



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**LAIORAYNE ARAÚJO DE LIMA**

**AMOSTRAGEM DE ÁGUAS SUPERFICIAIS SOB IMPACTO  
AGROPECUÁRIO NA PARAÍBA: EFEITOS DO USO DE SUABE  
DE MOORE MODIFICADO EM TRIPLICATA SOBRE A  
FREQUÊNCIA E DIVERSIDADE DE SOROVARES DE  
*Salmonella enterica***

**AREIA**

**2024**

**LAIORAYNE ARAÚJO DE LIMA**

**AMOSTRAGEM DE ÁGUAS SUPERFICIAIS SOB IMPACTO  
AGROPECUÁRIO NA PARAÍBA: EFEITOS DO USO DE SUABE  
DE MOORE MODIFICADO EM TRIPLICATA SOBRE A  
FREQUÊNCIA E DIVERSIDADE DE SOROVARES DE  
*Salmonella enterica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**Orientador:** Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

**AREIA**

**2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L732a Lima, Laiorayne Araújo de.

Amostragem de águas superficiais sob impacto agropecuário na Paraíba: efeitos do uso de suabe de moore modificado em triplicata sobre a frequência e diversidade de sorovares de Salmonella enterica / Laiorayne Araújo de Lima. - Areia, 2024.

31 f. : il.

Orientação: Celso José Bruno de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Sistemas agroalimentares. 2. Segurança alimentar.  
3. Água de irrigação. I. Oliveira, Celso José Bruno de.  
II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636 (043.3)

LAIORAYNE ARAÚJO DE LIMA

AMOSTRAGEM DE ÁGUAS SUPERFICIAIS SOB IMPACTO  
AGROPECUÁRIO NA PARAÍBA: EFEITOS DO USO DE SUABE  
DE MOORE MODIFICADO EM TRIPLICATA SOBRE A  
FREQUÊNCIA E DIVERSIDADE DE SOROVARES DE *Salmonella*  
*enterica*

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia da  
Universidade Federal da Paraíba, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Zootecnia.

Aprovado em: 19/02/2024.

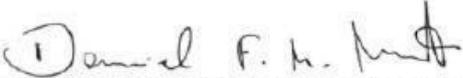
**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira  
Presidente

Universidade Federal da Paraíba

  
Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo  
Examinador

Universidade Federal de Campina Grande

  
Prof. Dr. Daniel Farias Marinho do Monte  
Examinador

Universidade Federal da Paraíba

A minha família, por todo apoio e incentivo,  
DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, meu alicerce, que nunca permitiram que eu me sentisse só. À minha mãe, Analice, minha vó, Maria Eliete, e minha bisavó Hozana (in memoriam), por todo esforço e carinho na minha criação. Ao meu marido, Alan, pela parceria e paciência.

Aos amigos que, cada um da sua forma, me ajudaram em cada passo no caminho. Em especial a Gabrielle, Geovânia e Mikaella, que não soltaram a minha mão mesmo depois de tanto tempo.

Aos colegas de trabalho, que tornaram todos os momentos melhores dentro do laboratório. Em especial a Valéria e Letícia, que não sabem o quanto foram essenciais para mim durante o mestrado.

À Juliana, técnica do LAPOA, por ser tão prestativa na resolução dos problemas. Aos professores Patrícia e Paulo, pela paciência e aprendizado proporcionado. À todos os professores do PPGZ, pela contribuição na minha formação profissional e pessoal.

Ao professor Celso, por acreditar em mim e no meu trabalho, por todas as oportunidades que me ofereceu e por todo aprendizado.

À todos que de alguma forma contribuíram com a minha caminhada até aqui.

Ao centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, e principalmente ao Laboratório de Avaliação de Produto de Origem Animal, por ser a base do meu progresso.

Agradeço ao Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho e da minha formação profissional e acadêmica.

Por fim, agradecemos ao Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN), no escopo do projeto “Cooperative Agreement to Support JIFSAN (Salmonella Water Project)”, financiado pelo Food and Drug Administration (FDA) do U.S. Department of Health and Human Services (HHS), como parte do auxílio U01FDU001418.

## RESUMO

O número crescente de estudos que relatam a ocorrência de *Salmonella enterica* em águas superficiais não recicladas garante novas investigações sobre o seu real papel como potenciais fontes de contaminação. Considerando a baixa concentração de *Salmonella* na água, o uso de suabe de Moore modificados (SMM) consolidou-se como uma técnica viável para a recuperação de *Salmonella enterica* para este tipo de amostra, possibilitando a amostragem de maiores volumes de água e reduzindo custos logísticos e problemas. Aqui relatamos os efeitos sem precedentes do uso de réplicas de SMM na recuperação e diversidade de sorovares de *Salmonella enterica*. Foram coletadas 270 amostras de água em triplicata por meio da SMM, totalizando 810 suabes. Os SMM foram cultivados utilizando procedimentos microbiológicos convencionais para isolamento de *Salmonella enterica*. Além disso, também testamos a precisão do caldo de enriquecimento-PCR como método de triagem para recuperação de *Salmonella enterica*. Além disso, os sorovares de *Salmonella enterica* de uma amostragem de 84 isolados foram determinados *in silico* após sequenciamento completo do genoma. A frequência global de *Salmonella enterica* em amostras de água foi de 77,8% (210/270), enquanto as frequências observadas em cada repetição individual foram de 63,7, 62,6 e 61,1%. O uso de triplicatas resultou em maiores ( $P < 0,05$ ) frequências de isolamento de *Salmonella enterica*. Entre as 210 amostras contendo *Salmonella enterica*, 123 (58,6%) foram positivas em todas as triplicatas. No entanto, 50 (23,8%) amostras foram positivas em duas de três repetições, enquanto 32 (17,6%) amostras foram positivas apenas em uma das três repetições. O cultivo em caldo de enriquecimento-PCR mostrou alta sensibilidade (98,37%) na detecção de *Salmonella* viável em comparação com a cultura em água convencional, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os caldos Tetracionato e Rappaport-Vassiliadis. Além disso, a utilização de triplicatas aumentou significativamente a diversidade de sorovares de *Salmonella* recuperados de cada amostra. Nossos resultados indicaram que o uso de triplicatas de 10L-SMM poderia melhorar significativamente a recuperação e diversidade de sorovares de *Salmonella enterica* em amostras de água. Contudo, outros aspectos que envolvam limitações técnicas e de custos associadas ao uso de triplicatas devem ser considerados.

**Palavras-chave:** sistemas agroalimentares; segurança alimentar; água de irrigação.

## ABSTRACT

The increasing number of studies reporting the occurrence of *Salmonella enterica* in non-recycled surface water warrants further investigations into their real role as potential sources of contamination. Considering the low concentration of *Salmonella* in water, the use of modified Moore swabs (MMS) has established itself as a viable technique for the recovery of *Salmonella enterica* for this type of sample, enabling the sampling of larger volumes of water and reducing logistical costs and problems. Here we report the unprecedented effects of the use of replicates of MMS on the recovery and diversity of *Salmonella enterica* serovars. A total of 270 water samples were collected in triplicate by MMS, totaling 810 swabs. The MMS were cultured using conventional microbiological procedures for isolation of *Salmonella enterica*. In addition, we also tested the accuracy of enrichment broth-PCR as a screening method for the recovery of *Salmonella enterica*. Furthermore, the serovars of *Salmonella enterica* from a sample of 84 isolates were determined *in silico* after whole genome sequencing. The overall frequency of *Salmonella enterica* in water samples was 77.8% (210/270), while the frequencies observed in each individual replicate were 63.7, 62.6, and 61.1%. The use of triplicates resulted in higher ( $P < 0.05$ ) frequencies of isolation of *Salmonella enterica*. Among the 210 samples containing *Salmonella enterica*, 123 (58.6%) were positive in all triplicates. However, 50 (23.8%) samples were positive in two of three replicates, while 32 (17.6%) samples were positive only in one of three replicates. Enrichment broth-PCR cultivation showed high sensitivity (98.37%) in detecting viable *Salmonella* compared with conventional water culture, although no significant differences were observed between Tetrathionate and Rappaport-Vassiliadis broths. Furthermore, the use of triplicates significantly increased the diversity of *Salmonella* serovars recovered from each sample. Our results indicated that the use of 10L-SMM triplicates could significantly improve the recovery and diversity of *Salmonella enterica* serovars in water samples. However, other aspects involving technical and cost limitations associated with the use of triplicates should be considered.

