés e conversas ao longo dos anos.

Ao pessoal presente e aqueles que já saíram do Laboratório de Microbiologia de Alimentos por auxiliarem de alguma forma com este trabalho e pelos momentos de descontrações: Isabela, Thiago, Samuel, Bruno, Lyvia e Priscila.

Aos meus filhos, Sofia, Lorenzo, Enrico e Aurora, pela paciência nos momentos em que precisei estar ausente e por todo carinho e amor.

À minha sobrinha Catharina, por todo amor, carinho e alegria.

Aos meus pais e à minha irmã Nathália que me apoiam incondicionalmente em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio, incentivo e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que colaboraram diretamente ou indiretamente com este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
Referências	12
2 <i>Salmonella</i> AND OTHER ENTEROBACTERIACEAE IN CONVENTIONAL AND ORGANIC VEGETABLES GROWN IN BRAZILIAN FARMS	17
Abstract.....	17
2.1 Introduction.....	17
2.2 Materials and Methods	18
2.2.1 Sampling	18
2.2.2 Enumeration of total <i>Enterobacteriaceae</i>	20
2.2.3 Identification of <i>Enterobacteriaceae</i> by MALDI-TOF MS.....	20
2.2.4 Detection of <i>Salmonella</i> by culture method	21
2.2.5 Detection of <i>Salmonella</i> by real-time PCR	21
2.2.6 Molecular characterization of isolates of <i>Salmonella</i>	22
2.2.7 Sanger sequencing	23
2.3 Results	24
2.4 Discussion	30
References.....	33
3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO IMPACTO DA ETAPA DE LAVAGEM E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS HORTALIÇAS NO RISCO DE INFECÇÃO POR <i>Salmonella</i>	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1 Introdução.....	42
3.2 Material e Métodos	44
3.2.1 Modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico.....	44
3.3 Resultados e Discussão	49
3.4 Conclusões.....	57
Referências	57

RESUMO

***Salmonella* e outras *Enterobacteriaceae* em hortaliças convencionais e orgânicas: ocorrência, diversidade e impacto da cadeia produtiva no risco de salmonelose**

O consumo regular de hortaliças integra uma alimentação saudável, sendo recomendado por autoridades de saúde em todo o mundo. No entanto, dados de vigilância epidemiológica em diversos países apontam aumento na associação de surtos de origem alimentar com o consumo de hortaliças. Este trabalho teve como objetivo obter dados sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. e outras *Enterobacteriaceae* em hortaliças produzidas pelos sistemas de cultivo convencional e orgânico, contribuindo para a construção de um modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico para estimar o impacto à saúde devido ao consumo destas hortaliças, com foco no risco de infecção por *Salmonella*. Um total de 200 amostras de hortaliças (100 convencionais e 100 orgânicas) foram coletadas em propriedades localizadas em Piracicaba (SP) e submetidas à pesquisa de *Salmonella* spp. utilizando método convencional (ISO 6579-1:2017) e molecular (qPCR). Foi também realizada a enumeração e o isolamento de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* para posterior identificação pela técnica de MALDI-TOF MS. *Salmonella* foi identificada em 17 (8,5%) amostras pelos dois métodos, sendo nove (4,5%) em hortaliças convencionais e oito (4,0%) em hortaliças orgânicas. Portanto, essas amostras apresentaram segurança microbiológica insatisfatória e em desacordo com a legislação brasileira vigente. No que se refere às *Enterobacteriaceae*, a média de contagem para hortaliças convencionais e orgânicas foi de $5,1 \pm 1,5$ e $5,4 \pm 1,4$ log UFC/g, respectivamente. Um total de 890 colônias foram isoladas, das quais 494 (55,5%) foram identificadas por MALDI-TOF MS: 257 (52%) de amostras convencionais e 237 (48%) de amostras orgânicas. Foram identificados 18 gêneros e 38 espécies de *Enterobacteriaceae*, sendo *Enterobacter* e *Pantoea* os gêneros mais frequentemente identificados em amostras provenientes de ambos os sistemas de cultivo. A maioria dos gêneros identificados são típicos da microbiota de hortaliças, mas alguns contêm espécies capazes de causar infecções oportunistas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. No geral, o sistema de cultivo não teve impacto nas populações microbianas das hortaliças analisadas neste estudo, *Salmonella* foi identificada por ambos os métodos empregados e MALDI-TOF MS mostrou-se uma técnica eficaz para distinguir bactérias isoladas de hortaliças. O modelo de avaliação de risco desenvolvido foi estruturado em seis módulos, baseados na cadeia produtiva de hortaliças. Foram simulados 72 cenários, considerando diferentes níveis iniciais de contaminação, frações de hortaliças contaminadas e realização das etapas de lavagem (com e sem o uso de sanitizantes), além de variações na temperatura de armazenamento das hortaliças. Este indicou que o uso de sanitizantes nas etapas de lavagem e, principalmente, a temperatura de armazenamento das hortaliças, são as variáveis que mais impactam a segurança microbiológica desses alimentos e, conseqüentemente, a estimativa de casos de salmonelose na população estudada.

Palavras-chave: Avaliação quantitativa de risco microbiológico, Hortaliças, MALDI-TOF MS, PCR em tempo real, Segurança microbiológica

ABSTRACT

***Salmonella* and other *Enterobacteriaceae* in conventional and organic vegetables: occurrence, diversity, and impact of the production chain on the risk of salmonellosis**

Regular consumption of vegetables is a key component of a healthy diet, recommended by health authorities worldwide. However, epidemiological surveillance data from various countries indicate an increase in the association of foodborne outbreaks with the consumption of vegetables. This study aimed to gather data on the occurrence of *Salmonella* spp. and other *Enterobacteriaceae* in vegetables produced by conventional and organic cultivation systems. It contributes to the development of a quantitative microbiological risk assessment model to estimate the health impact due to the consumption of these vegetables, with a focus on the risk of *Salmonella* infection. A total of 200 vegetable samples (100 conventional and 100 organic) were collected from properties located in Piracicaba (SP) and subjected to *Salmonella* spp. detection using both conventional methods (ISO 6579-1:2017) and molecular techniques (qPCR). Enumeration and isolation of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family were also carried out for subsequent identification using MALDI-TOF MS. *Salmonella* was identified in 17 (8.5%) samples by both methods, with nine (4.5%) in conventional vegetables and eight (4.0%) in organic vegetables. Therefore, these samples exhibited unsatisfactory microbiological safety and were not in compliance with current Brazilian legislation. Regarding *Enterobacteriaceae*, the average counts for conventional and organic vegetables were 5.1 ± 1.5 and 5.4 ± 1.4 log CFU/g, respectively. A total of 890 colonies were isolated, of which 494 (55.5%) were identified by MALDI-TOF MS: 257 (52%) from conventional samples and 237 (48%) from organic samples. Eighteen genera and 38 species of *Enterobacteriaceae* were identified, with *Enterobacter* and *Pantoea* being the most frequently identified genera in samples from both cultivation systems. Most identified genera are typical of vegetable microbiota, but some contain species capable of causing opportunistic infections, especially in immunocompromised individuals. Overall, the cultivation system had no impact on the microbial populations of the vegetables analyzed in this study. *Salmonella* was identified by both methods employed, and MALDI-TOF MS proved to be an effective technique for distinguishing bacteria isolated from vegetables. The developed risk assessment model was structured into six modules based on the vegetable production chain. Seventy-two scenarios were simulated, considering different initial contamination levels, fractions of contaminated vegetables, and washing steps (with and without the use of sanitizers), as well as variations in vegetable storage temperature. This indicated that the use of sanitizers in washing steps and, especially, the storage temperature of vegetables are the variables that most impact the microbiological safety of these foods and, consequently, the estimated cases of salmonellosis in the studied population.

Keywords: Risk assessment, Vegetables, MALDI-TOF MS, Real-time PCR, Microbiological safety

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção de alimentos, em decorrência do aumento populacional, ocorreram mudanças nas técnicas agrícolas. Além disso, a adoção de estilos de vida mais saudáveis aumentou o consumo de frutas e hortaliças devido a seus benefícios nutricionais (BERGER *et al.*, 2010). Sistemas alternativos de produção foram desenvolvidos em resposta ao questionamento da sociedade sobre a sustentabilidade e qualidade dos alimentos oriundos da agricultura convencional. Entre tais sistemas, a agricultura orgânica tem atraído a atenção do setor produtivo.

Estudos sugerem que práticas de agricultura orgânica, como o uso de esterco animal (em substituição aos fertilizantes químicos) e práticas de compostagem inadequadas, podem aumentar o risco de contaminação por microrganismos patogênicos, oferecendo riscos à saúde dos consumidores (NKOA, 2014; WINTER; DAVIS, 2006). No entanto, resultados de estudos comparando a qualidade microbiológica de hortaliças oriundas dos sistemas de cultivo convencional e orgânico são contraditórios (CEUPPENS *et al.*, 2014; GOMES NETO *et al.*, 2012; KHALIL; GOMAA, 2014; MAFFEI *et al.*, 2016; MARINE *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2010; RYU *et al.*, 2014; TANGO *et al.*, 2014).

Vários estudos revelam a ocorrência de patógenos como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica em hortaliças produzidas e comercializadas no Brasil e em diversos países, indicando que este alimento pode ser considerado como um veículo transmissor destes microrganismos (CEUPPENS *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2005; HERMAN; HALL; GOULD, 2015; JACKSON; GRIFFIN; COLE, 2013.; MASSEY *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2011; ROBERTSON *et al.*, 2018; SANT'ANA *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos, um recente surto de origem alimentar causado pela bactéria *E. coli* O157:H7 foi associado ao consumo de espinafre baby. Dados publicados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) revelaram 15 indivíduos infectados pela bactéria, dos quais quatro foram hospitalizados e três desenvolveram a síndrome hemolítico-urêmica, tendo sido registradas cinco mortes (CDC, 2022). Também, no mesmo país, outro surto associado ao consumo de hortaliças, no caso, brotos de alfafa, foi causado pela *Salmonella* Typhimurium, levando a um total de 63 indivíduos infectados, dos quais dez foram hospitalizados (CDC, 2023).

Salmonella spp. é considerada o principal agente etiológico de surtos alimentares relacionados ao consumo de produtos frescos, representando um grande desafio para garantia da segurança dos alimentos em todo o mundo. Sua presença nesses alimentos é inaceitável, sendo que o padrão microbiológico estabelecido pela legislação brasileira vigente, Resolução da Diretoria Colegiada nº 724, de 01 de julho de 2022, complementada pela Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022, é ausência desta bactéria em 25 g de produto (BRASIL, 2022a; BRASIL, 2022b).

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos, geralmente móveis, aeróbicas facultativas, não formadoras de esporos. As doenças causadas pela *Salmonella* são divididas em três subgrupos: febre tifóide, causada pela *Salmonella* Typhi, febre entérica, causada pela *Salmonella* Paratyphi (A, B e C) e a enterocolite, popularmente conhecida como salmonelose, causada pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 2023; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A manifestação clínica de infecções por *Salmonella* nos indivíduos é frequentemente a de gastroenterite aguda, que não requer tratamento. No entanto, quando a infecção se torna invasiva, a terapia antimicrobiana é necessária (JUKIĆN *et al.*, 2020). A *Salmonella* é frequentemente encontrada no trato intestinal de aves e outros animais que não apresentam nenhum sintoma da doença. Em humanos, a salmonelose pode se manifestar através do consumo de produtos de origem animal contaminados, que estavam infectados e foram utilizados na produção desse tipo de alimento (MRITUNJAY; KUMAR, 2015; THUNG *et al.*, 2019). Os principais veículos de infecção por *Salmonella* incluem carne, ovos e produtos avícolas (SALLAM *et al.*, 2014). No entanto, as frutas e hortaliças tem ganhado cada vez mais destaque ao longo dos últimos anos.

Diante do exposto, faz-se relevante o desenvolvimento de trabalhos com o intuito de estimar o impacto à saúde devido ao consumo de hortaliças produzidas por ambos os sistemas de cultivo, no que se refere à contaminação por microrganismos patogênicos. A avaliação de risco é uma importante ferramenta nesse sentido, proporcionando um processo estruturado para identificar perigos e estimar os potenciais efeitos adversos para a saúde dos indivíduos quando expostos a esses perigos. Ela é um dos componentes de um sistema conhecido como análise de risco, que compreende a avaliação, gestão e comunicação do risco.

