



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijos curados e de *Salmonella* spp. em carnes e derivados: Comparação entre o método PCR em tempo real e os respetivos métodos padrão

Carla Adriana Pereira Martins Fernandes

Angra do Heroísmo

2013

Universidade dos Açores  
Departamento de Ciências Agrárias



Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijos curados e de *Salmonella spp.* em carnes e derivados: Comparação entre o método PCR em tempo real e os respetivos métodos padrão

Relatório de Estágio realizado por  
Carla Adriana Pereira Martins Fernandes  
Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Maria da Graça Amaral da Silveira  
Professora Doutora do Departamento de Ciências Agrárias  
Universidade dos Açores

Co-orientador: Bruno Filipe da Silva Bettencourt  
Doutor do Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular  
Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira

Angra do Heroísmo

2013



Ao meu companheiro



## AGRADECIMENTOS

Ao terminar este trabalho desejo manifestar o meu reconhecimento aos amigos, colegas, familiares e a todos aqueles que, de alguma forma mais ou menos explícita, me apoiaram, colaboraram, criticaram e encorajaram, contribuindo para a sua concretização. A todos um abraço de amizade e agradecimento. Gostaria, no entanto, de destacar a minha gratidão.

Ao Laboratório Regional de Veterinária na pessoa da Dr.<sup>a</sup> Lídia Flor pela permissão e apoio na realização deste estágio no meu local de trabalho, e por toda a sua dedicação, disponibilidade, críticas e sugestões.

À minha orientadora, Prof. Doutora Graça Silveira da Universidade dos Açores, pela sua orientação, sugestões e críticas.

Ao meu co-orientador, Doutor Bruno Bettencourt do Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular, Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira E.P.E.R., pela sua orientação na parte prática e teórica, a sua dedicação, disponibilidade, críticas e sugestões.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório Regional de Veterinária que acreditaram em mim e sempre me apoiaram. Aos técnicos superiores Dra. Ana Carina Ferreira e Eng<sup>a</sup> Valentina Santos, por todo o apoio prestado durante a parte prática e teórica do trabalho. Aos técnicos Paula Borba, Helena Santos, Paula Rosa, por toda a ajuda prestada durante a parte do trabalho prático.

Um agradecimento muito especial à minha família pelo apoio, compreensão, carinho e encorajamento, sem eles não teria chegado aqui.

Por último, mas não menos importante ao meu marido Reginaldo Fernandes, pelo apoio incondicional e extraordinária compreensão, carinho e encorajamento.



## RESUMO

*Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* são microrganismos patogênicos de grande importância para a segurança alimentar. A detecção e identificação destes microrganismos pelos métodos padrão é trabalhosa e demorada, o que explica a grande variedade de métodos alternativos existentes no mercado. Muitos destes métodos alternativos são validados por organizações internacionais reconhecidas. Neste trabalho avaliou-se o desempenho do método alternativo PCR em tempo real na pesquisa de *Salmonella spp.* e de *L. monocytogenes*, tendo-se utilizado os kits “MicroSeq *Salmonella spp.* Detection” e “MicroSeq *Listeria monocytogenes* Detection” da Applied Biosystems para a lise e extração do ADN e comparou-se com os respectivos métodos de referência ISO 6579:2002 e ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004. Utilizaram-se 20 amostras de carnes e derivados, sendo 5 de carne moída, 9 de fumados, 4 de enchidos e 2 de entremeada que deram resultados negativos para a pesquisa de *Salmonella spp.* e que foram posteriormente contaminadas com *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (Microbiologics). Para a pesquisa de *L. monocytogenes* o procedimento foi idêntico, tendo-se contaminado experimentalmente 15 amostras de queijo curado com *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Microbiologics). Analisaram-se ainda 20 amostras de queijo como amostras cegas. Nas condições em que o trabalho foi realizado, a sensibilidade, a especificidade e a concordância relativas foram de 100% na comparação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real com os obtidos pelo método ISO 6579:2002 e pelo método ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004, para a pesquisa de *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*, respectivamente. A PCR em tempo real permitiu detectar *Salmonella spp.* em amostras de produtos cárneos com um nível de contaminação de 3 UFC/25g, e *L. monocytogenes* em amostras com um nível de contaminação de 6 UFC/ 25g de queijo. A comparação do limite de detecção relativo pela PCR em tempo real com os respectivos métodos padrão não deu diferenças significativas. Pode concluir-se assim que a utilização da técnica PCR em tempo real representa uma mais-valia em análises de rotina pois permite a obtenção de resultados fiáveis num curto espaço de tempo. A PCR em tempo real é uma excelente ferramenta para a triagem de alimentos isentos de *Salmonella spp.* e de *L. monocytogenes* obtendo-se resultados em 2 dias.

**Palavras-chave:** *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, PCR em tempo real

## ABSTRACT

*Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* are pathogenic microorganisms of great importance for food safety. Detection and identification of microorganisms by standard methods, is laborious and time-consuming, which explains the wide range of alternative methods available on the market. Many of these alternative methods are validated by recognized international organizations. This study assessed the performance of alternative method real-time PCR in the research of *Salmonella spp.* and *L. monocytogenes*, having used the kits "MicroSeq Salmonella spp Detection" and "MicroSeq Listeria monocytogens Detection" of Applied Biosystems to Lysis and DNA extraction and compared it with the respective reference methods ISO 6579: 2002 and ISO 11290-1: 1996 Amendment 1: 2004. For this assay we selected 20 samples of meat and derivatives, being 5 of ground beef, 9 of smoked, 4 of sausage and 2 of streaky bacon which gave a negative result for *Salmonella spp* and which were subsequently contaminated with *Salmonella tiphymurium* ATCC14028 (Microbiologics). For the assessment of *L. monocytogenes* the procedure was identical, having been contaminated experimentally 15 samples of cured cheese with *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Microbiologics). Moreover, 20 samples of cheese were analyzed as blind samples. The conditions under which the work was performed, the sensitivity, specificity and relative agreement were 100% in the comparison of results obtained by real-time PCR with those obtained by the method ISO 6579: 2002 and ISO 11290-1 method: 1996 Amendment 1: 2004, for detecting *Salmonella spp.* and *L. monocytogenes*, respectively. The real-time PCR allowed to detect *Salmonella spp* in samples of meat products with a level of contamination of 3 UFC/25g, and *L. monocytogenes* in samples with a level of contamination of 6 UFC/25 g of cheese. Comparison of the detection limit for real-time PCR with the respective standard methods gave no significant differences. It can be concluded that the use of real-time PCR technique represents an added value in routine analysis because it allows obtaining reliable results within a short period. The real-time PCR is an excellent tool for the screening of food free of *Salmonella spp.* and *L. monocytogenes* obtaining results in 2 days.

**Key-words:** *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, Real-time PCR

## Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESA / EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos / European Food Safety Authority
AFNOR	Association Français de Normalisation
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APSA	Agência Portuguesa de Segurança Alimentar
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
ATCC	American Type Culture Collection
Aw	Atividade de água
bDNA	branched DNA
BSA	Bovine serum albumin
CDCPUS	Centers for disease Control and Prevention United States
CE	Comissão Europeia
CEN	Comissão Europeia de Normalização
CT	Cycle threshold
DGCFQA	Direção Geral do Controlo e Fiscalização da Qualidade Alimentar
DGS	Direção Geral de Saúde
DHPV	Divisão de Higiene Pública e Veterinária
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRADR	Direção Regional da Agricultura e Desenvolvimento Rural
DSV	Direção de Serviços de Veterinária
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EIA	Ensaio Imuno-enzimático
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent. Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
HACCP	Hazard analysis and critical control points
IDF	International Dairy Federation
IFT	Institute of Food Technologists
IGAE	Inspeção-Geral das Atividades Económicas
IPC	Internal Positive Control
IRAE	Inspeção Regional das Atividades Económicas
ISO	International Standards Organisation
LRV	Laboratório Regional de Veterinária
MVM	Médicos Veterinários Municipais
NP	Desvio positivo
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de Hidrogénio
PN	Desvio negativo
PNCA	Plano Nacional de colheita de amostras
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAA	Região Autónoma dos Açores
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossómico
RTq-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SRRN	Secretaria Regional dos Recursos Naturais
EU	União Europeia
UFC	Unidades Formadoras de colónias



## Índice Geral

<b>RESUMO</b> .....	vii
Abstract .....	viii
Lista de Abreviaturas .....	ix
Índice Geral .....	xi
Índice de Quadros.....	xiii
Índice de Figuras.....	xiv
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
2.1. Segurança Alimentar.....	6
2.1.1. Legislação comunitária.....	7
2.1.2. Autoridade responsável pela segurança alimentar em Portugal.....	11
2.1.3. Autoridade responsável pela segurança alimentar na Região Autónoma dos Açores .....	12
2.2. Perigos de Origem Alimentar .....	14
2.3. Controlo .....	18
2.4. <i>Salmonella spp</i> .....	20
2.4.1. Classificação .....	20
2.4.2. Características Taxonómicas .....	22
2.4.3. Reservatórios .....	23
2.4.4. Epidemiologia.....	23
2.4.5. Alimentos envolvidos.....	26
2.4.6. Medidas de Controlo e Prevenção.....	27
2.5. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
2.5.1. Classificação.....	28
2.5.2. Características Taxonómicas.....	30
2.5.3. Reservatórios.....	31
2.5.4. Epidemiologia .....	31
2.5.5. Alimentos envolvidos .....	33
2.5.6. Medidas de Controlo e Prevenção .....	35
2.6. Análise Microbiológica de Alimentos.....	36
2.6.1. Método Padrão .....	37
2.6.2. Método Rápido .....	39

<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
3.1. Caracterização da amostra.....	48
3.2. Culturas Microbianas.....	48
3.3. Contaminação das Amostras.....	49
3.4. Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> .....	50
3.4.1. Pré-enriquecimento em caldo não selectivo .....	50
3.4.2. Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> pelo Método Padrão .....	51
3.4.3.Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> por PCR em tempo real .....	52
3.5. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	53
3.5.1.Enriquecimento Primário .....	53
3.5.2.Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> pelo Método Padrão .....	54
3.5.3.Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR em tempo real.....	55
3.6. Análise Estatística.....	56
<b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
4.1. Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> em carne e derivados.....	60
4.2. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos.....	64
4.3. Análise Estatística.....	67
4.3.1. Concordância, sensibilidade e especificidade relativa .....	68
4.3.2 Limite de detecção relativo .....	71
4.4. Análise Comparativa.....	73
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81
<b>ANEXOS</b> .....	91
<b>Anexo 1</b> - Problemas associados aos métodos de amplificação de ácidos nucleicos .....	92
<b>Anexo 2</b> - Tabela com os limites estabelecidos para a <i>Salmonella spp.</i> .....	93
<b>Anexo 3</b> - Tabela com os limites estabelecidos para a <i>Listeria monocytogenes</i> .....	95
<b>Anexo 4</b> - Diagrama do procedimento para a Pesquisa de <i>Salmonella</i> segundo a ISO 6579:2002.....	96
<b>Anexo 5</b> - Diagrama do procedimento para a Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> segundo a ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004.....	97
<b>Anexo 6</b> - Relação dos resultados obtidos pela ISO 6579:2002 e pela qPCR para detecção da ocorrência de <i>salmonela spp</i> em carne e derivados .....	98
<b>Anexo 7</b> - Relação dos resultados obtidos pela ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004 e pela qPCR para detecção da ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos .....	101

## Índice de Quadros

<b>Quadro 2.1 </b>	Distribuição do género <i>Samonella</i> em espécies, subespécies e número de serotipos .....	21
<b>Quadro 2.2 </b>	Levantamento epidemiológico de <i>Salmonella spp</i> .....	25
<b>Quadro 2.3 </b>	Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos crus em diferentes países .....	34
<b>Quadro 2.4 </b>	Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos prontos para consumo em diferentes países .....	34
<b>Quadro 3.1 </b>	Etapas da corrida no termociclador qPCR para o Kit “MicroSeq Listeria monocytogenes Detection Kit” .....	53
<b>Quadro 4.1 </b>	Valor médio do Ct por níveis de contaminação de <i>Salmonela spp</i> em carne e derivados .....	62
<b>Quadro 4.2 </b>	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella spp</i> nas amostras analisadas sem e com contaminação experimental.....	63
<b>Quadro 4.3 </b>	Valor médio do Ct por níveis de contaminação de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos ... ..	65
<b>Quadro 4.4 </b>	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras analisadas com e sem contaminação experimental .....	66
<b>Quadro 4.5 </b>	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras sem análise prévia .....	67
<b>Quadro 4.6 </b>	Valores da concordância relativa, da sensibilidade relativa e da especificidade relativa, resultantes da comparação dos dois métodos utilizados na pesquisa de <i>Salmonella spp</i> . .....	69
<b>Quadro 4.7 </b>	Valores da concordância relativa, sensibilidade relativa e da especificidade relativa, resultantes da comparação dos dois métodos utilizados na pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> .....	69
<b>Quadro 4.8 </b>	Organização dos dados necessários ao cálculo do limite de deteção relativo para a pesquisa de <i>Salmonella spp</i> .....	72
<b>Quadro 4.9 </b>	Organização dos dados necessários ao cálculo do limite de deteção relativo para a pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	72
<b>Quadro 4.10 </b>	Custos das análises utilizando a metodologia padrão e a metodologia rápida.....	74

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1 </b>	Distribuição dos surtos de origem alimentar por agentes na EU, 2008-2011 .....	16
<b>Figura 2.2 </b>	Surtos de origem alimentar verificados em Portugal no ano 2000 ....	17
<b>Figura 2.3 </b>	Distribuição do total de surtos de origem alimentar verificados em Portugal nos anos de 1999 e 2000 por categoria de produto .....	18
<b>Figura 2.4 </b>	Visualização da <i>Salmonella Typhi</i> através da técnica de imunofluorescência .....	20
<b>Figura 2.5 </b>	Visualização da <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
<b>Figura 2.6 </b>	Representação gráfica das fases da qPCR .....	44
<b>Figura 2.7 </b>	Representação gráfica dos resultados da amplificação em tempo real em função de diferentes teores de moléculas de ADN iniciais....	45
<b>Figura 3.1 </b>	Preparação das amostras de carne e derivados para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> .....	49
<b>Figura 3.2 </b>	Preparação das amostras de queijo para a pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	50
<b>Figura 4.1 </b>	Representação gráfica do procedimento segundo a ISO e as instruções do fabricante do KIT utilizado na qPCR.....	61
<b>Figura 4.2 </b>	Tempo necessário para a realização dos ensaios pelo método padrão e pelo método rápido .....	73

## **|1| INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar tem vindo nestes últimos anos a adquirir enorme relevância no domínio da saúde pública. O conhecimento cada vez mais amplo da transmissão de doenças através dos alimentos tem determinado a necessidade de submeter estes produtos a análises de forma a avaliar a sua inocuidade e, conseqüentemente, muitas técnicas têm sido desenvolvidas (Roberts, 2006).

A análise microbiológica de um alimento visa quantificar e/ou investigar a presença ou ausência de um determinado microrganismo em determinado produto, os quais podem constituir riscos para a saúde do consumidor. Estas análises permitem também identificar os microrganismos a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado, assim como determinar o agente etiológico mais provável no caso duma intoxicação alimentar. A análise microbiológica é ainda imprescindível para verificar se os padrões e as especificações microbiológicas, nacionais, ou internacionais, estão a ser cumpridas (Franco & Landgraf, 2002).

Pelo elevado número de casos causados por *Salmonella spp.* e pela gravidade das infeções causadas por *Listeria monocytogenes*, estes dois agentes são considerados dos mais importantes causadores de doenças transmitidas por alimentos (Tauxe, 1997). Os métodos de referência para a deteção de *L. monocytogenes* e *Salmonella spp* nos alimentos são muito trabalhosos e moroso (Rodríguez-Lázaro et al., 2004) o que levou à procura de novas metodologias mais rápidas, onde se incluem métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Feng, 2007).

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70 em consequência da necessidade de se reduzir o tempo de análises nos laboratórios de microbiologia, aumentando-se assim a produtividade do trabalho realizado. Tais métodos apresentam uma série de vantagens como redução do tempo de análise, significando menor retenção do produto na indústria, diminuição dos custos, simplificação das tarefas de realização de análises, facilidade de leitura dos resultados e especificidade, além de maior sensibilidade de alguns métodos quando comparados com os métodos convencionais (Hajdenwurcel, 1998).

A principal vantagem dos métodos rápidos é permitir, na indústria alimentar, uma rápida triagem das amostras contaminadas. No entanto, sendo uma ferramenta de triagem, os resultados negativos são considerados definitivos enquanto resultados positivos são considerados presuntivos, requerendo confirmação dos mesmos por um método padrão (Feng, 2007).

Parâmetros como a precisão, custo, tempo de análise, aceitabilidade pelos órgãos oficiais e comunidade científica, operacionalidade, formação e qualificação do analista, disponibilidade e qualidade de reagentes, assistência técnica oferecida pelos fabricantes e disponibilidade de espaço de laboratório, devem ser considerados na escolha e implementação de métodos rápidos (Lightfoot & Maier, 2003).

A detecção e identificação de muitos microrganismos faz-se hoje com o auxílio dos mais variados métodos de amplificação e hibridação dos ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos dos microrganismos podem ser detetados e analisados diretamente sem amplificação, ou após amplificação. Os métodos sem amplificação incluem a hibridação com sondas e a amplificação de sinal, pela técnica do bDNA. Os métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos incluem os sistemas de amplificação de sondas, no qual se incluem a PCR e as suas numerosas variações (Ferreira & Sousa, 2000).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo comparar a metodologia padrão utilizada no Laboratório Regional de Veterinária (LRV) para a pesquisa de *Salmonella spp* em carne e derivados e para a pesquisa de *L. monocytogenes* em queijos, com o método rápido, PCR em tempo real. Considera-se que a implementação destas pesquisas por PCR em tempo real no LRV, uma importante contribuição para responder às solicitações feitas pelas entidades oficiais de vigilância e controlo, produtores e consumidores.



## **|2| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. Segurança Alimentar

Em pleno século XXI, a segurança alimentar continua a ser um dos maiores desafios da humanidade, para tal tem contribuído o aumento da exigência por parte dos consumidores.

Vivemos numa época de grandes avanços científicos, que nos permitem olhar para o que comemos de outra forma. A sazonalidade de muitos alimentos deixou de existir. O aprovisionamento também foi alterado radicalmente com a possibilidade de conservar em congelação e em refrigeração.

Segundo a OMS, segurança alimentar é um termo abrangente que se refere ao facto de que “todas as pessoas, em todos os momentos, devem ter acesso a uma alimentação suficiente para uma vida ativa e saudável, disponível portanto, em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de serem livres de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar” (WHO, 2004).

Esta definição tem sido utilizada de forma imprecisa em alguns países, ou seja, o conceito de “*Food security*” é por vezes confundido com “*Food safety*”, porque as palavras “*security*” e “*safety*” são sinónimos em muitas línguas” (WHO, 2004). No entanto, estes conceitos são diferentes.

“*Food safety*” é um termo usado com significado de garantia do consumo alimentar seguro, no âmbito da saúde coletiva. A característica essencial do alimento seguro é a sua inocuidade, livre de contaminantes de natureza química, biológica, física ou ainda de quaisquer agentes que possam colocar em risco a saúde de quem os consome (Nitzke et al., 2010). Por outro lado, “*Food Security*” refere-se à garantia de acesso ao consumo de alimentos. Esta designação abrange todo o conjunto de necessidades para a obtenção de uma nutrição adequada à saúde (Nitzke et al., 2010).

O termo “*Food Security*” começou a ser utilizado após o fim da Primeira Guerra Mundial. A partir deste acontecimento, ficou evidente que um país poderia dominar o outro controlando o seu fornecimento de alimentos. Desta forma, a alimentação tonar-se-ia uma arma poderosa, principalmente se aplicada sobre um país que não tivesse a capacidade de produzir de forma autónoma, bens alimentares em

quantidade suficiente para a sua população. A questão adquiria, desta forma, significado de segurança nacional para cada país, apontando para a necessidade de formação de stocks "estratégicos" de alimentos e fortalecendo a ideia de que a soberania de um país dependia de sua capacidade de auto-suprimento de alimentos (Maluf, 2000).

Em 2001, a FAO, estabeleceu a definição atual de "Food Security" – "Situação que existe quando todas as pessoas, a qualquer momento têm acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos, que permitam satisfazer as suas necessidades em nutrientes e preferências alimentares para uma vida activa e saudável". Assim, a "Food security" é uma designação abrangente, onde se inclui a disponibilidade, o acesso físico e económico, a estabilidade dos abastecimentos e do acesso e a utilização de alimentos seguros e saudáveis (FAO/WHO, 2006). Assim, segundo esta designação, o termo alimento seguro é um conceito que vai ganhando importância, não só pelo seu interesse para a saúde pública, mas também pelo seu importante papel no comércio internacional (Barendz, 1998).

Até aos anos 60, a segurança e a qualidade dos alimentos era dada pelo controle de qualidade tradicional, feito através de amostragens e análises, considerando no geral, parâmetros definidos para o produto final (Portugal et al., 2002). Hoje em dia, devem ser entendidas como um compromisso e um objetivo vital por todas as organizações do sector alimentar, ao longo de toda a cadeia – do produtor ao consumidor. Neste sentido, assiste-se a uma evolução vertiginosa tanto nos métodos de produção e processamento dos alimentos como na fiscalização e controlo necessários de modo a garantir a correta implementação das normas de segurança consideradas adequadas em cada caso.

### 2.1.1. Legislação Comunitária

A União Europeia, consciente da extrema importância da segurança alimentar, desenvolveu uma legislação adaptada às novas realidades, tendo em conta, nomeadamente, a defesa dos interesses do consumidores e a necessidade de consolidação do mercado interno. Para além da legislação, houve a necessidade de desenvolver a investigação no campo da microbiologia alimentar e de promover

a prestação de serviços de apoio à segurança alimentar nas mais variadas vertentes de atuação (EU-RAIN, European union-risk analysis information network, 2005).

Neste sentido, a UE viu-se obrigada a rever um vasto número de Diretivas Comunitárias, em matéria de higiene dos géneros alimentícios no sentido de garantir um nível elevado de saúde pública e em Abril de 1997 publicou um documento de reflexão, com uma série de ideias para análise e debate público sobre os Princípios Gerais da Legislação Alimentar da União Europeia – Livro Verde (União-Europeia, 1997).

Em Janeiro de 2000, foram publicados os resultados desse processo de consulta e debate, sendo apresentadas propostas de ação comunitária em matéria de Segurança Alimentar num documento com 84 pontos de ação denominado “Livro Branco sobre Segurança Alimentar” (União-Europeia, 1999).

Esta publicação abrange toda a cadeia, de modo a existir um método completo e coeso de segurança alimentar “da exploração agrícola até à mesa”. Como a legislação existente não era comum a todos os estados membros, tornava-se, necessário definir, a nível comunitário, uma base comum para as medidas que regulam os géneros alimentícios e os alimentos para animais. Em todas as etapas desta cadeia, a responsabilidade jurídica de velar pela segurança dos géneros alimentícios incumbe aos operadores das empresas do setor alimentar (União-Europeia, 1999).

Para responder a estas preocupações, a UE, publicou o Regulamento (CE) nº 178/2002 de 28 de Fevereiro (2002b), que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios”, tendo entrado em vigor no dia 1 de Janeiro de 2005.

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA ou EFSA) reforça o sistema atual de apoio científico e técnico. A sua missão essencial é fornecer ajuda e pareceres científicos independentes, assim como criar uma rede para uma estreita cooperação com os organismos análogos nos Estados-Membros. Também

tem como funções avaliar os riscos ligados à cadeia alimentar e informar o grande público sobre os mesmos.

A legislação comunitária aparece como consequência do Livro Branco. Aparece assim:

- Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu (2004b), que estabelece requisitos gerais de higiene a respeitar pelas empresas do sector alimentar em todas as fases da cadeia alimentar. Este Regulamento é de aplicação obrigatória desde Janeiro de 2006;
- Regulamento (CE) n.º 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 (2004c), que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, a fim de garantir um nível elevado de segurança dos géneros alimentícios e de saúde pública;
- Regulamento (CE) n.º 854/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 (2004d), que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano;
- Diretiva 2003/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Novembro (2003), relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos;
- Diretiva 2004/41/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Abril de 2004 (2004a), que revoga certas diretivas relativas à higiene dos géneros alimentícios e às regras sanitárias aplicáveis à produção e à comercialização de determinados produtos de origem animal destinados ao consumo humano e altera as diretivas 89/662/CEE e 92/118/CEE.

