



Estudo de *Listeria monocytogenes* e *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) em leite cru de pequenos ruminantes e avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado

Ana Isabel Pires Lourenço

Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Doutor Pedro Miguel Marcelo Dias Nabais

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica do Professor Adjunto da Unidade Técnico-científica das Ciências da Vida e dos Alimentos, Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e co-orientação do Técnico Superior da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Doutor Pedro Miguel Marcelo Dias Nabais.

Maio, 2015

Agradecimentos

Na realização do estágio e na elaboração desta dissertação, várias pessoas contribuíram de algum modo e por isso não podia deixar de lhes agradecer:

À Professora Doutora Cristina Santos Pintado (Escola Superior Agrária de Castelo Branco) e ao Doutor Pedro Nabais (ASAE), por se terem disponibilizado a serem meus orientadores de estágio e por toda a ajuda prestada na realização desta dissertação.

Um agradecimento especial à Doutora Maria Manuel Mendes e à Doutora Graça Mariano, pela amabilidade com que me receberam, por todo o apoio e pela oportunidade de estagiar na Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE).

À Doutora Manuela de Sol por tudo o que me ensinou no laboratório ao longo destes 6 meses.

À Eng. Ana Santos pela sua disponibilidade e por solucionar sempre as coisas da melhor maneira possível.

À Eng. Manuela Goulão pela sua disponibilidade, transmissão de conhecimentos e amabilidade com que sempre me tratou.

À Teresa Póvoas pela simpatia, pelo enorme apoio e boa disposição ao longo do estágio.

Ao meu primo João Martins pela confiança e por me mostrar sempre o lado positivo das coisas. Significas muito para mim.

Ao João Barroso e às meninas da turma de Mestrado. Sem vocês não seria a mesma coisa.

Ao Ricardo Moura pela compreensão durante esta fase mais complicada.

Finalmente agradeço aos meus pais pelo investimento na minha formação académica.

Resumo

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a prevalência de *Esherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e de *Listeria monocytogenes* em leite cru de ovelha e cabra, por PCR em Tempo Real. No caso de amostras positivas para a pesquisa destes microrganismos, pretendeu-se avaliar a prevalência dos principais serogrupos de STEC e classificar os serogrupos associados aos isolados de *Listeria monocytogenes*. Foram igualmente analisadas as pastas de duas amostras de queijo curado.

As amostras de leite analisado (n=58) provieram de 36 explorações localizadas na região da Beira Baixa, fornecedoras de uma queijaria que elabora queijo curado feito com leite cru de pequenos ruminantes. Os resultados das análises microbiológicas das amostras de leite cru permitiram concluir que o leite cru de ovelha, comparativamente com o leite cru de cabra, constitui um maior reservatório para os genes de virulência de STEC, com 94,1% e 85,3% das amostras de leite cru de ovelha analisadas com pesquisa positiva para *stx1/stx2* e *eae*, respetivamente. Em relação à prevalência dos serogrupos de STEC, verificou-se que o serogrupo mais prevalente foi o O45, presente em 38,6% da totalidade das amostras analisadas, seguido dos serogrupos O103/145 (22,8%), O26 (19,3%) e O125 (8,8%). O serotipo O157:H7 estava presente em duas amostras de leite de ovelha. Não foi detetado o serogrupo O111.

Do total de amostras analisadas, duas foram positivas para *Listeria monocytogenes* (3,4%), em leite cru de cabra. No queijo curado, uma das amostras também se revelou positiva para *Listeria monocytogenes* em 25g de amostra. A serotipagem por PCR *Multiplex* dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes das três amostras com pesquisa positiva para este microrganismo permitiu-nos concluir que todos os isolados pertenciam ao serogrupo 4b, 4d e 4e.

No âmbito do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA) foram analisadas pela ASAE, em 2013 e 2014, um total de, respetivamente, 86 e 41 amostras de queijo curado produzido com leite cru, adquiridas em grandes superfícies e queijarias a nível nacional. Os resultados da avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado no ano 2013 basearam-se na apreciação de cada uma das amostras com base nos resultados das cinco unidades analisadas para pesquisa de *Salmonella* em 25g, contagem de *E. coli* (ufc/g) e contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g). No total das amostras, 6% revelaram-se não conformes para a contagem de *Listeria monocytogenes* (ufc/g) e as restantes (94%) revelaram-se conformes para os parâmetros analisados. No ano 2014, as amostras foram analisadas quanto à pesquisa de *Salmonella* em 25g, contagem de *E. coli* (ufc/g) e contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g). O número de amostras não conformes para queijo curado foi de 5%.

Palavras chave

Leite de ovelha, leite de cabra, segurança alimentar

Abstract

This study sought to assess the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Listeria monocytogenes* in raw milk from sheep and goats, using a Real-Time PCR assay. In the case of positive samples for research of these microorganisms, the aim was to assess the prevalence of the main serogroups of STEC and the serogroup associated with the isolates of *L. monocytogenes*. Two cured cheese samples, made with raw milk from sheep and goats, were also analyzed.

The milk samples analyzed (n=58) came from 36 milk producers located in the Beira Baixa region, providing a cheese factory that produces ripened cheeses made from raw milk of small ruminants. The results of the microbiological analysis of raw milk samples showed that the raw milk of sheep, compared to raw milk of goat, is a major reservoir for virulence genes of STEC, with 94.1% and 85.3% of raw sheep's milk samples with positive detection to *stx1/stx2* genes and *eae* gene, respectively. Regarding the prevalence of STEC serogroups, it was found that the most prevalent serogroup, the O45 serogroup, was present in 38.6% of all samples, followed by the O103 / 145 (22.8%), O26 (19.3%) and O125 (8.8%) serogroups. The serotype O157: H7 was present in two sheep milk samples. The O111 serogroup was not detected.