Enquanto a avaliação do risco é subsidiada por informações científicas, a gestão do risco é a etapa em que se implementam medidas de controle, visando reduzir o risco ao nível desejado de proteção do consumidor. Já a comunicação do risco é a etapa em que se faz a troca de informações a respeito dos riscos e dos fatores relacionados, no qual interagem os assessores de risco, os gestores de risco e todas as outras partes interessadas (WHO; FAO, 1995; SANT'ANA; FRANCO, 2010). A avaliação de risco microbiológico é constituída das seguintes etapas: (i) identificação do perigo microbiológico; (ii) avaliação da exposição; (iii) caracterização do perigo e (iv) caracterização do risco (WHO; FAO, 1995; WHO; FAO, 1999).

Um dos desafios para realização de avaliação quantitativa de risco microbiológico é saber o nível de contaminação pelo patógeno na hortaliça ainda no campo. Embora diversos trabalhos disponíveis na literatura apresentem dados de prevalência de patógenos em produtos vegetais cultivados no Brasil e em outros países, são escassos os trabalhos que quantificam estes patógenos nos produtos, devido às dificuldades metodológicas para enumerar tais microrganismos, geralmente presentes em baixas concentrações. A enumeração de microrganismos em baixos níveis em alimentos é difícil, pois requer técnicas de alta sensibilidade, geralmente trabalhosas e custosas. No entanto, a obtenção dessa informação é essencial para construção de um modelo de risco que permita a simulação de cenários considerando dados reais de contaminação das amostras no campo, evitando assim a necessidade de estimar dados. Uma das técnicas que vem sendo cada vez mais utilizada para obtenção de dados quantitativos para estudos de avaliação de risco é a PCR em Tempo Real, devido a sua sensibilidade (alto grau de confiança nos dados) rapidez e eficiência na identificação de patógenos em alimentos (KISLUK *et al.*, 2012; MALORNY *et al.*, 2008).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo obter dados sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. e outras *Enterobacteriaceae* em hortaliças produzidas pelos sistemas de cultivo convencional e orgânico, contribuindo para a construção de um modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico para estimar o impacto à saúde devido ao consumo destas hortaliças, com foco no risco de infecção por *Salmonella*.

Referências

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Brasília, 2022b. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Acesso em: 23 out. 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 724, de 1 de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Brasília, 2022a. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_724_2022_.pdf/33c61081-4f32-43c2-9105-c318fa6069ce. Acesso em: 21 ago. 2023.
- BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 2385-2397, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***E. coli* outbreak linked to frozen falafel print**. 1 dez. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2022/o121-10-22/index.html>
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Salmonella* outbreak linked to alfalfa sprouts**. 28 fev. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-12-22/index.html>
- 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**, [s. l.], v. 181, p. 67–76, 2014. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025>
- FANG, F. C.; LIBBY, S. J.; CASTOR, M. E.; FUNG, A. M. Isocitrate Lyase (AceA) is required for *Salmonella* persistence but not for acute lethal infection in mice. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 2547–2549, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.4.2547-2549.2005>
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2023.

- GOMES NETO, N. J.; PESSOA, R. M. L.; QUEIROGA, I. M. B.; 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**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 47–51, 2012. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.033>
- HERMAN, K. M.; HALL, A. J.; GOULD, L. H. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 143, n. 14, p. 3011-3021, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268815000047>
- JACKSON, B. R.; GRIFFIN, P. M.; COLE, D. Outbreak-associated *Salmonella enterica* Serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 1239-1244, 2013. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/19150>
- JUKIĆ, H.; DEDIĆ, S.; RODIĆ, M.; JUSUFHODŽIĆ, Z. (2020). *Salmonella* species: from production to dining table. **New Technologies, Development and Application**, [s. l.], v. 76, p. 655-662, 2020. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-18072-0_77
- KHALIL, R.; GOMAA, M. Evaluation of the microbiological quality of conventional and organic leafy greens at the time of purchase from retail markets in Alexandria, Egypt. **Polish Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 237-243, 2014.
- KISLUK, G.; HOOVER, D. G.; KNEIL, K. E.; YARON, S. Quantification of low and high levels of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on leaves. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 36–42, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.029>
- MAFFEI, D. F.; BATALHA, E. Y.; LANDGRAF, M.; SCHAFFNER, D. W.; FRANCO, B. D. G. M. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 47, p. 99–105, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006>
- MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by Real-Time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 1299-1304, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02489-07>

- MARINE, S.; PAGADALA, S.; WANG, F.; PAHL, D.; MELENDEZ, M.; KLINE, W.; ONI, R.; WALSH, C.; EVERTS, K.; BUCHANAN, R.; MICALLEF, S. 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**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 2395-2407, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00051-15>
- MASSEY, L.; HETTIARACHCHY, N.; HORAX, R.; RAYAPROLU, S.; KUMAR-PHILLIPS, G.; MARTIN, E.; RICKE, S. Efficacy of organic acid electrostatic spray for decontaminating *Salmonella* on cantaloupe cubes and cherry tomatoes. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 1-9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13748>
- MRITUNJAY, S. J.; KUMAR, V. Fresh farm produce as a source of pathogens: a review. **Research Journal of Environmental Toxicology**, [s. l.] v. 9, n. 2, p. 59-75, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3923/rjet.2015.59.70>
- NKOA, R. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 473-492, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0196-z>
- 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**, [s. l.] v. 22(8), 1400-1403, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.020>
- OLIVEIRA, M.; USALL, J.; VIÑAS, I.; ANGUERA, M.; GATIUS, F.; ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**, [s. l.] v. 27, n. 5, p. 679–684, 2010. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.008>
- ROBERTSON, J.; YOSHIDA, C.; KRUCZKIEWICZ, P.; NADON, C.; NICHANI, A.; TABOADA, E.; NASH, J. Comprehensive assessment of the quality of *Salmonella* whole genome sequence data available in public sequence databases using the *Salmonella* in silico Typing Resource (SISTR). **Microbial Genomics**, [s. l.] v. 4, n. 2, 2018. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000151>

- RYU, J.; KIM, M.; KIM, E.; BEUCHAT, L.; KIM, H. Comparison of the microbiological quality of environmentally friendly and conventionally grown vegetables sold at retail markets in Korea. **Journal of Food Science**, [s. l.] v. 79, n. 9, p. M1739-M1744, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12531>
- SALLAM, K. I.; MOHAMMED, M. A.; HASSAN, M. A.; TAMURA, T. Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. **Food Control**, [s. l.] v. 38, p. 209-214, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.10.027>
- SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M. Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 266-276, 2010. <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900021>
- SANT'ANA, A. S.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, [s. l.] v. 28, n. 6, p. 1235-1237, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.04.002>
- TANGO, C.; CHOI, N.; CHUNG, M.; OH, D. Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. **Journal of Food Protection**, [s. l.] v. 77, n. 8, p. 1411-1417, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-514>
- THUNG, T. Y.; LEE, E.; WAI, G. Y.; PUI, C. F.; KUAN, C. H.; PREMARATHNE, J. M. K. J. K.; NURZAFIRAH, M.; TAN, C. W.; MALCOLM, T.T.H.; RAMZI, O. S. B.; WENDY, D. R.; NEW, C. Y.; SON, R. A review of culture-dependent and molecular methods for detection of *Salmonella* in food safety. **Food Research**, [s. l.] v. 3, n. 6, p. 622-627, 2019. DOI: [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).018](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).018)
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- WINTER, C. K.; DAVIS S. F. Organic foods. **Journal of Food Science**, [s. l.] v. 71, n. 9, p. R117–R124, 2006. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00196.x>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Application of risk analysis to food standards issues: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation**. Geneva: World Health Organization, 1995. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ae922e/ae922e00.htm>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Codex Alimentarius Commission. **Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment**. (CAC/GL-30). Geneva: World Health Organization, 1999. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>

2 *Salmonella* AND OTHER *ENTEROBACTERIACEAE* IN CONVENTIONAL AND ORGANIC VEGETABLES GROWN IN BRAZILIAN FARMS¹

Abstract

This study aimed to assess the microbiological profile of conventional and organic vegetables grown in Brazilian farms through the detection of *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. A total of 200 samples (100 conventional and 100 organic), including leafy greens, spices/herbs, and other unusual vegetables, were submitted to the enumeration of *Enterobacteriaceae* by plating on VRBG agar. Moreover, colonies of *Enterobacteriaceae* were randomly selected and submitted to identification by MALDI-TOF MS. Samples were also tested for *Salmonella*, using culture-based and PCR-based enrichment methods. The mean counts of *Enterobacteriaceae* in conventional and organic vegetables were 5.1 ± 1.5 and 5.4 ± 1.4 log CFU/g, respectively ($P > 0.05$). A total of 18 genera (including 38 species) of *Enterobacteriaceae* were identified, and the most frequent ones found in samples from both farming systems were *Enterobacter* (76%) and *Pantoea* (68%). *Salmonella* was identified in 17 samples (8.5%): nine (4.5%) in conventional and eight (4.0%) in organic vegetables. These results indicate that the farming system had no impact on the *Enterobacteriaceae* populations and rates of *Salmonella* and revealed unsatisfactory microbiological safety of some samples, mainly due to the presence of *Salmonella*. These findings highlight the need for control measures during vegetable production, regardless of the farming system, to reduce microbial contamination and the risks of foodborne illnesses.

Keywords: Food safety, Fresh vegetables, MALDI-TOF MS, Organic farming, Real-time PCR.

2.1 Introduction

Regular consumption of vegetables is important for a healthy diet, as recommended by health authorities worldwide. The supply of important nutrients (e.g., several vitamins and minerals, dietary fiber, and phytochemicals) and a lower risk of some chronic diseases are among the benefits resulting from vegetable consumption [1, 2]. Many individuals searching for healthier diets are concerned about not only including vegetables in their daily meals, but also the way these vegetables are produced.

Alternative cropping systems have been developed in response to society's increasing concerns about the sustainability and quality of food from conventional agriculture. Among these systems, organic agriculture has been on the rise,

¹Artigo publicado na revista **Brazilian Journal of Microbiology** (<https://doi.org/10.1007/s42770-023-00934-2>).

attracting the attention of the food production sector. Organically produced food is considered healthy since it uses eco-agricultural principles that are environmentally friendly and provide products potentially free from agrochemicals [3-5].

Despite the health benefits of diets rich in vegetables, epidemiological surveillance data in several countries have indicated an increasing association between the occurrence of foodborne illnesses and the consumption of these products [6-8]. In addition, certain studies suggest that some organic farming practices, mainly the use of raw (or not properly composted) animal manure as fertilizer, may increase the risk of contamination by pathogenic microorganisms [9, 10]. Although animal manure may be used in both conventional and organic agriculture for soil fertilization, its use is more common in organic production since farmers cannot use synthetic fertilizers. Nevertheless, studies comparing the microbiological profile of conventional and organically grown vegetables have shown contradictory results [11-23].

Most of the studies cited above are limited to the enumeration of hygiene indicator organisms and detection of bacterial pathogens using conventional culture methods, which are laborious and time-consuming and may have limited detection capability if pathogens in a viable-but-non-culturable state are present [24]. On the other hand, new techniques for the rapid and accurate identification of microorganisms have been emerging in the last decades, allowing the detection, quantification and/or differentiation of microorganisms in foods. Among these, molecular-based and mass spectrometry-based techniques have gained increasing attention [25-28].

The present study aimed to assess the microbiological profile of conventional and organic vegetables grown in farms located in southeastern Brazil, through the detection of *Salmonella* spp. (using culture-based and PCR-based enrichment methods) and other bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, identified by MALDI-TOF MS.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Sampling

Visits were conducted to farmer markets in the city of Piracicaba, SP, southeastern Brazil, aiming to identify farms that grow conventional and organic vegetables. During these visits, farmers were informed about the purposes of this

study and invited to participate. A total of four farmers [two conventional (A and B) and two organics (C and D)] agreed to participate. Both organic farms were certified by competent Brazilian authorities.