Além disso, os seguintes Regulamentos e Diretivas completam a legislação comunitária em matéria de higiene dos géneros alimentícios:

- Regulamento (CE) n.º 882/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril (2004f), que reorganiza os controlos oficiais dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais de maneira a integrar os controlos em todas as etapas da produção e em todos os setores;

- Diretiva 2002/99/CE do Conselho, de 16 de Dezembro de 2002 (2002a), que estabelece as regras de polícia sanitária aplicáveis à produção, transformação, distribuição e introdução de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Nela constam as condições para a colocação no mercado dos produtos de origem animal e as restrições aplicáveis aos produtos provenientes de países ou de regiões terceiros, sujeitos a restrições de polícia sanitária;
- Regulamento (CE) n.º 183/2005, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de Janeiro (2005a), que estabelece os requisitos de higiene para alimentação animal, que completa o “*pacote higiene*”, pela inclusão de um elo importante da cadeia alimentar, garantindo a segurança dos alimentos para animais.

Em 2006 entrou em vigor um novo pacote de legislação cujo diploma fundamental é o Regulamento (CE) N.º 852/2004(2004b). No entanto, o pacote legislativo é mais completo, devendo ainda ter-se em consideração e particular atenção aos princípios, definições e regras estabelecidas nos seguintes documentos:

- Regulamento (CE) N.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 (2004e) relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais;
- Regulamento da Comissão (CE) N.º 2073/2005 de 15 Novembro de 2005 (2005b) relativo aos critérios microbiológicos para géneros alimentícios;
- Regulamento da Comissão (CE) N.º 2074/2005 de 5 Dezembro de 2005 (2005c) relativo à implementação de medidas para determinados produtos previstos no Regulamento (CE) N.º 853 (2004c) e para a organização de controlos oficiais no âmbito dos Regulamentos (CE) N.º 854/2004 (2004d) e N.º 882/2004 (2004e).

O cumprimento do Regulamento (CE) Nº 852/2004 (2004b) é compulsivo para todos os Estados-Membros da União Europeia e a entrada em vigor deste Regulamento é concomitante com a revogação da Diretiva Nº 93/43/CE (1993) transposta para a ordem jurídica nacional pelo Decreto-Lei nº 67/98 de 18 de Março (1998), revogado, entretanto, pelo Decreto-Lei nº 113/2006 de 12 de Junho de 2006 (2006).

Assim, o Regulamento (CE) Nº 852/2004 (2004b) estabelece as regras gerais destinadas aos operadores das empresas do setor alimentar no que se refere à higiene dos géneros alimentícios e aplica-se a todas as empresas e operadores, responsabilizando os respetivos operadores pela ausência de cumprimento das normas da legislação alimentar. Aplica-se a todas as fases de produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios, incluindo a produção primária. É, portanto, um diploma de aplicação horizontal no setor alimentar.

#### 2.1.2. Autoridade responsável pela segurança alimentar em Portugal

Através do Decreto-Lei nº 237/2005, de 30 de Dezembro (2005), foi criada, a nível nacional, a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, resultante da extinção de vários organismos que, então, operavam na área da segurança alimentar, tais como a Direcção-Geral do Controlo e Fiscalização da Qualidade Alimentar, a Agência Portuguesa de Segurança Alimentar e a Inspeção-Geral das Atividades Económicas. Segundo este Decreto a ASAE é a entidade responsável pela avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, bem como pela disciplina do exercício das atividades económicas nos setores alimentar e não alimentar, mediante a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora das mesmas (Picciochi, 2006).

Em 2012 foi publicada a nova orgânica da ASAE, pelo Decreto-Lei 194/2012 (2012). De acordo com este Decreto de Lei a ASAE tem por missão a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas, nos setores alimentar e não alimentar, bem como a avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, sendo o organismo nacional de ligação com as suas entidades congéneres, a nível europeu e internacional.

### 2.1.3. Autoridade responsável pela segurança alimentar na Região Autónoma dos Açores

A nível Regional são várias as entidades responsáveis pela segurança alimentar:

- Inspeção Regional das Atividades Económicas - Serviço da Vice-Presidência do Governo Regional dos Açores, Emprego e Competitividade Empresarial ao qual incumbe, na RAA, garantir o cumprimento das normas que disciplinam as atividades económicas.

Este serviço tem por âmbito o território da RAA, através da fiscalização de todos os locais onde se proceda a qualquer atividade industrial, comercial, agrícola, piscatória ou de prestação de serviços, zelando pelo cumprimento de todas as normas que disciplinam o exercício de tais atividades económicas.

- Secretaria Regional dos Recursos Naturais - é o departamento do Governo Regional que define e executa a política regional nos domínios da agricultura e pecuária, das pescas e aquicultura, do desenvolvimento rural, da formação agrária e extensão rural, das florestas, da orla costeira e dos assuntos relacionados com o mar, do ambiente, do ordenamento do território e dos recursos hídricos, promovendo o reforço da importância das atividades produtivas tradicionais e o pleno aproveitamento das potencialidades naturais da Região, sob uma perspetiva global e integrada e de desenvolvimento sustentável.

Entre outras missões que foram atribuídas a esta secretaria, através do Decreto Regulamentar Regional nº 11/2013/A (2013) destacam-se as seguintes:

- Apoiar as atividades económicas nos domínios da agricultura e pescas e indústrias e atividades conexas, do desenvolvimento rural e das florestas, apoiando a valorização e o desenvolvimento sustentável das atividades produtivas tradicionais da Região;
- Assegurar a proteção, a qualidade e a segurança da produção agrícola, designadamente nas áreas de proteção animal e de sanidade animal, proteção vegetal e fitossanidade.

Para a prossecução destas missões a SRRN dispõe da Direção Regional da Agricultura e Desenvolvimento Rural, como executivo central e dos Serviços de Desenvolvimento Agrário de Ilha, como executivos periféricos.

A Direção Regional da Agricultura e Desenvolvimento Rural tem por missão contribuir para a definição da política regional nos domínios da agricultura e pecuária, incluindo a indústria e atividades conexas, do desenvolvimento rural, da formação agrária e da extensão rural, bem como orientar, coordenar e controlar a sua execução.

Na dependência da DRADR funciona um núcleo de serviços designados por Direção de Serviços de Veterinária, que compreende os seguintes serviços: Divisão de Higiene Pública Veterinária e Laboratório Regional de Veterinária.

À DHPV compete, entre outras funções, as seguintes tarefas:

- Participar na definição, aplicação e avaliação das políticas de saúde pública, emitir parecer técnico sobre os projetos de instalação e dos equipamentos dos estabelecimentos destinados ao abate, preparação, transformação, manipulação, tratamento, armazenamento e distribuição de produtos de origem animal;
- Coordenar os procedimentos na aprovação de estabelecimentos que laboram produtos e subprodutos alimentares e, validar as propostas de atribuição, suspensão e cancelamento dos números de aprovação, a estabelecimentos de produtos e subprodutos de origem animal;
- Definir e coordenar a estratégia na gestão de risco com vista à promoção da segurança dos produtos e a execução das normas de funcionamento dos controlos oficiais e da inspeção higio-sanitária;
- Cooperar com outras instituições e serviços nos planos de prevenção e luta contra as doenças animais e emergentes de carácter zoonótico e participar nos inquéritos epidemiológicos;
- Coordenar o funcionamento e as medidas de gestão de risco das atividades relacionadas com os postos de inspeção fronteiriços e pontos de entrada na Região e o sistema de certificação de produtos de origem animal para efeitos de exportação;

- Definir, regulamentar e coordenar a atividade dos médicos veterinários oficiais da Região e as ações de inspeção higiossanitária dos produtos animais destinados ao consumo público ou à indústria;

O LRV, é o laboratório oficial da Região competindo-lhe, entre outras funções, colaborar na preparação, coordenação e execução dos planos de controlo oficial; prestar apoio direto a organismos oficiais com competências específicas no âmbito do controlo oficial de produtos de origem animal, a inspeção de fronteiras, inspeção sanitária e inspeção de alimentos e segurança alimentar e realizar análises no âmbito da sanidade animal.

- Médicos Veterinários Municipais

As responsabilidades dos MVM no âmbito do controlo dos estabelecimentos de comércio a retalho de carne, produtos da pesca e produtos lácteos são as seguintes:

- Manter um registo atualizado do universo de estabelecimentos sob seu controlo;
- Articular com as DSV no sentido de dar cumprimento ao previsto nos planos;
- Programar a execução dos controlos oficiais aos estabelecimentos sob sua jurisdição, de acordo com os critérios definidos;
- Executar os controlos oficiais e manter um registo atualizado das ações de controlo oficial realizadas.

## **2.2. Perigos de Origem Alimentar**

Os perigos alimentares podem ter origem biológica (bactérias, vírus e parasitas patogénicos), química (compostos tóxicos produzidos durante o processamento, pesticidas, contaminantes tóxicos inorgânicos, antibióticos, promotores do crescimento, aditivos alimentares tóxicos, lubrificantes, tintas ou desinfetantes) ou,

ainda, física (pedras, pedaços de vidro ou de metal), sendo que, estes últimos tendem a ter um menor impacto na saúde pública.

São hoje conhecidos mais de 200 agentes, de origem microbiana ou química, que podem aparecer nos alimentos e desencadear o aparecimento de doenças. Este número tem propensão para continuar a aumentar com a alteração dos hábitos de produção, preparação e de consumo dos alimentos. Os novos compostos químicos que vão sendo libertados para o ambiente, como resultado da atividade humana, poderão contribuir para a contaminação das cadeias alimentares. Contudo, os perigos biológicos são os que representam maior ameaça, devido à sua elevada capacidade para causarem doenças de ação quase imediata (Newell et al., 2010).

Os dados Europeus mais recentes sobre zoonoses e surtos de origem alimentar, são referentes a 2011 e foram publicados em 2013 pela “European Food Safety Authority” e o “European Centre for Disease Prevention and Control” no “Summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011”. No total, foram reunidos dados sobre vários microrganismos, entre eles: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* verotoxinogénica, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* e *Yersinia enterocolitica* (EFSA, 2013).

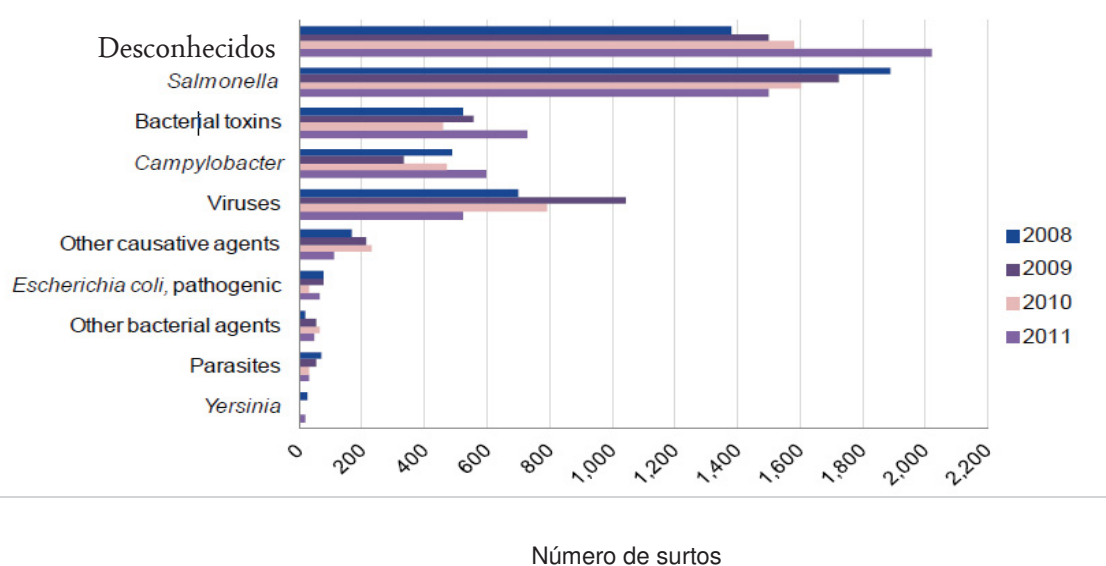
Segundo este relatório, foram registados 95 548 casos confirmados de salmonelose em humanos. Este número diminuiu 5,4% em comparação com 2010 e 37,9% em comparação com 2007. Presume-se que a redução observada é devido ao sucesso dos programas de controlo de salmonelas em populações de aves de capoeira. A carne picada e derivados, bem como os moluscos bivalves vivos foram as categorias de alimentos com maior proporção de produtos não conformes.

A mesma situação foi registada com a listeriose, o número de casos também diminuiu em comparação com 2010. Em 2011 foram confirmados 1 476 casos de listeriose e tal como nos anos anteriores, foi relatada uma alta taxa de mortalidade (12,7%) entre os casos. Todavia, foram poucos os casos em que a *L. monocytogenes* foi detetada acima do limite de segurança jurídica de alimentos prontos para consumo. Os alimentos que mais frequentemente excederam estes limites foram os produtos da pesca, queijos e linguiças.

As zoonoses que registaram um aumento significativo em 2011, foram a campilobacteriose humana, com 220 209 casos confirmados e as infeções causadas por *Escherichia coli verotoxinogénica* com 9 485 casos, sendo 1 064 causados pelo serogrupo O104. A campilobacteriose continuou a ser a zoonose mais relatada.

No total, foram relatados na UE 5 648 surtos de origem alimentar, resultando em 69 553 casos de doença em humanos, 7 125 hospitalizações e 93 mortes. A maioria dos surtos relatados foram causados por *Salmonella*, *Campylobacter*, toxinas bacterianas e vírus; no entanto, a epidemia em humanos foi causada por *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga associada a sementes germinadas (Fig. 2.1). Os ovos e ovoprodutos surgem como as principais vias de contaminação (EFSA, 2013).

**Figura 2.1.** Distribuição dos surtos de origem alimentar por agentes na EU, 2008-2011 (Adaptado de EFSA (2013))



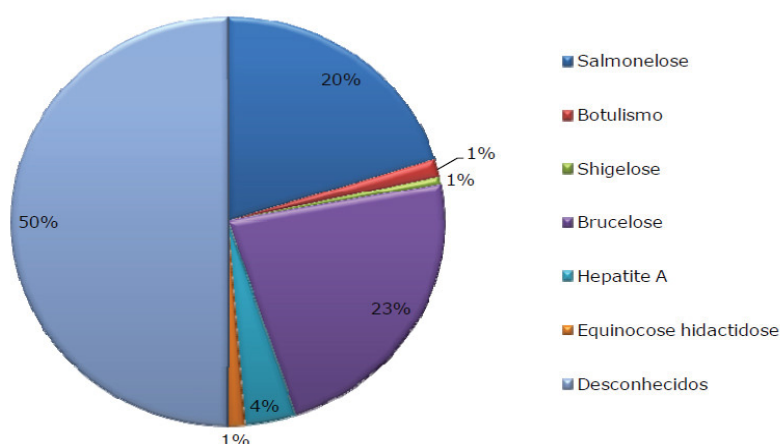
Contudo, muitas das notificações de doença de origem alimentar, apresentadas, resultam de estimativas, uma vez que a maioria dos países não dispõe de sistemas de registo de dados.

Em Portugal, tal como acontece na maioria dos países industrializados, os dados relativos às doenças de origem alimentar são escassos, o que se traduz numa subavaliação da real dimensão desta questão e, provavelmente, numa incorreta

perceção da importância relativa de cada uma das doenças. O facto da maioria das vítimas de uma infeção ou intoxicação alimentar não recorrer a um profissional de saúde e, quando o faz, raramente ser sujeita a análises que permitam identificar o agente responsável, contribui para esta situação (Veiga et al., 2009). Por exemplo, a campilobacteriose, que foi a zoonose mais relatada na União Europeia, poderá estar subestimada em Portugal devido ao facto de não ser de declaração obrigatória. Também existem dados que sugerem a existência de uma elevada incidência de contaminação por *L. monocytogenes* em alguns alimentos mas como a listeriose, não é de declaração obrigatória, esta também deverá estar subestimada (EFSA, 2009).

Segundo o oitavo relatório da OMS sobre o programa de vigilância para o controlo das doenças de origem alimentar, toxinfecções e intoxicações na Europa (1999-2000) (WHO, 2003) podemos constatar que, apesar dos dados serem escassos, para o ano 2000 foram notificados 2 224 casos de intoxicação com origem alimentar em Portugal, dos quais 23% dizem respeito a casos de brucelose, e 20% a casos de salmonelose (Fig. 2.2).

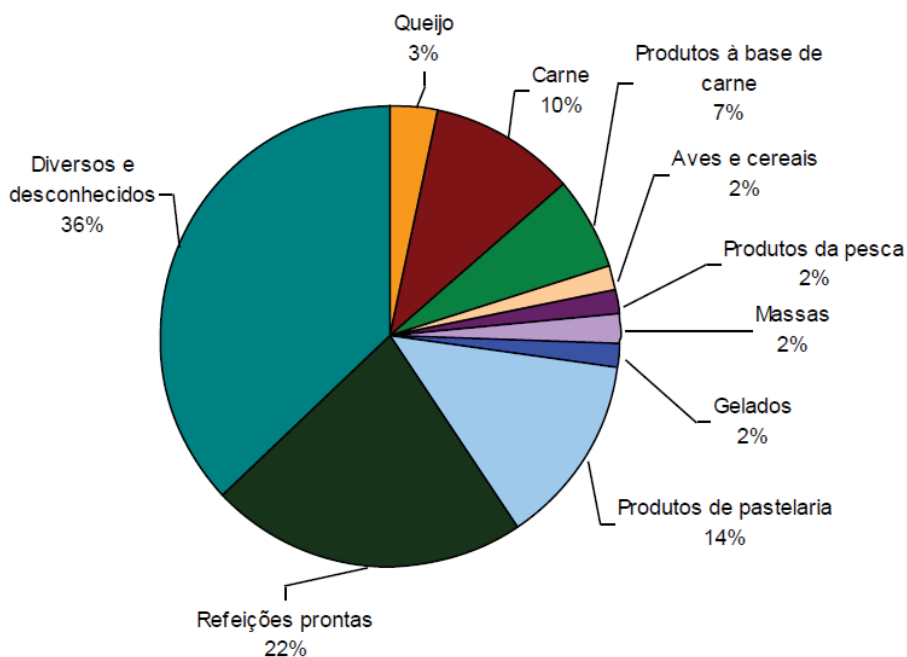
**Figura 2.2.** Surtos de origem alimentar verificados em Portugal no ano 2000 (Adaptado de WHO (2003)).



Os géneros alimentícios associados a estes surtos foram identificados em 70% das doenças de origem alimentar investigadas em 2000. Desta percentagem, 29% foram confirmados, após diagnóstico laboratorial (Fig. 2.3). Os produtos e preparados à base de carne, produtos de pastelaria e as refeições prontas para

consumo foram dos géneros alimentícios mais frequentemente imputados (WHO, 2003).

**Figura 2.3.** Distribuição do total de surtos de origem alimentar verificados em Portugal nos anos de 1999 e 2000 por categoria de produto (Adaptado de WHO (2003)).



### 2.3. Controlo

A possibilidade da intoxicação alimentar de origem bacteriana causar grandes surtos de doença aguda, num curto período de tempo, faz com que esta seja uma ameaça com que a maioria das empresas de géneros alimentícios se depara constantemente. Neste sentido foi publicado no final de 2005 o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 (2005b).

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 (2005b), alterado pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007, da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 (2007), pelo Regulamento (UE) n.º 365/2010 da Comissão de 28 de Abril de 2010 (2010), pelo Regulamento (UE) n.º 1086/2011 da Comissão de 27 de Outubro de 2011 (2011) e pelo Regulamento (UE) n.º 209/2013 da Comissão de 11 de Março de 2013 (2013), estabelece para diferentes géneros alimentícios, quais os respetivos critérios microbiológicos de segurança, define a aceitabilidade de um produto ou de um lote de géneros alimentícios colocados no mercado e estabelece critérios de higiene

dos processos. Este regulamento refere que os géneros alimentícios não devem conter microrganismos nem as suas toxinas e metabolitos em quantidades que representem um risco inaceitável para a saúde humana.

De acordo com o estabelecido no artigo 3º do regulamento (CE) n.º 2073/2005 (2005b) os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar que os géneros alimentícios cumprem os critérios microbiológicos estabelecidos no seu anexo I (critérios de segurança dos géneros alimentícios e de higiene dos processos). Para o efeito, em cada fase da produção, transformação e distribuição de alimentos, incluindo a venda a retalho, os operadores das empresas do sector alimentar devem tomar medidas, no quadro dos seus procedimentos baseados nos princípios do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) e da aplicação de boas práticas de higiene.

Quando necessário, os operadores das empresas do sector alimentar responsáveis pelo fabrico do produto devem realizar estudos em conformidade com o anexo II do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 (2005b), a fim de verificar se os critérios são cumpridos durante todo o período de vida útil dos produtos. Este requisito é aplicável, em especial, aos alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes* constituindo assim um risco para a saúde pública. Os referidos estudos podem incluir a determinação das características físico-químicas dos produtos alimentares, tais como o pH, Aw, teor de sal, concentração de conservantes e tipo de sistema de embalagem, bem como a consulta da literatura científica disponível e dos dados de investigação relativos às características de crescimento e sobrevivência dos microrganismos em questão.

Segundo este regulamento os limites aplicados têm em consideração a composição e o processo de fabrico dos alimentos, isto é, os fatores intrínsecos e extrínsecos que condicionam o desenvolvimento das bactérias. No entanto, estes limites devem estar abertos a reexame e, se necessário, serem revistos ou completados tendo em conta a evolução no domínio da segurança dos géneros alimentícios e da microbiologia alimentar, o que inclui os progressos registados na ciência, tecnologia e metodologia, as alterações de prevalência e níveis de contaminação, a evolução da população de consumidores sensíveis, bem como os eventuais resultados das avaliações de riscos (Gomes, 2007).

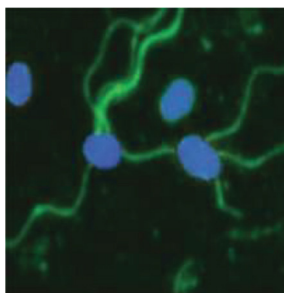
Em relação à *L. monocytogenes*, este regulamento estabelece como critério microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, que este patogénico não deva estar presente acima das 100 UFC/g durante o seu período de vida útil, quando colocado no mercado e nos alimentos em que é possível ocorrer o crescimento da bactéria, no entanto, deve estar ausente em 25 g antes do produto deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar, a menos que o produtor possa demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 UFC/g até ao fim do seu período de vida útil. No caso da *Salmonella* este regulamento estabelece como limite a sua ausência em 25g.

## **2.4. *Salmonella* spp**

### 2.4.1. Classificação

O género *Salmonella* (Fig.2.4) foi nomeado como tal em 1885 pelo médico veterinário e patologista, Salmon (Yan et al., 2003).

**Figura 2.4.** Visualização da *Salmonella Typhi* através da técnica de imunofluorescência. (Adaptado de (Baker et al., 2007)).



A classificação desta bactéria evoluiu ao longo do tempo. Historicamente, a sua classificação era baseada na epidemiologia, gama de hospedeiros, manifestações clínicas, reações bioquímicas e padrões antigénicos de superfície. De acordo com a nomenclatura mais recente, que reflete os avanços recentes em taxonomia (Grimont & Weill, 2007), o género *Salmonella* consiste de apenas duas espécies

principais: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *S. enterica* é dividida em seis subespécies, que são distinguíveis por certas características bioquímicas e pela sua susceptibilidade à lise pelo bacteriófago. Estas sub espécies são: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Para os serotipos de *S. bongori*, o símbolo V foi mantido para evitar confusão com os nomes do sorovar de *S. enterica subsp. enterica* (Quadro 2.1).

**Quadro 2.1.** Distribuição do género *Samonella* em espécies, subespécies e número de serotipos (Adaptado de (Guibourdenche et al., 2009)).

Género	Espécie	Subespécie	Número de Serotipos
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	1547
		<i>salame (II)</i>	513
		<i>arizonae (IIIa)</i>	100
		<i>diarizonae (IIIb)</i>	341
		<i>houtenae (IV)</i>	73
		<i>indica (VI)</i>	13
	<i>bongori</i>	<i>Subespécie V</i>	23
Total			2610

As estirpes de *Salmonella* são classificadas em serotipos com base na vasta diversidade dos seus antígenos de superfície, os quais são antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) em conformidade com o esquema de Kauffmann–White. Os antígenos O são designados por números árabes (1, 2, 4, etc.), enquanto os antígenos H são designados por letras minúsculas do alfabeto e por números árabes. Só existe um tipo imunológico de antígeno Vi, encontrado somente em *Salmonella typhi*, *Salmonella dublin* e *Salmonella hirschfeldii*. Os antígenos O e Vi são termorresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100° C durante duas horas. Os antígenos H são termolábeis. Para determinação do serotipo de uma *Salmonella*, os antígenos H que recobrem a célula precisam ser eliminados pelo aquecimento (Franco & Landgraf, 2004).