**Keywords:** agri-food systems; food safety; irrigation water.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Resumo metodológico ilustrado: coleta de Suabe modificado de Moore (1), pré- enriquecimento (2), cultivo em caldo de enriquecimento (3), plaqueamento de todos os caldos em ágar XLT-4 (4), plaqueamento de caldos com PCR positivo em ágar Hektoen enterico e ágares sulfito de bismuto (5), bioquímica em ágares LIA e TSI de colônias suspeitas, com transferência dos supostos positivos para ágar TSA (6), extração de DNA dos isolados (7) e PCR do gene *invA* (8)  
..... 18
- Figura 2 – Frequência de *Salmonella enterica* em amostras de água (n=270) coletadas por suabe de Moore modificado (SMM) em bacias hidrográficas naturais do nordeste do Brasil. O histograma mostra a frequência de amostras negativas (N) e positivas em uma (R1), duas (R2) e três (R3) réplicas  
..... 20

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos locais de coleta .....	16
Tabela 2 - Diversidade de sorovares de <i>Salmonella enterica</i> em 84 amostras positivas cujos isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo e identificação in sílico dos sorovares por meio da base de dados do <i>National Center for Biotechnology Information</i> .....	21

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1	<i>Salmonella enterica</i> E SUA PRESENÇA NA ATIVIDADE AGROPECUÁRIA .....	11
2.2	<i>Salmonella</i> EM RESERVATÓRIOS HÍDRICOS .....	13
2.3	MÉTODOS DE COLETA DE ÁGUA PARA ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> .....	15
2.4	SUABE MODIFICADO DE MOORE (SMM) .....	15
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
3.1	DESENHO DO ESTUDO .....	16
3.2	AMOSTRAS, PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS E IDENTIFICAÇÃO DE SOROVARES .....	17
3.3	ANÁLISE DE DADOS .....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Salmonella enterica* (*S. enterica*) é um patógeno de origem alimentar que impacta significativamente a saúde pública global (ROTH *et al.*, 2018). Alimentos de origem animal têm sido considerados fontes importantes de contaminação, uma vez que o trato gastrointestinal de animais de sangue quente é o habitat de uma grande diversidade de sorovares de *S. enterica* (ANDREWS-POLYMENIS *et al.*, 2010). Nos últimos anos, o número crescente de surtos de salmonelose associados ao consumo de produtos agrícolas (ALLARD *et al.*, 2019; HASSAN *et al.*, 2019; WALSH *et al.*, 2014) sugere a água de irrigação como potencial contaminante de *S. enterica* (LIU; WHITEHOUSE; LI, 2018; WALSH *et al.*, 2014), especialmente águas superficiais não tratadas, como rios, lagos, lagoas e represas (LI *et al.*, 2014; MARTÍNEZ *et al.*, 2017).

Considerando que as águas ambientais não são o habitat natural de *S. enterica*, a sua sobrevivência na água pode ser afetada por vários fatores físico-químicos (DOMINGO; HARMON; BENNETT, 2000; LIAO; SHOLLENBERGER, 2003). Portanto, *S. enterica* é geralmente encontrada em números baixos em corpos d'água (ANTAKI *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2023), representando um desafio para sua recuperação microbiológica a partir de amostras de pequeno volume de água. O volume da amostra parece ser um fator crítico que afeta a acurácia dos métodos de recuperação de *S. enterica* a partir de amostras de água (ACHEAMFOUR *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020). Por outro lado, a amostragem e o armazenamento de grandes volumes de água podem representar desafios logísticos significativos, tornando impraticável a coleta e o processamento de grandes amostras. Nesse aspecto, o uso do suabe de Moore modificado (SMM) tem ganhado atenção por permitir a amostragem de maiores volumes de água (geralmente 10 L) utilizando um aparelho de filtragem de baixo custo, que pode ser feito com materiais comuns (SBODIO *et al.*, 2013).

Apesar da crescente relevância do SMM como método padrão de amostragem de água para vigilância de *S. enterica* na água, não há informações sobre a eficácia do uso de triplicatas de SMM sobre a acurácia do método, tampouco sobre a diversidade de sorotipos. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do uso de triplicada de SMM sobre a recuperação e diversidade de sorovares de *S. enterica* em amostras de águas superficiais, além de avaliar o método de PCR de

cultura em caldo de enriquecimento como método de triagem para recuperação de *S. enterica*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Salmonella enterica* E SUA PRESENÇA NA ATIVIDADE AGROPECUÁRIA

O gênero *Salmonella* spp. pertence à família de Enterobactérias, a qual compreende bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e, em maioria, produtores de gás a partir da fermentação da glicose, exceto a espécie *Salmonella enterica* sorovar Typhi. Grande parte dos sorovares são móveis, movimentam-se por flagelos peritríquios, com exceção de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum biovars Pullorum e Gallinarum. Bactérias deste gênero podem ser encontradas em diferentes habitats, e comumente estão presentes na microbiota gastrointestinal de animais como bovino, aves domésticas, répteis e até mesmo no ser humano (ANDINO; HANNING, 2015; HANNING; NUTT; RICKE, 2009; LIU; WHITEHOUSE; LI, 2018; RUBY *et al.*, 2012).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o gênero *Salmonella* é classificado em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* acomete o homem e seus sorovares são classificados em três diferentes grupos de acordo com o tipo de hospedeiro (CDC, 2013).

No primeiro grupo, estão aqueles que não possuem hospedeiro eletivo, como *Salmonella* Enteritidis, que infectam tanto humanos como animais. Nos outros dois grupos estão aquelas que acometem somente seres humanos, como *Salmonella* Typhi, e aquelas que estão adaptadas somente aos animais, como aves (*Salmonella* Gallinarum) e bovinos (*Salmonella* Abortusovis) (CDC, 2013). *S. bongori* está mais associada a infecções em animais de sangue frio, mas pode causar também doenças em seres humanos e outros animais de sangue quente (GIAMMANCO *et al.*, 2002).

Durante o século XX, tornou-se consenso na comunidade médica e científica que a salmonelose é causada pela ingestão de água contaminada por esgotos ou

dejetos humanos e animais, bem como pelo consumo de alimentos contaminados (COSTALUNGA; TONDO, 2002; GUARD-PETTER, 2001), uma vez que esses alimentos são em sua maioria de origem animal (JAJERE, 2019). A partir desse entendimento, políticas de controle de qualidade na produção, manuseio e armazenamento de alimentos de origem animal, bem como a conscientização sobre o consumo de água tratada, foram estabelecidas como meios para a erradicação da salmonelose em humanos (MAIJALA *et al.*, 2005). Essas medidas foram responsáveis pela redução gradual do número de casos por ano ao longo do século (CDC, 2013). No entanto, no século XXI, não houve redução da incidência de salmonelose humana, atualmente estável, girando em torno de 1 milhão de casos por ano apenas nos Estados Unidos (TACK *et al.*, 2019).