Of the total analyzed samples, two were positive for *Listeria monocytogenes* (3.4%), from raw goat milk. Concerning ripened cheeses, one of the samples also revealed a positive detection of *L. monocytogenes* in 25g of sample. *Multiplex* PCR serotyping of *L. monocytogenes* isolated from the three samples with positive detection of this microorganism has enabled us to conclude that all isolates belonged to serogroup 4b, 4d and 4e.

Under the National Sampling Plan (*Plano Nacional de Colheita de Amostras*, PNCA) were analyzed by the *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica* (ASAE), in 2013 and 2014, a total of, respectively, 86 and 41 cured cheese samples produced with raw milk and purchased in supermarkets and dairies nationwide. The results of the evaluation of cured microbiological cheese quality in the year 2013 were based on the examination of each sample (with five units per sample), regarding the results of detection of *Salmonella* in 25g, *E. coli* enumeration (cfu/g) and *L. monocytogenes* enumeration (cfu/g). Concerning all the samples, 6% proved not conform to the enumeration of *L. monocytogenes* (cfu/g) and the remaining (94%) proved conform to the parameters analyzed. At 2014 the number of non-compliant samples for cured cheese was 5%.

Keywords

sheep milk, goat milk, food safety

Índice geral

1. Introdução	1
2. Pesquisa bibliográfica	3
2.1 O leite de pequenos ruminantes	3
2.2 O queijo	4
2.3 Potenciais perigos associados ao leite e produtos lácteos	5
2.4 Requisitos específicos e gerais a cumprir pelos operadores económicos	6
2.5 <i>Escherichia coli</i> como indicador de higiene	7
2.6 Microrganismos indicadores de segurança	8
2.6.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.6.1.1 Características bioquímicas	9
2.6.1.2 Métodos de pesquisa	10
2.6.1.3 Serotipagem de <i>L. monocytogenes</i>	11
2.6.1.4 <i>L. monocytogenes</i> nos alimentos	11
2.6.1.5 Surtos de origem alimentar	12
2.6.1.6 Listeriose em Portugal	13
2.6.2 <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	15
2.6.2.1 Serogrupos de <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC) associados a surtos	17
2.6.2.2 Fatores de virulência de STEC	18
2.6.2.3 Via de patogénese da STEC	18
2.6.2.4 Aspetos clínicos e epidemiológicos de STEC em animais	19
2.7 Metodologia molecular baseada na reação em cadeia da polimerase – PCR	20
2.7.1 PCR convencional	20
2.7.2 PCR em tempo real	21
2.7.3 Sondas TaqMan®	22
2.7.4 Sondas de hibridação – FRET	23
2.8 Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE)	24
3. Local de estágio e objectivos	26
4. Análise de dados do PNCA de 2013 e 2014	27
5. Estudo sobre <i>L. monocytogenes</i> e STEC em leite e queijo de pequenos ruminantes	28
5.1 Colheita de amostras	28
5.2 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> por PCR em tempo real	28
5.2.1 Enriquecimento	29
5.2.2 Extração de DNA das amostras e amplificação	29
5.2.3 Interpretação e análise de resultados	30
5.2.4 Confirmação dos resultados positivos	31

5.3 Pesquisa de genes de virulência em <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga por PCR em tempo real	32
5.3.1 Enriquecimento	32
5.3.2 Extração do DNA das amostras e amplificação	32
5.3.3 Interpretação e análise dos resultados	33
5.4 Serotipagem de <i>L. monocytogenes</i> por PCR Multiplex	34
5.5 Serotipagem de <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga por PCR em tempo real	35
5.5.1 Amplificação das amostras por PCR	35
5.5.2 Interpretação e análise de resultados	36
6. Resultados e discussão	39
6.1 Avaliação de dados do PNCA de 2013 e 2014	39
6.2 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> nas amostras de leite e queijo	43
6.3 Pesquisa de STEC nas amostras de leite	48
6.4 Serotipagem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	49
6.5 Serotipagem de STEC	50
7. Conclusões	55
8. Referências bibliográficas	57
9. Anexos	66
Anexo I - Auto de Colheita de amostras de leite cru	67
Anexo II - Amostras de leite cru de ovelha e cabra colhidas no âmbito do estudo	69
Anexo III - Resultados da avaliação microbiológica dos dados do PNCA 2013	71
Anexo IV - Resultados da avaliação microbiológica dos dados do PNCA 2014	77

Índice de figuras

Figura 1: Notícia referente ao surto de listeriose no dia 9 de agosto de 2010	15
Figura 2: Esquema das sondas TaqMan emitidas por PCR em tempo real	22
Figura 3: Exemplo de curvas de amplificação	24
Figura 4: Imagem representativa da extração e amplificação das amostras	30
Figura 5: Não conformidades de amostras de queijo curado no ano 2013	40
Figura 6: Não conformidades de amostras de queijo curado no ano 2014	42
Figura 7: 1º gel obtido após serotipagem de <i>L. monocytogenes</i> por <i>Multiplex</i> PCR	49
Figura 8: 2º gel obtido após serotipagem de <i>L. monocytogenes</i> por <i>Multiplex</i> PCR	49