Os serotipos mais comuns que causam infeções em humanos e animais pertencem à subespécie *enterica*. Os serotipos das outras subespécies são mais

frequentemente encontrados em animais poiquilotérmicos e no ambiente, sendo ocasionalmente associados a doenças humanas. Alguns serotipos de subespécie *arizonae* e subespécie *diarizonae* têm sido associados com a doença em perus e ovelhas enquanto outros podem ser transportadas por anfíbios e répteis de vida livre ou em cativeiro (OIE, 2010).

Na *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, muitos serotipos são designados por um nome geralmente indicativo de doenças associadas, especificidade do hospedeiro ou origens geográficas. Algumas salmonelas clinicamente importantes como a *Salmonella typhi* foram denominadas de acordo com a doença, outras, como a *Salmonella abortusovis* foram correlacionadas com a doença e/ou animal a partir do qual foram isoladas, ou mesmo pela região geográfica onde o organismo foi isolado pela primeira vez, como a *Salmonella london* e *Salmonella panama* (Patrick & François, 2007).

#### 2.4.2. Características Taxonómicas

A *Salmonella* pertence à família das *Enterobacteriaceae* e compreende pequenos bastonetes, 0,7 a 1,5 µm por 2,5 a 5,0 µm, Gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa. São bactérias fermentadoras de açúcares com produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S e são normalmente móveis com flagelos peritricos, exceto *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum*, que são imóveis (Forshell & Wierup, 2006).

A atividade de água afeta diretamente o desenvolvimento da bactéria embora o limite mínimo seja de 0,94, as salmonelas podem sobreviver por até mais de um ano em alimentos com baixa Aw (Germano & Germano, 2008).

O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores à 4,0 são bactericidas. Dependendo da natureza do ácido utilizado para a acidificação, o pH mínimo pode subir para 5,5. O ácido acético, o ácido propiónico e o ácido butírico são mais inibitórios do que o ácido clorídrico, para um mesmo pH. As salmonelas não toleram concentrações de sal superiores a 9%. O nitrito é inibitório e o seu efeito é acentuado pelo pH ácido. A temperatura ideal para a multiplicação da *Salmonella* é 35-37° C, sendo a

mínima de 5° C e a máxima de 47° C. Porém valores máximo e mínimo dependem do serotipo (Franco & Landgraf, 2004).

#### 2.4.3. Reservatórios

A *Salmonella* localiza-se primordialmente no trato gastrointestinal das aves em geral, de mamíferos domésticos e silvestres, bem como de répteis, sem provocar, na maioria das espécies hospedeiras, manifestação de sintomas. Isto ocorre, por exemplo, com a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pollorum* e *Salmonella gallinarum* em aves e a *Salmonella choleraesuis* em suínos (Germano & Germano, 2008). Os animais de estimação são considerados os principais reservatórios de *Salmonella* do tipo *typhimurium*, *enteritidis* e *newport* (Silva, 1995). A transmissão ao homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados (Favrin et al., 2001).

As fontes mais comuns de *Salmonella* são as carnes, principalmente de frango, leite e ovos. Além destes, diversos alimentos podem ser envolvidos na transmissão, sejam eles crus, insuficientemente processados ou que sofreram contaminação cruzada, de origem animal ou vegetal (Garrick & Smith, 1994).

#### 2.4.4 Epidemiologia

Este género é certamente, o de maior relevância em alimentos, pelo número de pessoas afetadas pela salmonelose, pelas complicações e sequelas desta doença, pela quantidade e volume de produtos alimentícios contaminados e pela perda económica devido a tratamento médico ou hospitalar ou reprocessamento e destruição de alimentos (Kaku et al., 1995).

A preocupação com a sua ubiquidade e com os efeitos decorrentes da sua veiculação pelos alimentos tem extensão internacional (Pardi et al., 1995). No entanto a sua epidemiologia é muito complexa, pois a origem da contaminação dos alimentos pode ocorrer por duas vias. Por um lado, os alimentos de origem animal podem conter esses microrganismos na sua origem, animais com infeções subclínicas ou portadores assintomáticos de *Salmonella spp* podem carregar este

agente para os alimentos a que dão origem. Por outro lado, os alimentos podem ser contaminados através de equipamento, manipuladores, roedores, insetos ou até mesmo por contaminação cruzada com outros alimentos, o que é muito frequente (Picollo, 1992).

Segundo Tessari et al. (2003), os serotipos mais associados às infecções alimentares são *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. Os primeiros registos em humanos de *Salmonella enteritidis* datam de 1888 em Frankenshausen, Alemanha.

A *Salmonella typhimurium* é o serotipo mais encontrado nos alimentos no Brasil, EUA, Canada e Japão. Contudo, alguns serotipos possuem distribuição mais restrita, tais como: *Salmonella derby*, que é muito frequente no México, porém raro nos EUA; *Salmonella panama* que tem grande importância na Europa e a *Salmonella weltewreden* na Ásia (Germano & Germano, 2001).

Os hábitos alimentares influenciam a epidemiologia das salmoneloses. A preparação e o armazenamento de grandes quantidades de alimentos, manuseio e controlo inadequados, e ainda temperaturas desfavoráveis são condições que propiciam o aparecimento de contaminações deste tipo, e favorecem o processo multiplicativo da *Salmonella*. Como exemplo pode citar-se o consumo de vísceras de animais, hábito comum em determinados países (China, África do Sul, Israel), que tem causado vários surtos de salmonelose (Germano & Germano, 2001).

Outros fatores que contribuem para esse incremento são: o aumento da proporção de idosos na população e do número de pacientes crónicos e imunocomprometidos (Darwin & Miller, 1999).

Apesar da altíssima incidência de surtos de salmonelose relatados em todo o mundo (Quadro 2.2), a magnitude do problema ainda é subestimada, pois a maioria dos casos não é notificada. Como a salmonelose é uma doença auto-limitante, muitas vezes ela não é diagnosticada corretamente. Além disso, como a maioria das pessoas infetadas não procura atendimento médico, amostras clínicas nem sempre são obtidas para testes laboratoriais e muitas vezes os resultados encontrados não são comunicados aos órgãos de saúde responsáveis (Rabsch et al., 2001).

Conseqüentemente estima-se que o número de infecções não notificadas é 20 a 100 vezes maior do que as notificadas. Nos Estados Unidos, estima-se que o número de casos de salmonelose seja 38 vezes maior que o número de casos notificados (Heinitz et al., 2000).

**Quadro 2.2.** Levantamento epidemiológico de *Salmonella spp*

Ano	País	Ocorrência	Referência
1986 - 1993	Argentina	Notificaram-se 150 surtos afetando mais de 600 pessoas, sendo que 47,3% apresentaram <i>Salmonella enteritidis</i> como agente causador da toxinfecção.	(Caffer & Eiguert, 1994)
1984	Portugal	Relatou-se a frequência de Salmonelose e(Caffer & Eiguert, 1994)(Caffer & Eiguert, 1994)(Caffer & Eiguert, 1994)m 92% dos surtos.	(Bernardo & Machado, 1989)
1991 - 1994	Itália	<i>Salmonella spp</i> foi responsável por 81% dos surtos onde <i>S. enteritidis</i> estava relacionado a 34% deles.	(Scuderi et al., 1996)
1995	Brasil	Notificou-se 56 surtos causados por <i>Salmonella</i> com 3516 casos e 5 óbitos.	(Kaku et al., 1995)
1995 - 2001	Comunidade Europeia (13 países)	Relatou-se em 13 países 600 000 casos de Salmonelose humana por ano, na sua maioria causada por <i>S. enteritidis</i> e <i>S. typhymurium</i> .	(Gill et al., 2004)
1999 - 2002	Brasil	Registaram-se 878 surtos de toxinfecção alimentar, com 20471 casos, das bactérias envolvidas a <i>Salmonella spp</i> correspondeu a 25,6% dos surtos.	(Eduardo & Katsuya, 2003)
2000	Brasil	Surto causado por pão de queijo contaminado por <i>Salmonella</i>	(Sousa & Joelle, 2000)
2000	França	Surto causado pelo consumo de sanduíches contaminados por <i>Salmonella spp</i> envolvendo 34 pessoas, levando à morte de uma criança.	(Haeghebaert et al., 2000)
2000 - 2004	Brasil	Registou-se 277 surtos causados pelo consumo de ovos e maionese caseira.	(ANVISA, 2004)
2004	Inglaterra	90% dos surtos alimentares foram causados por <i>Salmonella spp</i> .	(Franco & Landgraf, 2004)
2004	EUA, Canadá e Japão	Dados relatam o aumento gradativo da incidência de Salmonelose.	(Franco & Landgraf, 2004)
2005	Estados Unidos	Infeções por <i>Salmonella</i> , resultaram em 168 000 casos, 15 000 internações, 580 mortes, com custo aproximado de 3 bilhões de dólares.	(WHO, 2013)
2007	Inglaterra e País de Gales	Dos 101 surtos alimentares analisados, a <i>Salmonella spp</i> . foi responsável por mais da metade deles.	(Hughes et al., 2007)
2008	Estados Unidos	40 000 casos de Salmonelose foram relatados, resultando em 600 mortes	(CDCPUS, 2008)

#### 2.4.5. Alimentos envolvidos

A capacidade de algumas espécies de microrganismos sobreviverem em determinados alimentos, depende não somente de suas características físicas e nutricionais, mas também de fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos como: temperatura, pH, atividade de água entre outros, como também, manipulação e armazenamento inadequado. Finstad et al. (2012) afirmaram que mais de 95% dos casos ocorridos de salmonelose foram transmitidos por consumo de alimentos impróprios ou que foram contaminados no momento de seu preparo por práticas indevidas de manuseio.

São considerados alimentos que predispõe o crescimento e/ou manutenção de *Salmonella spp* todos aqueles com alto teor de humidade e alta percentagem de proteína, como, por exemplo, produtos lácteos (leite e queijos cremosos), ovos (pudins, gemadas, licores de ovos, maioneses), carnes (de bovinos, suínos e aves) e seus derivados (Germano & Germano, 2008).

Evangelista (2001), acrescenta ainda que os alimentos expostos ao ambiente durante muito tempo, são mais vulneráveis ao crescimento de *Salmonella spp*.

A presença de *Salmonella spp*. em amostras de carne, armazenadas a 0º C e 18ºC, por 90 dias, indica que estas bactérias sobrevivem a períodos longos de armazenamento, sob baixas temperaturas. O método de conservação de carnes em baixas temperaturas não garante a eliminação de microrganismos, provenientes da contaminação acidental de carcaças (Fortuna & Franco, 2005).

As carnes de aves domésticas, as carnes bovinas e suínas mal passadas ou cruas, e ainda os churrascos ou bifés, podem ser fontes de contaminação. No caso das aves, os seus derivados e ainda os ovos podem ser considerados a principal fonte contaminante de *Salmonella spp*. O leite e seus produtos não pasteurizados também se podem transformar em inimigos, quando se fala em contaminação via alimentos (Gomes, 2009).

Produtos de origem vegetal, como verduras e frutas, podem ser contaminados durante diferentes etapas de cultivo, devido a práticas agrícolas incorretas, sobretudo as concernentes à adubação com excrementos não tratados e águas residuais (Germano & Germano, 2008).

As fontes ambientais deste microrganismo incluem entre outros, água, solo, insetos, superfícies industriais e de cozinha, fezes de animais, carnes cruas, aves e alimentos crus de origem marinha. A transmissão ocorre quando o organismo é introduzido na área de preparação dos alimentos onde encontra condições que lhe permitem multiplicar-se, como a temperatura de conservação e o modo de preparação. Pode ainda ocorrer contaminação cruzada de alimentos processados com alimentos não processados. O organismo também pode ser transmitido através do contato direto com animais infetados, em ambientes contaminados por humanos infetados ou material fecal contaminado (Viegas, 2009).

Na UE a *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* são os serotipos mais associados a doenças humanas. Os casos de *Salmonella enteritidis* são mais associados a consumo de ovos contaminados e carne de aves domésticas; enquanto o serotipo com maior prevalência, *Salmonella typhimurium* está mais associada ao consumo de carne de porco, de frango e bovina (EFSA, 2013).

#### 2.4.6. Medidas de controlo e prevenção

Considerando que a presença de *Salmonella* no produto final destinado ao consumo humano é inaceitável, são necessárias medidas gerais e/ou específicas para prevenir a contaminação dos alimentos ou controlar a multiplicação bacteriana nestes.

Das medidas de controlo e prevenção necessárias destacam-se: evitar a contaminação cruzada; assegurar um aquecimento suficiente dos alimentos, seguidos de uma refrigeração rápida quando armazenados e evitar deixá-los muito tempo à temperatura ambiente; comprovar que os manipuladores de alimentos não são portadores de *Salmonella*; controlar os roedores, pássaros e insetos nas fábricas e terrenos adjacentes; incrementar a vigilância e deteção de salmonelas sobre todos os alimentos cozidos (Fortuna & Franco, 2005).

O calor é uma forma eficiente para a destruição deste patogénico, no entanto algumas *Salmonellas* são mais resistentes que outras, por exemplo, a *Salmonella seftenberg* é 10 a 20 vezes mais resistente que os outros serotipos (Franco & Landgraf, 1996). Além do calor, a irradiação com pequenas doses de raios gama

tem sido utilizada, uma vez que elimina as *Salmonellas* dos produtos crus e rações (Hobbs & Roberts, 1998).

De acordo com Hobbs & Roberts (1998), o controle de Saúde Pública é realizado através da higiene da produção, tratamentos seguros e de armazenagem; quando a contaminação ocorre no ambiente de preparação dos alimentos, é imprescindível que seja efetuado de maneira correta a limpeza dos equipamentos, utensílios e superfícies (Cardoso & Carvalho, 2006).

Em produtos à base de carne de aves, o controle da *Salmonella* é feito através da chamada exclusão competitiva. Neste processo, impede-se que *Salmonella* colonize o trato gastrintestinal das aves ainda na fase inicial das suas vidas. Os animais recém-nascidos são submetidos a um tratamento com culturas microbianas mistas, que vão ocupar os sítios de aderência das salmonelas, excluindo-as da flora intestinal dos animais (Franco & Landgraf, 2004).

Estas medidas, aplicadas em qualquer local de manipulação de alimentos, seja em ambiente comercial ou doméstico, são de importância fundamental para a diminuição da incidência de toxinfecções alimentares.

## **2.5. *Listeria monocytogenes***

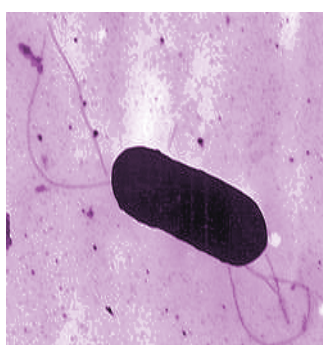
### 2.5.1. Classificação

O género *Listeria* é constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovvi*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. innocua*, baseado na homologia do ADN, homologia do rRNA 16S, propriedades quimiotaxicas e análise enzimática. Apenas as espécies hemolíticas provocam doença, sendo representadas pela *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovvi*. No entanto, só a primeira é considerada patogénica para o Homem (IFT, 2004).

*L. Monocytogenes* (Fig.2.5) foi inicialmente descoberta por Murray em 1924, sendo inicialmente denominada por *Bacterium monocytogenes* devido à monocitose apresentada por animais de laboratório experimentalmente infetados (Vazquez-Boland et al., 2001).

Em 1927, Prie estudando uma patologia em roedores na África do Sul, isolou do fígado destes animais uma bactéria a qual denominou *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao seu investigador Joseph Lister. Devido à semelhança entre as duas bactérias, estes dois pesquisadores resolveram denominar o microrganismo de *Listerella Monocytogenes*, Contudo, *Listerella* já contemplava um género protozoário, então, Prie sugeriu a mudança da nomenclatura para *Listeria monocytogenes* (Vazquez-Boland et al., 2001).

**Fig. 2.5.** *Listeria Monocytogenes* (Adaptado de Vertefeuille (2011))



A espécie *L. monocytogenes* inclui treze serovares (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7) serotificados com base em reações com antisoro de coelho, que se distinguem pelos carboidratos de superfície e antigénios flagelares (López et al., 2006; Orndorff et al., 2006).

Os serovares 4b, 1/2a e 1/2b são os agentes isolados na maioria dos casos de doença no animal e no Homem (Chaturongakul et al., 2008; López et al., 2006; OIE, 2008). São responsáveis por mais de 90% das infeções em humanos, e os mais frequentes em géneros alimentícios e locais de processamento de alimentos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

*L. monocytogenes* tem o seu genoma codificado para mais de 209 reguladores de transcrição o que lhe confere a capacidade de sobreviver e multiplicar-se em ambientes muito diferentes. Um gene deste tipo que está bem estudado é o *prfA*, este regula a expressão de diversos genes pertencentes ao grupo responsável pela virulência das espécies do género *Listeria* (Liu et al., 2004).

A capacidade de diferenciar as estirpes verdadeiramente virulentas das restantes poderia evitar a eliminação injustificada de alimentos e prevenir surtos de doença (Liu et al., 2004). No entanto, a legislação em vigor bem como a OMS, não distinguem estirpes virulentas de não virulentas, quando mencionam os riscos associados aos alimentos definem esta espécie como um todo.

### 2.5.2 Características taxonómicas

A *Listeria* é um organismo ubiqüitário que está amplamente distribuído pelo ambiente especialmente em plantas e solos (EFSA, 2012). O género é composto por bactérias, Gram-positivas, pequenas, em forma de cocos, possuindo aproximadamente 0,4-0,5 µm de diâmetro e 1-2 µm de comprimento, movimentam-se por flagelos à temperatura ambiente (FDA, 1992; Liu et al., 2007).

São bactérias anaeróbias facultativas com metabolismo fermentativo, e que se multiplicam bem em ambientes com baixa quantidade de O<sub>2</sub> e aumento na tensão de CO<sub>2</sub>, como no caso de alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (Nilsson et al., 2000).

É um microrganismo muito versátil, desenvolve-se em ambientes quentes, mas também a baixas temperaturas, incluindo as de refrigeração, sendo a sua temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37°C. Suporta altas concentrações de sal, sobrevive a grandes variações de pH (entre 4,3 e 9,4) (EFSA, 2012), tolera bem a presença de NaCl (sobrevivendo a 25,5 % de NaCl), e necessita de um mínimo de Aw de 0,932 (Liu et al., 2007).

Além destas importantes características, *L. monocytogenes* é ainda capaz de aderir a diferentes superfícies, contaminando os produtos alimentares (Autio et al., 2002), e por consequência, diferentes alimentos têm sido relatados por estarem associados com casos esporádicos e surtos de listeriose (Autio et al., 2002; Nakamura et al., 2004; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Como características bioquímicas distintivas, as espécies do género *Listeria* devem ser classificadas como catalase positiva, oxidase negativa, fermentadoras de

glicose produzindo, principalmente, ácido láctico, e não redutoras de nitrato a nitrito (Schmid et al., 2005).

### 2.5.3 Reservatórios

A *L. monocytogenes* é um microrganismo que pode colonizar e fazer parte da formação de um biofilme e, por este meio, fazer parte do meio ambiente de produção de alimentos. Os alimentos crus e materiais de produção de alimentos crus podem ser contaminados por este microrganismo. Os alimentos cozinhados podem ser recontaminados com o contacto com os alimentos crus, caixas, manipulação ou devido aos sistemas de ventilação (EFSA, 2012).

Os grandes reservatórios deste agente de infeção são o solo, a silagem e o trato gastrointestinal de animais assintomáticos, entre os quais se encontram os mamíferos, as aves, os peixes e os crustáceos. Contudo a maioria dos casos clínicos ocorrem em ruminantes, os porcos raramente desenvolvem a patologia. A maior parte das infeções em animais são subclínicas, todavia a listeriose pode manifestar-se de forma esporádica ou epidémica. Apesar do impacto económico da listeriose em animais, existe uma relação entre os animais e o seu papel como fonte de contaminação para o homem, devido à ingestão de produtos contaminados (OIE, 2008).

Alguns estudos mostram que 1 a 10% da população humana é portadora de *L. monocytogenes* ao nível intestinal (FDA, 1992).

### 2.5.4. Epidemiologia

A importância relativa da transmissão zoonótica desta patologia ao Homem ainda não está determinada, contudo, é mais relevante para a Saúde Pública a contaminação do ambiente em que se processam os alimentos (OIE, 2008).

A investigação epidemiológica demonstrou que são poucos os alimentos que não transmitem *L. monocytogenes*, a maioria dos casos são surtos e estão associados a alimentos processados (Roche et al., 2009).

A primeira associação de *L. monocytogenes* a uma doença no Homem, foi registada no Canadá em 1981, quando surgiu o primeiro surto de doença de origem alimentar que atingiu 41 pessoas e causou a morte a 15 crianças e 2 adultos, devido ao consumo de uma salada de repolho cru (Schelch et al., 1983; Slutsker & Schuchat, 1999). Um outro surto no ano de 1983, em Massachusets teve origem na ingestão de leite de vaca pasteurizado, questionando-se a eficácia da pasteurização na eliminação deste agente. A contaminação ter-se-ia dado devido a uma elevada concentração de *L. monocytogenes* no leite cru, protegida no interior das células. Estudos posteriores demonstraram que a pasteurização é eficaz a eliminar esta bactéria (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Em 1985 um grande surto com queijo *Mexican Style*, estabeleceu definitivamente a espécie de *L. monocytogenes* como agente de doença de origem alimentar. Outros surtos associados a queijo evidenciaram o perigo da utilização de leite cru na produção de queijo. Os alimentos pré-cozinhados ou prontos a consumir também constituem motivo de preocupação, pois têm ocorrido surtos de listeriose relacionados com este grupo de alimentos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

A listeriose é reportada essencialmente em países industrializados, havendo poucos ou nenhum caso reportado de África, Ásia e América do Sul. Isto tanto pode refletir diferentes padrões de consumo ou hábitos alimentares, diferente suscetibilidade dos hospedeiros, falta de meios de diagnóstico (Rocourt et al., 2000) ou mesmo por falta de informação, por não haver sistemas de vigilância implementados.

Em 2002, foi levado a cabo um estudo para avaliar a necessidade e a viabilidade de uma rede europeia que centralizasse toda a informação sobre as infeções humanas provocadas por *L. monocytogenes*. Todos os países questionados (Áustria, Alemanha, Bélgica, Dinamarca, Escócia, Espanha, Finlândia, França, Grécia, Holanda, Irlanda, Islândia, Itália, Noruega, Portugal, Reino Unido, Suécia, Suíça), exceto Portugal, tinham sistemas de vigilância da listeriose (Valk et al., 2005).

A França, Alemanha e Reino Unido apresentaram 64% do total dos casos de listeriose humana declarados em 2005 e 2006 na União Europeia. A Dinamarca e o Luxemburgo registaram as maiores incidências de listeriose, com valores iguais ou

superiores a 0,9 casos por 100 000 indivíduos no ano de 2006 (Denny & McLauchlin, 2008).

De acordo com a EFSA, em Portugal não existem dados que nos permitam avaliar a ocorrência de listeriose humana. Contudo segundo a Direção Geral de Saúde em 2010 ocorreu um surto de listeriose humana na Região de Lisboa e Vale do Tejo. Os dados compilados pela ASAE, no âmbito do PNCA, demonstram que, das 578 amostras colhidas no mesmo ano, a nível do retalho e testadas para o parâmetro *L. monocytogenes*, 15 apresentaram-se não conformes (com contagem acima de 100 UFC/g), representando uma taxa de positividade de 2,6%. Das 15 amostras positivas 7 (num total de 117 amostras) eram de queijo, 6 (num total de 196) de produtos à base de carne e 2 (num total de 81 amostras), de prato cozinhado, representando assim taxas de positividade de 5,98%, 3,06% e 2,46%, respetivamente (PITA, 2012).

#### 2.5.5. Alimentos envolvidos

Tal como já referenciado, a infeção humana por *L. monocytogenes* transmite-se principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, sendo na sua maioria: leite não pasteurizado, queijos de leite não pasteurizado, gelado e manteiga, vegetais crus, saladas insuficientemente lavados e ainda outros alimentos processados, nomeadamente de charcutaria, peixe e produtos da pesca (DGS, 2010).