On-site visits were conducted on these farms between June and December 2019 (three visits on each farm), where a total of 200 vegetable samples (100 conventional and 100 organic) were collected, based on their availability on the day of the visit (Table 1). These samples were removed directly from the soil in different points of the croplands, taken to the laboratory without being washed and immediately analyzed. All of them were subject to enumeration and identification of *Enterobacteriaceae*, apart from the detection of *Salmonella* spp.

Table 1. Types and numbers of conventional and organically grown vegetables tested.

Samples	Conventional	Organic
Arugula (<i>Eruca sativa</i>)	6	10
Barbados gooseberry (<i>Pereskia aculeata</i> Miller)	0	2
Basil (<i>Ocimum basilicum</i>)	1	3
Broccoli (<i>Brassica oleracea</i>)	1	0
Cabbage (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	1	5
Celery (<i>Apium graveolens</i>)	0	2
Chard (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>)	2	0
Chicory (<i>Cichorium intybus</i>)	8	7
Chives (<i>Allium schoenoprasum</i>)	2	10
Collard greens (<i>Brassica oleracea</i>)	16	10
Coriander (<i>Coriandrum sativum</i>)	2	3
Leek (<i>Allium porrum</i>)	0	5
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)	53	32
Mint (<i>Mentha spicata</i>)	3	1
Mustard greens (<i>Brassica juncea</i>)	1	0
Parsley (<i>Petroselinum crispum</i>)	3	8
Spinach (<i>Spinacia oleracea</i>)	1	1
Wormseed (<i>Dysphania ambrosioides</i>)	0	1
Total	100	100

2.2.2 Enumeration of total *Enterobacteriaceae*

After removing the damaged and spoiled leaves, 25 g of each sample were aseptically weighed, transferred to a sterile plastic bag and homogenized with 225 mL of 0.1% peptone (Acumedia, Michigan, USA) in a Stomacher (ITR Instrumentos para 111 Laboratórios Ltda., Esteio, RS, Brasil) for 1 min. Serial dilutions were prepared in 0.1% peptone and submitted to enumeration of total *Enterobacteriaceae* by plating on Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar (Kasvi, Italy) according to the 9:62:2015 APHA method [29].

Total *Enterobacteriaceae* counts expressed as CFU/g were log transformed and submitted to the Student's t-test to determine whether the contamination levels of conventional and organic vegetables differed significantly ($P \leq 0.05$). The software Sigma Stat version 3.11 (Systat Software Inc., USA) was used for statistical analyses.

2.2.3 Identification of *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS

A total of 890 morphologically different bacterial colonies grown on VRBG agar plates (approximately 4 to 5 from each sample) were randomly selected and purified by streaking on Brain Heart Infusion agar plates (Kasvi, Italy). These colonies were submitted to identification, using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The procedures followed the protocol described by Alves et al. [30], with modifications mentioned by Santos et al. [31]. In short, each colony was transferred from the plates to microtubes (Axygen, USA), which included 100 μ l of ultrapure water. Subsequently, 300 μ l of ethanol P.A. 99.5% (Synth, 129 Brazil) were added and the microtubes were vortexed (10 s) and centrifuged (12,446 g, 2 min). The supernatant was discharged, and the pellet was suspended in 30 μ l of 70% formic acid (Sigma, Germany). The microtubes were vortexed and centrifuged again, followed by the addition of 30 μ l of acetonitrile P.A. 99.8% (Sigma, Germany). Finally, these microtubes were vortexed and centrifuged one more time, so that the supernatant with the proteins and peptides of interest could be obtained.

The α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix was prepared as a saturated solution in 300 μ L of acetonitrile with 0.1% trifluoroacetic acid. Next, 0.5 μ L of each sample extract was placed onto a steel target plate, where they dried at room temperature. Finally, 0.5 μ L of matrix solution was included and left to air dry. The

analyses were conducted on a MALDI-TOF MS Biotyper™ (Bruker Daltonics, Germany) and bacteria were identified by means of the Biotyper 3.1 database. Standard cutoff score values for species and genus identification are set to 2.0 and 1.7 by the manufacturer.

2.2.4 Detection of *Salmonella* by culture method

Another portion of 25 g of each vegetable sample was homogenized in a Stomacher (ITR Instrumentos para 111 Laboratórios Ltda., Esteio, RS, Brasil) with 225 ml of Buffered Peptone Water – BPW ISO (Kasvi, Italy) for 1 min and incubated at 37±1°C for 18±2 h. After this enrichment step, isolation of *Salmonella* followed the ISO 6579-1:2017 method [32]. Results were expressed as presence or absence of *Salmonella* spp. in 25 g.

2.2.5 Detection of *Salmonella* by real-time PCR

The detection of *Salmonella* by real-time PCR was performed from samples of vegetables pre-enriched in BPW, obtained in the first step of the culture method. The procedures followed the protocol described by Maffei et al. [33]. An aliquot (1 ml) of each enriched sample was submitted to DNA extraction using the commercial kit mericon DNA Bacteria (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol. The *Salmonella* strains amplification was performed with the mericon *Salmonella* spp. kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. The reactions included a total volume of 20 µL containing 10.4 µL of reconstituted mericon assay and 9.6 µL of genomic DNA and were performed by real-time PCR technique using the Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The amplification program consisted of an initial holding stage of 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 72°C for 10 s, as defined by the mericon *Salmonella* spp. kit instructions. Finally, the results were analyzed using the CFX Maestro Software version 1.0 following the manufacturer's recommendation. To enable the quantification of the target DNA in the analyzed samples, a standard curve was constructed, ranging from 10⁸ to 10⁰ *Salmonella* equivalent genome copies per reaction (Figure 1). Considering that the average *Salmonella* genome size is 4.964.097 base pairs [34], the concentration of DNA needed to construct the standard curve was calculated. The quantitative estimation of *Salmonella* in the

enriched cultures (log equivalent) was obtained through the interpolation of the cycle threshold values (CT) obtained for the samples with the CT of the standard curve. The coefficients of PCR amplification efficiency were above 98%, while the correlation coefficients (R²) of the standard curve were above 0.99. All amplifications included positive and negative controls as well as internal controls and were run in triplicate.

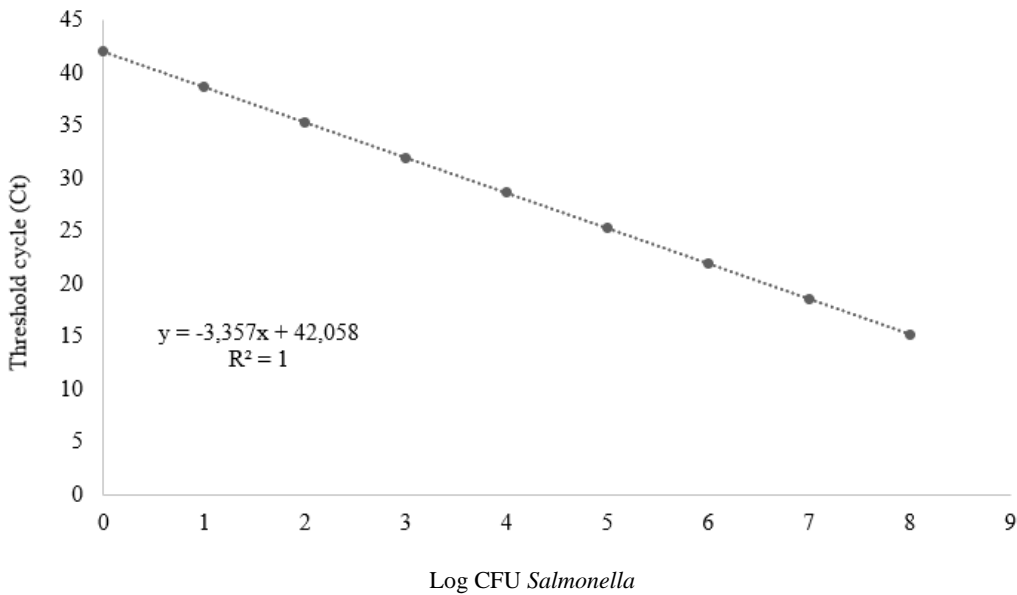


Figura 1. Standard qPCR curve for *Salmonella* spp. showing the linear relationship between Ct values and estimated number of cells (log CFU).

2.2.6 Molecular characterization of isolates of *Salmonella*

The genomic DNA of the isolates morphologically and biochemically identified as *Salmonella* according to the guidelines of the ISO 6579 was extracted using InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. In addition, the genomic DNA of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 was also extracted as positive control. Subsequently, they were genotyped using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) to characterize the *Salmonella* profiles found in the present study.

The ERIC-PCR was performed using the primer set described by Herrera-Sánchez et al. [35], where the sequence of the primers were ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA-3') and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGAGCG-3'). The amplification reaction was performed in a total volume of 25 µL, including 2 µL of bacterial DNA (*Salmonella*), 10 µL of

mastermix PCR BIO Taq DNA Polymerase (PCR Biosystems Ltd., London, UK), 2 μL of forward and reverse primers (1.0 $\mu\text{L}/\text{pm}$ per each), and the remaining volume was filled by 11 μL of PCR grade water. The PCR protocol was carried out with a Bio-Rad thermocycler C-1000 (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA) and consisted of an initial denaturation step for 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of 30 seconds at 95 °C, 1 min at 52 °C, 7 min at 72 °C and a final extension step for 10 min at 72 °C [36].

An aliquot of 10 μL of each PCR product and the 1 Kb ladder (Promega Corporation, Madison, USA) were mixed with 2 μL of Bromophenolblue loading buffer and 0.3 μL of GelRed Nucleic Acid Gel Stain (with 10,000X DMSO, Biotium), then, loaded on the 1% agarose gel, and the electrophoresis was performed with 1x TBE buffer (50V, 3:20h). The gel image was captured by a scanner under ultraviolet transillumination using Image Lab™ Molecular Imager Gel Doc™ XR Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The band profiles generated by ERIC-PCR were analyzed through the comparison with the band profile of a positive control of *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) and in previous studies.

2.2.7 Sanger sequencing

To identify the *Salmonella* strains detected in the samples herein analyzed, the Sanger sequencing method was performed for those that showed a unique band profile in ERIC-PCR analysis. The Sanger sequencing was performed for both strands of the PCR products of *invA* gene amplification (796 bp; forward - 5'-CGGTGGTTTTAAGCGTACTCTT-3' and reverse - 5'-CGAATATGCTCCACAAGGTT-3' primers) [37]. Briefly, the *invA* region amplification was performed from a PCR reaction with a total volume of 25 μL , 10 μL of mastermix PCR BIO Taq DNA Polymerase (PCR Biosystems Ltd., London, UK), 2 μL of forward and reverse primers (1.0 $\mu\text{L}/\text{pm}$ per each), 1 μL of sample and the left volume was filled by 12 μL of PCR grade water. The reaction was subjected to denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 57 °C and 2 min at 72 °C [37]. The PCR reaction was performed in a Bio-Rad C-1000 thermocycler (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA). The amplification of the *invA* region was confirmed by electrophoresis on 2% agarose gel with 1x TBE buffer (90V, 50 min), where 5 μL of the PCR product and 1 μL molecular weight 100bp DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, USA) were mixed with 2 μL of Bromophenolblue loading buffer and 0.3 μL of intercalating GelRed Nucleic Acid Gel Stain (with 10,000X DMSO,

Biotium) were loaded on the gel. The gel image was captured by a scanner under ultraviolet transillumination using Image Lab™ Molecular Imager Gel Doc™ XR Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After the specific amplification of the region *invA*, the PCR products were sent to a commercial facility to be purified and sequenced by Sanger technique. The obtained sequences were mapped against those registered in the GenBank database [34] using the BLAST tool by MEGA11 program [38].

2.3 Results

The main vegetables grown on the farms visited were lettuce and collard greens, representing 42.5% and 13% of the samples analyzed in this study, respectively. However, other varieties of vegetables frequently used in the preparation of spices and/or teas (e.g., basil, chives, coriander, leek, mint, and parsley) and some unusual vegetables (e.g., barbados gooseberry and wormseed) were also found in the production fields.

The mean counts of *Enterobacteriaceae* in conventional and organic vegetables were 5.1 ± 1.5 and 5.4 ± 1.4 log CFU/g, respectively. There was no significant difference in the counts between samples from both farming systems ($P > 0.05$; Student's t-test) (Table 2). Of the 890 bacterial colonies isolated from VRBG agar plates, 494 (55.5%) were identified by MALDI-TOF MS, being 257 (52%) from conventional and 237 (48%) from organic samples. In total, 25 genera and 61 species of bacteria were identified, of which 18 genera (including 38 species) belonged to the *Enterobacteriaceae* family.