Índice de tabelas

Tabela 1: Composição nutricional média de leite de pequenos ruminantes	3
Tabela 2: Critérios de segurança dos géneros alimentícios para <i>L. monocytogenes</i>	4
Tabela 3: Resumo das características da <i>L. monocytogenes</i>	9
Tabela 4: Prevalência de <i>L. monocytogenes</i> no leite e queijo, em Portugal e Espanha	12
Tabela 5: Resumo das características de <i>Escherichia coli</i> O157	17
Tabela 6: Componentes do kit iQ-Check™ para a pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	29
Tabela 7: Interpretação dos resultados com o controlo positivo e negativo, na deteção do controlo interno e <i>L. monocytogenes</i>	31
Tabela 8: Interpretação dos resultados na pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	31
Tabela 9: Interpretação dos resultados com o controlo positivo e negativo, na deteção dos genes <i>stx1/stx2</i> , <i>eae</i> e controlo interno	33
Tabela 10: Interpretação dos resultados com pesquisa dos genes <i>stx1/stx2</i> , <i>eae</i> e controlo interno	34
Tabela 11: Sequência dos nucleótidos usados na serotipagem molecular de <i>L. monocytogenes</i>	34
Tabela 12: Componentes do kit iQ-Check™ STEC SerO	36
Tabela 13: Interpretação dos resultados com o controlo positivo e negativo	37
Tabela 14: Interpretação dos resultados para os serogrupos	38
Tabela 15: Resultados da pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> e STEC em 25 mL em leite de ovelha	44
Tabela 16: Resultados da pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> e STEC em 25 mL em leite de cabra	45
Tabela 17: Resultados das amostras serotipadas por PCR em tempo real na primeira fase	52
Tabela 18: Resultados das amostras serotipadas por PCR em tempo real na segunda fase	53

1. Introdução

A qualidade, segurança e autenticidade dos alimentos constituem preocupações do consumidor atual. Os consumidores esperam que os alimentos que compram e consomem sejam apetecíveis, nutritivos e ao mesmo tempo seguros (Pfeifer *et al.*, 2004).

Durante o processo de produção, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por substâncias tóxicas ou por microrganismos patogénicos ou de deterioração. O leite, devido à sua riqueza nutritiva, constitui um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos, sendo veículo de transmissão de importantes agentes zoonóticos para o homem (Frazier, 1993).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que as doenças provenientes da ingestão de água e alimentos causam morte a cerca de 2,2 milhões de pessoas anualmente, em todo o mundo, 1,9 milhões das quais sendo crianças (WHO, 2008). As diarreias provocadas pelo consumo de alimentos contaminados e de água imprópria para consumo são, nos últimos anos, as principais causas de doença e morte nos países em desenvolvimento, matando cerca de 1,8 milhões de pessoas todos os anos. Numa listagem das doenças com maior prevalência no mundo, as gastroenterites ocupam o primeiro lugar. De acordo com as suas estimativas, as doenças de origem alimentar são 300 a 350 vezes mais frequentes do que indicam os casos declarados, afetando, anualmente uma em cada três pessoas. Estas doenças são na sua maioria toxinfecções alimentares, termo frequentemente utilizado para englobar as infeções alimentares, que ocorrem quando se ingere um alimento contaminado com um microrganismo patogénico que é capaz de se multiplicar no trato gastrointestinal, e as intoxicações alimentares, que resultam da ingestão de alimentos onde previamente cresceram bactérias ou outros microrganismos que produziram toxinas que acabam por ser ingeridas juntamente com o alimento (Veiga *et al.*, 2009).

Em relação ao leite e seus derivados, os cuidados higiénicos para evitar a contaminação devem ser iniciados desde o maneio do animal pela ordenha até à obtenção do produto final (Riedel, 1992). Diversos microrganismos patogénicos podem ser encontrados no leite, entre eles podem-se destacar a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *Listeria monocytogenes*.

Em Portugal a listeriose não é uma doença de notificação obrigatória e não se encontra em funcionamento nenhum sistema de vigilância, pelo que os casos não são reportados à EFSA (EFSA, 2015). Deste modo, é importante saber qual a situação em Portugal no que concerne à existência de leites e queijos contaminados com esta bactéria e que são possíveis de provocar esta doença.

Assim, com este trabalho pretendeu-se avaliar a prevalência de STEC e *Listeria monocytogenes* em 58 amostras de leite cru de pequenos ruminantes. No caso de

amostras positivas para a pesquisa destes microrganismos, pretendeu-se avaliar a prevalência dos principais serogrupos de STEC e classificar os serogrupos associados aos isolados de *Listeria monocytogenes*.

2. Pesquisa bibliográfica

2.1 O leite de pequenos ruminantes

Caracterizado como um fluido biológico de alta polivalência alimentar, o leite é produzido pelas fêmeas dos mamíferos, existindo variações na sua composição de acordo com a espécie animal (Tabela 1).

Tabela 1: Composição nutricional média de leite de pequenos ruminantes.

Espécie Animal	Proteína (%)	Gordura (%)	Lactose (%)
Ovino	5,5	7,4	4,8
Caprino	2,9	4,5	4,1

Fonte: Adaptado de Nunes (2004)

Por se tratar de um alimento rico em princípios nutritivos e pela elevada quantidade de água, a sua conservação sem intervenção tecnológica é praticamente impossível, sendo portanto uma substância altamente perecível (Oliveira, 1986) e um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários grupos de microrganismos que nele encontram condições ótimas de multiplicação (Zocche *et al.*, 2002).

No que se refere à definição de qualidade do leite, o caso do fabrico de queijo a partir de leite cru representa a situação mais completa e complexa pois envolve, para além dos aspetos relacionados com a genuinidade de composição e das características higiénicas comuns (parâmetros físicos, químicos e microbiológicos), todos os aspetos que se podem relacionar com as características finais do produto ou que podem ter implicações a nível tecnológico (Martins e Vasconcelos, 2001). Os ganhos em eficiência no processamento industrial, aliados às características organolépticas do produto final, fazem com que a qualidade da matéria-prima seja um atributo cada vez mais considerado pelas indústrias de laticínios (Demeu *et al.*, 2001).

A indústria dos laticínios de pequenos ruminantes depende de consumidores com elevado poder de compra, dispostos a pagar mais por um produto tradicional ou que procuram uma alternativa aos laticínios de bovino (Haenlein, 2001).