A contaminação destes alimentos pode ocorrer desde a colheita ao processamento, no retalho ou no consumidor mas geralmente ocorre durante a fase de processamento do alimento na fábrica. Após a introdução de *Listeria* nas instalações esta pode persistir por um longo período de tempo (Miettinen et al., 1999; Vogel et al., 2001). *L. monocytogenes* apresenta características, referidas anteriormente, que levam à sua sobrevivência nas instalações fabris e que levam a que esta bactéria seja uma ameaça à segurança sanitária dos alimentos (Vazquez-Boland et al., 2001).

O nível de contaminação dos alimentos é ocasionalmente superior a  $10^3$  UFC/g (podendo atingir valores de  $10^7$  UFC/g em queijo), apesar de normalmente ser inferior a  $10^2$  UFC/g (Awaisheh, 2010).

O Quadro 2.3. e 2.4 apresenta a percentagem de amostras positivas em alguns alimentos em países da Europa e nos Estados Unidos da América e demonstra que a incidência de *L. monocytogenes* nos alimentos é muito variável.

**Quadro 2.3.** Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em alimentos crus em diferentes países.

Alimentos crus	Incidência (%)	Fonte
<u>Portugal</u>		
Leite (Ovelha, vaca e cabra)	2%	(Guerra et al., 2001) (Mena et al., 2004)
Carne de galinha	60%	
Peixe	12%	
<u>Espanha</u>		
Leite de cabra	2,56%	(Gaya et al., 1996)
<u>Dinamarca</u>		
Carne	30,9%	(Norrung et al., 1999)
Peixe	14,2%	
<u>USA</u>		
Caranguejo	3%	(Thimothe et al., 2002)

**Quadro 2.4.** Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo em diferentes países.

Alimentos “prontos para consumo”	Incidência (%)	Fonte
<u>Portugal</u>		
Queijo de pasta semi-dura de ovelha	44%	(Guerra et al., 2001) (Mena et al., 2004)
Produtos à base de carne	21%	
Fiambre	25%	
Queijo fresco	4%	
<u>Espanha</u>		
Salada	10,3%	(De Simon & Ferrer, 1998)
<u>Dinamarca</u>		
Salmão fumado	40%	(Jorgensen & Huss, 1998)
<u>USA</u>		
Salada embalada	0,74%	(Gombas et al., 2003)
Queijos	0,71%	

### 2.5.6 Medidas de controlo e prevenção

As medidas de prevenção e controlo existentes são eficazes quando adotadas de forma sistemática, como documentado em França e nos EUA (Estados Unidos da América), onde a incidência foi reduzida nas últimas décadas devido ao aumento da atividade regulatória, implementação de programas de autocontrolo baseados nos princípios HACCP ao longo da cadeia industrial e recomendações específicas para os grupos de alto risco (Valk et al., 2005).

A ampla distribuição de *Listeria* no ambiente facilita a sua entrada em fábricas e matadouros e as suas características (multiplicação a temperaturas de refrigeração, produção de biofilmes) ajudam a que esta consiga subsistir nas instalações por longos períodos de tempo. Assim, a sua introdução é inevitável mas a contaminação dos alimentos pode ser reduzida através de uma higiene meticulosa (Schlech, 2000).

Para eliminar este patogénico da cadeia é importante a introdução de medidas fundamentadas nas unidades fabris, assim como a respetiva monitorização (Liu, 2008). Um das principais medidas é o controlo do microrganismo nos pontos de origem da matéria-prima (Franco & Landgraf, 1996).

Outras medidas a serem tomadas no local de produção são:

- ✓ Limpeza e sanificação dos equipamentos;
- ✓ Construção da indústria de maneira a impedir a entrada de animais, poeira e insetos;
- ✓ Evitar o contato do produto final com a matéria-prima, evitando, assim, a contaminação cruzada.
- ✓ Organização pela indústria de um setor de controlo de qualidade que se aplique não somente aos parâmetros de processamento, mas também ao controle do ambiente, inclusive do pessoal (Franco & Landgraf, 1996).

Deve ser dada especial atenção à formação dos trabalhadores. Estes, além de serem potenciais fontes de entrada de microrganismos para as instalações, podem

igualmente ser responsáveis pela contaminação cruzada, quando são negligenciadas as regras básicas de manipulação dos alimentos (Liu, 2008).

A educação dos consumidores é de extrema importância para a prevenção da listeriose, principalmente dos grupos de risco. Um adequado processamento térmico dos alimentos, uma correta armazenagem de produtos refrigerados (< 5°C), uma limpeza regular dos frigoríficos e o consumo de alimentos “pronto para consumo” o mais rápido possível são algumas das recomendações. Os princípios de higiene e preparação de boa comida também desempenham um papel importante na prevenção de *Listeria* e outras infeções de origem alimentar (EFSA, 2012).

## **2.6. Análise Microbiológica de Alimentos**

Há uma série de razões que justificam a necessidade de analisar os alimentos para determinar quantitativa ou qualitativamente os microrganismos presentes. Um dos principais objetivos das análises microbiológicas é verificar que o alimento cumpra certas normas padronizadas (normas internas estabelecidas pela companhia processadora, as externas exigidas pelo comprador ou as legalmente estabelecidas), que as matérias-primas cumpram as normas pré-estabelecidas pelo produtor; que o processo de fabrico esteja sob controlo e que a higiene da linha de fabricação seja assegurada (Hayes, 1995).

Na seleção dos métodos a serem usados num laboratório é importante, portanto, usar métodos publicados como normas, sempre que estejam disponíveis. Em alguns países, os métodos são especificados na legislação e, portanto, não há escolha. Os métodos estão disponíveis nas seguintes fontes (Lightfoot & Maier, 2003):

- I. International Standards Organisation (ISO);
- II. Comissão Europeia de Normalização (CEN);
- III. International Dairy Federation (IDF);
- IV. Association of Official Analytical Chemists (AOAC);

## V. Organismos de normalização de cada país.

### 2.6.1. Método Padrão

A detecção de *Salmonella spp* e *L. monocytogenes* em alimentos é frequentemente realizada pelos métodos convencionais, chamados métodos padrão, que foram desenvolvidos para a detecção de ambas as bactérias em situações desfavoráveis, como é o caso de alimentos nos quais as células bacterianas se encontrem em numero muito reduzido e/ou danificadas pelo processo de preservação, como aplicação de calor, de congelamento ou de secagem (Giombelli, 2000; Silva et al., 1997).

As técnicas convencionais para detecção de *Salmonella spp* e *Listeria spp* em alimentos, embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e na forma de preparação das amostras envolvem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos, e identificação completa das colónias por meio de testes bioquímicos e sorológicos (Reis et al., 2002).

O pré-enriquecimento em caldo não seletivo permite a recuperação de células danificadas por incubação da amostra por um período mínimo de 18 horas a 35-37°C. Vários meios podem ser utilizados nesta etapa, recomendados por órgãos nacionais e internacionais (AOAC, 2002).

A etapa de enriquecimento em caldo seletivo tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação do número de microrganismos, inoculando-se o pré-enriquecimento em caldo seletivo por 18 a 24 horas em temperaturas recomendadas para o caldo utilizado. É recomendado a utilização de, no mínimo, dois tipos de caldos seletivos, pois a resistência destes microrganismos varia de estirpe para estirpe. A eficácia do isolamento depende da interação entre meios de enriquecimento seletivo, temperatura e tempo de incubação (AOAC, 2002; Silva et al., 1997).

O plaqueamento seletivo e diferencial tem como objetivo o desenvolvimento preferencial de unidades formadoras de colónias (UFC) com características típicas para posterior confirmação sorológica e bioquímica (AOAC, 2002; Silva et al., 1997).

A primeira confirmação é realizada com o objetivo de se verificar se as colónias típicas desenvolvidas na placa são realmente as bactérias pesquisadas (AOAC, 2002; Silva et al., 1997).

A segunda confirmação é efetuada através de provas bioquímicas e sorológicas utilizadas para a identificação da espécie (Fortuna & Franco, 2005).

Embora esta metodologia padrão continue a ser o padrão de referência, apresenta uma sensibilidade limitada, já que requer que os caldos de enriquecimento contenham um número de células viáveis suficiente para permitir seu isolamento (Chaicumpa et al., 1995). Além disso, outras bactérias que crescem nos meios seletivos podem apresentar colónias com características semelhantes e prejudicar o seu isolamento e identificação (Rambach, 1990).

Outras limitações da metodologia normalizada dizem respeito ao crescente número de serotipos destes patogénicos que apresentam reações bioquímicas atípicas, como a fermentação de lactose (Fach et al., 1999), e o desenvolvimento de colónias com morfologia diferente das descritas na literatura. Também os efeitos debilitantes da exposição destes patogénicos à dessecação, radiação, baixas temperaturas e preservação pelo calor ou agentes químicos, durante o processamento dos alimentos, e a limitação de nutrientes podem resultar em células viáveis não cultiváveis, limitando a fiabilidade de métodos biológicos (Doran et al., 1994).

Assim, devido às limitações da metodologia normalizada mencionadas e, principalmente, devido ao longo período de tempo requerido para a deteção, diversos métodos foram propostos nos últimos anos (Blackburn, 1993; Swaminathan & Feng, 1994).

### 2.6.2. Métodos Rápidos

Existem vários fatores que devem ser considerados antes de se adaptar um novo método rápido (Fung, 1995; Swaminathan & Feng, 1994):

1. **Exatidão.** Os resultados falsos-positivos ou falsos-negativos devem ser minimizados e preferencialmente inexistentes. O método de detecção deve ser o mais sensível possível e o limite de detecção o mais baixo possível.
2. **Validação.** Os métodos rápidos de análises devem ser validados utilizando técnicas “standard” e avaliando estudos de colaboração. Estes estudos devem realizar-se preferencialmente em amostras de alimentos contaminadas artificialmente. Nos E.U.A. a avaliação pela AOAC Internacional tem uma ampla aceitação. Em França a AFNOR tem uma posição similar. Para tratar estes aspetos na União Europeia foi iniciado o Projeto Europeu MICROVAL.
3. **Rapidez.** Os métodos rápidos de detecção de patogénicos e toxinas deverão oferecer resultados precisos em poucas horas ou num dia. No entanto, muitos métodos de detecção necessitam de um enriquecimento da amostra, já que necessitam de um mínimo de  $10^4$ - $10^5$  organismos/ml para darem resultados fidedignos.
4. **Automatização.** A capacidade de analisar muitas amostras ao mesmo tempo é imprescindível nos métodos rápidos, no entanto também é importante a possibilidade de formatos mais simples para o uso em laboratórios pequenos.
5. **Matriz das amostras.** Os novos métodos devem funcionar bem para as diferentes matrizes a analisar. A microflora acompanhante, os componentes da matriz, etc. podem interferir com o método e invalidar o resultado.
6. **Custos.** O financiamento inicial dos métodos rápidos pode ser elevado, porque muitos sistemas requerem instrumentos caros.
7. **Simplicidade.** Os métodos devem ser fáceis de realizar e manipular.
8. **Disponibilidade.** O fornecimento deve ser rápido.

**9. Suporte técnico.** A formação, o serviço técnico e o acompanhamento por parte da companhia que desenvolveu o método são essenciais.

**10. Necessidade de espaço.** Os instrumentos devem ser preferencialmente compactos e pequenos.

Dos métodos existentes para detecção rápida de *Salmonella spp* e *L. monocytogenes*, destacam-se os testes imunológicos e moleculares.

#### a) Testes imunológicos

Um dos testes imunológicos mais utilizado é o da aglutinação. A reação de aglutinação caracteriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinados antigénios na sua superfície. A aglutinação pode ocorrer tanto com partículas que apresentam determinados antigénios naturais na sua superfície (hemácias, bactérias, protozoários, etc.) como com partículas inertes (partículas de látex, poliestireno, bentonite, etc.), ou mesmo com células antigenicamente não relacionadas (hemácias, bactérias) às quais se adsorvem ou se fixam antigénios solúveis. No primeiro caso, a reação é dita aglutinação direta, e no segundo, aglutinação indireta ou passiva (Ferreira & Ávila, 1996). Este teste é um indicador altamente específico e pode ser efetuado numa lâmina, em tubos ou numa placa com micro poços. A aglutinação em tubos é normalmente mais sensível do que em lâmina, porque requer um período de incubação mais longo, permitindo que haja uma maior interação entre o antigénio e o anticorpo. As placas com micro poços podem ser usadas para reduzir o volume do anticorpo usado (HPA, 2011).

As suspensões bacterianas padronizadas e os anticorpos podem ser obtidos comercialmente, em testes de aglutinação látex. Estes testes são preferidos pela sua simplicidade, especificidade e sensibilidade (Resende & Franco, 2001). As partículas de látex são esferas de poliestireno que podem ser utilizadas como suportes na adsorção de proteína solúvel e antigénios polissacáridos, funcionando como sistema indicador da reação antigénio-anticorpo (Ferreira & Ávila, 1996).

Entre as técnicas imunológicas, baseadas nas reações antigénio-anticorpo, destacam-se as imuno-enzimáticas que utilizam anticorpos marcados com uma enzima cromogénica. As técnicas imuno-enzimáticas podem utilizar anticorpos policlonais e também monoclonais que são capazes de detetar muitos dos serotipos associados à infeção humana (Reis et al., 2001).

O primeiro ensaio imuno-enzimático foi relatado em 1977 com a necessidade de abreviar o tempo necessário para obter os resultados analíticos da *Salmonella* e melhorar a produtividade laboratorial (Beumer et al., 1991; Franco & Landgraf, 1996). Os ensaios imuno-enzimáticos utilizados em técnicas de triagem podem contribuir para acelerar e simplificar a deteção de diversos tipos de patogénicos em alimentos (AOAC, 2002) e são muito utilizados por apresentarem diversas vantagens: simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem (Franco & Landgraf, 1996).

Os ensaios imuno-enzimáticos do tipo ELISA são muito utilizados, em função das vantagens que proporcionam (Chart et al., 1998; Johnson & Van Emon, 1996). O princípio básico deste teste é a imobilização de um dos reagentes numa fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo. O teste deteta quantidades extremamente pequenas de antigénios ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. Dependendo do substrato enzimático utilizado, a formação do produto poderá ser acompanhada de produção de cor, luz ou fluorescência (Ferreira & Ávila, 1996).

Vários sistemas reagentes de ELISA têm sido utilizados para deteção de *Salmonella spp* e *L. monocytogenes*. Estes geralmente requerem que o microrganismo alvo esteja numa concentração  $10^6$  UFC/mL, apesar de alguns testes relatarem um limite de sensibilidade de  $10^4$  UFC/ml (Forsythe, 2002). Tal requerimento justifica as etapas de pré-enriquecimento seletivo utilizadas nas metodologias.

Um dos sistemas validado pela AOAC, para ambas as deteções, *Salmonella spp* e *L. monocytogenes* foi o sistema mini-VIDAS. Em comparação com métodos tradicionais, o tempo de ensaio é reduzido em até 2 dias e a análise estatística dos

dados indica que não há diferença significativa entre eles. A essas vantagens aliam-se outras como: maior sensibilidade e especificidade, comparadas aos métodos convencionais. O maior problema referido com o método é a ocorrência de resultados falso-positivos ou falso-negativos. Resultados falso-positivos de ELISA podem ser eliminados usando combinações de anticorpos monoclonais de alta especificidade (AOAC, 2002; Franco & Landgraf, 1996).

Historicamente, o sistema Vidas foi validado pela AFNOR, em 17 de Junho de 1994 como um método de análise rápida para todos os produtos para a alimentação humana. Esta validação foi obtida de acordo com o método de referência descrito em França NF EN ISO 11290-1 padrão (2004). O método também foi validado como método oficial N<sup>o</sup> 999,06 pela AOAC, em maio de 1999.

O método Vidas consiste num sistema de análise qualitativa imuno-enzimática automatizada que utiliza pela técnica ELFA uma mistura de anticorpos monoclonais de captura com grande especificidade para deteção de antigénios (estirpes moveis e imóveis) nos produtos alimentares e nas amostras ambientais. Todas as etapas do teste são executadas automaticamente utilizando galerias plásticas descartáveis, constituídas por compartimentos contendo os reagentes necessários para o teste. A leitura e interpretação dos resultados também são automáticas (AOAC, 2002; Reis et al., 2001).

#### b) Testes moleculares

Dentro dos métodos moleculares, a PCR é uma ótima alternativa para uma deteção rápida, sensível e específica. Vários procedimentos e múltiplas combinações da PCR foram desenvolvidos e usados por vários investigadores para a pesquisa patogénicos (Fields et al., 1997; Meng et al., 1997).

A elevada sensibilidade da PCR permite que as sequências alvo sejam detetadas mesmo quando presentes em baixas concentrações, permitindo a deteção de populações bacterianas pequenas dentro de uma microbiota complexa. Embora a reação da PCR seja capaz de amplificar a sequência de ADN alvo a partir de um único organismo, um volume extremamente pequeno (1 a 10 µl) de amostra de

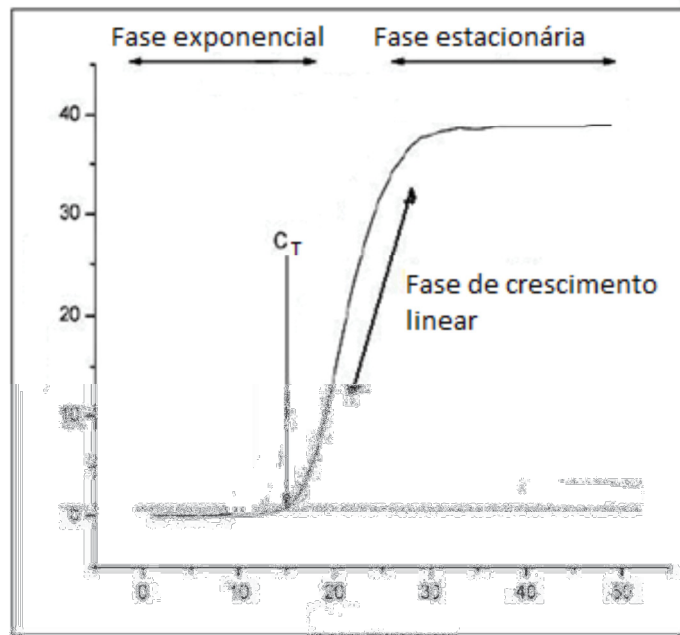
ADN utilizado na reação restringe o limite de detecção da PCR em, aproximadamente  $10^2$  ou  $10^3$  células/ml (Sharma & Carlson, 2000).

Apesar da alta sensibilidade da PCR, são necessárias etapas de enriquecimento para aumentar o número de células a nível detetável. Em acréscimo, estes enriquecimentos antes da PCR auxiliam na recuperação de células danificadas aumentando o seu número em relação à concentração de inibidores, diluem células mortas e substâncias inibidoras para a reação que possam estar presentes na matriz da amostra, aumentam a probabilidade de detecção de células vivas e possibilitam o isolamento do organismo alvo para testes complementares (Sharma & Carlson, 2000). Assim, a necessidade de monitorizar em simultâneo a quantidade e qualidade do ADN amplificado levou ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR convencional: a PCR em tempo real.

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR ou RTq-PCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores. Montaram um sistema ao qual acoplaram uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitia-lhes detetar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação de brometo de etídio às moléculas de ADN de dupla cadeia recém-sintetizadas (Higuchi et al., 1993).

O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do ADN amplificado, em cada ciclo de amplificação. Assim, apresenta as três fases características da PCR: a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. A primeira fase é bastante específica e precisa. Na fase de crescimento linear os produtos da reação são consumidos e iniciam o processo de degradação. A fase estacionária corresponde ao final da análise devido ao elevado nível de degradação dos produtos da PCR. Os compostos fluorescentes adicionados ao ADN geram um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases e que podem ser representados graficamente como demonstrado na Figura 2.6. (Higuchi et al., 1993).

**Figura 2.6.** Representação gráfica das fases da PCR em tempo real (Adaptado de (Kubista M, 2006).



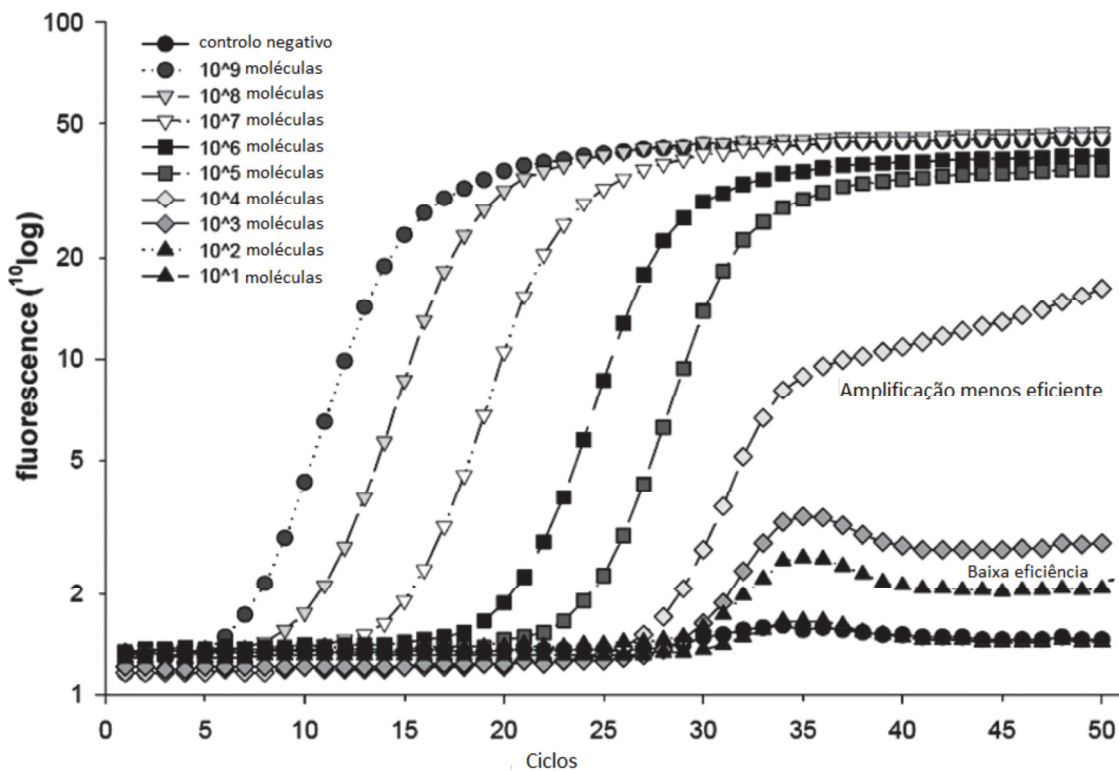
A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se estudar a reação devido à elevada eficiência registrada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do *input* de ADN é mais consistente. Por este motivo os dados de fluorescência são geralmente recolhidos desde o início do processo de amplificação. A interpretação dos resultados obtidos pelos equipamentos obriga a que se definam conceitos específicos, como “baseline”, ponto CT e “threshold” (Heid et al., 1996; Kubista M, 2006; Mackay et al., 2007; Pelt-Verkuil et al., 2008).

A “baseline” corresponde ao limiar mínimo de deteção de fluorescência do instrumento sendo considerado “ruído de fundo” do equipamento. O ponto CT, denominado na literatura como “cycle threshold”, corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável. Trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detetada ultrapassa o limiar da fase exponencial, conhecido também na literatura como “threshold”, definido automática e arbitrariamente pelo software do equipamento em função da “baseline”. O valor mínimo de CT é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação, o que significa que um menor número de moléculas

inicialmente representa um maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à “baseline” (Heid et al., 1996; Kubista M, 2006; Mackay et al., 2007; Pelt-Verkuil et al., 2008).

Na maioria dos protocolos da qPCR, o valor CT varia entre 17 ciclos (aproximadamente 10 milhões de moléculas iniciais) e 37 ciclos (aproximadamente 1 molécula inicial) como é demonstrado na Figura 2.7 (Pelt-Verkuil et al., 2008).

**Figura 2.7.** Representação gráfica dos resultados da amplificação em tempo real em função de diferentes teores de moléculas de ADN iniciais (Adaptado de Pelt-Verkuil et al. (2008)).