Table 2. Population of *Enterobacteriaceae* in conventional and organic vegetables.

Samples	Total <i>Enterobacteriaceae</i>	
	Conventional	Organic
Arugula	5.8±1.1	5.1±1.5
Barbados gooseberry	n.a.	3.7±0.8
Basil	2.6*	4.6±1.2
Broccoli	3.0*	n.a.
Cabbage	4.8*	4.6±1.2
Celery	n.a.	5.7±0.3
Chard	4.9±1.2	n.a.
Chicory	6.0±1.1	6.0±1.0
Chives	4.8±2.9	5.9±1.2
Collard greens	2.9±0.4	4.6±1.4
Coriander	6.1±1.4	5.5±1.1
Leek	n.a.	5.4±1.1
Lettuce	5.3±1.3	5.7±1.5
Mint	4.8±0.9	5.7*
Mustard greens	8.6*	n.a.
Parsley	4.8±0.8	5.0±2.0
Spinach	6.1*	5.7*
Wormseed	n.a.	6.1*
Mean	5.1±1.5	5.4±1.4

Results expressed as mean ± SD (log CFU/g), when applicable.

n.a: not applicable (unassessed sample)

*: There was no standard deviation, as the result of only one sample was considered.

Similar genera were found in vegetables from both farming systems and the most frequently identified ones were *Enterobacter* [31.1% (conventional) and 27.8% (organic)] and *Pantoea* [19.5% (conventional) and 37.1% (organic)] (Table 3). On the other hand, some genera were only detected in samples from organic (including *Cedecea*, *Cronobacter*, *Hafnia* and *Pluralibacter*) and conventional farming systems (including *Buttiauxella*, *Pectobacterium* and *Raoultella*). However, it is not possible to state that this is a trend, as the identification of bacteria by MALDI-TOF was made with a limited number of bacterial colonies randomly selected from VRBG agar

plates. Although VRBG agar was used to favor the growth of *Enterobacteriaceae*, 98 (24.7%) non-*Enterobacteriaceae* were identified, belonging to the families Aeromonadaceae, Bacillaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae and Rhizobiaceae (Figure 2).

Table 3. *Enterobacteriaceae* identified by MALDI-TOF MS and their occurrence in conventional and organic vegetables.

Conventional			Organic		
Genera	Species	n (%)	Genera	Species	n (%)
<i>Buttiauxella</i>	<i>B. noackiae</i>	1 (0.4)	<i>Cedecea</i>	<i>C. neteri</i>	1 (0.4)
	<i>B. warmboldiae</i>	1 (0.4)		<i>Citrobacter</i>	<i>C. farmeri</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>C. braakii</i>	2 (0.8)	<i>C. koseri</i>		2 (0.8)
	<i>C. freundii</i>	2 (0.8)	<i>Cronobacter</i>	<i>Cronobacter</i> sp.	2 (0.8)
<i>Enterobacter</i>	<i>E. asburiae</i>	37 (14.4)		<i>E. asburiae</i>	23 (9.7)
	<i>E. cloacae</i>	29 (11.3)	<i>E. cancerogenus</i>	3 (1.3)	
	<i>E. kobei</i>	9 (3.5)	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	28 (11.8)
	<i>E. ludwigii</i>	5 (1.9)		<i>E. kobei</i>	2 (0.8)
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	5 (1.9)	<i>E. ludwigii</i>	10 (4.2)	
	<i>K. aerogenes</i>	1 (0.4)	<i>Erwinia</i>	<i>E. persicina</i>	1 (0.4)
<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	15 (5.8)		<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>K. pneumoniae</i>	2 (0.8)	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>	1 (0.4)
	<i>K. variicola</i>	6 (2.3)		<i>K. aerogenes</i>	2 (0.8)
<i>Kluyvera</i>	<i>K. ascorbata</i>	1 (0.4)	<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	6 (2.5)
<i>Leclercia</i>	<i>L. adecarboxylata</i>	7 (2.7)		<i>K. variicola</i>	5 (2.1)
<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>	19 (7.4)	<i>Kluyvera</i>	<i>K. intermedia</i>	3 (1.3)
	<i>P. ananatis</i>	26 (10.1)	<i>Leclercia</i>	<i>L.</i>	11 (4.6)

				<i>adecarboxylata</i>	
	<i>P. dispersa</i>	5 (1.9)		<i>P. agglomerans</i>	58 (24.5)
<i>Pectobacterium</i>	<i>P. carotovorum</i>	3 (1.2)		<i>P. ananatis</i>	22 (9.3)
	<i>P. alcalifaciens</i>	4 (1.6)		<i>P. dispersa</i>	2 (0.8)
<i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri</i>	4 (1.6)	<i>Pantoea</i>	<i>P. eucrina</i>	1 (0.4)
	<i>R. ornithinolytica</i>	3 (1.2)		<i>Pantoea</i> sp.	2 (0.8)
<i>Raoultella</i>	<i>S. fonticola</i>	1 (0.4)		<i>P. stewartii</i>	3 (1.3)
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>	3 (1.2)	<i>Pluralibacter</i>	<i>P. pyrinus</i>	1 (0.4)
	<i>S. colletis</i>	1 (0.4)	<i>Providencia</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	1 (0.4)
<i>Siccibacter</i>	<i>S. turicensis</i>	1 (0.4)		<i>S. fonticola</i>	2 (0.8)
Other non- <i>Enterobacteriaceae</i>		64 (24.9)	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>	5 (2.1)
Total		257 (100.0)	<i>Siccibacter</i>	<i>S. turicensis</i>	3 (1.3)
			Other non- <i>Enterobacteriaceae</i>		34 (14.3)
			Total		237 (100.0)

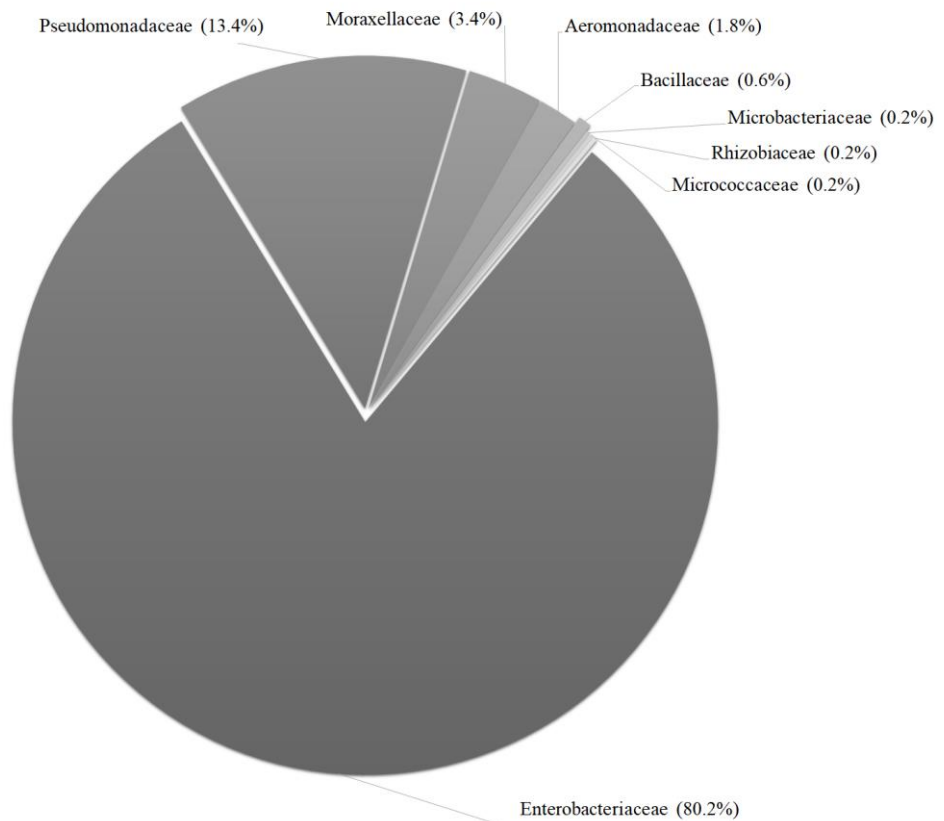


Figure 2. Families of bacteria isolated in VRBG identified by MALDI-TOF MS.

Regarding *Salmonella* spp., 17 (8.5%) vegetable samples were positive for this bacterium: nine (4.5%) from conventional and eight (4.0%) from organic farms. This result was obtained using both culture-based and PCR-based enrichment methods (Table 4). Interestingly, the positive samples were mostly arugula, collard greens and lettuce. According to the standard curve, the estimated populations of *Salmonella* in these positive samples ranged from 5.0 to 7.0 log CFU/g. Although considered high, this value can be justified by the pre-enrichment step (necessary in the method used) and indicate the presence of viable *Salmonella* cells in the samples.

The ERIC-PCR technique revealed two specific band profiles, where the first one generated 3-10 bands ranging in size from 200 to 2000 bp and the second one generated 3-6 bands ranging in size from 300 to 1000 bp. The Sanger sequencing results from the isolates belonging to both profiles (two from each) resulted in the identification of *Salmonella* enterica subsp. enterica, where 11 (64.7%) and 6 (35.5%) of the strains presented similarity (>97%) to serovars Typhimurium and Enteritidis, respectively (Table 4).

Table 4. Positivity for *Salmonella* in conventional and organic vegetables.

Farm	Vegetables	Number of <i>Salmonella</i> isolates	<i>Salmonella</i> serovar detected
Conventional (A)	Arugula	1	Typhimurium
	Collard greens	1	Typhimurium
	Lettuce	1	Typhimurium
		1	Enteritidis
Conventional (B)	Chicory	1	Typhimurium
	Collard greens	1	Enteritidis
		1	Enteritidis
		1	Typhimurium
Organic (C)	Arugula	1	Enteritidis
	Collard greens	2	Typhimurium
	Lettuce	1	Typhimurium
Organic (D)	Arugula	2	Typhimurium
		2	Enteritidis
	Lettuce	1	Typhimurium

2.4 Discussion

Fresh vegetables are an important part of a healthy diet. However, they may be contaminated with harmful microorganisms. The microbial contamination of these products can occur along the production chain, regardless of the organic or conventional farming system. The main sources of contamination at the preharvest stage (in the field) include contaminated soil, irrigation water, use of raw (or poorly treated) animal manure and compost, and fecal contamination originated from livestock or wild animals, while postharvest sources may include human handling, contaminated harvesting equipment and utensils, wash and rinse water, improper storage, and packaging [39, 40]. Moreover, vegetables are often consumed raw, without the need for heat treatment before consumption. This increases the risk of illness to consumers if these vegetables are contaminated with microbial pathogens.

According to the most recent epidemiological report published by the Brazilian Ministry of Health, a total of 6,347 foodborne outbreaks were reported in the country between 2012 and 2021, including 104,839 sick individuals and 89 deaths. Among

these outbreaks, the food involved was identified in 2,126 (33.5%), of which 51 (2.4%) were associated with the consumption of vegetables [41]. However, it is not known whether these outbreaks were connected to the consumption of conventional or organic vegetables. In addition, a study conducted by Finger et al. [42] assessed the foodborne outbreaks reported in Brazil between 2000 and 2018, based on data from the Ministry of Health and from scientific articles dealing with this topic in the country in the same period. Regarding official data, they found that 13,163 outbreaks were reported during this period, including 247,570 cases and 195 deaths. However, vegetables were not listed among the foods involved in outbreaks in their study, possibly due to their low prevalence in those outbreaks. On the other hand, based on data obtained from scientific articles, vegetables were mentioned as foods involved in outbreaks in two (3.5%) of the 57 articles analyzed.

The involvement of vegetables in foodborne outbreaks is also reported outside Brazil. According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), a total of 51 foodborne outbreaks linked to leafy greens were reported in 2014-2018 in the United States of America. Among these, five were multistate outbreaks. Most recently, in 2019–2021, the CDC investigated and warned the public about nine multistate outbreaks linked to leafy greens [43]. Interestingly, data from the FAO/WHO report entitled "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring", published in 2018, showed that the most frequently attributed sources of STEC globally were fresh produce (i.e., fruits and vegetables) (13%), followed by beef (11%) and dairy products (7%) [44]. Although the present study did not examine STEC populations, these data are relevant because they emphasize the involvement of vegetables in foodborne outbreaks.