Nas últimas duas décadas, vários surtos de salmonelose foram atribuídos a alimentos vegetais (LIU; WHITEHOUSE; LI, 2018; WALSH *et al.*, 2014). Isso tem alertado para a possibilidade de que as medidas de controle adotadas anteriormente não sejam suficientes para o controle da salmonelose. Além disso, levantam a necessidade de estudos que esclareçam as fontes e vias de contaminação, incluindo as águas utilizadas na irrigação e processamento de alimentos em geral.

Os surtos de salmonela relacionados ao consumo de alimentos não cárneos aumentaram rapidamente nas últimas décadas. Dados recentes indicam que 13% dos surtos de *Salmonella* nos EUA foram relacionados a alimentos não cárneos contaminados (HANNING; NUTT; RICKE, 2009). Investigações epidemiológicas indicam que a contaminação cruzada nas fábricas pode ser a causa de surtos associados a alimentos com baixa umidade (HANNING; NUTT; RICKE, 2009). *Salmonella* Typhimurium, S. Offa, S. Tennessee e S. Poona foram isoladas a partir de pasta de gergelim e sementes de gergelim que foram vendidas para consumo cru em cereais (BROCKMANN; PIECHOTOWSKI; KIMMIG, 2004).

Sabe-se que as bactérias nas superfícies das plantas podem formar biofilmes complexos, incluindo diversas espécies de bactérias (DENIS *et al.*, 2016), dificultando procedimentos de limpeza e higienização. Dessa forma, a persistência de *S. enterica* produtos vegetais, incluindo frutas, nozes e vegetais de caules de videira, poder ser fontes potenciais de contaminação. Há evidências de que surtos de salmonelose associados a frutos do mar ocorridos nos EUA foram causados por contaminação

cruzada durante o cultivo, processamento, preparação e transporte (HANNING; NUTT; RICKE, 2009; STEELE; ODUMERU, 2004).

## 2.2 *Salmonella* EM RESERVATÓRIOS HÍDRICOS

A qualidade microbiológica da água na agropecuária, independentemente da fonte, é crucial para manter produtos alimentícios seguros. As fontes de águas não residuais que normalmente não são consideradas contaminadas com resíduos ou material fecal podem desempenhar um papel importante na contaminação de produtos frescos por *Salmonella* e outras bactérias patogênicas (HANNING; NUTT; RICKE, 2009). A *Salmonella* parece possuir os mecanismos para manter a viabilidade e sobreviver com sucesso também em ambientes aquáticos. Em amostras de água do rio, *Salmonella* mostrou-se viável mesmo após 31 dias do evento de contaminação (DOMINGO; HARMON; BENNETT, 2000). Além disso, *Salmonella* pode sobreviver a tensões associadas ao microambiente de água doce em laboratório, o que aumenta a expressão de um regulador chave de genes de virulência (NUTT *et al.*, 2003).

O trato gastrointestinal de vertebrados é geralmente considerado o habitat natural de *Salmonella*, e as bactérias liberadas pelas fezes podem ser transportadas para os sistemas aquáticos por descargas de esgoto, eventos de chuva ou escoamentos superficiais associados (SHA; FORSTNER; HAHN, 2013). A sobrevivência de *Salmonella* em fontes hídricas aparentemente vai além de um achado acidental ou apenas indício de contaminação fecal. Na verdade, esse pode ser um dos maiores reservatórios que abriga bactérias viáveis. BAUDART *et al.* (2000) realizaram experimentos que demonstravam a presença de *S. Typhimurium* em águas de rios e nos sedimentos marinhos, indicando que a presença dessa espécie nos sedimentos marinhos próximos à vazão do rio que sustentava a capacidade de *Salmonella* sobreviver a longo prazo em um ambiente natural.

*S. enterica* pode sobreviver em um ambiente com uma ampla faixa de pH (4,05-9,5) e se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura (7-48°C) (FATICA; SCHNEIDER, 2011). Em um ambiente fechado à temperatura ambiente (25 ° C), foi demonstrado que a *Salmonella* pode sobreviver por até 5 anos em água estéril ou em

uma solução tamponada com fosfato (SHA; FORSTNER; HAHN, 2013). Em um estudo de POLO et al. (1998), foi observada maior contaminação por *S. enterica* em amostras de água de rios em comparação com outras fontes de água, como praias e reservas de água doce.

O ambiente ecológico das águas de irrigação, como rios ou lagos, pode ser bastante complexo e dinâmico. A sobrevivência e a persistência de *S. enterica* na água pode depender de vários fatores ambientais, como temperatura, pH, sal, concentração de oxigênio dissolvido, disponibilidade de nutrientes, interação com outros microrganismos e exposição à radiação ultravioleta (UV) (STEELE; ODUMERU, 2004; WANJUGI; HARWOOD, 2013; WILKES *et al.*, 2011). Como resultado, a viabilidade de *S. enterica* pode diminuir na água ao longo do tempo e poderá sobreviver geralmente menos de 30 dias (STEELE; ODUMERU, 2004).

Muitos estudos mostram agora que os biofilmes podem facilitar a sobrevivência de *Salmonella* na água. Adicionalmente, invertebrados, como protozoários de vida livre e vários animais vertebrados, podem servir como reservatórios para *Salmonella* e outras bactérias patogênicas (LIU; WHITEHOUSE; LI, 2018). Isso suscita uma grande preocupação, uma vez que atualmente muitos rios são amplamente utilizados como fontes de irrigação para frutas e legumes.

Além do prolongamento da viabilidade e sobrevivência de *Salmonella* no ambiente aquático, LI *et al.* (2015) também sugeriram que a detecção frequente de *Salmonella* na água de irrigação pode ser devida a inúmeros eventos de reintrodução associados a vários hospedeiros diferentes no ambiente. Isso foi apoiado pela análise de microarranjos genômicos em isolados de *Salmonella* Newport (LI *et al.*, 2015). Por um lado, os produtos que crescem no campo podem ser diretamente contaminados por *Salmonella* excretada de hospedeiros ambientais próximos, como suínos, frangos, bovinos, humanos, outras vidas silvestres ou adubos inadequadamente compostos aplicados nos campos (ANDINO; HANNING, 2015; BRANDL; COX; TEPLITSKI, 2013; LI *et al.*, 2015). Por outro lado, essas bactérias também podem ser introduzidas repetidamente nas lagoas de irrigação por meio de eventos de tempestades e chuvas, sobreviver na água e alcançar produtos frescos através da irrigação, e circular de volta para humanos e outros animais (LI *et al.*, 2015).

## 2.3 MÉTODOS DE COLETA DE ÁGUA PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella*

Dentre os principais métodos de análise de água para presença de *Salmonella*, realiza-se a coleta de um volume de água variável, em geral menos de 500 ml (ROCHA *et al.*, 2022), a qual é filtrada por uma membrana em laboratório, e transferida para meio de cultura (ABULREESH, 2012).

Considerando que a água não é o ambiente natural de *S. enterica*, o uso de volumes pequenos de água pode comprometer a eficácia de isolamento da bactéria (SHARMA *et al.*, 2020). Por isso, outros métodos que permitem a coleta de maior volume de água podem ser alternativas viáveis, tais como emprego de filtração *in situ* utilizando suabe modificado de Moore ou ultrafiltração, possibilitando a coleta de volumes de dezenas ou mesmo centenas de litros de água. Outros tipos de filtração também podem ser utilizados, como filtração de fluxo tangencial e filtração de fluxo normal (MCEGAN *et al.*, 2013).

## 2.4 SUABE MODIFICADO DE MOORE (SMM)

O “Suabe de Moore” consiste numa gaze amarrada em um barbante, e foi originalmente proposto pela primeira vez por Brendam Moore em 1948 para a identificação de *Salmonella* em água. Ao longo dos anos o método tem sido amplamente utilizado para isolamento de uma grande diversidade de patógenos (SBODIO *et al.*, 2013).