2.2 O queijo

Os queijos e outros produtos derivados do leite, tal como todos os alimentos, têm de ser seguros e deverão ser reconhecidos como tal pelos consumidores. O fabrico do queijo obedece a regras bem definidas, podendo destacar-se o respeito pelos procedimentos de fabrico e maturação bem como o acompanhamento de procedimentos de higiene ao longo de todo o processo. A sanidade dos rebanhos, a ordenha higiénica, o licenciamento das queijarias e uma boa definição de controlo do processo de fabrico são os aspetos mais importantes para garantir a segurança do produto. A segurança alimentar dos queijos tradicionais depende de todos os operadores envolvidos (Kalantzoupolos *et al.*, 2002).

Segundo o Regulamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de novembro, a bactéria *L. monocytogenes* não deve estar presente acima das 100 unidades formadoras de colónias/g, nos géneros alimentícios que se encontrem no mercado e durante o seu período de vida útil. Este critério aplica-se aos alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, excepto os destinados a lactantes e a fins medicinais específicos (Tabela 2). A nível do estabelecimento industrial, nos alimentos em que é possível ocorrer a sua multiplicação, a bactéria deve estar ausente em 25 g no momento que o alimento deixa de estar sob o controlo do operador da empresa, 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.

Tabela 2: Critérios de segurança dos géneros alimentícios para *L. monocytogenes*.

Categoria de alimentos	Microorganismos/respectivas toxinas e metabolitos	Plano de amostragem (*)		Limites (°)		Método de análise de referência (°)	Fase em que o critério se aplica
		n	c	m	M		
1.1. Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específico (*)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ausência em 25 g		EN/ISO 11290-1	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
1.2. Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (°)		EN/ISO 11290-2 (°)	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
		5	0	Ausência em 25 g (°)		EN/ISO 11290-1	Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu
1.3. Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos (*) (°)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (°)	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil

Fonte: Regulamento (CE) nº 2073/2005

2.3 Potenciais perigos associados ao leite e produtos lácteos

Os principais perigos associados ao leite e produtos lácteos decorrem de contaminações físicas, químicas e microbiológicas assumindo, no entanto, esta última, um papel relevante em termos de segurança e qualidade alimentar.

O leite cru é um alimento muito perecível e um ótimo substrato para o desenvolvimento dos microrganismos. As principais doenças relacionadas com o consumo de leite ou produtos lácteos, assim como a sua deterioração, estão associadas, maioritariamente, com a presença de agentes biológicos. A maioria dos microrganismos isolados no leite cru são bactérias (Batista e Venâncio, 2003).

Note-se que a qualidade e segurança do leite e produtos lácteos estão relacionados com o grau de contaminação inicial. Um leite com elevada carga microbiana dificilmente mantém estáveis as suas características por períodos de tempo longos, mesmo que se encontre conservado a temperaturas adequadas de refrigeração, uma vez que a contaminação inicial que sofreu, principalmente por bactérias psicrótroficas, formadoras ou não de esporos, resulta na produção de elevadas quantidades de enzimas - lipases e proteases - que irão causar rapidamente alterações no produto (ASAE, 2009). Outros fatores igualmente importantes são: a água, saúde das fêmeas produtoras de leite, alimentação animal e práticas de manejo, procedimentos de ordenha, equipamentos e utensílios utilizados na ordenha, processos de higienização, estação do ano, clima, conservação do leite e tempo que medeia desde a ordenha até ao seu tratamento ou transformação (Britz e Robinson 2008; Schimidt, 2008; ASAE, 2009). O grau de contaminação inicial do leite pode assim comprometer toda a linha produtiva pelo que o compromisso global de todos os intervenientes nessa cadeia de produção é essencial.

Uma das fontes de contaminação do leite é o próprio animal, através da presença de mastites. Estas são inflamações da glândula mamária cuja etiologia é infecciosa ou traumática (Radostits *et al.*, 2007). Os agentes bacterianos mais comuns de mastite são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Heredia *et al.*, 2009; Adams e Moss, 2008). Ocasionalmente foram reportados casos de mastites devidas a outros microrganismos, nomeadamente *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* (Adams e Moss, 2008). Em Portugal, Pintado *et al.* (2009) isolaram *L. monocytogenes* num ovino lactante que, apesar de não apresentar sintomatologia, excretava este microrganismo no lado esquerdo do úbere.

2.4 Requisitos específicos e gerais a cumprir pelos operadores económicos

Com o objetivo de evitar, eliminar e reduzir para níveis aceitáveis, os perigos que possam colocar em causa a saúde do consumidor existem requisitos, medidas e procedimentos – alguns de carácter obrigatório e outros apenas de carácter orientador - a adotar por parte dos operadores económicos. Os requisitos específicos de higiene, que devem ser cumpridos pelos operadores económicos do setor do leite e produtos lácteos, encontram-se no Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento e do Conselho, de 29 de abril, na Secção XI respeitante ao leite e produtos lácteos. Nos pontos I) II) e III) do Capítulo I estabelecem-se os requisitos sanitários aplicáveis à produção de leite cru, à higiene nas explorações de leite cru e aos critérios aplicáveis ao leite cru, respetivamente. A conjugar a este diploma há a referir o Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento e do Conselho também de 29 de abril, relativo à higiene geral dos géneros alimentícios.

Em adição ao estabelecido legalmente nos vários artigos deste regulamento, os operadores, dependendo da fase em que atuam, devem cumprir com os requisitos gerais de higiene aplicáveis a todos os operadores das empresas do setor alimentar.

Para além destes dois Regulamentos existe legislação que, direta ou indiretamente contribui para alcançar o objetivo pretendido - a segurança alimentar - como é o caso dos diplomas legais relativos à saúde, bem-estar e alimentação animal, aos critérios microbiológicos e à qualidade da água. Nesta sequência, pretende-se abordar de forma sintética os requisitos mais pertinentes que os operadores devem cumprir desde a produção primária até à venda ao consumidor final.