The population (total counts) of *Enterobacteriaceae* did not differ significantly between the organic and conventional vegetable samples analyzed in the present study. Although the occurrence of *Enterobacteriaceae* is common in vegetables and part of their microbiota, some members of this bacterial family may be human pathogens. Hence, more than knowing which genera and species of *Enterobacteriaceae* compose the microbiota of vegetables, the authors wanted to find out whether the microbial profiles of vegetables are impacted by the farming system.

This study identified 494 (55.5%) of the 890 bacterial colonies isolated from conventional and organic vegetable samples using the Biotyper 3.1 database (Bruker Daltonics). This identification rate was higher than that found by Fröhling et al. [45], who identified 46% of the isolates obtained from samples of endive lettuce (*Cichorium endivia*) during different postharvest processing steps, using the SARAMIS™ database (BioMérieux Deutschland GmbH, Germany). On the other hand, it was like that found by Santos et al. [31] and lower than that found by Finger et al. [46], who were able to identify 54.1% and 81.9% of the isolates obtained from minimally processed vegetables, respectively, also using the Biotyper 3.1 database (Bruker Daltonics). The unsuccessful identification of 396 (44.5%) isolates obtained in the present study may be due to the lack of reference mass spectra for relevant microorganisms in food since this technique is mainly used for pathogen identification in the clinical area [26].

Most of the genera and species identified in this study are typical of the microbiota of vegetables. However, some genera, such as *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia* and *Serratia* (isolated from samples from both farming systems) contain species capable of causing opportunistic infections (e.g., bacteremia, meningitis, urinary tract infections and others), mainly in immunocompromised patients, being relevant in clinical settings [47, 48].

Salmonella spp. was detected in 17 (8.5%) of the 200 samples of vegetables analyzed in this study, with similar occurrence between samples from both farming systems. Consequently, these samples showed unsatisfactory microbiological safety since they do not meet the microbiological criteria of absence of this organism in 25 g, as established by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) for fresh and fresh-cut/minimally processed vegetables [49, 50].

The presence of *Salmonella* in food is unacceptable and poses health risks to consumers. This bacterium is one of the main etiological agents involved in foodborne outbreaks reported in several countries [51, 52]. The prevalence of *Salmonella* found in this study (8.5%) is within the range reported in other studies carried out in Brazil and other countries, which detected this pathogen in vegetable samples ranging from 0.4 to 23.1%. Nonetheless, most of these studies used only conventional (culture-based) methods [15, 53-57].

Although this study did not aim to evaluate the farming practices employed in conventional and organic fields, during the visits to the four farms, we could observe

that all of them cultivated vegetables in open lands and used household composts containing animal manure as fertilizer (although the conventional ones also used commercial composts). The conventional farmers (A and B) reported the use of composted chicken manure donated by neighboring properties, while the organic farmers reported the use of composts prepared/composted in their property, containing cattle (C and D) and swine manure (D), since they have these animals. It is worth highlighting that the use of inadequately composted or raw manure, among other factors (including animals in the field), can increase the microbial contamination of vegetables.

In conclusion, these results suggest that the farming system had no impact on the population of *Enterobacteriaceae* and rates of *Salmonella* in the vegetable samples analyzed. *Salmonella* was equally identified by both conventional (culture-based) and molecular (PCR-based enrichment) methods and the analysis of *Enterobacteriaceae* (total counts and identification by MALDI-TOF MS) revealed a similar microbial profile between samples from both farming systems. The data obtained highlight the need for control measures during the production of vegetables, regardless of the farming system, to reduce microbial contamination and, consequently, the risks of foodborne illnesses. These control measures must be based on Good Agricultural Practices and postharvest Good Hygiene Practices.

References

1. Angelino D, Godos J, Ghelfi F, Tieri M, Titta L, Lafranconi A, Marventano S, Alonzo E, Gambera A, Sciacca S, Buscemi S, Ray S, Galvano F, Rio DD, Grosso G (2019) Fruit and vegetable consumption and health outcomes: an umbrella review of observational studies. *Int J Food Sci Nutr* 70:652–667. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1571021>
2. Yahia EM, García-Solís P, Celis MEM (2019) Contribution of Fruits and Vegetables to Human Nutrition and Health. In: Yahia EM (ed) *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Woodhead Publishing, pp 19–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00002-6>.
3. Gomiero T (2018). Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. *Appl Soil Ecol* 123:714–728. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.014>

4. Hm R, Darma R, Asrul L, Taufik DK (2020) The potential of organic agriculture, soil structure and farmers income for inclusive agriculture sustainability: A review. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 575:012099. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/575/1/012099>
5. Hurtado-Barroso S, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós RM (2019) Organic food and the impact on human health. Crit Rev Food Sci Nutr, 59:704–714. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1394815>
6. Aiyedun SO, Onarinde BA, Swainson M, Dixon RA (2021) Foodborne outbreaks of microbial infection from fresh produce in Europe and North America: a systematic review of data from this millennium. Int J Food Sci Technol 56:2215–2223. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14884>
7. Aworh O (2020) Food safety issues in fresh produce supply chain with particular reference to sub-Saharan Africa. Food Control, 123:107737. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107737>
8. Machado-Moreira B, Richards K, Brennan F, Abram F, Burgess CM (2019) Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? Compr Rev Food Sci Food Saf, 18:1727–1750. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12487>
9. Brazilian Ministry of Health. (2022) Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA). <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-transmitidas-por-alimentos> Accessed 19 April, 2022.
10. Finger JAFF, Baroni WSGV, Maffei DF, Bastos DHM, Pinto UM (2019) Overview of foodborne disease outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. Foods 8:434. <https://doi.org/10.3390/foods8100434>.
11. Rahman SME, Mele MA, Lee Y-T, Islam MZ (2021) Consumer Preference, Quality, and Safety of Organic and Conventional Fresh Fruits, Vegetables, and Cereals. Foods 10:105. <https://doi.org/10.3390/foods10010105>
12. Winter CK, Davis SF (2006) Organic Foods. J Food Sci 71:R117–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00196.x>
13. Bohaychuk VM, Bradbury RW, Dimock R, Fehr M, Gensler GE, King RK, Rieve R, Barrios PR (2009) A Microbiological Survey of Selected Alberta-Grown Fresh Produce from Farmers' Markets in Alberta, Canada. J Food Prot 72:415–420. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.2.415>

14. Gomes Neto NJ, Lucena Pessoa RM, Barbosa Nunes Queiroga IM, Magnani, M, de Sousa Freitas FI, de Souza EL, Maciel JF (2012) Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. Food Control 28:47–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.033>
15. Khalil R, Goma M (2014) Evaluation of the Microbiological Quality of Conventional and Organic Leafy Greens at the Time of Purchase from Retail Markets in Alexandria, Egypt. Pol J Microbiol 63:237–243.
16. Maffei DF, Batalha EY, Landgraf M, Schaffner DW, Franco BDGM (2016) Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. Braz J Microbiol 47:99–105.
17. Marine SC, Pagadala S, Wang F, Pahl DM, Melendez MV, Kline WL, Oni RA, Walsh CS, Everts KL, Buchanan RL, Micallef SA, Griffiths, MW (2015) 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. Appl Environ Microbiol 81:2395–2407. <https://doi.org/10.1128/AEM.00051-15>
18. Merlini VV, Pena FDL, Da Cunha DT, de Oliveira JM, Rostagno MA, Antunes AEC (2018) Microbiological Quality of Organic and Conventional Leafy Vegetables. J Food Qual 2018:4908316. <https://doi.org/10.1155/2018/4908316>
19. Mukherjee A, Speh D, Jones AT, Buesing KM, Diez-Gonzalez F (2006) Longitudinal Microbiological Survey of Fresh Produce Grown by Farmers in the Upper Midwest. J Food Prot 69:1928–1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1928>
20. Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguera M, Gatus F, Abadias M (2010) Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. Food Microbiol 27:679–684. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.008>
21. Phillips CA, Harrison MA (2005) Comparison of the Microflora on Organically and Conventionally Grown Spring Mix from a California Processor. J Food Prot 68:1143–1146. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.6.1143>
22. Ryu J-H, Kim M, Kim E-G, Beuchat LR, Kim H (2014) Comparison of the Microbiological Quality of Environmentally Friendly and Conventionally Grown Vegetables Sold at Retail Markets in Korea. J Food Sci 79:M1739–M1744. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12531>

23. Szczech M, Kowalska B, Smolińska U, Maciorowski R, Oskiera M, Michalska A (2018) Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *Int J Food Microbiol* 286:155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018>
24. Tango CN, Choi NJ, Chung MS, Oh DH (2014) Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. *J Food Prot* 77:1411–1417. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-514>
25. Wießner S, Thiel B, Krämer J, Köpke U (2009) Hygienic quality of head lettuce: Effects of organic and mineral fertilizers. *Food Control* 20:881–886. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.009>
26. Foddai ACG, Grant IR (2020) Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:4281–4288. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10542-x>
27. Akimowicz M, Bucka-Kolendo J (2020) MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochim Pol* 67:327–332. https://doi.org/10.18388/ABP.2020_5380
28. Ashfaq MY, Da'na DA, Al-Ghouti MA (2022) Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *Environ Manage* 305:114359. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114359>
29. Ricke SC, Kim SA, Shi Z, Park SH (2018) Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. *J Appl Microbiol* 125:313-327. <https://doi.org/10.1111/jam.13888>
30. Umesha S, Manukumar HM (2018) Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:84-104. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126701>
31. Kornacki JL, Gurtler JB, Stawick B (2015) Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Salfinger Y, Tortorello ML (ed) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 5th edn. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 103-120.

32. Alves LAC, Souza RC, da Silva TMC, Watanabe A, Dias M, Mendes MA, Ciamponi AL (2016) Identification of microorganisms in biofluids of individuals with periodontitis and chronic kidney disease using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 30:1228–1232. <https://doi.org/10.1002/rcm.7555>
33. Santos TS, Campos FB, Padovani NFA, Dias M, Mendes MA, Maffei DF (2020) Assessment of the microbiological quality and safety of minimally processed vegetables sold in Piracicaba, SP - Brazil. *Lett Appl Microbiol* 71:187-194. <https://doi.org/10.1111/lam.13305>
34. International Organization for Standardization (2017) ISO 6579-1:2017 - Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp., 4th edn. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
35. Maffei DF, Moreira DA, Silva MBR, Faria DB, Saldaña E, Ishimura I, Landgraf M, Franco BDGM (2019) Assessing the relationship between organic farming practices and microbiological characteristics of organic lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.) grown in Sao Paulo, Brazil. *J Appl Microbiol* 127:237–247. <https://doi.org/10.1111/jam.14281>
36. GenBank BlastN (2021) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Accessed January 6, 2022
37. Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS (2020) Molecular characterization of antimicrobial resistance and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR as a molecular typing tool for *Salmonella* spp. isolated from poultry and humans. *Vet World*, 13:1771–1779. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1771-1779>
38. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
39. Fratamico PM (2003) Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. *Mol Cell Probes* 17:215–221. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00056-2)

40. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38:3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
41. Alegbeleye OO, Singleton I, Sant'Ana AS (2018) Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiol* 73:177–208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>
42. Sant'Anna PB, Franco BDGM, Maffei DF (2020) Microbiological safety of ready-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. *J Sci Food Agric* 100:4664–4670. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10438>
43. Centers for Disease Control and Prevention (2021) Lettuce, Other Leafy Greens, and Food Safety. <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/leafy-greens.html> Accessed December 30, 2021
44. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272871> Accessed December 30, 2021
45. Fröhling A, Rademacher A, Rumpold B, Klocke M, Schlüter O (2018) Screening of microbial communities associated with endive lettuce during postharvest processing on industrial scale. *Heliyon* 4:e00671. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00671>
46. Finger JAFF, Maffei DF, Dias M, Mendes MA, Pinto UM (2021) Microbiological quality and safety of minimally processed parsley (*Petroselinum crispum*) sold in food markets, southeastern Brazil. *J Appl Microbiol* 131:272–280. <https://doi.org/10.1111/jam.14935>
47. Baylis C, Uyttendaele M, Joosten H, Davies A (2011) The *Enterobacteriaceae* and their significance to the food industry. ILSI Europe, Brussels, Belgium. www.ils.eu Accessed December 30, 2021
48. Iwu CD, Okoh AI (2019) Preharvest Transmission Routes of Fresh Produce Associated Bacterial Pathogens with Outbreak Potentials: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 16:4407. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224407>
49. Brazilian Ministry of Health (2019) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.