Em 2011, o suabe foi aprimorado através do desenvolvimento de um dispositivo de filtração nomeado suabe modificado de Moore (SMM), o qual consiste em um cassete produzido por tubos e conexões de baixo custo e um elemento filtrante, como pano de queijo ou gaze estéreis (BISHA *et al.*, 2011). Através de uma bomba peristáltica, o SMM é utilizado a campo para filtração de volumes grandes de água, normalmente 10L, permitindo que o elemento filtrante seja utilizado para isolamento de *Salmonella* ou mesmo outras bactérias em águas superficiais.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional que consistiu na amostragem de águas superficiais das principais bacias hidrográficas do Estado da Paraíba, para determinação da frequência de *S. enterica*. As informações sobre as bacias hidrográficas (n=10) estão apresentadas na Tabela 1. O tamanho mínimo da amostra (n=246) foi calculado com base em uma frequência esperada de *Salmonella enterica* de 20% (ROCHA et al., 2022), nível de confiança de 50% e erro de 5% (Thrusfield, 2018). Foram coletadas 270 amostras distribuídas entre 10 reservatórios e seus respectivos rios, sendo selecionados dois ou três pontos de coleta de cada um deles, de acordo com a facilidade de acesso à margem da água. Foram realizadas três repetições individuais (R1, R2 e R3) em cada amostragem, totalizando 810 amostras de água.

Tabela 1 – Caracterização dos locais de coleta.

ID	Açude associado	Bacia Hidrográfica	Local	Coordenadas	Capacidade (m <sup>3</sup> )
1	Saulo Maia	Mamanguape	Areia/PB	6°55'49.4"S 35°40'49.0"W	9.833.615
2	Araçagi	Mamanguape	Araçagi/PB	6°51'16"S 35°18'03"W	63.289.037
3	Jandaia	Curimataú	Bananeiras/PB	6°39'31.6"S 35°40'37.0"W	10.032.266
4	Epitácio Pessoa	Paraíba	Boqueirão/PB	7°29'38.8"S 36°08'47.6"W	466.525.964
5	Acauã	Paraíba	Itatuba/PB	7°26'11"S 35°33'54"W	253.000.000
6	São Gonçalo	Piranhas	Sousa/PB	6°50'51"S 38°18'33"W	40.582.277
7	Coremas	Piancó	Coremas/PB	7°01'27"S 37°57'10"W	744.144.694
8	Mãe D'água	Piancó	Coremas/PB	7°01'17.7"S 37°59'03.8"W	545.017.499
9	Condado	Piranhas	Condado/PB	6°54'29.0"S 37°35'10.9"W	36.834.375

10	Engenheiro Ávidos	Piranhas	Cajazeiras/PB	6°59'12"S 38°27'17"W	293.617.376
----	----------------------	----------	---------------	-------------------------	-------------

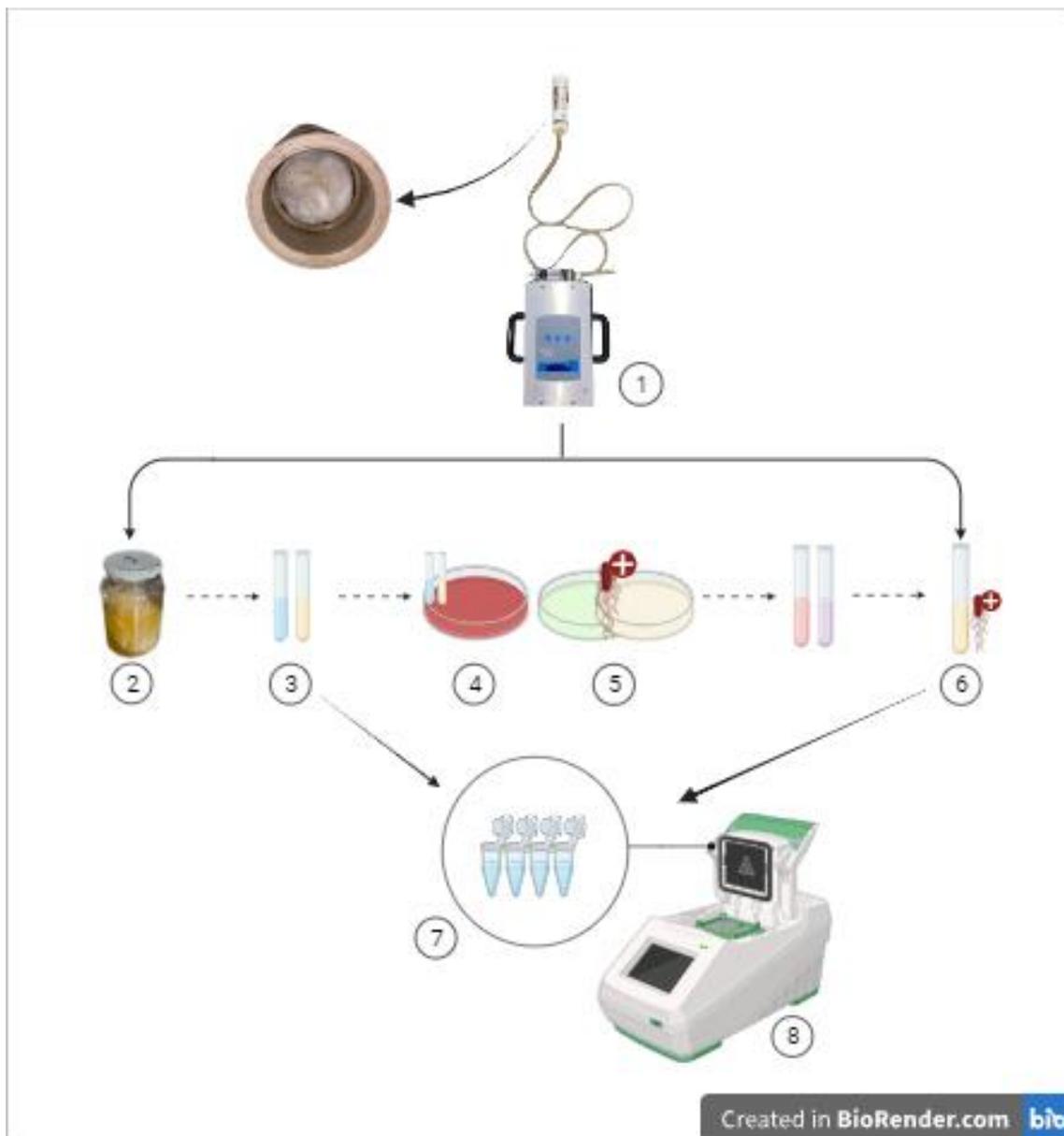
Fonte: AESA, 2024.

### 3.2 AMOSTRAS, PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS E IDENTIFICAÇÃO DE SOROVARES

Em cada local de amostragem, três repetições independentes foram obtidas utilizando uma filtragem de 10L de água por SMM. O isolamento microbiológico foi realizado segundo ANDREWS *et al.* (2023). Após filtragem, os filtros de gaze do SMM foram embebidos em água peptonada tamponada modificada (1:10) e mantidos refrigerados durante o transporte do local de amostragem até o laboratório, onde foram incubados por 18 a 20 horas a 37°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). De cada amostra, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi transferida para 9,9 mL de rappaport-vassiliadis (RV) e uma alíquota de 1 mL para 9 mL de tetracionato (TT). Após incubação a  $42,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas, uma alça de cada caldo foi semeada em placas de ágar XLT-4. Paralelamente, alíquotas dos caldos RV e TT enriquecidos foram submetidas à extração de DNA (FRESCHI *et al.*, 2005) para ensaio de PCR (caPCR). As reações de PCR foram realizadas em um volume de master mix final de 25  $\mu\text{L}$  contendo os iniciadores F: 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' e R: 3' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 5') específicos para o gene *invA* de *Salmonella enterica*. A eletroforese foi realizada no equipamento Mini-Sub Cell GT Horizontal Electrophoresis System (BIO-RAD, CA, EUA) ajustado para 80V constantemente e máximo de 400mA.