Os locais destinados ao armazenamento do leite devem estar protegidos contra os parasitas, estar adequadamente separados dos locais de estabulação e, quando necessário, dispor de um equipamento de refrigeração adequado, mantido limpo e concebido/equipado de modo a evitar qualquer contaminação. Após a ordenha, a temperatura elevada associada ao tempo de armazenagem do leite cru são fatores importantes de proliferação de bactérias mesófilas (FAO e IDF, 2013). No Regulamento (CE) n.º 853/2004, no ponto B do n.º II, do Capítulo I, da Secção IX, consta que os operadores de empresas do setor alimentar devem assegurar que, imediatamente após a ordenha, o leite deve ser mantido num local limpo, de modo a evitar qualquer contaminação, e ser arrefecido imediatamente a uma temperatura não superior a 8 °C (no caso da recolha ser feita diariamente) ou não superior a 6°C (no caso da recolha não ser feita diariamente). Por outro lado com a manutenção do leite em refrigeração durante longos períodos existe uma proliferação de bactérias psicotróficas.

Tendo em conta que, no decorrer do transporte do leite cru para os locais de tratamento e/ou transformação, poderão ocorrer contaminações químicas,

microbiológicas e físicas existem procedimentos base que, se forem cumpridos, garantem que esta fase não contribuirá para nenhum problema de segurança e qualidade do leite e produtos lácteos. Estes devem ser adequados e encontrar-se em bom estado de conservação e higiene. Para tal devem, obrigatoriamente, sofrer um adequado processo de higienização de modo a evitar o risco de contaminação química ou microbiológica do leite cru, quer seja pela existência de resíduos de leite ou outros géneros alimentícios resultantes de transportes anteriores, quer seja pela possibilidade de subsistirem resíduos de detergentes e desinfetantes consequentes de uma aplicação ou enxaguamento incorrecto.

No Regulamento (CE) n.º 853/2004 é referido ainda que cabe aos operadores económicos adotar os procedimentos necessários para assegurar que o leite cru obedeça aos critérios estabelecidos e que, no caso de os mesmos não serem cumpridos, deverão informar a autoridade competente desse facto e tomar medidas efetivas para corrigir essa situação de irregularidade.

Para além da aprovação dos estabelecimentos, o artigo 3.º do Regulamento (CE) n.º 852/2004 refere que os operadores das empresas do setor alimentar devem assegurar que em todas as fases de produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios existam processos baseados nos princípios do sistema de análise de perigos e controlo dos pontos críticos (HACCP).

2.5 *Escherichia coli* como indicador de higiene

Um dos microrganismos mais usados como indicador de higiene é a bactéria *Escherichia coli*. Esta foi descrita em 1885 pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich, tendo sido isolada de fezes de crianças (Adams e Moss, 2008). Inicialmente designada *Bacterium coli*, foi renomeada em 1920, altura em que as evidências da relação da bactéria com gastroenterites e consequente mortalidade infantil aumentavam (Roberts *et al.*, 1996).

O trato intestinal dos animais homeotérmicos, nos quais se inclui o ser humano, é uma fonte natural de *E. coli* e, portanto, virtualmente todos os humanos e animais domésticos saudáveis apresentam esta bactéria na flora do seu intestino.

E. coli é a espécie mais conhecida do género *Escherichia*. Apesar de haver serogrupos patogénicos de *E. coli*, a maioria das bactérias é inofensiva, relacionando-se através de comensalismo com humanos e animais (CDC, 2010; Adams e Moss, 2008). Nesta relação, *E. coli* sintetiza vitaminas úteis ao ser humano e compete com bactérias patogénicas, suprimindo o seu desenvolvimento quando estas estão presentes (Lablè e Garcia, 2001).

A presença de *E. coli* em alimentos é um indicador de contaminação fecal direta ou indireta. Elevadas contagens de *E. coli* e de coliformes totais normalmente indica falhas ao nível da higiene (Yucel e Ulusoy, 2006). A contaminação fecal direta ocorre durante o processamento de matérias-primas de origem animal, devido

essencialmente a uma fraca higiene pessoal dos manipuladores e a deficientes práticas de produção. Já a contaminação fecal indireta pode ter a ver com a água poluída e esgoto, na preparação de alimentos, na higiene pessoal, na agricultura e no lazer (Ray, 2004).

Em produtos processados pelo calor, como os pasteurizados, pode-se recorrer à contagem de *E. coli* para comprovar a eficácia do processo térmico. A presença desta bactéria após processamento pelo calor é vista com grande preocupação, pois há uma elevada possibilidade da presença de microrganismos patogénicos entéricos no género alimentício. A sua presença permite ainda dar uma indicação sobre as condições higiénicas da fábrica e/ou da possibilidade de ocorrência de contaminação pós-processamento (Downes e Ito, 2001; Ray, 2004).

2.6 Microrganismos indicadores de segurança

2.6.1 *Listeria monocytogenes*

O género *Listeria* inclui seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi* (Liu, 2006; Ludwig *et al.*, 2009). *Listeria monocytogenes* é a única espécie patogénica para o homem, enquanto que *L. ivanovii* é considerada potencialmente patogénica para o homem e os animais (Chambel *et al.*, 2007; Adams e Moss, 2008). *Listeria monocytogenes* é um microrganismo amplamente distribuído no ambiente. Podemos ver as suas características na Tabela 3.

Tabela 3: Resumo das características da *L. monocytogenes*.