A eficiência da amplificação é fundamental para o sucesso da técnica. Esta deve variar idealmente entre os 90% e 100% ( $-3,6 > \text{declive} > -3,1$ ). A eficiência da amplificação pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o comprimento da ampliação, existência de estruturas secundárias na amostra, qualidade dos “primers” usados, procedimentos laboratoriais incorretos, presença ou utilização de inibidores da PCR (hemoglobina, ureia, heparina, glicogénio, gorduras, iões cálcio, etc.), presença ou utilização de promotores da PCR (glicerol, DMSO, BSA, proteína

gene 32, *Taq Extender*, *E.coli ss DNA binding*), entre outros (Pelt-Verkuil et al., 2008).

O sucesso desta técnica rapidamente levou ao seu aperfeiçoamento. Para tal contribuíram, por exemplo, o desenvolvimento de sondas de oligonucleótidos de dupla-hélice projetadas para unir o fragmento replicado do ADN, no caso da microbiologia de alimentos para "detetar" uma sequência característica do patogénico desejado (Borges et al., 2006), e a descoberta de que a "*Taq* polimerase" possui atividade exonuclease 5"-3". Na última década diversas plataformas de instrumentação foram criadas e comercializadas, no entanto, a maioria é composta por um termociclador, com sistema ótico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com *software* próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (Mackay et al., 2007).

Métodos validados de PCR estão disponíveis na Bio-Rad, Roche, QualiconOxoid, Genesystems, AES Chemunex, Applied BioSystems, Idaho Technology Inc., Lantmännen, IEH Laboratories and Consulting Group, ADNucleis e BioControl systems. A validação é um passo importante no processo de padronização de um método porque fornece evidências que o novo método dá resultados semelhantes e está de acordo com o atualmente utilizado na referência (Patel et al., 2006).

São vários os problemas associados aos métodos de amplificação de ácidos nucleicos (Anexo 1). Uma das maiores dificuldades da PCR convencional e da qPCR em Microbiologia Alimentar é a presença de compostos que inibem a reação da PCR. Estes compostos podem contaminar os modelos de ADN extraídos de amostras de alimentos e por sua vez, podem gerar resultados falso-negativos (Elizaquível & Aznar., 2008). Portanto, a avaliação e eliminação de compostos inibitórios de PCR são passos importantes no desenvolvimento da PCR clássica e da qPCR (Abu Al-Soud & Radstrom, 2000).

|3| MATERIAL E MÉTODOS

### **3.1. Caracterização da Amostra**

Os alimentos mais frequentemente associados aos casos de salmonelose são as carnes e derivados enquanto que os produtos da pesca, queijos e linguiças contaminados com *Listeria monocytogenes* estão associados aos casos de listeriose. Neste sentido, o Regulamento 2073/2005 (versão consolidada) (2005b) determina a pesquisa de *Salmonella* spp. em carnes e derivados (Anexo 2) e de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo (Anexo 3). No âmbito deste estudo, utilizaram-se duas matrizes de alimentos: queijo curado para a pesquisa de *L. monocytogenes* e carnes e derivados para a pesquisa de *Salmonella* spp.

As amostras foram recebidas como amostras cegas e analisadas no LRV no âmbito do Controlo Oficial dos estabelecimentos de Alimentos de Origem Animal.

Selecionaram-se para o presente estudo amostras que deram resultados negativos para a pesquisa de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes*: 20 amostras de carnes e derivados, sendo 5 de carne moída, 9 de fumados, 4 de enchidos, 2 amostras de entremeada e 15 amostras de queijo curado. As amostras foram contaminadas experimentalmente de acordo com as figuras 3.1. e 3.2..

Foram ainda analisadas 20 amostras de queijo sem qualquer análise prévia.

### **3.2. Culturas microbianas**

Foram utilizadas duas estripes de referência, *Salmonella* *Tiphymurium* ATCC14028 (Microbiologics) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Microbiologics). As estirpes foram reconstituídas no meio de cultura “Sheep Blood Agar (Oxoid CM0854) suplementado com 7% de sangue de carneiro, incubaram a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foram suspensas no meio “Skim Milk”, divididas em alíquotas e conservadas a – 70°C até à sua utilização (segundo as instruções do fabricante, Microbiologics).

Aquando da sua utilização, a cultura foi inoculada no meio de “Brain Heart Infusion Broth” (Oxoid CM1135) e foi a incubar durante 24 horas a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, foi realizada uma contagem de cada uma das culturas, tendo-se

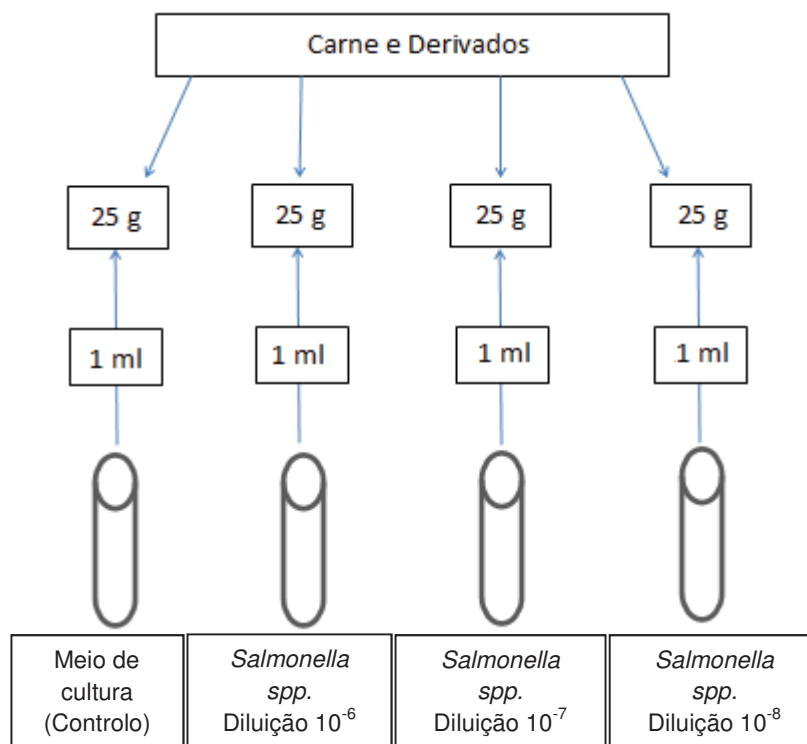
obtido  $6,8 \times 10^8$  UFC/ml na contagem de *Salmonella typhimurium* e  $2,4 \times 10^8$  UFC/ml na contagem de *L. monocytogenes*.

### 3.3. Contaminação das amostras

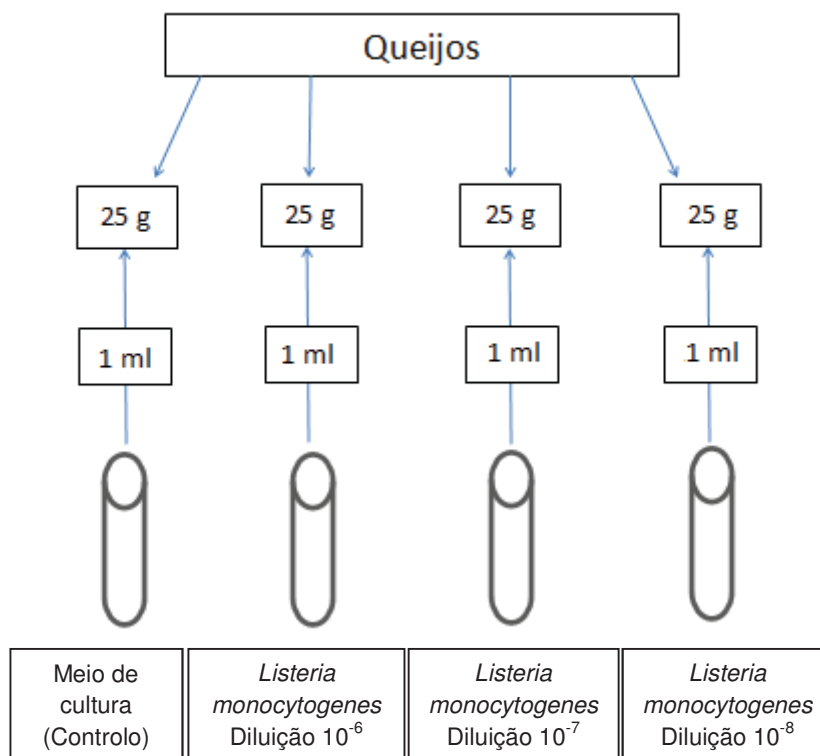
Uma vez que um dos objetivos do presente trabalho era determinar o limite de detecção relativo do método em estudo, foram realizadas diluições seriadas de forma a obter concentrações de 1 UFC/ml ( $10^{-8}$ ), 10 UFC/ml ( $10^{-7}$ ) e 100 UFC/ml ( $10^{-6}$ ) UFC/ml, após o que se procedeu à contaminação das amostras. Estas concentrações foram verificadas pela realização de uma contagem dos inóculos utilizados.

Pesaram-se, em condições de assépsia, 4 tomas de 25 g de cada amostra para sacos stomacker esterilizados. Numa toma foi adicionado 1 ml de meio de cultura estéril (controlo negativo), às restantes três tomas, foi adicionado 1 ml da cultura de trabalho, cada uma com 1 nível de contaminação diferente (Figura 3.1 e 3.2).

**Figura 3.1.** Preparação das amostras de carne e derivados para pesquisa de *Salmonella*



**Figura 3.2.** Preparação das amostras de queijo para pesquisa de *L. monocytogenes*.



### 3.4. Pesquisa de *Salmonella spp*

A pesquisa de *Salmonella spp.* em carnes e derivados, foi feita pelo método de referência descrito na ISO 6579:2002- "Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*" (Anexo 4) e por meio da qPCR, utilizando o Kit da Applied Biosystems "MicroSeq *Salmonella spp* Detection Kit.

#### 3.4.1. Pré-enriquecimento em caldo não seletivo

O pré-enriquecimento em caldo não seletivo é comum a ambos os métodos. Adicionou-se a cada uma das amostras analisadas, 225 mL de água peptonada (Oxoid CM509). Homogeneizou-se as suspensões durante 1 minuto no stomacker (8 batimentos por segundo) e incubou-se a 37°C +/- 1°C durante 18 +/- 2 h.

### 3.4.2. Pesquisa de *Salmonella spp* pelo Método Padrão

A pesquisa de *Salmonella* pelo método de referência, exige mais 3 etapas extra em relação ao pré-enriquecimento em caldo não selectivo; enriquecimento seletivo em meios líquidos, plaqueamento e identificação e confirmação.

O enriquecimento seletivo em meios líquidos foi feito em Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) (BioMérieux) e Muller Kauffmann with Tetrathionate and novobiocin MKTTn (Bio-Rad). O caldo RVS incubou a 41,5 °C +/- 1°C durante 24 +/- 3 horas e o caldo MKTTn incubou a 37°C +/- 1°C durante 24 +/- 3 horas.

Para a identificação a ISO recomenda a utilização do meio de cultura Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD agar) (Oxoid) e outro meio seletivo, complementar ao XLD agar que seja apropriado para o isolamento das salmonelas lactose positivas. A escolha do mesmo é da responsabilidade dos laboratórios. Neste trabalho foi utilizado o meio de cultura seletivo Rapid Salmonella (Bio-Rad). Este é um meio cromogénico que permite um bom crescimento e diferenciação das colónias características de salmonela e está validado pela AFNOR (Nº BRD 07/11-12/05) e pela AOAC-RI (Nº. 050701). Tem como principais vantagens o fato de ser de fácil preparação, permitir a clara diferenciação das colónias e detetar as salmonelas móveis e as lactose positivas. Os meios de cultura seletivos utilizados foram a incubar a 37°C +/- 1°C durante 24 +/- 2 horas.

Após o período de incubação foi verificado o eventual desenvolvimento de colónias típicas e atípicas de *Salmonella spp*. No meio de cultura Rapid' Salmonella Agar, as colónias típicas apresentam-se magentas. No meio XLD Agar as colónias apresentam-se com o centro negro e com um halo de cor vermelha devido à mudança de cor pelo indicador, contudo, neste meio as variantes de salmonela H<sub>2</sub>S negativas (Ex: *S. paratyphi* A) são rosa com o centro rosa escuro. As *Salmonellas* lactose positivas crescem de cor amarela com ou sem escurecimento.

Foram realizadas subculturas das colónias características de *Salmonella spp* no meio de cultura Agar nutritivo (Oxoid), para utilização das colónias nos testes de confirmação bioquímicos e serológicos.

A confirmação bioquímica da *Salmonella spp* foi efetuada pelo teste do Triple Sugar Iron Agar (Oxoid); da Ureia Agar Base (Difco) e pelo ID 32 E (bioMérieux Ref<sup>a</sup> 32400), cujo procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A realização dos testes (TSI e Ureia) funciona como um método de triagem na pesquisa de salmonela, reduzindo deste modo a utilização das galerias de ID32E, no caso do teste de ureia ser positivo.

As galerias ID 32E permitem a realização de testes de identificação em 18/24 horas. São constituídas por 32 microtubos de testes bioquímicos padronizados e miniaturizados. Os microtubos são inoculados com uma suspensão bacteriana, com densidade ótima adequada (0,5 Mcfarland), que reconstitui os meios reacionais. As reações produzidas durante o período de incubação a 37°C traduzem-se por alterações da cor do meio ou reveladas após adição de reagentes específicos. Estes testes estão associados a bases de dados extensivas, armazenadas no programa do aparelho Mini Api (bioMérieux). Estas bases de dados são regularmente atualizadas, em função da evolução dos conhecimentos na área da identificação bacteriana a nível internacional.

A confirmação Serológica foi realizada com o “Antiserum Salmonella Group Poly A-I & Vi” Ref<sup>a</sup> 222641 da BD-Difco.

### **3.4.3. Pesquisa de *Salmonella spp* por PCR em tempo real**

Em paralelo ao procedimento padrão, foi executado o Kit “MicroSeq *Salmonella spp*. Detection Kit” da Applied Biosystems, segundo as instruções do fabricante.

Após o pré-enriquecimento recolheu-se 750 µl do sobrenadante e transferiu-se para uma coluna de filtração inserida num tubo tipo eppendorf, com o objetivo de filtrar a amostra. Centrifugou-se o filtrado durante 3 min a 13 000 x g. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de tampão de lise ao pellet, ressuspendeu-se o sedimento por pipetagem, seguiu-se uma incubação a 95°C por 10 min. Após este tempo, centrifugou-se por 1 min a 13 000 x g, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o ADN em 250 µL de água. Pipetou-se 30 µL para os tubos contendo o reagente liofilizado. Após uma centrifugação a 2 000 x g, durante 2 minutos, colocaram-se cuidadosamente as tiras contendo as amostras no

termociclador de qPCR e introduziu-se as variáveis da corrida no software (temperaturas e tempos de cada um dos passos e o nº de ciclos) (Quadro 3.1). A desnaturação, hibridação/extensão ocorrem durante a corrida no termociclador de qPCR (7500 Fast – Applied Biosystems).

**Quadro 3.1.** Etapas da corrida no termociclador de PCR em tempo real para o Kit “MicroSeq Salmonella Detection Kit”. Adaptado de Applied Biosystems (2009)

Passos	Activação da enzima	PCR	
		Ciclos (40 ciclos)	
		Desnaturação	Hibridação/Extensão
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C
Tempo	2 min.	3 seg.	30 seg.

Por último analisou-se os resultados. Todos os positivos ou suspeitos positivos resultantes deste procedimento devem ser confirmados através da inoculação no meio Rapid Salmonella e dos testes de confirmação indicados pela ISO 6579:2002.

### 3.5. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* nos queijos curados, foi realizada de acordo com a ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 1: Detection method” (Anexo 5), como método normalizado e por qPCR, como método alternativo.

#### 3.5.1. Enriquecimento Primário

O enriquecimento primário foi comum a ambos os métodos, tendo-se para o efeito adicionado a cada uma das amostras analisadas (25g), 225 mL do meio “Half Fraser” (Oxoid CM0895 e Sr0166). Homogeneizou-se as suspensões durante 1 minuto no stomacker e incubou-se a 30°C +/- 1°C durante 24 h +/- 2 h.

### 3.5.2. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* pelo Método Padrão

Tal como na pesquisa de *Salmonella spp*, para a pesquisa de *L. monocytogenes* pelo método padrão são necessárias, para além do enriquecimento primário, mais 3 etapas.

O enriquecimento secundário agora em meio seletivo - “Fraser Broh Base” Oxoid CM0895 e Sr0156) que incubou a 37°C +/- 1°C durante 48 horas +/- 2 h.

Para a identificação a ISO recomenda a utilização do meio de cultura Agar Listeria (BioRad) e outro meio seletivo, complementar ao Agar Listeria e que seja apropriado para o isolamento da *L. monocytogenes*. Neste trabalho foi utilizado o meio de cultura selectivo “Rapid L’mono” (356 4043 Bio-Rad), que está validado pela AFNOR (Nº BRD 07/05 - 09/01) e pela AOAC-RI (Nº. 030406). Tem a vantagem de além de ser de fácil preparação, inibir a maioria da flora interferente (bactérias Gram-negativas e positivas, leveduras e bolores). Os meios utilizados incubaram a 37°C +/- 1°C durante 24 horas seguidas de mais 18 a 24 horas, quando não existe crescimento ao fim de 24 horas de incubação.

Após o período de incubação, foi verificado o eventual desenvolvimento de colónias típicas de *L. monocytogenes*.

No meio de cultura Agar Listeria, as colónias típicas apresentam-se azuis esverdeadas rodeadas por um halo opaco. No meio Rapid L’ mono as colónias apresentam-se com a cor azul.

A confirmação bioquímica da *L. monocytogenes* foi efetuada pelo teste da hemólise, da catalase e pelo Api Listeria (bioMérieux 10300), cujo procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Os testes de hemólise e catalase são indicados pela ISO 11290-1 e não são contemplados pelo API Listeria. Estes dois testes servem de triagem na pesquisa de *L. monocytogenes*, o teste de catalase porque todas as *Listerias* são catalase positivas e o teste da hemólise porque permite diferenciar, apenas as espécies *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* são produtoras de  $\beta$ -hemólise.

O API Listeria é um dos sistemas capaz de identificar todas as espécies de *Listeria*, incluindo *L. monocytogenes*. As galerias são compostas por 10 microtubos que contêm os substratos desidratados e permitem a realização de testes enzimáticos e fermentações de açúcares. A leitura destas galerias é feita visualmente e a identificação foi feita de forma automática utilizando o aparelho de leitura (Mini API) da bioMérieux.

### **3.5.3. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* por PCR em tempo real**

Em paralelo ao procedimento normalizado, foi executado o Kit “MicroSeq *Listeria monocytogenes* Detection Kit” juntamente com o “PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit” da Applied Biosystems, segundo as instruções do fabricante. O “PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit” é recomendado na análise de alimentos com um alto teor lipídico e na detecção de bactérias de lise difícil, como a *Listeria spp.*

Após o pré-enriquecimento recolheu-se 750 µl do sobrenadante e transferiu-se para uma coluna de filtração inserida num tubo tipo eppendorf, com o objectivo de filtrar a amostra. Centrifugou-se o filtrado durante 3 min a 13 000 x g. Decorrido o tempo de centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de água esterilizada ao pellet.

Para facilitar a lise das bactérias que tem uma lise difícil e para alimentos com elevado teor de lípidos antes do tampão de lise fez-se um rebentamento mecânico das células tendo-se utilizado Zirconium do “PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit”. Para o efeito transferiu-se a suspensão obtida para um tubo de 1,5 ml contendo Zirconium. Centrifugou-se novamente durante 3 min a 13 000 x g. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de tampão de lise ao pellet, ressuspendeu-se o sedimento por pipetagem, seguindo-se uma incubação a 95 °C por 10 min. Após este período de tempo, centrifugou-se por 1 min a 13 000 x g, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o ADN em 250 µL de água.

Pipetou-se 30 µL para os tubos contendo o reagente liofilizado. Após uma centrifugação a 2 000 x g, durante 2 minutos, colocaram-se cuidadosamente as tiras contendo as amostras no termociclador de qPCR e introduziu-se as variáveis da

corrida no software (temperaturas e tempos de cada um dos passos e o nº de ciclos) (Quadro 3.1). A desnaturação, hibridação/extensão ocorrem durante a corrida no termociclador de qPCR (7500 Fast – Applied Biosystems).

Por último analisou-se os resultados. Neste sistema de detecção de agentes patogénicos da ® MicroSEQ para amostras alimentares, é recomendado, para confirmar o resultado, a execução das culturas e os métodos de confirmação indicados pela ISO 11290-1:1996 Amend. 1:2004, sempre que o resultado seja positivo ou duvidoso.

### **3.6. Análise Estatística**

A EN/ISO 16140 (2003) preconiza que para uma comparação de métodos, sejam analisadas 60 amostras por tipo de alimentos, incluindo alimentos com contaminação natural e experimental, devendo ser feita a análise estatística para determinar os seguintes parâmetros: Concordância relativa, Sensibilidade Relativa, Especificidade Relativa e Limite de deteção relativo.

a) Concordância relativa: Grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo em amostras idênticas;

b) Desvio Positivo (NP): O método alternativo indica um falso positivo quando tem um desvio positivo, ou seja, quando tem um resultado positivo enquanto o método de referência indica um resultado negativo;

c) Desvio Negativo (PN): O método alternativo indica um desvio negativo se este dá um resultado negativo enquanto o método de referência dá um resultado positivo;

d) Sensibilidade relativa: Capacidade do método alternativo para detetar o alvo quando ele é detetado pelo método de referência;

e) Especificidade relativa: Capacidade do método alternativo de não detetar o alvo quando ele não é detetado pelo método de referência.

A análise destes parâmetros foi realizada segundo o teste não paramétrico de McNemar. Segundo Siegel (1956), o cálculo  $(|PN - NP| - 1)^2 / (PN + NP) = x^2$  será significativo para  $p=0,05$  quando  $x^2 > 3,84$ .

O Limite de detecção relativo é avaliado pelo número mínimo de microrganismo cultivável que pode ser detetado em 50% das ocasiões, pelo método alternativo e pelo método padrão. É calculado utilizando o teste exacto de Fisher.



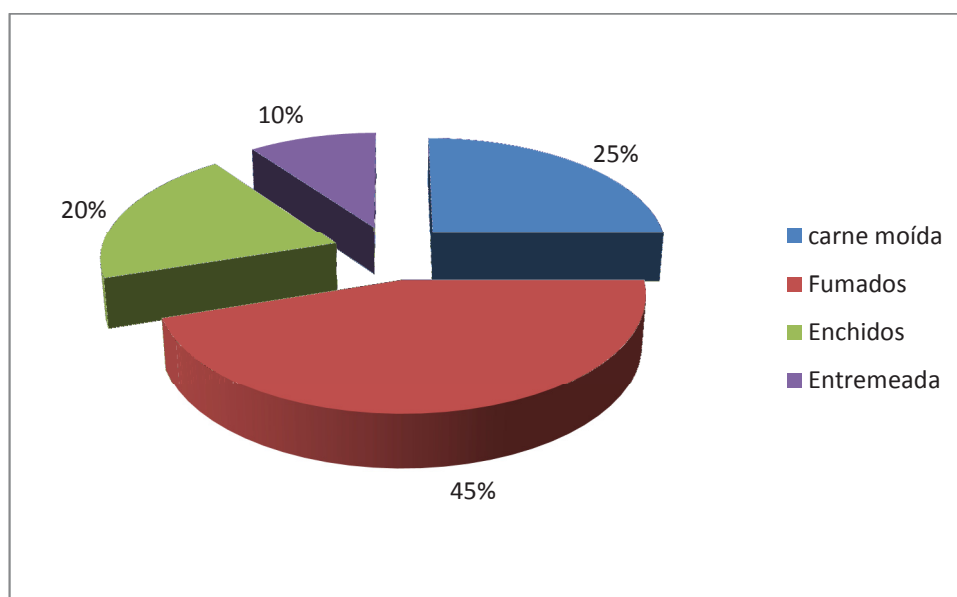
## 141 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

#### 4.1. Pesquisa de *Salmonella spp* em carne e derivados

Foram analisadas 20 amostras de carnes e derivados, para pesquisa de *Salmonella spp*. As amostras foram contaminadas com três níveis diferentes de inóculo, com o objetivo de conhecer o nível de detecção de cada um dos métodos utilizados (Anexo 6).

A maior percentagem de alimentos analisados pertence ao grupo dos fumados, onde estão incluídos o fiambre e o chouriço (Gráfico 4.1).