Amostras de caldo positivas para *S. enterica* por PCR foram posteriormente semeadas em ágar Hektoen enterico e ágar sulfito de bismuto. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 24 horas. De cada placa, até três colônias presumíveis de *Salmonella* foram posteriormente triadas por testes bioquímicos usando ágar lisina ferro (LIA) e triplo açúcar ferro (TSI) incubados a  $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante a noite. Os isolados apresentando características morfológicas típicas de *S. enterica* foram transferidos para ágar tríptico de soja (TSA) e confirmados por PCR (isPCR) utilizando os mesmos iniciadores e condições de ciclagem térmica aplicadas aos caldos de enriquecimento. Suabes apresentando pelo menos uma cepa positiva na isPCR foram considerados positivos.

Figura 1 – Resumo metodológico ilustrado: coleta de Suabe modificado de Moore (1), pré- enriquecimento (2), cultivo em caldo de enriquecimento (3), plaqueamento de todos os caldos em ágar XLT-4 (4), plaqueamento de caldos com PCR positivo em ágar Hektoen enterico e ágar sulfito de bismuto (5), bioquímica em ágar LIA e TSI de colônias suspeitas, com transferência dos supostos positivos para ágar TSA (6), extração de DNA dos isolados (7) e PCR do gene *invA* (8).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Três isolados de cada réplica de 84 amostras positivas, foram submetidos ao sequenciamento completo do genoma no âmbito da iniciativa Genome Trakr (1006745). O sorovar foi determinado pelo sistema de montagem genômica do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), com sede em Bethesda, Maryland, EUA.

### 3.3 ANÁLISE DE DADOS

Testes de independência do qui-quadrado foram utilizados para investigar o efeito do uso de triplicatas sobre a frequência de *S. enterica*, assim como possíveis diferenças entre os caldos de enriquecimento RV e TT na recuperação de *Salmonella* das amostras. O coeficiente kappa de Fleiss foi utilizado para avaliar a concordância entre as repetições amostrais (R1, R2 e R3) sobre o status de *Salmonella* para cada amostra. O teste Kappa de Cohen foi utilizado para medir o nível de concordância entre os dois caldos (RV e TT) utilizados no teste de PCR de cultivo de enriquecimento de caldo. A interpretação dos resultados de concordância com base nos valores kappa foi realizada seguindo MCHUGH (2012). Todos os testes estatísticos foram realizados no RStudio utilizando o pacote "pacman" para o Coeficiente Kappa, enquanto o pacote "quiqua1" foi utilizado para o qui-quadrado de independência, utilizando o V de Cramer para calcular o tamanho do efeito. A representação visual dos resíduos ajustados gerados utiliza a função 'corrplot'.

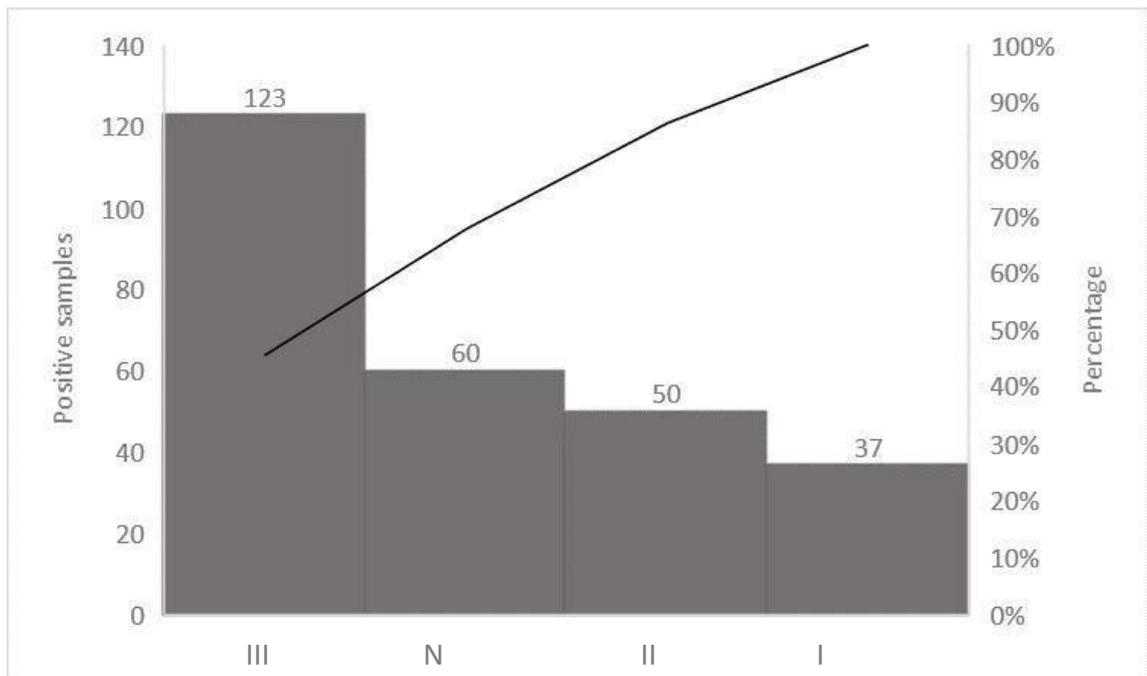
A sensibilidade, especificidade e precisão do cultivo de enriquecimento-PCR para detecção de *S. enterica* em amostras de água foram determinadas usando o cultivo microbiano como padrão ouro.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*S. enterica* foi recuperada de pelo menos uma das três réplicas em 210 amostras (77,8%), enquanto sua frequência em termos de número total de suabes foi de 506/810 (62,5%). Embora a detecção de *S. enterica* tenha sido semelhante nas réplicas de amostragem (R), ou seja, R1 = 63,7% (172/270), R2 = 62,6% (165/270) e R3 = 61,1% (162/270), o uso de triplicatas resultou em maior ( $P < 0,05$ ) frequência de

recuperação de *S. enterica*. Conforme mostrado na Figura 2, apenas 58,6% (123/210) de todas as amostras positivas resultaram da recuperação de *S. enterica* em todas as três repetições, enquanto 23,8% (50/210) e 17,6% (32/210) amostras foram positivas para *S. enterica* em duas ou uma réplica, respectivamente. Embora tenhamos observado uma frequência semelhante de *S. enterica* entre as três repetições, apenas uma concordância moderada (67,8% de concordância; valor Kappa = 0,542) foi observada entre as réplicas. Portanto, o uso de triplicatas de 10L de filtrado em SMM resultou em maior frequência de recuperação de *S. enterica* em comparação com a amostragem sem réplicas.

Figura 2 - Frequência de *Salmonella enterica* em amostras de água (n=270) coletadas por suabe de Moore modificado (SMM) em bacias hidrográficas naturais do Nordeste do Brasil. O histograma mostra a frequência de amostras negativas (N) e positivas em uma (I), duas (II) e três (III) réplicas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Embora a água não seja o habitat natural de *S. enterica*, vários estudos relataram uma elevada ocorrência e longa persistência de *S. enterica* em ambientes aquáticos (ROCHA *et al.*, 2022). A importância crescente da água como fonte suposta de contaminação por *S. enterica* em produtos agrícolas por meio de sistemas de irrigação reforça a necessidade de métodos precisos para detecção de *S. enterica*,

uma vez que subestimar os níveis de contaminação por *S. enterica* pode representar um viés crítico tanto na vigilância epidemiológica quanto em programas de gerenciamento de qualidade de alimentos.