Microrganismo	<i>Listeria monocytogenes</i>
Características do microrganismo	Bacilos; Gram-positivos; Não formam esporos; Anaeróbios facultativos; Psicotróficos; Cresce a temperaturas de 3°C-42°C (ótimo 30-37°C); pH 5,0-9,0 (mínimo 4,4); $a_w > 0,92$.
Fonte	Microrganismo ubiquitário – solo, água, plantas, ambiente, silagens; Pode igualmente ser encontrado nas fezes dos animais (selvagens e domésticos) e do Homem (que podem ser portador assintomático deste microrganismo, no leite de animais saudáveis ou com mastites).
Doença	Listeriose
Período de Incubação	3 a 70 dias
Sintomas	Sinais clínicos de uma pessoa portadora de listeriose não são específicos e com frequência são confundidos com sintomas de uma gripe, como febre e dores de cabeça, podendo ser acompanhado por sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreias.
Duração	Dias a várias semanas
Sequelas	Se a infecção passar para o sistema nervoso, verifica-se rigidez no pescoço (torcicolo), confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões; A contaminação do feto pode resultar em aborto ou parto prematuro; Nos adultos com o sistema imunitário debilitado e nos recém-nascidos podem ocorrer septicemia ou meningite.
Modo de transmissão associado aos alimentos	Ingestão de alimentos crus contaminados ou de alimentos contaminados que sofreram um tratamento térmico que visava a eliminação ou redução para níveis aceitáveis dos microrganismos patogênicos, mas foi insuficiente ou sofreram uma contaminação após o tratamento/processamento.
Medidas e processamentos de controle	Boa higiene pessoal; Boas práticas de higiene do decorrer no processo de fabrico; Tratamento térmico dos géneros alimentícios; Armazenamento dos géneros alimentícios a temperaturas adequadas.

2.6.1.1 Características bioquímicas

Como requisitos nutricionais, a maioria das estirpes de *L. monocytogenes* necessitam de cisteína, valina, isoleucina e leucina para se multiplicarem e nenhuma requer asparagina, glutamina, prolina, histidina e tirosina como fator essencial/estimulante de crescimento (Siddiqi e Khan, 1989). A fenilalanina e o Fe^{3+} estimulam o crescimento e a glucose e a glutamina são necessárias como fonte primária de carbono e azoto (Premaratne *et al.*, 1991).

Listeria apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa e apresenta positividade aos testes: vermelho de metilo e Voges-Proskauer (Ludwig *et al.*, 2009).

As espécies de *Listeria* sob condições de aerobiose fermentam a glucose, formando ácido láctico, ácido acético e acetoína e, sob condições de anaerobiose, não se forma acetoína mas forma-se ácido láctico (Pine *et al.*, 1989). Produz ácido através da fermentação de açúcares como a glucose, manose, maltose e fructose, sem produção de gás e hidrolisa a esculina mas não a ureia. A gelatina e a caseína do leite também não são hidrolisadas por *Listeria* (Ludwig *et al.*, 2009).

2.6.1.2 Métodos de pesquisa

De um modo geral, as espécies do género *Listeria* multiplicam-se em quase todos os meios bacteriológicos não seletivos, tais como triptona de soja (TSA - *Tryptone Soya Agar*) e caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - *Brain Heart Infusion*). A dificuldade reside muitas vezes no isolamento quando a bactéria está presente em pequenas quantidades na amostra e esta está contaminada por outra flora bacteriana. Existe uma ampla variedade de meios seletivos para o isolamento de *Listeria* a partir de amostras não estéreis como alimentos, amostras do meio ambiente, amostras clínicas e fezes. Têm sido desenvolvidos vários protocolos para pesquisar *L. monocytogenes* nos vários tipos de amostras (Wagner e McLauchlin, 2008).

Os métodos mais utilizados para a pesquisa de *L. monocytogenes* são o protocolo FDA (*Food and Drug Administration*) para a pesquisa em lacticínios e a ISO 11290 (*International Organization Standardization*) para todo o tipo de amostras (Churchill *et al.*, 2006; Zunabovic *et al.*, 2010). O recurso à norma ISO 11290 é o recomendado pelo Reg. (CE) 2073/2005, sendo por isso um dos mais utilizados. Neste existem dois passos de enriquecimento e, posteriormente, são utilizados dois meios seletivos, o meio cromogénico ALOA (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti*) e outro, segundo a escolha do laboratório, como o meio OXFORD ou o meio PALCAM. No meio ALOA as colónias de *L. monocytogenes* têm sensivelmente 1 mm de diâmetro e são tipicamente verde-azuladas rodeadas por um halo opaco, permitindo a sua diferenciação.

Estes métodos variam no caldo de enriquecimento e no meio selectivo utilizado: após um período de enriquecimento, as culturas são semeadas em meios seletivos para isolamento das colónias de *L. monocytogenes* ou de outra espécie de *Listeria*, se presentes. Estes meios contêm compostos como acriflavina (para inibir outras bactérias Gram positivas) e ácido nalidíxico (para inibir bactérias Gram negativas), entre outros (Churchill *et al.*, 2006).

Os meios de cultura ALOA e Rapid L"mono são meios que, para além de serem seletivos como o meio Oxford ou o meio PALCAM, são também diferenciais, o que permite seleccionar apenas as colónias mais suspeitas de *L. monocytogenes*.

Após o isolamento nos meios seletivos devem ser efectuados testes de confirmação e de acordo com o método ISO 11290, as colónias seleccionadas devem ser inoculadas no meio triptona de soja com extrato de levedura (TSYEA - *Tryptone Soya Yeast Extract Agar*) e incubadas a 37°C durante 18-24 horas. Se as colónias suspeitas forem semelhantes às de *Listeria* (opacas, incolores e de bordos definidos) deve ser efectuado o teste de coloração de Gram e o teste da mobilidade, os quais deverão mostrar uma cultura móvel e com bacilos Gram positivos.