50. Brazilian Ministry of Health (2019) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.
51. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Son R (2011) *Salmonella*: A foodborne pathogen. *Int Food Res J* 18:465–473.
52. Wadamori Y, Gooneratne R, Hussain MA (2017) Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *J Sci Food Agric* 97:1396–1403. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8125>
53. Arrais BR, Ferreira MRA, Silva TS, Pinto JFN, Stella AE, Dias M, Moreira CN (2020) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Salmonella* spp. in lettuce. *Res Soc Dev* 9:e281974150. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4150>
54. Ceuppens S, Hessel CT, de Quadros Rodrigues R, Bartz S, Tondo EC, Uyttendaele M (2014) Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *Int J Food Microbiol* 181:67–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025>
55. de Quadros Rodrigues R, Loiko, MR, Minéia Daniel de Paula C, Hessel CT, Jacxsens L, Uyttendaele M, Bender RJ, Tondo EC (2014) Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control* 42:152–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043>
56. Mukherjee A, Speh D, Dyck E, Diez-Gonzalez F (2004) Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J Food Prot* 67:894–900. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.894>
57. Nguz K, Shindano J, Samapundo S (2005) Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. *Food Control* 16:623–628. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.07.001>

3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO IMPACTO DA ETAPA DE LAVAGEM E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS HORTALIÇAS NO RISCO DE INFECÇÃO POR *Salmonella*

Resumo

As hortaliças frescas são suscetíveis à contaminação em toda a cadeia produtiva. Uma vez que os vegetais são frequentemente consumidos crus, o seu risco de causar doenças transmitidas por alimentos é significativamente aumentado. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico (AQRM) para estimar o risco de infecção por *Salmonella* devido ao consumo de hortaliças folhosas, com foco no impacto da etapa de lavagem (com e sem o uso de sanitizantes) e da temperatura de armazenamento das hortaliças. O modelo de AQRM foi estruturado em seis módulos: i) no campo, ii) lavagem na fazenda (após a colheita), iii) armazenamento no varejo, iv) armazenamento na residência, v) lavagem na residência (antes do consumo) e vi) consumo, dose-resposta e risco de infecção. Um total de 72 cenários foram simulados, considerando diferentes níveis iniciais do patógenos (0 e 1 log UFC/g), frações de hortaliças contaminadas (0,01; 0,1 e 1%), uso de sanitizantes e temperatura de armazenamento. Ao todo, 50.000 iterações foram executadas para cada um dos 72 cenários utilizando o software @Risk acoplado ao Excel. Dados disponíveis na literatura revelam que a lavagem de hortaliças com e sem o uso de sanitizantes pode resultar em uma redução de aproximadamente $2,3 \pm 0,3$ e $0,8 \pm 0,4$ log UFC nas contagens de *Salmonella*, respectivamente. Três diferentes distribuições triangulares foram consideradas para a temperatura de armazenamento em °C [RiskTriang(0,5,10), RiskTriang(5,15,28) e RiskTriang(15,20,28)]. Os *outputs* foram risco de infecção e número estimado de casos de salmonelose. O modelo de AQRM estimou que o número de casos de infecção aumenta à medida que a temperatura de armazenamento das hortaliças aumenta. O modelo também previu que o uso de sanitizante na água de lavagem teve maior impacto em cenários com alta prevalência de *Salmonella*, especialmente quando as hortaliças foram armazenadas sob refrigeração. Quando a prevalência foi assumida como sendo de 1%, a concentração inicial foi de 0 log UFC/g, o sanitizante foi usado no campo e na residência e o armazenamento refrigerado foi usado, o modelo previu um caso de infecção para cada 1.136 porções consumidas. Quando a temperatura ambiente foi considerada no armazenamento, e todas as outras variáveis permaneceram as mesmas, o modelo previu um caso de infecção para cada 108 porções. Se o uso de sanitizante fosse omitido, o número de porções necessárias para causar um caso de infecção cairia para 248 e 103 porções, respectivamente. Esses resultados destacam o papel crítico da temperatura de armazenamento na redução do risco microbiológico em hortaliças folhosas e a importância do uso de sanitizantes na redução do risco de salmonelose.

Palavras-chave: Avaliação quantitativa de risco microbiológico. Contaminação microbiana. Hortaliças. *Salmonella* spp.

Abstract

Fresh vegetables are susceptible to contamination throughout the production chain. As vegetables are often consumed raw, their risk of causing foodborne illnesses is significantly increased. The aim of this study was to develop a

Quantitative Microbiological Risk Assessment (QMRA) model to estimate the risk of *Salmonella* infection due to the consumption of leafy vegetables, focusing on the impact of the washing step (with and without the use of sanitizers) and the temperature of vegetable storage. The QMRA model was structured into six modules: i) in the field, ii) on-farm washing (post-harvest), iii) retail storage, iv) home storage, v) home washing (pre-consumption), and vi) consumption, dose-response, and infection risk. A total of 72 scenarios were simulated, considering different initial pathogen levels (0 and 1 log CFU/g), fractions of contaminated vegetables (0.01, 0.1, and 1%), sanitizer use, and storage temperature. In total, 50,000 iterations were executed for each of the 72 scenarios using the @Risk software integrated with Excel. Data available in the literature reveal that washing vegetables with and without the use of sanitizers can result in a reduction of approximately 2.3 ± 0.3 and 0.8 ± 0.4 log CFU in *Salmonella* counts, respectively. Three different triangular distributions were considered for storage temperature in °C [RiskTriang(0,5,10), RiskTriang(5,15,28), and RiskTriang(15,20,28)]. The outputs were infection risk and the estimated number of salmonellosis cases. The QMRA model estimated that the number of infection cases increases as the storage temperature of vegetables rises. The model also predicted that the use of sanitizer in the washing water had a greater impact on scenarios with a high prevalence of *Salmonella*, especially when vegetables were stored under refrigeration. When the prevalence was assumed to be 1%, the initial concentration was 0 log CFU/g, sanitizer was used in the field and at home, and refrigerated storage was used, the model predicted one infection case for every 1,136 portions consumed. If room temperature storage was assumed, and all other variables remained the same, the model predicted one infection case for every 108 portions. If sanitizer use were omitted, the number of portions needed to cause one infection case would drop to 248 and 103 portions, respectively. These results highlight the critical role of storage temperature in reducing microbiological risk in leafy vegetables and the importance of sanitizer use in reducing the risk of salmonellosis.

Keywords: Quantitative microbiological risk assessment. Microbial contamination. Vegetables. *Salmonella* spp.

3.1 Introdução

O consumo regular de hortaliças é incentivado por autoridades de saúde em todo o mundo, e a demanda por esses alimentos tem aumentado no Brasil e em outros países, refletindo a busca por uma alimentação saudável (ANGELINO *et al.*, 2019; OLAIMAT & HOLLEY, 2012). Por outro lado, tem crescido também o número de surtos de origem alimentar associados ao consumo de hortaliças contaminadas com microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp. A presença dessa bactéria nos alimentos representa um perigo para a saúde dos consumidores. No entanto, para estimar o risco de infecção, ou seja, o impacto à saúde devido ao consumo de hortaliças contaminadas, uma avaliação de risco microbiológico se faz necessária.

A avaliação de risco microbiológico desempenha um papel importante nesse sentido, ao proporcionar um processo estruturado para identificar perigos e estimar

os potenciais efeitos adversos para a saúde dos consumidores, associados com a exposição a esses perigos. Ela é um dos componentes de um sistema conhecido como análise de risco, que compreende: avaliação do risco (constituída pelas etapas: identificação do perigo, avaliação da exposição, caracterização do perigo e caracterização do risco), gestão do risco e comunicação do risco. Enquanto a avaliação de risco baseia-se em dados científicos, a gestão de risco é o estágio em que medidas de controle são aplicadas para reduzir o risco ao nível de segurança desejado para o consumidor. Por outro lado, a comunicação de risco é o momento em que ocorre a troca de informações sobre os riscos e os fatores associados, envolvendo assessores de risco, gestores de risco e outras partes interessadas (APPLICATION..., 1995; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1999; SANT'ANA; FRANCO, 2010).

A literatura dispõe de diversos trabalhos reportando a ocorrência de *Salmonella* em hortaliças (convencionais, orgânicas e minimamente processadas), bem como surtos relacionados ao consumo desses alimentos contaminados (CALLEJÓN *et al.*, 2015; DE GIUSTI *et al.*, 2010; ELIAS; DECOL; TONDO, 2018; HANNING, NUTT, RICKE, 2009; MARINE *et al.*, 2015; MAYSA & ABD-ELALL, 2015; TURNER *et al.*, 2019; TRUCHADO; ALLENDE, 2020). No entanto, carece de estudos focados na avaliação quantitativa de risco microbiológico.

A proposta inicial deste estudo previa o desenvolvimento de um modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico (AQRM) para estimar o risco de infecção por *Salmonella* devido ao consumo de hortaliças convencionais e orgânicas, considerando cenários com características de ambos os sistemas de cultivo. Porém, dados preliminares revelaram não haver diferença significativa entre o perfil microbiológico de hortaliças produzidas por ambos os sistemas de cultivo. Com isso, optou-se por construir um modelo de AQRM visando estimar o risco de infecção por *Salmonella* devido ao consumo de hortaliças, independente do sistema de cultivo, avaliando o impacto do uso de sanitizantes na etapa de lavagem (no campo), bem como da temperatura de armazenamento durante a etapa comercialização (varejo).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico

O modelo de AQRM construído é do tipo “cadeia produtiva”, sendo composto por seis etapas: (i) campo, (ii) lavagem no campo, após colheita, (iii) armazenamento no varejo, (iv) armazenamento na residência, (v) lavagem na residência e (vi) consumo, dose-resposta e risco de infecção. A Tabela 1 fornece uma visão geral das variáveis de simulação e distribuições usadas no modelo de AQRM, discutidas detalhadamente na seção Resultados e Discussão. A primeira coluna indica a referência da célula da planilha; a segunda coluna descreve a variável ou etapa; a terceira coluna representa o valor das células como um número, uma fórmula ou função @Risk; a quarta coluna mostra as unidades da variável e a última coluna indica a fonte das informações utilizadas para estabelecer a variável (dados inseridos pelos autores, citação da literatura ou calculada a partir de outras células da planilha).

O modelo de AQRM foi construído em planilha do Microsoft Excel e as simulações foram realizadas utilizando o software @RISK versão 8.2.2 (Palisade Company LLC, Ithaca, NY). Cinquenta mil (50,000) iterações foram executadas para cada cenário usando amostragem por Latin Hypercube com a semente de número aleatório fixada em 1 para garantir que os resultados pudessem ser diretamente comparados. A população inicial do patógeno (0 e 1 log UFC/g), a fração do produto contaminado (0,01, 0,1 e 1,0%), a temperatura de armazenamento no varejo (distribuições triangulares 0,5,10; 5,15,28; 15,20,28 °C) e o uso ou não de sanitizantes durante a etapa de lavagem foram modelados, resultando em um total 72 cenários avaliados.

Tabela 1. Visão geral das variáveis e parâmetros de simulação.