Entre as 235 amostras positivas na caPCR após enriquecimento em caldos RV ou TT, *S. enterica* não foi recuperada em 18 (2,11%). Isto pode estar relacionado com a capacidade da PCR em detectar organismos não viáveis. Por outro lado, *S. enterica* foi cultivada a partir de três amostras que apresentaram resultados negativos no teste de enriquecimento-PCR, o que poderia ser atribuído a supostos inibidores de PCR no modelo de DNA. A precisão global do método de caPCR foi de 42,09% (98,37% de sensibilidade; 5,63% de especificidade) em comparação com o método microbiológico convencional. Estes resultados sugerem que o caldo de enriquecimento-PCR poder ser utilizado como uma alternativa de triagem para amostras positivas a serem confirmadas por cultivo, reduzindo custos associados aos meios. Não observamos diferenças significativas entre o uso dos caldos Rappaport-Vassiliadis (0,89) e Tetracionato (0,87) como modelo de DNA para PCR em relação à recuperação de frequência de *S. enterica*, em consonância com achados anteriores (HUGHES *et al.*, 2003; PAL; MARSHALL, 2009). Por outro lado, KUMAR (2010) relatou uma recuperação significativamente maior de *S. enterica* usando RV em comparação com TT. Em nosso estudo, foi observada concordância de 91,7% entre os resultados do VR e do TT, considerada moderada (valor Kappa = 0,607).

A Tabela 2 mostra a diversidade de sorovares de *S. enterica* em 84 amostras positivas, das quais os isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo e identificação *in silico* dos sorovares por meio do NCBI. Curiosamente, foram observadas diferenças significativas no perfil sorovar entre triplicatas na mesma amostra. Considerando as amostras com recuperação de *S. enterica* em duas ou três repetições (n=69), apenas 19 (27,5%) delas apresentaram perfil sorovar idêntico nessas repetições.

Tabela 2 - Diversidade de sorovares de *Salmonella enterica* em 84 amostras positivas cujos isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo e identificação *in silico* dos sorovares por meio da base de dados do *National Center for Biotechnology Information*.

Sample ID	R1	R2	R3	R1 serovar profiling	R2 serovar profiling	R3 serovar profiling
C152	0	0	1	-	-	Infantis
C162	1	1	1	Rubislaw; Infantis	Saintpaul	Saintpaul
C171	1	1	1	Newport	Saintpaul	Javiana
C172	1	1	1	Schwarzengrund	Urbana	Rubislaw
C181	1	1	1	Muenster	Muenster	Michigan
C182	1	1	1	Corvallis; I 4:b:-	Muenchen; Molade or Wippra; Kiambu	Rubislaw; Ohio; Infantis; I 4:b:-
C191	1	1	1	I 18:d:-	I 18:d:-	I 18:d:-
C192	1	1	1	I 7:k:-	Javiana; Anatum	Carrau; Saintpaul
C193	1	1	1	Carrau	Saintpaul	Rubislaw
C222	1	1	1	Corvallis	Corvallis; Agona; San Diego	Carrau; Rubislaw; Hadar; Infantis
C223	1	1	1	Mbandaka	Infantis	San Diego
C231	1	1	1	Gaminara	Muenchen	Muenchen; Javiana
C232	1	1	1	I 16:e,h:e,n,z15	I 16:e,h:e,n,z15	Schwarzengrund; I 16:e,h:e,n,z15
C252	0	1	0	-	Gaminara	-
C261	1	1	1	Corvallis	Anatum	Panama
C262	1	1	1	Schwarzengrund	Schwarzengrund	Schwarzengrund
C264	1	1	1	Muenchen; Infantis; Javiana	Rubislaw; Javiana; Muenchen; Infantis	Rubislaw; Javiana; Infantis
C364	1	1	1	Infantis	Infantis; Urbana	Rubislaw
C372	1	1	0	Muenchen	Muenchen	-
C381	1	0	0	Muenchen	-	-

C391	1	1	0	I 4:-:1,5	I 4:-:1,5	-
C3103	1	1	1	Othmarschen; Newport	Othmarschen	Othmarschen; Saintpaul
C411	1	1	1	Corvallis	Corvallis	Infantis
C413	1	1	1	Muenchen; Corvallis	Muenchen	IV 6,7:z4,z24:-
C422	1	1	1	Corvallis	Infantis; I 7:l,v:-	Corvallis
C431	1	1	1	Rubislaw; I 7:l,v:-	Saintpaul; I 4:b:-	Carrau; Sandiego; I 7:l,v:-
C432	1	1	1	I 16:r:e,n,z15	Carrau; Saintpaul	I 16:r:e,n,z15
C441	1	1	1	Hadar	Hadar	Hadar
C442	1	1	1	Rubislaw	Rubislaw	Rubislaw
C453	1	1	1	Saintpaul	Saintpaul	Saintpaul
C461	1	1	1	Newport	Newport	Newport
C462	0	1	0		Businga	-
C481	1	1	1	Poona	Saintpaul	Newport
C482	1	1	1	Rubislaw	Saintpaul; Newport	Javiana; Newport
C4101	1	1	1	Carrau	Urbana	Newport
C4103	1	1	1	Javiana	Javiana; Infantis	Infantis
C512	1	1	1	Newport	Newport	Newport
C513	1	1	1	Newport	Newport; Panama	Hadar
C522	1	1	1	Infantis	Corvallis; Hadar	Newport; Mbandaka; Hadar
C523	0	1	0	-	I 7:l,v:-	-
C532	1	1	0	Saintpaul; Braenderup	Saintpaul	Rubislaw
C551	0	1	0		Infantis	
C552	1	1	1	Saintpaul	Saintpaul	Saintpaul

C561	1	1	1	Newport; Rubislaw	Newport; Rubislaw	Newport; Rubislaw
C582	1	1	1	Newport	Newport	Newport
C593	1	0	1	Newport		Rubislaw
C621	1	0	0	Sandiego; Braenderup	-	-
C622	1	1	1	Braenderup; Hadar	Braenderup; Hadar; II 42:r:-	Braenderup; Hadar
C623	1	0	1	I 7:l,v:-		Braenderup
C652	1	1	0	Gaminara	Gaminara	
C664	0	1	1	-	Urbana	Urbana; Braenderup
C671	0	1	0	-	Poona	-
C6103	1	1	1	Infantis	Infantis	Infantis
C722	1	1	1	Rubislaw; Meleagridis; Corvallis	Saintpaul; Rubislaw	-
C751	0	1	0	-	Carrau	-
C762	0	1	0	-	Saintpaul	-
C7102	0	1	0	-	Saintpaul	-
C7103	0	1	1	-	Saintpaul; Rubislaw	Saintpaul; Rubislaw
PC23	1	0	0	Rubislaw; IV 43:z4,z23:-	-	-
1C21	1	1	0	Newport	Carrau	-
1C51	1	0	0	Braenderup	-	-
1C53	0	1	0	-	Carrau	-
1C64	1	1	1	Rubislaw; Adelaide	Newport; Rubislaw	Newport
1C71	1	0	0	Rubislaw; Carrau	-	-
1C101	1	1	1	Oran	Oran; Poona	Oran
1C102	1	1	1	Oran	Oran	Oran