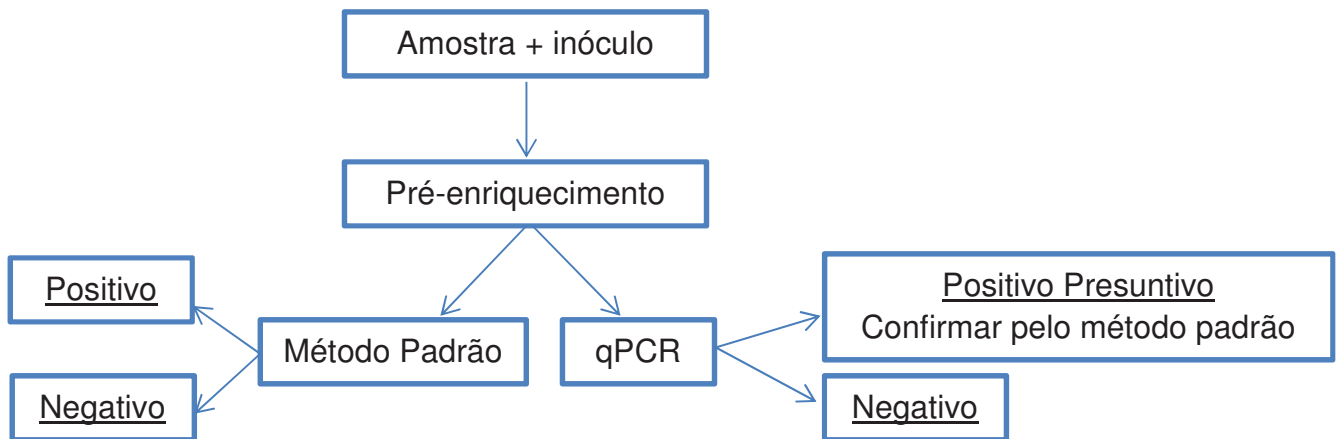
**Gráfico 4.1.** Percentagem de amostras analisadas por grupos para detecção da ocorrência de *Salmonella spp* em carne e derivados



Estas amostras foram analisadas pelo método padrão - ISO 6579:2002 e por qPCR utilizando o kit “MicroSeq *Salmonella spp* Detection Kit”. O pré-enriquecimento foi comum nos dois métodos (Fig 4.1).

As amostras foram contaminadas experimentalmente como descrito no material e métodos (Fig. 3.1), tendo esta contaminação sido verificada imediatamente antes e após a inoculação e após a fase de incubação de Pré-enriquecimento. Na contagem efetuada antes da contaminação verificou-se que o número de microrganismos na diluição  $10^{-8}$  foi de 3 UFC/ml, na diluição  $10^{-7}$  de 42UFC/ml e na diluição  $10^{-6}$  foi incontável.

**Figura 4.1.** Representação gráfica do procedimento segundo a ISO e as instruções do fabricante do KIT utilizado na PCR em tempo real (Applied Biosystems)



Nas amostras analisadas imediatamente após inoculação verificou-se a ausência de crescimento nas amostras contaminadas com as diluições  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  e uma contagem de 6 UFC/25g nas amostras contaminadas com a diluição  $10^{-6}$ . Após o pré-enriquecimento verificou-se cultura abundante (incontável) em todas as amostras contaminadas experimentalmente para todas as diluições. Nos controlos negativos não houve crescimento.

No que se refere à análise por qPCR, a integração e interpretação dos resultados obtidos foi efectuada pelo software ABI 7500 V2.0.6, sendo baseada em conceitos específicos e bem definidos como: “baseline”, ponto CT (“Cycle threshold”) e “threshold”. A “baseline” corresponde ao limiar mínimo de deteção de fluorescência do instrumento sendo considerado “ruído de fundo” do equipamento. O ponto CT, corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável. A partir deste ponto a fluorescência detetada ultrapassa o limiar da fase exponencial, o “threshold”, definido automática e arbitrariamente pelo software do equipamento em função da “baseline”. O valor mínimo de CT depende da quantidade de moléculas de ADN presentes no início do processo de amplificação, o que significa, que um menor número de moléculas inicialmente necessita de um maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à “baseline” (Heid et al., 1996; Kubista M, 2006; Mackay et al., 2007; Pelt-Verkuil et al., 2008).

Como se pode verificar pela análise dos resultados apresentados no quadro 4.1, de facto quanto maior o numero de salmonelas utilizadas para contaminar experimentalmente as amostras (quanto menor a diluição, respetivamente), e consequentemente maior o numero de moléculas de ADN presente, menor o numero de ciclos requeridos, ou seja, quanto maior o nível de contaminação, menor o valor de CT.

**Quadro 4.1.** Valor médio do CT por níveis de contaminação de *Salmonella spp* em carne e derivados

Grupos	Valor médio do Ct						Média IPC (Controlo Positivo Interno)
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	Valor médio Total (Ct)	Diluição 10 <sup>-7</sup>	Valor médio Total (Ct)	Diluição 10 <sup>-6</sup>	Valor médio Total (Ct)	
Carne moída	23,14	18,65	19,90	16,04	17,85	13,77	27,85
Fumados	15,93		12,78		10,06		
Enchidos	15,16		17,76		13,71		
Entremeada	20,35		13,70		13,45		

Nas amostras não contaminadas (Controlo negativo), não foram observados resultados positivos como se pode verificar no Anexo 6. O valor do CT nestas amostras foi superior a 40, daí o resultado ser negativo.

Ao comparar os resultados obtidos pelos dois métodos (Quadro 4.2), verificamos que a percentagem de concordância da qPCR com a ISO 6579:2002, nas amostras sem contaminação experimental (controlo negativo) foi de 95%, pois uma das amostras apresentou um resultado indeterminado, o que significa, que não foi detetado nenhum valor de CT e o equipamento emite o resultado como indeterminado.

**Quadro 4.2.** Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella spp* nas amostras analisadas sem e com contaminação experimental

Nível de contaminação		ISO 6579:2002	qPCR
Sem contaminação	Resultados positivos	0	0
	Resultados negativos	20	19
	Resultado indeterminado	0	1
	Total de amostras analisadas	20	20
Diluição 10 <sup>-8</sup>	Resultados positivos	20	20
	Resultados negativos	0	0
	Total de amostras analisadas	20	20
Diluição 10 <sup>-7</sup>	Resultados positivos	20	19
	Resultados negativos	0	0
	Resultado indeterminado	0	1
	Total de amostras analisadas	20	20
Diluição 10 <sup>-6</sup>	Resultados positivos	20	20
	Resultados negativos	0	0
	Total de amostras analisadas	20	20

Nas amostras contaminadas com as diluições de 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-6</sup>, a percentagem de concordância com o método padrão foi de 100%, ou seja, todas as amostras foram positivas pela qPCR e pela ISO 6579. Na contaminação com a diluição 10<sup>-7</sup> um dos resultados foi indeterminado, pelo que a percentagem de concordância foi de 95%.

Todos os resultados obtidos foram analisados e comparados com um controlo positivo interno da reação (IPC – *Internal Positive Control*). A inclusão do IPC nas reações, além de confirmar o rendimento de todos os reagentes, previne a ocorrência de resultados falsos negativos decorrentes da possível presença de substâncias inibidoras da PCR (Applied-biosystems, 2008).

Nas duas amostras que apresentaram resultado indeterminado, também o valor do IPC foi indeterminado. Tal facto pode estar relacionado com problemas durante a fase de amplificação e deteção, que resultaram numa preparação incorreta do “master mix”, numa pipetagem incorreta do controlo positivo e das amostras, da

degradação da sonda, da programação incorreta do termociclador, ou do posicionamento incorreto do controlo positivo.

Quando o resultado é indeterminado a sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase da amplificação (Poort, 1996). No entanto, não foi possível repetir o ensaio, tendo em conta que já não havia reações disponíveis do Kit utilizado.

#### **4.2. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijos**

Na pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi utilizada a matriz queijos, em que foram incluídas 15 amostras contaminadas experimentalmente, com três níveis diferentes de inóculo e um controlo negativo, e 20 amostras cegas, ou seja, não analisadas previamente (Anexo 7).

As amostras foram analisadas pelo método padrão - ISO 11290-1 e por qPCR e tal como na pesquisa de *Salmonella spp*, o pré-enriquecimento foi comum nos dois métodos.

Uma vez que o queijo é muito rico em gordura e pelo facto da *Listeria* ser uma bactéria gram-positiva e consequentemente a lise das células ser mais difícil utilizou-se o “PrepSeq Rapid Spin Sample Preparation Kit”, que foi desenvolvido para a análise de alimentos com um alto teor lipídico e na detecção de bactérias de lise difícil (Applied-Biosystems, 2010b).

A sensibilidade de deteção do “MicroSEQ *Listeria monocytogenes* Detetion Kit” aumenta quando se utiliza o “PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit”, além de que a combinação destes dois kits consome pouco tempo e é de fácil utilização (Rodriguez-Lazaro et al., 2005).

Tal como na pesquisa de *Salmonella spp*, 15 amostras foram contaminadas experimentalmente como descrito no material e métodos (Fig.3.2), tendo esta contaminação sido verificada por sub-cultura imediatamente antes e após a inoculação, assim como após a fase de incubação do pré-enriquecimento. Os resultados foram muito idênticos aos que se obtiveram para a *Salmonella*, ou seja, na contagem efetuada antes da contaminação verificou-se que o número de

microrganismos na diluição  $10^{-8}$  foi de 6 UFC/ml, na diluição  $10^{-7}$  de 71UFC/ml e na diluição  $10^{-6}$  foi incontável.

Nas amostras analisadas imediatamente após inoculação verificou-se a ausência de crescimento nas amostras contaminadas com as diluições  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$ , e uma contagem de 9 UFC/25g nas amostras contaminadas com a diluição  $10^{-6}$ . Após o pré-enriquecimento verificou-se cultura abundante (incontável) em todas as amostras contaminadas experimentalmente para todas as diluições. Nas amostras utilizadas como controlos negativos não houve crescimento.

No que diz respeito à qPCR, antes da corrida foram introduzidas no software as variáveis necessárias, como descrito no material e métodos (Quadro 3.1). Após a corrida foram analisados os resultados obtidos com o IPC da reação, tendo-se verificada que a média dos valores CT obtidos neste estudo, são concordantes com a carga microbiana presente, ou seja quanto maior o nível de contaminação, maior o CT (quadro 4.3).

**Quadro 4.3.** Valor médio do CT por níveis de contaminação de *Listeria monocytogenes* em queijos

Amostras	Valor médio do CT				Média IPC
	Sem análise prévia	Diluição $10^{-8}$	Diluição $10^{-7}$	Diluição $10^{-6}$	
Queijo curado	30,99	26,90	25,10	22,20	28,61

Ao comparar os resultados obtidos pelos dois métodos (Quadro 4.4), verificámos que percentagem de concordância da qPCR com a ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004, foi de 100%.em todas as amostras analisadas. No entanto, há que salientar o facto de que duas das 15 amostras contaminadas com a diluição  $10^{-8}$ , deram resultados negativos pelos dois métodos, quando deveria ter sido positivo. Nesta situação há que ter em conta que a contagem obtida no nível de contaminação com a diluição  $10^{-8}$  UFC/ml utilizado foi de 6 UFC/ml, o que sugere que ocorreu um erro de procedimento.

Não foram observados resultados positivos nas amostras não contaminadas (Controlo negativo), como se pode verificar no Anexo 7. O valor do CT nestas amostras foi superior a 40, daí o resultado ser negativo.

**Quadro 4.4.** Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas com e sem contaminação experimental

Nível de contaminação		ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	qPCR
Sem contaminação (Controlo negativo)	Resultados positivos	0	0
	Resultados negativos	15	15
	Total de amostras analisadas	15	15
Diluição 10 <sup>-8</sup>	Resultados positivos	13	11
	Resultados negativos	2	2
	Total de amostras analisadas	15	13
Diluição 10 <sup>-7</sup>	Resultados positivos	15	15
	Resultados negativos	0	0
	Total de amostras analisadas	15	15
Diluição 10 <sup>-6</sup>	Resultados positivos	15	15
	Resultados negativos	0	0
	Total de amostras analisadas	15	15

Finalmente, analisaram-se 20 amostras de queijo que não foram analisadas previamente, cujo resultado para a pesquisa de *L. monocytogenes* era desconhecido, de forma a reproduzir um procedimento normal de rotina pela qPCR. Quando comparámos os resultados obtidos (presença/ausência) nos dois métodos, verificamos que nas amostras sem análise prévia, 6 (30%) foram positivas pelos dois métodos e 14 foram negativas também pelos dois métodos (Quadro 4.5). A percentagem de concordância nestas amostras foi de 100%.

**Quadro 4.5.** Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Listeria monocytogenes* nas amostras sem análise prévia

	ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	qPCR
Resultados positivos	6	6
Resultados negativos	14	14
Total de amostras analisadas	20	20

Os elevados níveis de concordância obtidos refletem todo o trabalho desenvolvido nos últimos anos, no sentido de otimizar os procedimentos de detecção qualitativa de patogênicos por qPCR, nomeadamente no que se refere à eliminação de substâncias que poderiam inibir a PCR (concentração dos ácidos nucleicos alvo), à homogeneização das amostras e às medidas de prevenção de medição de células mortas (KLEIN, 20002; Wolffs et al., 2004).

### 4.3. Análise Estatística

A utilização de métodos rápidos para a detecção de microrganismos exige a sua validação de forma a garantir que forneçam resultados fiáveis. O regulamento (CE) nº 2073/2005 (2005b) refere que é aceitável o uso de métodos rápidos desde que estes sejam validados em função do método de referência, ou o uso de métodos próprios desde que certificados por terceiros em conformidade com o protocolo estabelecido na norma EN/ISO 16140 (2003) ou outros protocolos idênticos internacionalmente aceites.

É dada assim a liberdade aos laboratórios de decidir implementar o método que melhor se aplica, tendo em conta o número de amostras processadas diariamente, as instalações, o pessoal, o equipamento e o orçamento que têm para investir.

Este estudo não possuía amostras suficientes que permitissem uma análise estatística de validação conforme o descrito na EN/ISO 16140 (2003). Contudo aplicou-se o tratamento estatístico tendo em conta o número de amostras analisadas, segundo a mesma ISO, de modo a obterem-se dados que permitam a sua comparação. Assim os dados obtidos serão utilizados no cálculo da

concordância, sensibilidade e especificidade relativas e do limite de detecção relativo.

#### 4.3.1. Concordância, sensibilidade e especificidade relativa

Os estudos de avaliação do desempenho de métodos alternativos para a detecção rápida de agentes patogênicos em alimentos, exige a contaminação experimental dos alimentos de forma a poder se avaliar parâmetros como sensibilidade, especificidade, exclusividade e inclusividade, que somente podem ser determinados quando se tem um conhecimento da presença/ausência dos microrganismos desejados (Feng, 1998).

No quadro 4.6 e 4.7 são apresentados os resultados obtidos no cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa, nas amostras sem contaminação e nas amostras com os diferentes níveis de contaminação. No cálculo destes parâmetros apenas devem ser considerados os resultados positivos e negativos (EN/ISO 16140), pelo que os resultados indeterminados que se observou neste estudo não estão incluídos nos cálculos.

Como se pode verificar no quadro 4.6 na pesquisa de *Salmonella spp*, a percentagem obtida para estes parâmetros foi de 100%. O mesmo resultado foi obtido aquando da validação deste método pela AFNOR (Applied-Biosystems, 2010a) na matriz de carne e derivados, em que a qPCR foi considerado semelhante à ISO 6579:2003.

**Quadro 4.6.** Valores da concordância relativa, da sensibilidade relativa e da especificidade relativa, resultantes da comparação dos dois métodos utilizados na pesquisa de *Salmonella spp.*

Métodos: ISO 6579 qPCR <i>Salmonella spp</i>		PP (++)	NN (--)	PN (+-)	NP (-+)	N	PP+NN	Concordância relativa %	N+	Sensibilidade relativa (%)	N-	Especificidade relativa (%)
								$\frac{100 \times (PP+NN)}{N}$	PP+PN	$\frac{100 \times PP}{N+}$	NN+NP	$\frac{100 \times NN}{N-}$
								N		N+		N-
Nível contam.	Sem cont.	0	19	0	0	19	19	100	0	0	19	100
	$10^{-6}$	20	0	0	0	20	20	100	20	100	0	0
	$10^{-7}$	19	0	0	0	19	19	100	19	100	0	0
	$10^{-8}$	20	0	0	0	20	20	100	20	100	0	0

**Legenda:** PP - concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+); NN- concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-) ; NP- Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+); PN- Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-); N- Somatório.

**Quadro 4.7.** Valores da concordância relativa, sensibilidade relativa e da especificidade relativa, resultantes da comparação dos dois métodos utilizados na pesquisa de *L. monocytogenes*

Métodos ISO 11290-1 qPCR <i>Listeria monocytogenes</i>		PP (++)	NN (--)	PN (+-)	NP (-+)	N	PP+NN	Concordância relativa %	N+	Sensibilidade relativa (%)	N-	Especificidade relativa (%)
								$\frac{100 \times (PP+NN)}{N}$	PP+PN	$\frac{100 \times PP}{N+}$	NN+NP	$\frac{100 \times NN}{N-}$
								N		N+		N-
Nível contam.	Sem cont.	0	15	0	0	15	15	100	0	0	15	100
	$10^{-6}$	15	0	0	0	15	15	100	15	100	0	0
	$10^{-7}$	15	0	0	0	15	15	100	15	100	0	0
	$10^{-8}$	11	2	0	0	13	13	100	11	100	2	100
Sem análise prévia		6	14	0	0	20	20	100	6	100	14	100

**Legenda:** PP - concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+); NN- concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-) ; NP- Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+); PN- Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-); N- Somatório.

Na pesquisa de *L. monocytogenes* (quadro 4.7), a percentagem obtida no cálculo da Especificidade, Sensibilidade e Concordância Relativas foi de 100%. O relatório da validação deste método em produtos lácteos pela AFNOR (Applied-Biosystems,

2011), indica que a Especificidade Relativa calculada foi de 98%, a Sensibilidade Relativa foi de 96,8% e a Concordância Relativa foi de 97,5%. Com estes resultados, tal como no caso da *Salmonella spp*, a qPCR pode-se considerar uma alternativa ao método padrão.

Os mesmos resultados foram obtidos em outros estudos. Barocci et al. (2008) verificaram que a utilização da qPCR para a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos e superfícies a partir do pré-enriquecimento apresentava a mesma sensibilidade quando comparada com o método padrão.

Vanegas et al. (2009) avaliaram a detecção de *L. monocytogenes* por qPCR, após o pré-enriquecimento, em leite cru de cinco municípios de Boyacá-Colombia. Neste estudo, de um total de 81 amostras, 21 deram resultados positivos pela qPCR e apenas 13 amostras foram positivas pelo método padrão, o que levou os autores a concluir que a qPCR tem maior sensibilidade quando comparado com o método padrão. No entanto, neste estudo, não foi realizada nenhuma confirmação dos resultados positivos, o que sugere que possa tratar-se de falsos positivos.

De facto a qPCR permite a detecção, ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade da intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de ADN-alvo, independentemente de se tratar de ADN de células mortas ou células viáveis, daí a necessidade de confirmação dos resultados positivos pelo método padrão. O problema de detecção de falsos positivos é ainda mais evidente no que se refere à pesquisa de *L. monocytogenes* por qPCR, pois segundo o Regulamento 2073:2005 (2005b), esta deve ser realizada apenas em alimentos prontos para consumo, ou seja, onde a probabilidade de existirem células bacterianas mortas como resultado do processamento é elevada.

No que se refere à pesquisa de *Salmonella spp* num estudo em que se analisaram 110 amostras de diferentes alimentos (frango, carne picada, peixe e leite cru) verificou-se uma elevada sensibilidade relativa de 100% da qPCR, quando comparado com o método padrão (Malorny et al., 2003).

Fakhr et al. (2006) num estudo em que utilizaram o Kit “ iQ-Check Salmonella” (BioRad) quando comparado com o método padrão em amostras de carne de peru,

verificou-se que após a etapa de pré-enriquecimento a qPCR não conseguiu detetar *Salmonella spp* em 3 das 49 amostras que foram positivas pelo método normalizado. Uyttendaele *et al.* (2003) utilizando o mesmo kit para a pesquisa de *Salmonella spp* em aves naturalmente contaminados, verificaram que após a etapa de pré-enriquecimento em água peptonada, a qPCR também deu alguns falsos negativos.

Nos métodos padrão em que a detecção é feita por crescimento em placa, o passo de pré-enriquecimento permite que as células microbianas recuperem de condições de stresse como as que se verificam nos alimentos, promovendo a recuperação das células em estado não-cultivável, aumentando a detecção de células viáveis. Neste sentido, o pré-enriquecimento, tal como indicado pelas ISOs 6579:2002 e 11290-1:1998, contribui para aumentar a sensibilidade do método.

Nos métodos moleculares, no entanto, como a detecção é feita em função do número de moléculas de ADN presente, o pré-enriquecimento só contribuirá de facto para aumentar a sensibilidade do método se houver multiplicação dos microrganismos durante a incubação em água peptonada.

#### 4.3.2 Limite de detecção relativo

A determinação do limite de detecção relativo, ou seja o número mínimo de microrganismos cultivável que pode ser detetado em 50% das ocasiões, pelos dois métodos, foi feita pelo teste exato de Fisher tendo-se utilizado os resultados apresentados nos quadros 4.8 e 4.9. Verificou-se que não houve diferenças entre os métodos utilizados, tendo em conta que os resultados positivos e negativos foram iguais.

**Quadro 4.8.** Organização dos dados necessários ao cálculo do limite de detecção relativo para a pesquisa de *Salmonella spp*

		Resultados			
	Contaminação	Método	Negativos	Positivos	Total
Pesquisa de <i>Salmonella spp</i>	S/ contaminação	ISO 6579	20	0	20
		qPCR	19	0	19
		<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>0</b>	<b>39</b>
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	ISO 6579	0	20	20
		qPCR	0	20	20
		<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>40</b>
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	ISO 6579	0	20	20
		qPCR	0	19	19
		<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>39</b>	<b>39</b>
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	ISO 6579	0	20	20
		qPCR	0	20	20
		<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

**Quadro 4.9.** Organização dos dados necessários ao cálculo do limite de detecção relativo para a pesquisa de *L. monocytogenes*

		Resultados			
	Contaminação	Método	Negativos	Positivos	Total
Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	S/ contaminação	ISO 11290-1	29	6	35
		qPCR	29	6	35
		<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>12</b>	<b>70</b>
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	ISO 11290-1	2	13	15
		qPCR	2	9	11
		<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>22</b>	<b>26</b>
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	ISO 11290-1	0	15	15
		qPCR	0	15	15
		<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	ISO 11290-1	0	15	15
		qPCR	0	15	15
		<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

Na pesquisa de *L. monocytogenes*, para o nível de contaminação mais baixo (6 UFC/25 g) as diferenças entre os dois métodos não foram estatisticamente significativas. Pode-se então concluir que o limite de detecção pela qPCR utilizando

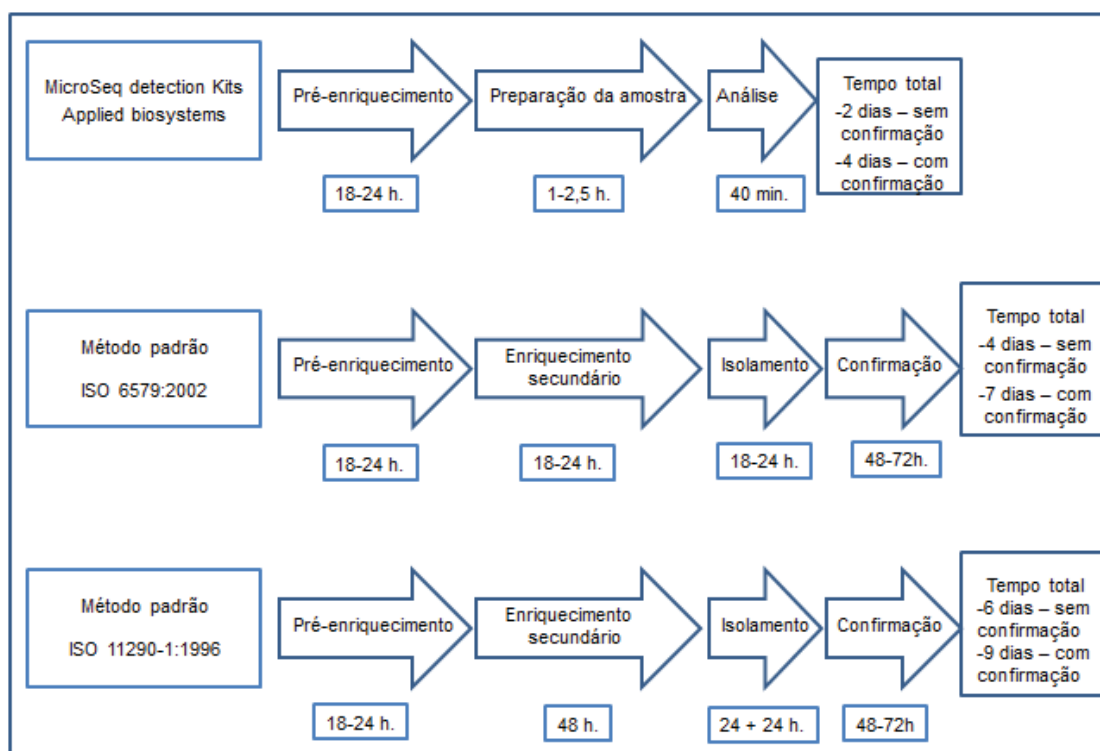
o “MicroSeq Listeria monocytogenes detection kit” é idêntico ao obtido pelo método padrão descrito na ISO 11290-1.