Célula	Variável	Valor	Unidade	Referência
B2	Campo			
B3	Nível de contaminação inicial	-	Log UFC/g	Input (autor)
B4	Fração contaminada	-	%	Input (autor)
B5	Fração não contaminada	=1-B4	%	Calculado
B6	Lavagem no campo			
B7	Média da redução logarítmica nas porções contaminadas após a lavagem	Com sanitizante: 2,3 Sem sanitizante: 0,8	Log UFC/g	Quadro 1
B8	DP da redução logarítmica nas porções contaminadas após a lavagem	Com sanitizante: 0,3 Sem sanitizante: 0,4	Log UFC/g	Quadro 1
B9	Redução logarítmica nas porções contaminadas após a lavagem	=RiskNormal(B7,B8)	Log UFC/g	Calculado
B10	Nível nas porções contaminadas após a lavagem	=B3-B9	Log CFU/g	Calculado
B11	Escolha de porção contaminada ou não contaminada	=RiskBinomial(1,B4)	Sem unidade	Calculado
B12	Nível escolhido	=SE(B11=0,-100,B10)	Log UFC/g	Calculado
B13	Armazenamento no varejo			
B14	Temperatura	-	°C	Input (autor)
B15	Temperatura (<15 °C)	=RiskTriang(5,10,15)	°C	Maistro <i>et al.</i> (2012)

B16	Temperatura (>15 °C)	=RiskUniform(15,28)	°C	Weather Spark (2022)
B17	Temperatura, escolha	=SE(B14<15,B15,B16)	°C	Calculado
B18	Tempo	=RiskUniform(2,5)	Dias	Input (autor)
B19	Parâmetro b do modelo de multiplicação	0,0243	Log UFC/hr/°C	Maffei <i>et al.</i> (2017)
B20	Parâmetro T0 do modelo de multiplicação	2,66	°C	Maffei <i>et al.</i> (2017)
B21	Raiz quadrada da taxa de multiplicação	=B19*(B17-B20)	sq rt(Log UFC/hr)	Calculado
B22	Taxa de multiplicação	=B21*B21	Log UFC/hr	Calculado
B23	Taxa de multiplicação abaixo da temperatura mínima corrigida	=SE(B21>0,B21*B21,0)	Log UFC/hr	Calculado
B24	Taxa de multiplicação corrigida de horas para dias	=B23*B24	Log UFC/dia	Calculado
B25	Mudança durante o armazenamento no varejo	=B24*B18	Log UFC/mudança	Calculado
B26	Nível após armazenamento no varejo	=B12+B25	Log UFC/g	Calculado
B27	Armazenamento na residência			
B28	Temperatura	=RiskTriang(0,5,10)	°C	Finger <i>et al.</i> (2022)
B29	Tempo	=RiskUniform(0,7)	Dias	Maffei <i>et al.</i> (2020)
B30	Parâmetro b do modelo de multiplicação	0,0243	Log UFC/hr/°C	Maffei <i>et al.</i> (2017)
B31	Parâmetro T0 do modelo de multiplicação	2,66	°C	Maffei <i>et al.</i> (2017)
B32	Raiz quadrada da taxa de	=B30*(B28-B31)	sq rt(Log	Calculado

	multiplicação		UFC/hr)	
B33	Taxa de multiplicação	=B32*B32	Log UFC/hr	Calculado
B34	Taxa de multiplicação abaixo da temperatura mínima corrigida	=SE(B32>0;B32*B32,0)	Log UFC/hr	Calculado
B35	Taxa de multiplicação corrigida de horas para dias	=B34*24	Log UFC/dia	Calculado
B36	Mudança durante o armazenamento doméstico	=B35*B29	Log UFC/mudança	Calculado
B37	Nível após armazenamento na residência	=B26+B36	Log UFC/g	Calculado
B38	Lavagem na residência (com desinfetantes)			
B39	Redução logarítmica nas porções contaminadas após a lavagem	=B9	Log UFC/g	Calculado
B40	Nível nas porções contaminadas após a lavagem	=B37-B39	Log UFC/g	Calculado
B41	Consumo, dose-resposta e risco de infecção			
B42	Porção	=RiskDiscrete({20,40,60,80,160,320}, {0.14,0.35,0.07,0.37,0.06,0.005})	g	Maffei <i>et al.</i> (2020)
B43	Nível do patógeno (não log)	=10^B40	UFC/g	Calculado
B44	Nível por porção	=B43*B42	UFC	Calculado
B45	Dose-resposta alfa	0,1324	Sem unidade	WHO/FAO (2002)
B46	Dose-resposta beta	51,45	Sem unidade	WHO/FAO (2002)
B47	Probabilidade de doença	=1-(1+B44/B46)^-B45	%	Calculado
B48	Exposição (número de porções por iteração)	1	Porções	Input (autor)
B49	Doenças por número de porções por iteração	=RiskBinomial(B48,B47)	Doenças	Calculado
B50	Ocorrência de doença	=SE(B49>0,1,0)	Sem unidade	Calculado
B51	População da cidade de São	12.396.372	Habitantes	IBGE

	Paulo			(2021)
B52	% da população que consome hortaliças (mensal)	97,8	%	Maffei <i>et al.</i> (2020)
B53	População de São Paulo que consome hortaliças	12.123.651,8	Habitantes	Calculado
B54	Número de casos na população exposta	=B49*B53	Casos	Calculado

3.3 Resultados e Discussão

O primeiro módulo da Tabela 1 descreve as condições no campo. Os valores referentes ao nível de contaminação inicial (0 e 1 log UFC/g) e a fração de hortaliças contaminadas com *Salmonella* (0,01, 0,1 e 1,0%) foram inseridos pelos autores, sendo baseados em estudos preliminares conduzidos por Danyluk e Schaffner (2011) e Maffei *et al.* (2017).

O segundo módulo (lavagem após a colheita) considera o efeito da etapa de lavagem na redução da contaminação microbiana (foco em *Salmonella*), com base em trabalhos publicados na literatura e sumarizados no Quadro 1. Independente do sistema de cultivo, muitas propriedades realizam uma etapa de lavagem após a colheita das hortaliças, com o objetivo de remover sujidades visíveis. Além disso, algumas (inclusive orgânicas) adicionam sanitizantes na água de lavagem nesta etapa (Maffei *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022). Portanto, o modelo de AQRM considerou cenários com e sem o uso de sanitizantes a base de cloro na água de lavagem.

Quadro 1. Redução logarítmica de *Salmonella* em hortaliças lavadas com e sem o uso de sanitizantes.

Variável	Redução (log UFC)	Sanitizante	Referência
Com sanitizantes	2,0	Dicloroisocianurato de sódio (250 ppm)	Maffei <i>et al.</i> (2016)
	2,0	Hipoclorito de sódio (200 ppm)	Pezzuto <i>et al.</i> (2016)
	2,1	Hipoclorito de sódio (50 ppm)	Stopforth <i>et al.</i> (2008)
	2,3	Hipoclorito de sódio (200 ppm)	Silveira <i>et al.</i> (2017)
	2,5	Hipoclorito de sódio (50 a 200)	Cuggino <i>et al.</i> (2020)
	2,8	Hipoclorito de sódio (50 ppm) + ácido cítrico (pH 6,5)	Stopforth <i>et al.</i> (2008)
Média±DP	2,3±0,3		
Sem sanitizantes	0,3	-	Maffei <i>et al.</i> (2016)
	0,7	-	Neal <i>et al.</i> (2012)
	1,0	-	Silveira <i>et al.</i> (2017)
	1,1	-	Stopforth <i>et al.</i> (2008)
Média±DP	0,8±0,4		

O terceiro módulo (armazenamento no varejo) representa as alterações nas populações de *Salmonella* em função da temperatura e do tempo de armazenamento no varejo. Sabe-se que a multiplicação deste patógeno é influenciada pela temperatura e que no Brasil o armazenamento de hortaliças não é padronizado em todos os locais. Ou seja, enquanto alguns estabelecimentos armazenam sob refrigeração, outros mantêm estes produtos expostos em temperatura ambiente. Portanto, o modelo de risco construído contempla cenários considerando o armazenamento de hortaliças em temperatura ambiente [RiskTriang(15,20,28)] e de refrigeração [RiskTriang(0,5,10)].

Com base nos dados do Weather Spark (2022), a temperatura média em São Paulo varia de 13 °C a 28 °C ao longo do ano, raramente ficando abaixo de 10 °C ou acima de 32 °C (na maior parte do ano é >15 °C). Portanto, para temperaturas >15 °C, assumiu-se uma distribuição uniforme (15,28). Quanto ao armazenamento sob temperaturas mais amenas (ou de refrigeração), considerando-se uma

distribuição triangular (5,10,15), com base no trabalho de Maistro *et al.* (2012), o qual avaliou a temperatura dos expositores em que as embalagens de hortaliças prontas para o consumo foram expostas à venda em um supermercado da cidade de Campinas (SP), nos quais a temperatura variou de 5 a 15 °C, com a maioria em torno de 10 °C.

Devido à carência de dados sobre o tempo de armazenamento das hortaliças no varejo, assumiu-se uma distribuição uniforme de 2 a 5 dias, com base na opinião informal de colaboradores que atuam no setor de hortifruti. A taxa de multiplicação de *Salmonella* em função da temperatura foi baseada na pesquisa publicada por Maffei *et al.* (2017). O nível de *Salmonella* no final do tempo de armazenamento e as mudanças no nível de contaminação durante o armazenamento foram determinados por cálculo, conforme consta na Tabela 2.

O quarto módulo (armazenamento na residência) representa as alterações no nível de *Salmonella*, em função da temperatura e do tempo de armazenamento nas residências. Enquanto no varejo é comum encontrar as hortaliças sendo armazenadas em temperatura ambiente, nas residências esses alimentos costumam ser armazenados sob refrigeração. Isso é o que mostra um estudo conduzido por Maffei *et al.* (2020) com consumidores de hortaliças na cidade de São Paulo. Do total 225 participantes, 217 (98,6%) relataram armazenar hortaliças na geladeira. Outro estudo, conduzido Finger *et al.* (2022), levantou dados sob a temperatura dos refrigeradores de 216 residências brasileiras. Os registros foram feitos ao longo de três dias e os autores observaram que na maioria das residências (91%) a temperatura do refrigerador variou de 0 a 10 °C. Por esse motivo, optou-se por utilizar uma distribuição triangular (0,5,10 °C) considerando esta faixa de temperatura. Quanto ao tempo que ficam armazenadas nas residências, assumiu-se uma distribuição uniforme de 0 a 7 dias.

O quinto módulo (lavagem na residência) considera o efeito da etapa de lavagem realizada nas residências, antes do consumo. Considerando que os consumidores brasileiros são estimulados a higienizar as hortaliças antes do consumo (inclusive os sanitizantes costumam ser dispostos próximo às hortaliças no varejo), optou-se por utilizar os mesmos parâmetros de redução constantes no segundo módulo da Tabela 2.

O sexto módulo refere-se aos dados de consumo, dose-resposta e risco de infecção por *Salmonella*. Dados do trabalho conduzido por Maffei *et al.* (2020), com

225 consumidores na cidade de São Paulo, foram inseridos em uma distribuição discreta para definir a porção (quantidade de hortaliças) consumida. O nível de *Salmonella* por porção foi calculado multiplicando a quantidade consumida pela concentração do patógeno na hortaliça. A dose-resposta foi estimada usando o modelo Beta-Poisson (Tabela 2, B45-46), proposto pela Organização Mundial da Saúde/Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (WHO/FAO, 2002).

Os principais *outputs* do modelo foram risco de infecção e número estimado de casos na população exposta. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. No que se refere ao uso de sanitizantes na etapa de lavagem das hortaliças, foram simulados cenários considerando o uso (ou não) no campo e nas residências, bem como o uso apenas no campo ou nas residências. Todos os cenários foram simulados considerando três condições de temperatura durante o armazenamento das hortaliças no varejo, representadas por distribuições triangulares: temperatura de refrigeração [RiskTriang (0, 5, 10°C)], ampla faixa de temperatura [RiskTriang (5, 15, 28°C)] e temperatura ambiente [RiskTriang (15, 20, 28°C)].

A Tabela 6 apresenta o número de porções necessárias para causar um caso de doença. Percebeu-se que esse número é nitidamente maior quando as hortaliças são mantidas em temperatura de refrigeração em comparação aos cenários em que as hortaliças são armazenadas em temperatura ambiente ou mesmo numa ampla faixa de temperatura. Conseqüentemente, o número de casos de infecção previstos para a população residente em São Paulo aumenta na medida em que aumenta a temperatura de armazenamento.