2C22	1	1	1	Javiana; Corvallis; Cerro	Corvallis; Cerro;	Javiana; Cerro
2C23	1	1	1	Rubislaw	Carrau	Lomita; Rubislaw; I 7:- :1,5
2C51	1	1	0	Braenderup	Rubislaw	-
2C53	1	1	0	Saintpaul	IV 45:g,z51:-; IV 6,7:z4,z24:-	-
2C61	1	1	1	Saintpaul	Rubislaw; Muenchen	Poona; Saintpaul
2C62	1	1	1	Poona	Muenchen	Schwarzengrund; Poona
2C64	1	1	1	Infantis	Infantis; IV 43:z4,z23:-	Infantis; IV 43:z4,z23:-
2C72	0	1	1	-	Saintpaul; Corvallis	Saintpaul
2C102	1	1	1	Oran	Oran	Oran
2C103	1	1	1	Oran	Oran	Oran
3C21	1	1	1	Newport	Rubislaw; Saintpaul; Albany or Duesseldorf	Rubislaw
3C22	1	1	1	Corvallis; Agona; Albany or Duesseldorf	Albany or Duesseldorf	Agona
3C23	1	1	1	Agona; I 3,10:d:-	Albany or Duesseldorf	Minnesota
3C51	1	1	1	Anatum	Carrau	Carrau
3C52	1	1	1	Saintpaul; Gaminara; I 7:- :1,5	Saintpaul; I 7:- :1,5	I 7:-:1,5
3C62	0	0	1	-	-	Oran
3C64	1	1	1	Rubislaw; Poona	Rubislaw	Poona
3C102	1	1	1	Oran	Oran	Oran

Um fator chave associado ao uso crescente do SMM é a capacidade de amostragem de um maior volume de água (geralmente amostras de 10L) em comparação com métodos convencionais que utilizam volumes de amostra menores (SBODIO *et al.*, 2013). Embora os métodos de ultrafiltração possam melhorar a precisão da detecção de *S. enterica*, a abordagem SMM tornou-se um método de referência para o isolamento de *S. enterica* em amostras de água, considerando os baixos custos de amostragem, a viabilidade em aplicações de campo e a alta precisão (SHARMA *et al.*, 2020).

A decisão de filtrar volumes de água superiores a 10L usando um único SMM em vez de réplicas de amostras verdadeiras por ponto de amostragem deve abranger aspectos técnicos, como entupimento do material filtrante, geralmente gaze estéril de alta qualidade. É possível que o uso de triplicatas (3 x 10L) possa levar a uma precisão maior do que o uso de uma amostra de 30L. No entanto, os fatores econômicos e práticos associados à utilização de triplicados também devem ser considerados. Do nosso ponto de vista, a amostragem triplicada torna os estudos significativamente mais trabalhosos devido ao aumento do trabalho de campo e laboratório, além de uma logística mais complexa e aumento dos custos de processamento. Portanto, o uso de triplicatas em amostragens de SMM deve ser considerado caso a caso.

#### **4 CONCLUSÃO**

A utilização de duplicatas ou triplicatas do Suabe de Moore Modificado pode melhorar significativamente não só a frequência de recuperação, mas também a diversidade sorovares de *Salmonella* que contamina águas superficiais naturais. Isto deve ser considerado juntamente com outros fatores, tais como o aumento dos custos e da carga de trabalho para estabelecer o projeto mais apropriado para a vigilância de *S. enterica* na água. Em adição, o caldo de enriquecimento-PCR poder ser utilizado como uma alternativa de triagem para amostras positivas de *Salmonella* a serem confirmadas por cultivo.

## REFERÊNCIAS

- ABULREESH, H. H. **Salmonellae in the Environment**. Em: *Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. [s.l.] InTech, 2012. p. 765–785.
- ACHEAMFOUR, C. L.; PARVEEN, S.; HASHEM, F.; SHARMA, M.; GERDES, M. E.; MAY, E. B.; ROGERS, K.; HAYMAKER, J.; DUNCAN, R.; FOUST, D.; TAABODI, M.; HANDY, E. T.; EAST, C.; BRADSHAW, R.; KIM, S.; MICALLEF, S. A.; CALLAHAN, M. T.; ALLARD, S.; ANDERSON-COUGHILIN, B.; CRAIGHEAD, S.; GARTLEY, S.; VANORE, A.; KNIEL, K. E.; SOLAIMAN, S.; BUI, A.; MURRAY, R.; CRADDOCK, H. A.; KULKARNI, P.; ROSENBERG GOLDSTEIN, R. E.; SAPKOTA, A. R. Levels of **Salmonella enterica** and **Listeria monocytogenes** in Alternative Irrigation Water Vary Based on Water Source on the Eastern Shore of Maryland. *Microbiology Spectrum*, v. 9, n. 2, 31 out. 2021. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/Spectrum.00669-21>>.
- AESA, A. E. de G. das Á. **Monitoramento-AESA**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.aesa.pb.gov.br/aesa-website/monitoramento/>>. Acesso em: 6 jan. 2024.
- ALLARD, S. M.; CALLAHAN, M. T.; BUI, A.; FERELLI, A. M. C.; CHOPYK, J.; CHATTOPADHYAY, S.; MONGODIN, E. F.; MICALLEF, S. A.; SAPKOTA, A. R. **Creek to Table: Tracking Fecal Indicator Bacteria, Bacterial Pathogens, and Total Bacterial Communities from Irrigation Water to Kale and Radish Crops**. *The Science of the total environment*, v. 666, p. 461–471, 20 maio 2019. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L627293663>>.
- ANDINO, A.; HANNING, I. **Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars**. *Scientific World Journal*, v. 2015, n. Table 3, 2015.
- ANDREWS-POLYMENIS, H. L.; BÄUMLER, A. J.; MCCORMICK, B. A.; FANG, F. C. **Taming the elephant: Salmonella biology, pathogenesis, and prevention**. *Infection and Immunity*. jun. 2010.
- ANTAKI, E. M.; VELLIDIS, G.; HARRIS, C.; AMINABADI, P.; LEVY, K.; JAY-RUSSELL, M. T. **Low concentration of Salmonella enterica and generic Escherichia coli in farm ponds and irrigation distribution systems used for mixed produce production in Southern Georgia**. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 13, n. 10, p. 551–558, 1 out. 2016.
- BAUDART, J.; GRABULOS, J.; BARUSSEAU, J. -P.; LEBARON, P. **Salmonella spp. And Fecal Coliform Loads in Coastal Waters from a Point vs. Nonpoint Source of Pollution**. *Journal of Environmental Quality*, v. 29, n. 1, p. 241–250, 2000.

BISHA, B.; PEREZ-MENDEZ, A.; DANYLUK, M. D.; GOODRIDGE, L. D. **Evaluation of Modified Moore suabes and continuous flow centrifugation for concentration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 from large volumes of water.** Journal of Food Protection, v.74, n. 11, p. 1934–1937, 2011.

BRANDL, M. T.; COX, C. E.; TEPLITSKI, M. ***Salmonella* interactions with plants and their associated microbiota.** Phytopathology, v. 103, n. 4, p. 316–325, 2013.

BROCKMANN, S. O.; PIECHOTOWSKI, I.; KIMMIG, P. ***Salmonella* in Sesame Seed Products.** Journal of Food Protection, v. 67, n. 1, p. 178–180, 2004.

CDC. **An atlas of *Salmonella* in the United States, 1968-2011.** National Center for Emerging Zoonotic Infectious Diseases. Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases, v. 1, n. 1, p. 1–248, 2013.

Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/salmonella/>>.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. **Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 33, n. 4, p. 342–346, dez. 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822002000400013&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000400013&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

DENIS, N.; ZHANG, H.; LEROUX, A.; TRUDEL, R.; BIETLOT, H. **Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada.** Food Control, v. 67, p. 225–234, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.047>>.

DOMINGO, J. W. S.; HARMON, S.; BENNETT, J. **Survival of *Salmonella* species in riverwater.** Current Microbiology, v. 40, n. 6, p. 409–417, 2000.