Se considerarmos que quando se pesquisou *Salmonella spp* e *L. monocytogenes* pelo método qPCR, a pesquisa realizou-se imediatamente após o pré enriquecimento, e que pelos métodos padrão as amostras foram ainda incubadas em caldos de enriquecimento, na realidade o número de microrganismos analisados na PCR, foi inferior ao analisado pelo método padrão, ou seja, na prática o limite de detecção pela qPCR é inferior à do método padrão.

#### 4.4. Análise Comparativa

Uma das grandes vantagens da utilização da qPCR é exatamente o tempo necessário até à emissão de um resultado. Ao comparar o tempo necessário nas duas metodologias (fig. 4.2.) verificamos, que independentemente do resultado obtido, a qPCR permite uma resposta num espaço de tempo mais curto.

**Figura 4.2.** Tempo necessário para a realização dos ensaios pelo método padrão e pelo método rápido



Na pesquisa de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* pela metodologia padrão foram necessários 4 e 6 dias, respetivamente, para a emissão dos resultados quando estes foram negativos (ISO 6579:2002, ISO 11290-1:1998), enquanto pela qPCR o tempo necessário foi de apenas 2 dias. Quando os resultados foram positivos, devido à necessidade de confirmação, levou 7 e 9 dias, na pesquisa de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* pela metodologia padrão, respetivamente, sendo possível obter os mesmos resultados ao fim de 4 dias utilizando a qPCR. Para indústria alimentar este tempo significa custos acrescidos.

Uma das desvantagens da qPCR é o custo. Para além do elevado custo inicial, resultante do investimento num termociclador qPCR, se compararmos os consumíveis e reagentes utilizados em ambos os métodos (Quadro 4.10), verificamos que os custos são superiores quando se utiliza a qPCR. No entanto, estes custos referem-se apenas aos kits utilizados no presente trabalho, os quais poderão ser substituídos por outros kits com custo diferentes, ou até mesmo preparando todos os tampões de lise e extração de ADN, assim como o desenho “in-house” dos primers e sondas a utilizar, o que seguramente tornará o custo por análise em qPCR muito inferior. A utilização de reagentes “in-house” requer uma validação posterior, para que possam ser utilizados em laboratórios certificados.

**Quadro 4.10.** Custos das análises utilizando a metodologia padrão e a metodologia rápida.

Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	Método		
	ISO 6579:2002	“Microseq <i>Salmonella</i> detection Kit”	
Custo por análise sem confirmação	7 €	13€	
Custo por análise com confirmação	18€	22€	
Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	ISO 11290-1:1998	“MicroSeq <i>Listeria monocytogenes</i> detection Kit”	
	Custo por análise sem confirmação	20 €	22 €
	Custo por análise com confirmação	33 €	35 €

Os kits utilizados no presente trabalho o “MicroSeq *Salmonella spp* Detection Kit” e o “MicroSeq *Listeria monocytogens* Detection Kit” (Applied Biosystems) estão certificados pela “AFNOR” (certificado nº ABI 29/02-09/10 e ABI 29/02-09/10 e certificado nº ABI 29/05-19/11, respetivamente), segundo a EN/ISO 16140:2003. A certificação permite a utilização dos Kits como método de rotina em qualquer laboratório sem ser necessária nova validação, sendo porém necessário a sua implementação.

É necessário que o laboratório tenha em consideração, caso opte por outros kits ou procedimentos mais económicos, a necessidade de proceder à sua validação se estes não estiverem validados por uma entidade exterior, e.g. AFNOR, AOAC, entre outras.

Apesar dos resultados apresentados no presente trabalho darem um forte contributo, a implementação da qPCR como método de rotina no LRV, exige que se repitam os mesmos procedimentos para outras matrizes relevantes para o laboratório. A ISO/TS 19036 (2006) agrupa as matrizes com base nas suas propriedades físicas em quatro grupos distintos, tais como:

- Líquidos e pós (p. ex. água, leite, leite em pó, leite de soja, leite de coco);
- Sólidos bem misturados (p. ex. carne picada, carne separada mecanicamente, carne de salsicha, carne esmagada, gelado de leite, natas batidas, creme de soja);
- Sólidos pequenos (ou muito pequenos) (p. ex. salsa desidratada/cogumelos, cenouras raladas, salada, camarões, cereais, alimentos para animais, avelãs trituradas, etc.);
- Outros sólidos (p. ex. queijo, carne não picada, pastelaria, etc.).
- O número de matrizes a serem testadas depende da variedade de matrizes analisadas por rotina pelo laboratório.

Finalmente o laboratório deve ainda realizar os ensaios de controlo de qualidade indicados pela NP EN ISO 17025 (2005), os controlos internos (mínimo 3 brancos e 4 controlos positivos e negativos, por analista) e os controlos externos (mínimo de 1 participação por analista num ensaio Interlaboratorial).



151 CONCLUSÕES

## 5. CONCLUSÕES

As diversas metodologias baseadas na biologia molecular vieram trazer um contributo enorme à pesquisa de agentes de infeções de origem alimentar. No entanto, a metodologia baseada em qPCR é influenciada pelo método de extração de ADN, pelo processo de enriquecimento, e pelo tipo de alimento, pelo que há a necessidade de normalizar o método para cada binómio agente patogénico/matriz de alimento. Assim, nas condições em que o presente trabalho foi desenvolvido pode-se concluir que:

- A qPCR utilizando o “MicroSeq *Salmonella spp* Detection Kit” da Applied Biosystems é uma alternativa eficaz à ISO 6579:2003 para a pesquisa de *Salmonella spp* em produtos cárneos, nomeadamente carne moída, fumados, enchidos e entremeada, após o pré-enriquecimento em meio de Água Peptonada, uma vez que a sensibilidade, a especificidade e a concordância relativas foram de 100%;
- A qPCR utilizando o “MicroSeq *Listeria monocytogenes* Detection Kit” da Applied Biosystems é uma alternativa eficaz à ISO 11290-1:1996 para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijos maturados, após o enriquecimento primário em meio half fraser, uma vez que a sensibilidade, a especificidade e a concordância relativas foram de 100%;

A qPCR permitiu detetar *Salmonella spp* em amostras de produtos cárneos com um nível de contaminação de 3 UFC/25g, e *L. monocytogenes* em amostras com um nível de contaminação de 6 UFC/ 25g de queijo. Para ambos os microrganismos a comparação do limite de deteção relativo pela qPCR com os respetivos métodos padrão não deu diferenças significativas.

Pode concluir-se que a utilização da técnica qPCR, utilizando os kits “MicroSeq *Salmonella spp* Detection Kit” e “MicroSeq *Listeria monocytogenes* Detection Kit” da Applied Biosystems, representa uma mais-valia na rotina de um laboratório de análises microbiológicas, uma vez que em análises de triagem permite a obtenção de resultados fiáveis num curto espaço de tempo:

- Se os resultados de pesquisa forem negativos é possível obter resultados pela qPCR ao fim de 2 dias, comparativamente com 4 e 6 dias para a pesquisa de *Salmonella spp* e a *L. monocytogenes* pelos métodos padrão, respetivamente.
- Se os resultados forem positivos, exigindo a sua confirmação, é possível obter resultados pela qPCR ao fim de 4 dias, comparativamente com 7 e 9 dias para a pesquisa de *Salmonella spp* e a *L. monocytogenes* pelos métodos padrão, respetivamente.

A qPCR é uma excelente ferramenta para a triagem de alimentos isentos de *Salmonella spp* e de *L. monocytogenes*. No entanto, se o laboratório Regional de Veterinária decidir implementar a qPCR como método de rotina, os procedimentos desenvolvidos no presente trabalho terão que ser repetidos para todas as matrizes alimentares analisadas por rotina no laboratório (ISO/TS 19036).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu Al-Soud, W., Radstrom, P., 2000, Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol* 38, pp. 4463-4470.
- ANVISA, 2004, Hábitos de higiene são fundamentais no controle da salmonela. Notícias da Anvisa: Diário e Mensal, Brasília, 17 set. 2004
- AOAC, 2002, Official methods of analysis of AOAC international., 17 ed. Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Applied-biosystems, 2008, TaqMan® food pathogen detection kits Protocol: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica.*, Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/sxve0o1r.pdf> Acesso em: 25/05/2013
- Applied-Biosystems, 2009. MicroSEQ® *Salmonella spp.* Detection Kit Protocol. Part Number 4405964 Rev.A, p. 28.
- Applied-Biosystems, 2010a. EN ISO 16140 Validation Study of MicroSEQ *Salmonella spp* method in food products and environmental samples -AFNOR Validation, Biosystems, A., ed. (Applied Biosystems).
- Applied-Biosystems, 2010b. MicroSEQ *Listeria monocytogenes* Detection Kit Protocol. Part Number 4405962 Rev. C, p. 32.
- Applied-Biosystems, 2011. EN ISO 16140 Validation Study of MicroSEQ *Listeria monocytogenes* method in food products and environmental samples - AFNOR Validation (Applied Biosystems), pp. 1-92.
- Autio, T., Lunden, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Bjorkroth, J., Sjoberg, A.M., Korkeala, H., 2002, Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *Int J Food Microbiol* 77, pp. 83-90.
- Awaisheh, S.S., 2010, Incidence and contamination level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in ready-to-eat meat products in Jordan. *J Food Prot* 73, pp. 535-540.
- Baker, S., Hardy, J., Sanderson, K.E., Quail, M., Goodhead, I., Kingsley, R.A., Parkhill, J., Stocker, B., Dougan, G., 2007, A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella Typhi*. *PLoS Pathog* 3, p. 59.
- Barendz, A.W., 1998, Food safety and total quality management. *Food Control* 9, pp. 2-3.
- Barocci, S., Calza, L., Blasi, G., Briscolini, S., Curtis, M., Palombo, B., Cucco, L., Postacchini, M., Sabbatini, M., Graziosi, T., Nardi, S., Pezzotti, G., 2008, Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. *Food Control* 19, pp. 750-756.
- Bernardo, F.M.A., Machado, J.C.C., 1989, Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango em Portugal. *Perspectiva epidemiológica em humanos. Revta Port. Ciênc. Vet.* 84, pp. 31-45
- Beumer, R.R., Brinkman, E., Rombouts, F.M., 1991, Enzyme-Linked immunoassays for detection of *Salmonella spp.*: a comparison with other methods. *Int J Food Microbiol* 12, pp. 363-374.
- Blackburn, C.W., 1993, Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonellas* in foods. *J Appl Bacteriol* 75, pp. 199-214.
- Borges, A.A., Campos, G.M., Moreli, M.L., Souza, R.L., Aquino, V.H., Saggiaro, F.P., Figueiredo, L.T., 2006, Hantavirus cardiopulmonary syndrome: immune response and pathogenesis. *Microbes Infect* 8, pp. 2324-2330.
- Caffer, M.I., Eiguert, T., 1994, *Salmonella enteritidis* in Argentina. *Inf. J. Food Microb.* 21, pp. 15-19.
- Cardoso, T.G., Carvalho, V.M., 2006, Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.* *Rev. Inst. Ciênc. Saúde* 24, pp. 95-101.
- CDCPUS, 2008, Salmonella Questions and Answers related to the outbreak of *Salmonella saintpoul* infections associated with tomatoes., Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/saintpoul/faq.html> Acesso em: 19/05/2013
- Chaicumpa, W., Ngren-Ngarmert, W., Kalambaheti, T., Chongsanguan, Y.R.M., Tapchaisri, P., Desakorn, V., Suthienkul, O., 1995, Monoclonal antibody-based Dot Blot ELISA for the

- detection of *Salmonella* in foods. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 13, pp. 156-166.
- Chart, H., Evans, J., Chalmers, R., Salmon, R., 1998, *Escherichia coli* O157 serology: false-positive ELISA results caused by human antibodies to bovine serum albumin. Lett. Appl. Microbiol. 27, pp. 76-78.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K., 2008, Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. Trends in Microbiology 16, pp. 388-396.
- Comunidade-Europeia 1993. Directiva 93/43/CEE DO CONSELHO de 14 de Junho de 1993 relativa à higiene dos géneros alimentícios.
- Darwin, K.H., Miller, V.L., 1999, Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucous. Clinical Microbiology Reviews 12, pp. 405-428.
- De Simon, M., Ferrer, M.D., 1998, Initial numbers, serovars and phagovars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain). International Journal of Food Microbiology 44, pp. 141-144.
- Denny, J., McLauchlin, J., 2008, Human *Listeria monocytogenes* infections in European opportunity for improved European surveillance. Euro Surveill 13.
- DGS, 2010, Infecção por *Listeria monocytogenes* - Portugal. Disponível em: <http://www.dgs.pt/em-destaque/infeccao-por-listeria-monocytogenes-portugal-actualizacao-em-05082010.aspx>  
Acesso em: 03/06/2013
- Doran, J.L., Collinson, S.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Burian, J., Munro, C.K., Lee, S.H., Somers, J.M., Todd, E.C.D., Kay, W.W., 1994, fimA and tctC based DNA diagnostics for *Salmonella*. Molecular and Cellular Probes 8, pp. 291-310.
- Eduardo, M.B.P., Katsuya, E.M., 2003, Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes de Estado de São Paulo - 1999 -2002. Rev. Hig. Alim. 17.
- EFSA, 2012, Scientific Opinion on a review on the European Union Summary Reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, *verotoxigenic Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks. The European Food Safety Authority Journal 10, p. 2726.
- EFSA, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011 (European Food Safety Authority), p. 250.
- EFSA, 2009, The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. The European Food Safety Authority Journal 27, pp. 17-50.
- Elizaquível, P., Aznar, R., 2008, Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. Journal of Food Protection 71, pp. 2110-2114.
- EU-RAIN European union-risk analysis information network, 2005. The Science of Food: Safety and Nutrition. (Dublin), p. 111.
- Evangelista, J., 2001, Tecnologia de alimentos, 2ª ed. Edition. Atheneu, São Paulo.
- Fach, P., Dilasser, F., Grout, J., Tache, J., 1999, Evaluation of a polimerase chain reaction base test for detecting *Salmonella* spp, in foods samples: Probelia *Salmonella* spp. Journal of Food Protection 62, pp. 1387-1393.
- Fakhr, M.K., McEvoy, J.M., Sherwood, J.S., Logue, C.M., 2006, Adding a selective enrichment step to the iQ-Check real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. Letters in Applied Microbiology 43, pp. 78–83p.
- FAO/WHO 2006. Food Safety risk analysis. A guide for national food safety authorities. In FAO Food and nutrition p. 119.
- Favrin, J., Jassim, S.A., Griffiths, M.W., 2001, Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in broth. Applied and Environmental Microbiology 67, pp. 217-224.

- FDA, 1992, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook: *Listeria monocytogenes*., Disponível em: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html> Acesso em: 03/06/2013
- Feng, P., 1998, Rapid Methods for detecting foodborne pathogens, In: Bacteriological analytical Manual. Gaithersburg:FDA, United States.
- Feng, P., 2007, Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation technologies, In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.) Food microbiology: fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, pp. 911-934.
- Ferreira, A.W., Ávila, S.M., 1996, Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2-173 pp.
- Ferreira, S., Sousa, J.C., 2000, Microbiologia. Lidel, Lisboa.
- Fields, P.I., Blom, K., Hugues, H.J., Hesel, L.O., Feng, P., Swaminathan, B., 1997, Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism test for identification of E. coli O157:H7 and O157:NM. J. Clin. Microbiol., 33, pp. 2188-2191.
- Finstad, S., O'Bryan, C.A., Marcy, J.A., Crandall, P.G., Ricke, C.S., 2012, *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis Food Research International 45, pp. 789-794.
- Forshell, L.P., Wierup, M. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. In Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties (Paris), pp. 551-554.
- Forsythe, S.J., 2002, Microbiologia da Segurança Alimentar. Artmed Editora, 65 p.
- Fortuna, J.L., Franco, R.M., 2005, Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. Higiene Alimentar 19, pp. 33-44.
- Franco, B.D.G.M., Landgraf, M., 2002, Microbiologia dos Alimentos, 1ª Edição Edition. São Paulo: Atheneu.
- Franco, B.D.G.M., Landgraf, M., 2004, Microbiologia dos Alimentos. Atheneu, São Paulo.
- Franco, B.G.M., Landgraf, M., 1996, Microbiologia dos Alimentos. Editora Atheneu, São Paulo, 187 p.
- Fung, D.Y.C., 1995, What's need in rapid detecion of foodborne pathogens Food Technol. 49, pp. 64-67.
- Garrick, R.C., Smith, A.D., 1994, Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other *Enterobacteriaceae* Letters in applied Microbiology 18, pp. 187-189.
- Gaya, P., Saralegui, C., Medina, M., Nunez, M., 1996, Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in raw caprine milk. J Dairy Sci 79, pp. 1936-1941.
- Germano, P.M.L., Germano, M.I.S., 2001, Higiene e vigilância sanitária de alimentos. Varela, São Paulo.
- Germano, P.M.L., Germano, M.I.S., 2008, Higiene e vigilância sanitária de alimentos:qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. Manole, São Paulo, 317 p.
- Gill, N., Reilly, B., Smith, H. 2004. Enter-net quarterly *Salmonella* report Oct-Dec 2004/4. International surveillance network for the enteric infections-*Salmonella*, *VTEC O0157* and *Campylobacter*.
- Giombelli, A., 2000, Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: um problema técnico bastante complexo. Higiene Alimentar. 14, pp. 58-61p.
- Gombas, D.E., Chen, Y., Clavero, R.S., Scott, V.N., 2003, Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J Food Prot 66, pp. 559-569.
- Gomes, C.P., 2007, Critérios Microbiológicos Aplicáveis aos Géneros Alimentícios. Segurança e qualidade alimentar, pp. 48-51.
- Gomes, M.J.P., 2009, *Enterobacteriaceae (Salmonella spp.)*. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/salmonella200901.pdf> Acesso em:06/06/2013

- Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007, Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovares., 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Paris.
- Guerra, M.M., McLauchlin, F.A., Bernardo, F.M.A., 2001, *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. . Food Microbiology 18, pp. 423-429.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A.D., 2009, Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. Research in Microbiology, pp. 161: 126-129.
- Haeghebaert, S., Duché, L., Masini, B., Dubreuil, M., Bouvet, P., 2000, Epidémie de salmonellose à *Salmonella* enterica sérotype Typhimurium dans des institutions médico-sociales. Alpes de Haute-Provence, septembre 1999-janvier 2000. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 36, pp. 153-155.
- Hajdenwurcel, J.R., 1998, Atlas de microbiologia de alimentos. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 66 p.
- Hayes, P.R., 1995, Food microbiology and hygiene, 2th Edition. Elsevier Science Publishers Ltd, London.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996, Real time quantitative PCR. Genome Res. 6, pp. 986-994.
- Heinitz, M.L., Ruble, R.D., Wagner, D.E., Tatini, S.R., 2000, Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. . Journal of Food Protection 63, pp. 579-592.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11, pp. 1026-1030.
- Hobbs, B.C., Roberts, D., 1998, Toxinfecções e Controle Higiênico-sanitário de alimentos. Varela, São Paulo.
- HPA, 2011, Bacteriology - Test procedures. Health Protection Agency TP 3, pp. 1-13.
- Hughes, C., Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., 2007, Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales. Food Control 18, pp. 166-722.
- IFT, 2004. Scientific status summary: Bacteria Associated with Foodborne Diseases. IFT 525W. Van Buren Street Suite 1000, IL60607 (Chicago, Institute of Food Technologists).
- International-Standard 2003. ISO 16140:2003 Amendment 1:2011 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.
- International-Standard 2004. ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004 - "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 1: Detection method".
- International-Standard, 2005, NP EN ISO 17025:2005 - "Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração".
- International-Standard, 2006, ISO/TS 19036:2006 - "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations".
- Johnson, J.C., Van Emon, J.M., 1996, Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for detection of polychlorinated biphenyls in environmental soil and sediment samples. Anal. Chem. 68, pp. 168-169.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H., 1998, Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. Int J Food Microbiol 42, pp. 127-131.
- Kaku, M., Peresi, J.T.M., Tavechio, A.T., Fernandes, S.A., Batista, A.B., Castanheira, I.A.Z., Garcia, G.M.P., Irino, K., Gelli, D.S., 1995, Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. . Rev. Saúde Pública 29, pp. 127-131.
- KLEIN, D., 20002, Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. . Trends in Molecular Medicine 8, pp. 257-260.
- Kubista M, A.J., Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N., 2006, The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 27, pp. 95-125.

- Lightfoot, N.F., Maier, E.A., 2003, Análise Microbiológica de alimentos e água: Guia para a garantia da qualidade. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Liu, D., 2008, Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. Int. J. Food Microbiol. 122, pp. 229-242.
- Liu, D., A., A., Frank, A., Austin, F., Lawrence, M., 2004, Use of PCR primers derived from putative transcriptional regulator gene for species – specific determination of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 91, pp. 297-304.
- Liu, D., Lawrence, M., Austin, F., Ainsworth, A., 2007, Multiplex PCR for Species and Virulence-specific Determination of *Listeria monocytogenes*: A Multiplex PCR for Species- and Virulence-specific Determination of *Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods 71, pp. 133-140.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., Martínez-Suarez, J., 2006, *Listeria monocytogenes* en alimentos: son todos los aislamientos igual de virulentos? Revista Argentina de Microbiología v.8, pp. 224-234.
- Mackay, I.M., Mackay, J.F., Nissen, M.D., Sloots, T.P., 2007, Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay. Caister Academic Press, Norfolk, UK., 1-40 pp.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M., J., H., 2003, Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int J Food Microbiol. 83, pp. 39-48p.
- Maluf, R.S., 2000, O novo contexto internacional da segurança alimentar. Abastecimento e segurança alimentar - os limites da liberalização. IE/UNICAMP-REDCAPA-CPDA, pp. 37-63.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P., 2004, Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiology 21, pp. 213-216.
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, D., Mitchell, S., S., K., 1997, A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. Microbiol. 24, pp. 172-176.
- Miettinen, M.K., Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J., 1999, Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol 46, pp. 187-192.
- Ministério-da-Agricultura-do-Desenvolvimento-Rural-e-das-Pescas 1998. Decreto-Lei nº 67/98 de 18 de Março de 1998 (Diário da República, Série I-A).
- Ministério-da-Agricultura-do-Desenvolvimento-Rural-e-das-Pescas 2006. Decreto de lei nº113/2006 de 12 de Junho de 2006 (Diário da República nº113, Série I-A).
- Nakamura, H., Hatanaka, M., Ochi, K., Nagao, M., Ogasawara, J., Hase, A., Kitase, T., Haruki, K., Nishikawa, Y., 2004, *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. Int J Food Microbiol 94, pp. 323-328.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., Van Der Giessen, J., Kruse, H., 2010, Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. International Journal of Food Microbiology 139 Suppl 1, pp. 3-15.
- Nilsson, L., Chen, Y., Chikindas, M.L., Huss, H.H., Gram, L., Montville, T.J., 2000, Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 66, pp. 769-774.
- Nitzke, J.A., Penna, N.G., Olivera, L.Y., Martinelli, S., Fritz, A., Daudt, C.E., Noll, I.B., 2010, Segurança alimentar - rompendo barreiras. Braz. J. Food Technol. 3.
- Norrung, B., Andersen, J.K., Schlundt, J., 1999, Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. . International Journal of Food Microbiology 53, pp. 195-203.
- OIE, 2008, *Listeria monocytogenes*, In: OIE Terrestrial Manual. World Organization for Animal Health, Paris.
- OIE, 2010, Terrestrial Animal Health Code Vol 1, 19 Edition. World Organization for Animal Health, Paris.
- Orndorff, P., Hamrick, T., Smoak, I., Havell, E., 2006, Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Veterinary Microbiology 114, pp. 1-15.