No que se refere ao uso de sanitizantes na água de lavagem, este apresentou impacto apenas nos cenários em que foi prevista elevada prevalência de *Salmonella*, tendo relação também com a temperatura de armazenamento no varejo. Ou seja, cenários em que as hortaliças foram mantidas sob refrigeração no varejo e submetidas a etapas de lavagem com o uso de sanitizantes (no campo e nas residências) resultam em um número maior de porções necessárias para causar um caso de doença em comparação aos cenários em que o sanitizante foi utilizado em apenas uma das etapas (campo ou residências) ou não utilizado. Isso impactou também no número de casos de infecção previstos para a população residente em São Paulo, ou seja, o número de casos previstos foi maior nos cenários sem o uso

de sanitizante. No entanto, essa diferença é inexistente nos cenários que consideram armazenamento das hortaliças em temperatura ambiente.

Tabela 6. Número de porções necessárias para causar um caso de infecção.

Sanitizante	Prevalência de <i>Salmonella</i> (%)	1		0,1		0,01	
	Nível de contaminação inicial (log UFC/g)	0	1	0	1	0	1
	Temperatura no varejo (°C)						
Campo: sim Residência: sim	RiskTriang(0,5,10)	1.136	602	12.500	7.142	-	-
	RiskTriang(5,15,28)	168	157	1.851	1.724	50.000	50.000
	RiskTriang(15,20,28)	108	106	1.136	1.111	10.000	10.000
Campo: não Residência: não	RiskTriang(0,5,10)	248	196	3.125	2.272	50.000	25.000
	RiskTriang(5,15,28)	131	125	1.428	1.315	25.000	16.666
	RiskTriang(15,20,28)	103	102	1.063	1.063	10.000	10.000
Campo: sim Residência: não	RiskTriang(0,5,10)	476	299	4.166	2.272	-	50.000
	RiskTriang(5,15,28)	158	148	1.470	1.315	16.666	16.666
	RiskTriang(15,20,28)	105	104	1.020	1.000	10.000	10.000
Campo: não Residência: sim	RiskTriang(0,5,10)	480	301	5.000	2.272	-	50.000
	RiskTriang(5,15,28)	159	148	1.515	1.315	16.666	16.666
	RiskTriang(15,20,28)	105	104	1.000	1.000	10.000	10.000

Tabela 7. Número de doenças por 50.000 porções.

		Prevalência de <i>Salmonella</i> (%)		1		0,1		0,01	
Sanitizante		Nível de contaminação inicial (log UFC/g)		0	1	0	1	0	1
		Temperatura no varejo (°C)							
Campo: sim	RiskTriang(0,5,10)	44	83	4	7	0	0		
Residência: sim	RiskTriang(5,15,28)	296	318	27	29	1	1		
	RiskTriang(15,20,28)	461	469	44	45	5	5		
Campo: não	RiskTriang(0,5,10)	201	255	16	22	1	2		
	RiskTriang(5,15,28)	381	399	35	38	2	3		
	RiskTriang(15,20,28)	482	487	47	47	5	5		
Campo: sim	RiskTriang(0,5,10)	105	167	12	22	0	1		
	RiskTriang(5,15,28)	315	336	34	38	3	3		
	RiskTriang(15,20,28)	472	479	49	50	5	5		
Campo: não	RiskTriang(0,5,10)	104	166	10	22	0	1		
	RiskTriang(5,15,28)	314	337	33	38	3	3		
	RiskTriang(15,20,28)	473	480	50	50	5	5		

Tabela 8. Número estimado de casos de infecção devido ao consumo de hortaliças contaminadas com *Salmonella* na população de São Paulo por mês.

Sanitizante	Prevalência de <i>Salmonella</i> (%)	1		0,1		0,01	
	Nível de contaminação inicial (log UFC/g)	0	1	0	1	0	1
	Temperatura no varejo (°C)						
Campo: sim	RiskTriang(0,5,10)	1.066,881	2.012,526	96.989	169.731	-	-
Residência: sim	RiskTriang(5,15,28)	7.177,202	7.710,643	654.677	703.172	24.247	24.247
	RiskTriang(15,20,28)	11.178,007	11.371,985	1.066,881	1.091,129	121.237	121.237
Campo: não	RiskTriang(0,5,10)	4.873,708	6.183,062	387.957	533.441	24.247	48.495
Residência: não	RiskTriang(5,15,28)	9.238,223	9.674,674	848.656	921.398	48.495	72.742
	RiskTriang(15,20,28)	11.687,200	11.808,437	1.139,623	1.139,623	121.237	121.237
Campo: sim	RiskTriang(0,5,10)	2.545,967	4.049,300	290.968	533.441	-	24.247
Residência: não	RiskTriang(5,15,28)	7.637,901	8.147,094	824.408	921.398	72.742	72.742
	RiskTriang(15,20,28)	11.444,727	11.614,458	1.188,118	1.212,365	121.237	121.237
Campo: não	RiskTriang(0,5,10)	2.521,720	4.025,052	242.473	533.441	-	-
Residência: sim	RiskTriang(5,15,28)	7.613,653	8.171,341	800.161	921.398	72.742	72.742
	RiskTriang(15,20,28)	11.468,975	11.638,706	1.212,365	1.212,365	121.237	121.237

3.4 Conclusões

O modelo de avaliação quantitativa de risco microbiológico desenvolvido indicou que a temperatura de armazenamento no varejo foi a variável que mais impactou no número estimado de casos de infecção por *Salmonella*. Estes dados ressaltam a importância de as hortaliças serem armazenadas sob baixas temperaturas ao longo da cadeia produtiva, a fim de retardar o desenvolvimento microbiano (em especial de patógenos, caso estejam presentes), melhorando a segurança microbiológica desses produtos, que são na maioria das vezes consumidos crus, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores. Embora o uso de sanitizantes nas etapas de lavagem contribua para a redução da carga microbiana presente nas hortaliças (e especialmente para evitar a ocorrência de contaminação cruzada), sua eficácia se torna limitada quando estas são armazenadas sob temperaturas que favorecem o desenvolvimento microbiano.

Referências

- ANGELINO D., GODOS J., GHELFI F., TIERI M., TITTA L., LAFRANCONI A., MARVENTANO S., ALONZO E., GAMBERA A., SCIACCA S., BUSCEMI S., RAY S., GALVANO F., DEL RIO D., GROSSO G. Fruit and vegetable consumption and health outcomes: an umbrella review of observational studies. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, p. 652-667, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1571021>
- APPLICATION of risk analysis to food standards issues: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization, 1995. 39p. (WHO/FNU/FOS/95.3). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/008/ae922e/ae922e00.htm>.
- CALLEJÓN, R. M.; RODRÍGUEZ-NARANJO, I.; UBEDA, C.; HORNEDO-ORTEGA, R.; GARCIA-PARRILLA, C.; TRONCOSO, A. M. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 32–38, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1821>

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment. 1999. (CAC/GL-30). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/004/y1579e/y1579e05.htm>
- CUGGINO, S. G.; BASCÓN-VILLEGAS, I.; RINCÓN, F.; PÉREZ, M. A.; POSADA-IZQUIERDO, G.; MARUGÁN, J.; CARRO, C. P.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F. Modelling the combined effect of chlorine, benzyl isothiocyanate, exposure time and cut size on the reduction of *Salmonella* in fresh-cut lettuce during washing process. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 86, p. 103346, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103346>
- DANYLUK, M. D., SCHAFFNER, D. W. Quantitative assessment of the microbial risk of leafy greens from farm to consumption: Preliminary framework, data, and risk estimates. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 74, p.700–708, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-373>
- DE GIUSTI, M., AURIGEMMA, C., MARINELLI, L., TUFI, D., DE MEDICI, D., DI PASQUALE, S., DE VITO, C., BOCCIA, A. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 109, p. 996–1006, 2010. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04727.x>
- ELIAS, S. O.; DECOL, L. T.; TONDO, E. C. Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. **Food Quality and Safety**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 173-181, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy022>
- FINGER, J. A. F. F.; SILVA, G. A.; LIMA, E. M. F.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; MAFFEI, D. F.; PINTO, U. M. Survey on food safety and hygiene practices in Brazilian households. In: International ICFMH Conference (FoodMicro), 27., 2022, Atenas. Anais [...]. Atenas: FoodMicro, 2022. p. 233-233.
- HANNING, I. B.; NUTT, J. D.; RICKE, S. C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 635–648, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0232>

- MAFFEI, D. F., MOREIRA, D. A., SILVA, M. B. R., FARIA, D. B., SALDAÑA, E., ISHIMURA, I., LANDGRAF, M., FRANCO, B. D. G. M. Assessing the relationship between organic farming practices and microbiological characteristics of organic lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.) grown in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 127, p. 237-47, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14281>
- MAFFEI, D. F.; SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Quantitative assessment of the impact of cross-contamination during the washing step of ready-to-eat leafy greens on the risk of illness caused by *Salmonella*. **Food Research International**, [s. l.], v. 92, p. 106-112, 2017. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.014>
- MAFFEI, D. F.; SANT'ANA, A. S.; MONTEIRO, G.; SCHAFFNER, D. W.; FRANCO, B. D. G. M. Assessing the effect of sodium dichloroisocyanurate concentration on transfer of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in wash water for production of minimally processed iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 444-451, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12577>
- MAFFEI, D. F.; SILVEIRA, M. A.; SILVA, M. B. R.; MOREIRA, D. A.; LOURENÇO, F. R.; SCHAFFNER, D. W.; FRANCO B. D. G. M. Consumption data and consumer handling practices of leafy greens in the city of São Paulo, Brazil: useful information for quantitative microbiological consumer phase risk assessments. **Food Protection Trends**, [s. l.] v. 40, n. 4, p. 224-231, 2020.
- 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**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 258–264, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.021>
- MARINE, S. C., PAGADALA, S., WANG, F., PAHL, D. M., 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**, [s. l.], v. 81, p. 2395–2407, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00051-15>

- MAYSA, A. I. A., & ABD-ELALL, A. M. M. Diversity and virulence associated genes of *Salmonella enterica* serovars isolated from wastewater agricultural drains, leafy green producing farms, cattle and human along their courses. **Revue de Medecine Veterinaire**, [s. l.], v. 166, p. 96–106, 2015.
- NEAL, J. A.; MARQUEZ-GONZALEZ, M.; CABRERA-DIAZ, E.; LUCIA, L. M.; O'BRYAN, C. A.; CRANDALL, P. B.; RICKE, S. C.; CASTILLO, A. comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 1123-1128, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.011>
- OLAIMAT, A. N., HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **Food Microbiology**, v. 32, p. 1-19, 2012. DOI: [10.1016/j.fm.2012.04.016](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016)
- PEZZUTO, A.; BELLUCO, S.; LOSASSO, C.; PATUZZI, I.; BORDIN, P.; PIOVESANA, A.; COMIN, D.; MIONI, R.; RICCI, A. Effectiveness of washing procedures in reducing *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on a raw leafy green vegetable (*Eruca vesicaria*). **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1663, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01663>
- SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M. Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, p. 266-276, 2010. [Review]. DOI: <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900021>
- SILVA, M. B. R., MAFFEI, D. F., MOREIRA, D. A., DIAS, M., MENDES, M. A., FRANCO, B. D. G. M. Agricultural practices in Brazilian organic farms and microbiological characteristics of samples collected along the production chain. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 132, p. 1185-1196, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15247>
- SILVEIRA, J. B.; HESSEL, C. T.; TONDO, E. C. Inactivation of *Salmonella enteritidis* on lettuces used by minimally processed vegetable industries. **Journal of Infection in Developing Countries**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 34-41, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.8224>

- STOPFORTH, J. D.; MAI, T.; KOTTAPALLI, B.; SAMADPOUR, M. Effect of acidified sodium chlorite, chlorine, and acidic electrolyzed water on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* inoculated onto leafy greens. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 625-628, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.3.625>
- TRUCHADO, P.; ALLENDE, A. La implicación de las frutas y hortalizas en las toxiinfecciones alimentarias y la relevancia del estado fisiológico de las bacterias. **Arbor**, v. 196, n. 795, p. a541, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1005>
- TURNER, K.; MOUA, C. N.; HAJMEER, M.; BARNES, A.; NEEDHAM, N. Overview of leafy greens–related food safety incidents with a California link: 1996 to 2016. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 405-414, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-316X>
- WEATHER SPARK. **Clima e condições meteorológicas médias em São Paulo no ano todo.** 2022. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/30268/Clima-característico-em-São-Paulo-Brasil-durante-o-ano>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Risk assessment of *Salmonella* in eggs and broiler chickens.** Microbiological risk assessment series (n. 2). Geneva: World Health Organization, 2002.