FATICA, M. K.; SCHNEIDER, K. R. ***Salmonella* and produce: Survival in the plant environment and implications in food safety.** Virulence, v. 2, n. 6, p. 573–579, 2011.

FRESCHI, C. R., CARVALHO, L. F. D. O., & OLIVEIRA, C. J. B. **Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR).** Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, p. 363–367, 2005.

GIAMMANCO, G. M.; PIGNATO, S.; MAMMINA, C.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; NASTASI, A.; GIAMMANCO, G. **Persistent endemicity of *salmonella bongori* 48:z35:-In southern Italy: Molecular characterization of human, animal, and environmental isolates.** Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 9, p. 3502–3505, 2002.

GUARD-PETTER, J. **The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*.** Environmental Microbiology, v. 3, n. 7, p. 421–430, jul. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2001.00213.x>>.

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, v. 6, n. 6, p. 635–648, 2009.

HASSAN, R.; WHITNEY, B.; WILLIAMS, D. L.; HOLLOMAN, K.; GRADY, D.; THOMAS, D.; OMOREGIE, E.; LAMBA, K.; LEEPER, M.; GIERALTOWSKI, L. **Multistate outbreaks of *Salmonella* infections linked to imported Maradol papayas - United States, December 2016-September 2017.** Epidemiology and Infection, v. 147, n. December 2016, p. e265, 2019.

HUGHES, D.; DAILIANIS, A. E.; HILL, L.; CURIALE, M. S.; GANGAR, V.; ARNOLD, D.; BARRAT, C.; BAXTER, T.; BELL, J.; BROOKS, R.; BRYANT, D.; BURKE, K.; BURNIE, A.; CLIFFARD, D.; DANISAVICH, T.; DANIELS, K.; DEISS, K.; D'ONORIO, A.; FAUCHER, K.; FINKENBINER, D.; GASANOV, U.; GEBLER, J.; GERRY, A.; GRAHAM, D.; GRAHAM, T.; HARRIS, P.; HETRICK, S.; JURGENS, J.; KEATING, K. J.; KLOKMAN, R.; LE, C.; MATROZZA, M.; MCCARTHY, R.; MCCAWLEY, C.; MUNYARD, S.; PYE, V.; RAJKOWSKI, K.; RISTOV, K.; ROSINKO, J.; SCHNEIDER, K.; SCHUBERT, M. J.; SLOAN, E.; SOUTER, F.; WILSON, M.; ZUROSKI, K. **Salmonella in Foods: New Enrichment Procedure for TECRA *Salmonella* Visual Immunoassay Using a Single RV(R10) Only, TT Only, or Dual RV(R10) and TT Selective Enrichment Broths (AOAC Official Method 998.09): Collaborative Study 1.** Journal of AOAC International, v.86, n. 4, p. 775–790, mar. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article/86/4/775/5657033>>.

JAJERE, S. M. **A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance.** Veterinary World, v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019.

KUMAR, R. **Evaluation of Culture Media for Selective Enrichment and Isolation of *Salmonella* in Seafood.** Journal of AOAC International, v. 93, n. 5, p. 1468–1471, 1 mar. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article/93/5/1468/5655781>>.

LI, B.; VELLIDIS, G.; LIU, H.; JAY-RUSSELL, M.; ZHAO, S.; HU, Z.; WRIGHT, A.; ELKINS, C. A. **Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from surface water in southeastern United States.** Applied and Environmental Microbiology, v.80, n. 20, p. 6355–6365, 2014.

LI, X.; ATWILL, E. R.; ANTAKI, E.; APPLGATE, O.; BERGAMASCHI, B.; BOND, R. F.; CHASE, J.; RANSOM, K. M.; SAMUELS, W.; WATANABE, N.; HARTER, T.; X., L.; E.R., A.; E., A.; O., A.; B., B.; R.F., B.; J., C.; K.M., R.; W., S.; N., W.; T., H. **Fecal Indicator and Pathogenic Bacteria and Their Antibiotic Resistance in Alluvial Groundwater of an Irrigated Agricultural Region with Dairies.** Journal of Environmental Quality, v. 44, n. 5, p.1435–1447, 2015. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L606477303>>.

LIAO, C.-H.; SHOLLENBERGER, L. M. **Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline.** Letters in Applied Microbiology, v. 37, n.1, p. 45–50, jul. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>>.

LIU, H.; WHITEHOUSE, C. A.; LI, B. **Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety.** Frontiers in Public Health, v. 6, n. May, p. 1–13, 2018.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E.; PELTOLA, J. **The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme.** Food Control, v. 16, n. 8, p. 669–675, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713504001227>>.

MARTÍNEZ, M. C.; RETAMAL, P.; ROJAS-AEDO, J. F.; FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; LAPIERRE, L. **Multidrug-Resistant Outbreak-Associated *Salmonella* Strains in Irrigation Water from the Metropolitan Region, Chile.** Zoonoses and Public Health, v. 64, n. 4, p. 299–304, 1 jun. 2017.

MCEGAN, R.; RODRIGUES, C. A. P.; SBODIO, A.; SUSLOW, T. V.; GOODRIDGE, L. D.; DANYLUK, M. D. **Detection of *Salmonella* spp. from large volumes of water by modified Moore suabes and tangential flow filtration.** Letters in Applied Microbiology, v. 56, n. 2, p.88–94, fev. 2013.

MCHUGH, M. L. **Interrater reliability: the kappa statistic.** Biochem Med (Zagreb), v. 22, n.3, p. 276–282, 15 out. 2012.

NUTT, J. D.; PILLAI, S. D.; WOODWARD, C. L.; STERNES, K. L.; ZABALA-DÍAZ, I. B.; KWON, Y. M.; RICKE, S. C. **Use of a *Salmonella* Typhimurium *hila* fusion strain to assess effects of environmental fresh water sources on virulence gene expression.** Water Research, v. 37, n. 14, p. 3319–3326, 2003.

PAL, A.; MARSHALL, D. L. **Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella* spp. from frozen Channel catfish and Vietnamese basa fillets.** Food Microbiology, v. 26, n. 3, p. 317–319, maio 2009.

POLO, F.; FIGUERAS, M. J.; INZA, I.; SALA, J.; FLEISHER, J. M.; GUARRO, J. **Relationship between presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats.** FEMS Microbiology Letters, v. 160, n. 2, p. 253–256, 1998.

ROCHA, A. D. de L.; FERRARI, R. G.; PEREIRA, W. E.; LIMA, L. A. de; GIVISIEZ, P. E. N.; MORENO-SWITT, A. I.; TORO, M.; DELGADO-SUÁREZ, E. J.; MENG, J.; OLIVEIRA, C. J. B. de. **Revisiting the Biological Behavior of *Salmonella enterica* in Hydric Resources: A Meta-Analysis Study Addressing the Critical Role of Environmental Water on Food Safety and Public Health.** Frontiers in Microbiology, v. 13, 2 jun. 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.802625/full>>.

ROTH, L.; SIMONNE, A.; HOUSE, L.; AHN, S. **Microbiological analysis of fresh produce sold at Florida farmers' markets.** Food Control, v. 92, p. 444–449, out. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713518302639>>.

RUBY, T.; MCLAUGHLIN, L.; GOPINATH, S.; MONACK, D. ***Salmonella's long-term relationship with its host***. FEMS Microbiology Reviews, v. 36, n. 3, p. 600–615, 2012.

SBODIO, A.; MAEDA, S.; LOPEZ-VELASCO, G.; SUSLOW, T. V. **Modified Moore suabe optimization and validation in capturing E. Coli O157: H7 and *Salmonella enterica* in large volume field samples of irrigation water**. Food Research International, v. 51, n. 2, p. 654– 662, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.011>>.