L. monocytogenes é produtora de β -hemolisinas (exibe um halo de hemólise em meio de agar sangue de ovelha ou de cavalo), utiliza a ramnose como fonte de açúcares e exibe positividade no teste CAMP (*Christie Atkins Munch Peterson*), com

Staphylococcus aureus mas negatividade com *Rhodococcus equi* (Ludwig *et al.*, 2009). Outra opção para confirmar as culturas suspeitas de *L.monocytogenes* é o método rápido bioquímico API Listeria (Ref. 10 300, bioMérieux®).

2.6.1.3 Serotipagem de *L. monocytogenes*

A espécie *L. monocytogenes* inclui treze serotipos, que se distinguem pelos antígenos somáticos e antígenos flagelares (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7). Na maioria dos surtos, os serotipos 4b, 1/2a e 1/2b são os isolados de doenças no animal e no Homem (Chaturongakul *et al.*, 2008; López *et al.*, 2006; OIE, 2005). São responsáveis por mais de 90% das infeções em humanos, e são também os mais frequentes em géneros alimentícios e locais de processamento de alimentos (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007).

O serotipo 4b, além de ser o principal responsável pela listeriose, é também mais isolado em pacientes com meningoencefalite do que em pacientes com infeção sistémica, o que pode indicar que é mais virulento que os restantes. Associado a este facto está também a maior taxa de mortalidade registada associada ao serogrupo 4 (26%) relativamente ao serotipo 1/2 (16%) (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

2.6.1.4 *L. monocytogenes* nos alimentos

A listeriose humana pode contrair-se por várias fontes, mas a mais importante é a ingestão de alimentos contaminados (OIE, 2005; EFSA, 2015). É uma das doenças bacterianas mais mortais, com taxas de fatalidade entre os 20-30% (McLauchlin, 1990; Schuchat *et al.*, 1991). Esta apresenta uma sazonalidade marcada, ocorrendo mais casos no fim do Verão/Outono, em contraste com a sazonalidade da listeriose animal, que apresenta um pico na Primavera (Liu, 2008).

Os dados de 2013 relativos aos Estados-Membros, compilados no relatório da EFSA (EFSA, 2015), demonstram que na pesquisa de *L. monocytogenes* nos produtos “prontos para consumo, no retalho, poucas amostras apresentavam uma contagem acima das 100 ufc/g, ou seja, acima do limite legal. Os alimentos que apresentaram uma maior taxa de não conformidade neste critério foram os queijos (1,1%), produtos piscícolas (1,0%) e produtos cárneos “prontos para consumo”, excepto salsichas fermentadas (0,3%). Relativamente ao critério imposto na fase de produção, ausência em 25 g de alimento, a maioria dos incumprimentos foi registada em produtos cárneos “prontos para consumo”, excepto salsichas fermentadas (6,7%), produtos piscícolas (6,6%) e em outros produtos “prontos para consumo” (1,8%). Para amostras de lotes, a maior taxa de não conformidades foi registada em produtos piscícolas “prontos para consumo” (5,3%) e em queijos (1,3%) (EFSA, 2015). A tabela seguinte apresenta a prevalência de *L. monocytogenes* em amostras de leite e queijo, em Portugal e Espanha.

Tabela 4: Prevalência de *L. monocytogenes* no leite e queijo, em Portugal e Espanha.

Alimentos Crus	Prevalência	Fonte
Portugal		
Leite (cabra, ovelha e vaca)	2%	Guerra <i>et al.</i> , 2001
Leite cru de ovelha e cabra	6,2%	Pintado e Felício., 2002
Queijo curado	34,6 %	Pintado e Felício., 2002
Queijo macio	46%	Pintado <i>et al.</i> , 2005
Espanha		
Leite de cabra	2,56%	Gaya <i>et al.</i> , 1996
Queijo de pasta semi-dura de ovelha	44%	Guerra <i>et al.</i> , 2001
Queijo fresco	4%	Guerra <i>et al.</i> , 2001

2.6.1.5 Surtos de origem alimentar

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

Apesar do carácter ubiqüitário da *L. monocytogenes*, a incidência de listeriose é muito baixa, normalmente com 2 a 8 casos anuais por milhão na Europa e Estados Unidos da América (EFSA, 2015).

Na Suíça, entre os anos de 1983-1987, 122 pessoas ficaram infetadas após ingerirem queijo de pasta mole contaminado (Büla *et al.*, 1995). Inicialmente não se conseguia identificar a fonte de infeção mas, após uma extensa pesquisa nos produtos lácteos, isolou-se o mesmo subtipo na superfície do queijo em questão (Farber e Peterkin, 1991).

Foram reportadas taxas excepcionalmente superiores em Espanha no ano de 1990 com 10,9 casos por milhão (Nolla-Salas *et al.*, 1993) e em França, em 1986, com 14,7 casos por milhão (Goulet e Brohier, 1989). No Japão foi reportada uma incidência de 0,65 casos por milhão entre 1996 e 2002 (Okutani *et al.*, 2004). Em situações epidémicas, a incidência na população-alvo aumenta num fator de 3 a 10 (Vázquez-Boland *et al.*, 2001), pois esta doença pode ser superior nos grupos de risco como imunodeprimidos, idosos e pacientes com infeções do sistema nervoso central, podendo chegar aos 70% (Rocourt *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Leite *et al.* (2006), em Portugal, com 15 isolados clínicos demonstrou que 13 pertenciam ao serotipo 4b (86,7%) e 2 ao serotipo 1/2b (13,3%), o que está de acordo com outros estudos. Na França foram analisadas 603 amostras

de *L. monocytogenes* provenientes de isolados humanos, entre os anos de 2001 e 2003, e 96% pertenceram aos serotipos 4b, 1/2a e 1/2b (Goulet *et al.*, 2006).

Valk *et al.* (2005) estudaram os sistemas de vigilância na Europa, abrangendo 17 países. Todos, excepto Portugal tinham ativo, pelo menos, um sistema de vigilância (Áustria, Bélgica, Islândia, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Itália, Holanda, Noruega, Espanha, Suécia, Suíça e Reino Unido).