- Pardi, M., Santos, I.F., Souza, E.R., Pardi, H.I., 1995, *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne.*, Vol 1. UFG.
- Patel, J.R., Bhagwat, A.A., Sanglay, G.C., Solomon, M.B., 2006, Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food Microbiology* 23, pp. 2046-2055.
- Patrick, A.D.G., François, X.W., 2007, *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, 9 Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 1-166 pp.
- Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., Hays, J.P., 2008, *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Netherlands, 332 p.
- Picciochi, P.C., 2006, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Ministério da Economia e da Inovação. Disponível em: <http://www.qualidademadeira.com.pt/ficheiros/documentos/Seminarios/asae%20madeira%20novembro%202006.pdf>, Acesso em:16/06/2013
- Piccolo, R.C., 1992, Surto de salmonelose ocorrido em Cantina Escolar no Município de São Paulo, 1991. *Higiene Alimentar* 6, pp. 28-30.
- PITA, J.S.M. 2012. Surto de listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo : investigação e medidas implementadas pela ASAE. In Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Podzorski, R.P., Persing, D.H., 1995, Molecular detection and identification of microorganisms, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC, pp. 130-157p.
- Poort, S.R., 1996, *Blood*. 88, pp. 3698-3703p.
- Portugal, J.A., Neves, B.S., Oliveira, A.C.S., Silva, P.H.F., Brito, M.A.V.P., 2002, Segurança alimentar na cadeia do leite. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 115-179 pp.
- Rabsch, W., Tschape, H., Baumler, A.J., 2001, Review: Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection* 3, pp. 237-247.
- Rambach, A., 1990, New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella spp.* from *Proteus spp.* and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, pp. 301-303.
- Região-Autónoma-dos-Açores 2013. Regulamento (UE) nº 209/2013 da Comissão de 11 de Março de 2013 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 no que diz respeito aos critérios microbiológicos aplicáveis a rebentos e às regras de amostragem de carcaças de aves de capoeira e carne fresca de aves de capoeira. In *Jornal Oficial da União Europeia*
- Reis, R.B., Mamizuka, E.M., Franco, B.D.G.M., 2001, Production of immunoreagents to be used in an enzyme immunoassay for detection of *Salmonella*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21, pp. 261-266.
- Reis, R.B., Mamizuka, E.M., Franco, B.D.G.M., 2002, Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 22.
- República-Portuguesa 2005. Decreto-Lei n.º 237/2005, de 30 de Dezembro - Cria a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). In *Diário da República*.
- República-Portuguesa 2012. Decreto-Lei n.º 194/2012 - Aprova a orgânica da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. In *Diário da República* 1.ª série — N.º 163.
- Resende, P.P., Franco, A.V., 2001, Esporotricose cutâneo-linfática. *Cadernos Brasileiros de Medicina* 14, pp. 1-4.
- Roberts, T.A. 2006. *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities* (Springer), p. 752.
- Roche, S.M., Kerouanton, A., Minet, J., Le Monnier, A., Brisabois, A., Velge, P., 2009, Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. *Int J Food Microbiol* 130, pp. 151-155.
- Rocourt, J., Jacquet, C., Reilly, A., 2000, Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int J Food Microbiol* 62, pp. 197-209.

- Rodriguez-Lazaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M., Pla, M., 2005, Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of pre-real-time PCR strategies. . Journal of Food Protection 68, pp. 1467–1471.
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Hugas, M., Pla, M., 2004, Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* by Real-Time PCR. . Applied and Environmental Microbiology 70, pp. 6299-6301.
- Schelch, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., E.V., H., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., 1983, Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med., Waltham v. 308, pp. p.203-208.
- Schlech, W.F., 3rd, 2000, Foodborne listeriosis. Clin Infect Dis 31, pp. 770-775.
- Schmid, M.W., Ng, E.Y., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 2005, Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. Syst Appl Microbiol 28, pp. 1-18.
- Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E., Anastasio, M.P., 1996, Foodborne outbreaks caused by *salmonella* in Italy, 1991-1994. . Epidemiol. Infect. 116, pp. 257-265.
- Sharma, V.K., Carlson, S.A., 2000, Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment- broth culture. Applied and Environmental Microbiology 66, pp. 5472-5476.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., 1997, Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. Livraria Varela, São Paulo, 295 p.
- Slutsker, L., Schuchat, A., 1999, Listeriosis in humans, 2 Edition. Ryser & Math, 1999, 75-96 pp.
- Sousa, C.L., Joelle, M.R.S.P., 2000, Avaliação da qualidade microbiológica e físicoquímica de carne bovina moída em açougues do município de Macapá – AP. Higiene Alimentar 14, pp. 60-65.
- Swaminathan, B., Feng, P., 1994, Rapid detetion of food-borne pathogenic bacteria. . Annu. Rev. Microbiol. 48, pp. 41-426.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., 2007, Forum: The epidemiology of human listeriosis. . Microbes and Infection 9, pp. 1236-1243.
- Tauxe, R.V., 1997, Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. . Emerg. Infect. Dis. 3, pp. 425-434.
- Tessari, E.N.C., Cardoso, A.L.S.P., Castro, A.G.M., 2003, Prevalência de *Salmonella* enteritides em carcaças de frango industrialmente processadas. Higiene Alimentar 107, pp. 52-55.
- Thimothe, J., Walker, J., Suvanich, V., Gall, K.L.M.W., Moody, M.W., Wiedmann, M., 2002, Detection of *Listeria* in crawfish processing plants and in raw, whole crawfish and processed crawfis (Procambarus spp.). J. Food Prot 65, pp. 1735-1739.
- União-Europeia, 1997, Livro Verde sobre os Principios Gerais da Legislação Alimentar da União Europeia, Vol UE 4. União Europeia, Bruxelas.
- União-Europeia 1999. Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos (Bruxelas, Comissão das Comunidades Europeias).
- União-Europeia 2002a. Diretiva 2002/99/CE do Conselho, de 16 de Dezembro de 2002, que estabelece as regras de polícia sanitária aplicáveis à produção, transformação, distribuição e introdução de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. In Jornal Oficial das Comunidades Europeias.
- União-Europeia 2002b. Regulamento (CE) 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2003. Directiva 2003/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Novembro, relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos. In Jornal Oficial da União Europeia
- União-Europeia 2004a. Directiva 2004/41/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Abril de 2004, que revoga certas directivas relativas à higiene dos géneros alimentícios e às regras sanitárias aplicáveis à produção e à comercialização de determinados produtos de

- origem animal destinados ao consumo humano e altera as directivas 89/662/CEE e 92/118/CEE. In Jornal Oficial da União Europeia
- União-Europeia 2004b. Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu, que estabelece requisitos gerais de higiene a respeitar pelas empresas do sector alimentar em todas as fases da cadeia alimentar. Este Regulamento é de aplicação obrigatória desde Janeiro de 2006. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2004c. Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, a fim de garantir um nível elevado de segurança dos géneros alimentícios e de saúde pública. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2004d. Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2004e. Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, que reorganiza os controlos oficiais dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais de maneira a integrar os controlos em todas as etapas da produção e em todos os setores. In Jornal Oficial da União Europeia
- União-Europeia 2004f. Regulamento (CE) Nº 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. In Jornal Oficial da União Europeia
- União-Europeia 2005a. Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de Janeiro, que estabelece os requisitos de higiene para alimentação animal, que completa o “pacote higiene”, pela inclusão de um elo importante da cadeia alimentar, garantindo a segurança dos alimentos para animais. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2005b. Regulamento da Comissão (CE) Nº 2073/2005 de 15 Novembro de 2005 relativo aos critérios microbiológicos para géneros alimentícios. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2005c. Regulamento da Comissão (CE) Nº 2074/2005 de 5 Dezembro de 2005 relativo à implementação de medidas para determinados produtos previstos no Regulamento (CE) Nº 853 e para a organização de controlos oficiais no âmbito dos Regulamentos (CE) Nº 854/2004 e Nº 882/2004. In Jornal Oficial da União Europeia
- União-Europeia 2007. Regulamento (CE) n.º 1441/2007, da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.o 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (Jornal Oficial da União Europeia).
- União-Europeia 2010. Regulamento (UE) nº 365/2010 da Comissão de 28 de Abril de 2010 que altera o Regulamento (CE) n. o 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a Enterobacteriaceae no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar. In Jornal Oficial da União Europeia.
- União-Europeia 2011. Regulamento (UE) nº 1086/2011 da Comissão de 27 de Outubro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n. o 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho e o anexo I do Regulamento (CE) n. o 2073/2005 da Comissão no que diz respeito a *Salmonella* em carne fresca de aves de capoeira. In Jornal Oficial da União Europeia
- União-Europeia 2013. Decreto Regulamentar Regional nº 11/2013/A (Diário da República).
- Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J.C., Martin, P., 2005, Surveillance of *Listeria* infections in Europe. Euro Surveill 10, pp. 251-255.
- Vanegas, m.C., Vásquez, E., Martinez, A.j., Rueda, A.M., 2009, Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. Food Control 20, pp. 430-432.

- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J., 2001, *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14, pp. 584-640.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Nunes, S., 2009. Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal, ASAE, ed. (Lisboa), p. 330.
- Verteufeuille, R. 2011. The danger of *Listeria* in Food, Legend's, Phoenix, eds. (Arizona).
- Viegas, S.J., 2009, Alterações do estado de saúde associadas à alimentação : contaminação microbiológica dos alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge., Lisboa, 32 p.
- Vogel, B.F., Jorgensen, L.V., Ojeniyi, B., Huss, H.H., Gram, L., 2001, Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. Int J Food Microbiol 65, pp. 83-92.
- WHO, 2003. Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe 8th Report 1999-2000 Country Reports: Portugal., p. 12.
- WHO, 2004. Summary and Conclusions of the 61st Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives In JEFCA/61/SC (Rome, Italy).
- WHO, 2013, *Salmonella* (non-typhoidal). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> Acesso em: 12/09/2013
- Wolffs, P., Grage, H., Hagberg, O., Radstrom, P., 2004, Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR. J Clin Microbiol 42, pp. 408-411.
- Yan, S.S., Pendrak, M.L., Abeça-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P., Foley, S.L., 2003, An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews 4, pp. 189-204.

**ANEXOS**

**Anexo 1 - Problemas associados aos métodos de amplificação de ácidos nucleicos.**  
Adaptado de (Podzorski & Persing, 1995).

<b>Problema</b>	<b>Causa</b>
Falsos Positivos	Contaminação com produtos amplificados  Reagentes contaminados  Amostras contaminadas durante o processamento de controlos positivos ou de amostras positivas  Esquema de trabalho bidirecional/limitações de instalações
Falsos negativos	Presença de inibidores  Erros na medição de volumes  Erro humano  Extração inadequada dos ácidos nucleicos  Mau funcionamento do equipamento (termociclador)  Problemas com reagentes (concentração de magnésio, síntese de primers)  Fracá qualidade das amostras
Excesso de sensibilidade	Deteção de organismos mortos, presença de microrganismos em indivíduos assintomáticos, deteção de contaminantes ambientais, deteção de sequências endógenas
Amplificação de genes quiméricos (híbridos)	Presença de regiões conservadas entre diferentes tipos de ADN alvo existentes na mesma amostra.

**Anexo 2** - Tabela com os limites estabelecidos para a *Salmonella spp.* (Adaptado de Regulamento CE 2073/2005)

<b>Categoria de Alimentos</b>	<b>Limite</b>	<b>Fase de Aplicação</b>
Carne picada e preparados de carne destinados a serem consumidos crus	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Carne picada e preparados de carne destinados a serem consumidos cozinhados	Ausência em 10g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Carne separada mecanicamente	Ausência em 10g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Produtos à base de carne destinados a serem consumidos crus	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Produtos à base de carne obtidos a partir da carne de aves de capoeira e destinados a serem consumidos cozinhados	Ausência em 10g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Gelatina e colagénio	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Queijo, manteiga, leite em pó, soro de leite em pó e natas fabricadas com leite cru ou com tratamento mais fraco que a pasteurização	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Sorvetes fabricados com leite	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Ovo produtos e alimentos prontos para consumo que contenham ovos crus	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Crustáceos e moluscos cozidos	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Moluscos bivalves vivos e equinodermes, tunicados e gastrópodes vivos	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Sementes germinadas	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil

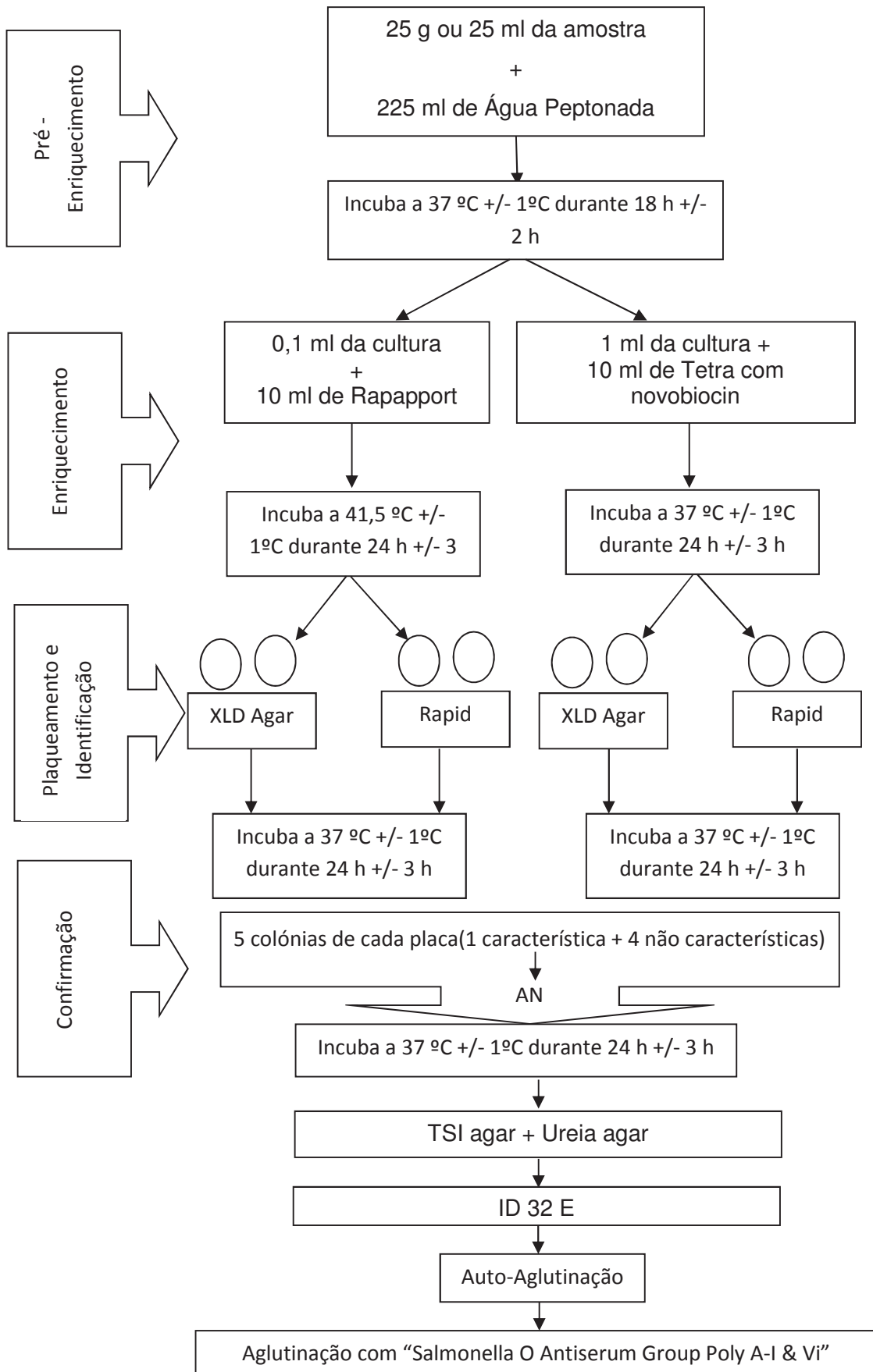
**Anexo 2 - Continuação**

<b>Categoria de Alimentos</b>	<b>Limite</b>	<b>Fase de Aplicação</b>
Frutas e produtos hortícolas pré-cortados, bem como sumos de frutas e de hortícolas não pasteurizados	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a lactentes com menos de seis meses e fórmulas de transição desidratadas	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil

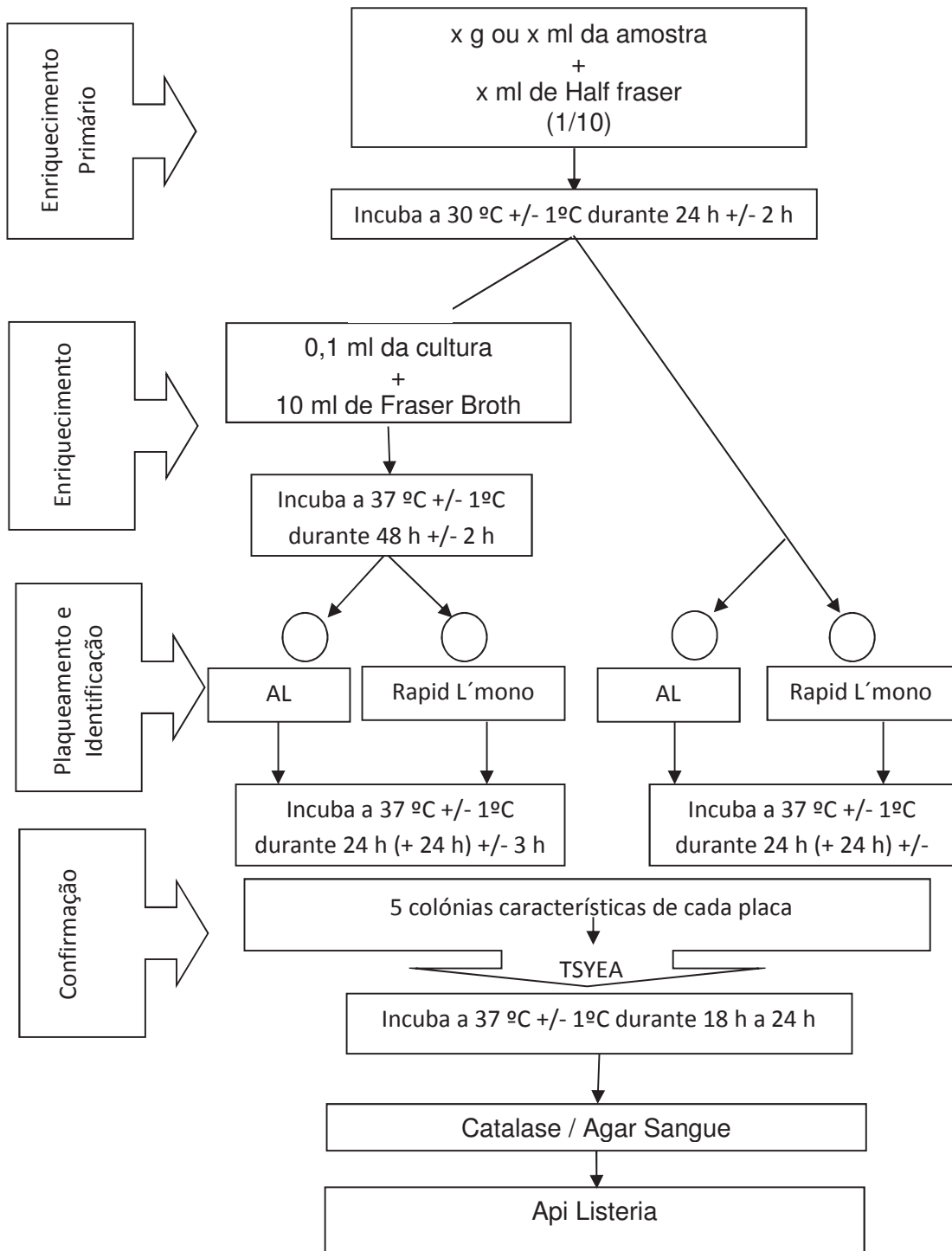
**Anexo 3** - Tabela com os limites estabelecidos para a *Listeria monocytogenes*. (Adaptado de Regulamento CE 2073/2005)

<b>Categoria de Alimentos</b>	<b>Limite</b>	<b>Fase de Aplicação</b>
Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos	Ausência em 25g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos	Ausência em 25g	Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu
	100 ufc/g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil
Alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específico	100 ufc/g	Produtos colocados no mercado, durante a sua vida útil

**Anexo 4** - Diagrama do procedimento para a Pesquisa de *Salmonella* segundo a ISO 6579:2002



**Anexo 5** - Diagrama do procedimento para a Pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo a ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004



**Anexo 6 -** Relação dos resultados obtidos pela ISO 6579:2002 e por PCR em tempo real para detecção da ocorrência de *salmonella spp* em carne e derivados

Amostras	Nível de contaminação	ISO 6579:2002	qPCR	Valor Ct
1-Carne moída	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	30,15
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	23,88
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	21,97
2-Carne moída	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	32,30
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	29,95
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	26,55
3-Carne moída	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	19,75
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	16,44
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,50
4-Carne moída	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	18,85
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	15,97
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,50
5- Carne moída	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	14,63
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	13,25
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	12,51
6 -Fiambre	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	19,40
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	15,00
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	14,72
7-Fiambre	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	16,32
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	15,00
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	14,72

**Anexo 6 - Continuação**

Amostras	Nível de contaminação	ISO 6579:2002	qPCR	Valor Ct
8-Fiambre	S/ contaminação	NEG	RI	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	15,17
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	14,05
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	12,50
9-Fiambre	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	13,91
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	13,67
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,31
10-Fiambre	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	14,32
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	14,26
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,83
11-Chouriço	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	14,50
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	14,05
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	12,34
12-Chouriço	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	26,62
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	25,55
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	18,96
13-Chouriço	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	20,50
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	17,08
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	15,49
14-Chouriço	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	19,80
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	14,34
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	12,95

### Anexo 6 – Continuação

Amostras	Nível de contaminação	ISO 6579:2002	qPCR	Valor Ct
15-Chourição	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	14,94
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	13,99
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	12,99
16-Chourição	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	17,62
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	14,97
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	12,68
17-Chourição	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	16,97
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	15,52
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	14,46
18-Chourição	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	14,71
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	RI	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,21
19-Entremeada	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	16,61
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	13,87
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,46
20-Entremeada	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	13,70
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	13,53
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	13,44

RI= Resultado indeterminado

**Anexo 7 -** Relação dos resultados obtidos pela ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004 e por PCR em tempo real para detecção da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos

Queijo curado	Nível de contaminação	ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	qPCR	Valor Ct
Amostra 1	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 2	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 3	Sem análise prévia	POS	POS	28,34
Amostra 4	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 5	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 6	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 7	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 8	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 9	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 10	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 11	Sem análise prévia	POS	POS	25,18
Amostra 12	Sem análise prévia	POS	POS	35,20
Amostra 13	Sem análise prévia	POS	POS	33,27
Amostra 14	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 15	Sem análise prévia	POS	POS	32,20
Amostra 16	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 17	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 18	Sem análise prévia	POS	POS	31,77
Amostra 19	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 20	Sem análise prévia	NEG	NEG	Indeterminado
Amostra 21	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	RI	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	29,27
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	24,98

**Anexo 7 - Continuação**

Queijo curado	Nível de contaminação	ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	qPCR	Valor Ct
Amostra 22	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	31,09
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	29,21
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	25,70
Amostra 23	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	32,94
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	26,55
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	24,84
Amostra 44	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	28,62
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	26,91
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	22,47
Amostra 25	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	29,46
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	26,19
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	22,80
Amostra 26	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	24,94
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	18,60
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	18,22
Amostra 27	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	24,33
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	18,92
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	16,82
Amostra 28	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	32,58
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	29,95

**Anexo 7 - Continuação**

Queijo curado	Nível de contaminação	ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	qPCR	Valor Ct
Amostra 29	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	RI	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	33,39
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	30,22
Amostra 30	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	33,03
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	30,80
Amostra 31	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	21,53
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	18,47
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	15,53
Amostra 32	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	24,50
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	18,34
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	15,48
Amostra 33	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	22,44
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	18,24
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	14,79
Amostra 34	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	21,70
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	17,82
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	14,35
Amostra 35	S/ contaminação	NEG	NEG	Indeterminado
	Diluição 10 <sup>-8</sup>	POS	POS	34,34
	Diluição 10 <sup>-7</sup>	POS	POS	28,92
	Diluição 10 <sup>-6</sup>	POS	POS	26,07

RI= Resultado indeterminado.