Em 2009, foram reportados pelos 26 Estados-Membros da UE 1645 casos humanos de listeriose, representando um aumento de 264 casos (19%), em relação a 2008. Foram registadas 270 vítimas mortais representando uma taxa de mortalidade de 16,6% (EFSA, 2011).

Além das situações referidas, em 1995, em França, ocorreu um surto associado a queijo de pasta mole produzido com leite não pasteurizado (Lundén *et al.*, 2004), em 2000 (Carolina do Norte) ligado a queijo fresco mexicano (MacDonald *et al.*, 2005), em 2001 (Suécia) associado a queijo fresco produzido a partir de leite cru (Carrique-Mas *et al.*, 2003), em 2002 (Canadá) associado a queijo de pasta mole ou semi-dura de leite cru (Gaulin *et al.*, 2003), em 2003 (Texas) devido a queijo fresco mexicano (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007), em 2005 e 2006, na Suíça e República Checa, respetivamente, associados a queijo de pasta mole (Bille *et al.*, 2006; Vít *et al.*, 2007) e em 2008, (Canadá) devido a queijo produzido com leite cru (Taillefer *et al.*, 2010; Health Canada, 2009).

Entre setembro e dezembro de 2011 ocorreu um surto de grandes dimensões nos Estados Unidos, o qual afetou 146 pessoas e vitimou mortalmente 25. Foram indicadas 4 estirpes diferentes de *L. monocytogenes* que contaminaram meloas numa quinta no estado de Colorado (CDC, 2011).

Entre 2009 e 2013 verificou-se uma tendência crescente de listeriose na UE / EEE e, em 2013, houve um aumento de 9,4% em comparação com 2012. Em 2013, sete surtos de origem alimentar com forte evidência de serem causados por *L. monocytogenes* foram relatados por cinco países dos EM. Estes surtos resultaram em 51 casos (11 internamentos e três mortes). Também, três surtos foram relacionados com crustáceos, moluscos e ainda salada mista, carnes e queijo. Em 2013, o nível global de não-conformidade para queijos moles e semi-moles foi consideravelmente maior do que nos anos anteriores (EFSA, 2015).

2.6.1.6 Listeriose em Portugal

Almeida *et al.* (2006) realizaram um estudo retrospectivo sobre a listeriose em Portugal e compilaram os casos identificados entre os anos de 1994 e 2003. Foram registados 35 casos de listeriose com uma taxa de mortalidade de 37,5%, para os 16 casos em que se teve acesso à evolução clínica da doença. Segundo este estudo o ano com mais casos foi o de 2003, com uma incidência de pelo menos 1,4 casos por

milhão de habitantes. Este estudo permitiu ter a noção de que, apesar de não haver registos em relatórios oficiais, a listeriose é uma ameaça em Portugal.

Num estudo posterior, os mesmos autores compilaram casos de listeriose diagnosticados em Portugal entre 2004 e 2007. Foram identificados 67 casos com uma taxa de fatalidade superior a 40%, para os 24 casos em que foi conhecida a evolução clínica. O número de casos aumentou ao longo dos anos em estudo registando-se em 24 casos, com uma taxa anual de 2,3 casos por milhão de habitantes, sensivelmente o dobro do valor referido em 2003.

Relativamente à presença de *L. monocytogenes* nos alimentos, Mena *et al.* (2004) estudaram a sua incidência em produtos comercializados em Portugal (retalho). De 1035 amostras, 72 (7,0%) apresentaram um resultado positivo na pesquisa de *L. monocytogenes*. As maiores taxas de positividade foram registadas em carne de frango cru (60%), carne vermelha crua (17,7%), leite cru (16,7%; 1/6), peixe cru (12%) e vegetais congelados (12,9%). Apesar dos valores serem elevados, a presença de *L. monocytogenes* nestes produtos não é tão problemática quanto a presença em produtos “prontos para consumo” pois estes alimentos crus normalmente são cozinhados ou pasteurizados antes de consumidos. Nos produtos “prontos para consumo” foi registada uma prevalência de 25% em fiambre, 8,3% em frutos secos, 4,1% em pastelaria e 4% em queijo fresco, alimentos que fazem parte dos hábitos alimentares portugueses (Mena *et al.*, 2004).

Em julho de 2010 o laboratório da Escola Superior de Biotecnologia da Saúde da Universidade Católica Portuguesa (ESB- UCP), na sequência de um aumento de casos de listeriose registados na região de Lisboa e Vale do Tejo (15 casos entre os meses de fevereiro a julho de 2010) informou a Direção Geral de Saúde da possível existência de um surto de listeriose (Pita, 2012). As informações de nove doentes, nos estabelecimentos de retalho em que teriam efetuado compras e os alimentos adquiridos e os estabelecimentos de restauração frequentados, nos dois meses anteriores aos primeiros sintomas, foram encaminhados para a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) e posteriormente, em 2010 surgiram as primeiras notícias referentes ao surto de listeriose (Figura 1).

NA ZONA DE LISBOA

13 pessoas mortas com listeriose

por DIL.pt 09 Agosto 2010

A Direcção Geral de Saúde (DGS) anunciou em comunicado que está a investigar casos de listeriose - uma infecção bacteriana grave - ocorridos em Lisboa e Vale do Tejo, que segundo o jornal 'Sol' são já mais de 20 e terão causado 13 mortes desde o início do ano.

Segundo a edição online do semanário 'Sol', o laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto classifica a existência de cerca de 20 doentes com listeriose como "um surto", já que os casos estão concentrados na área metropolitana de Lisboa. A maioria dos doentes terá sido tratada no Hospital Garcia de Orta, em Almada, e no Curry Cabral, em Lisboa.

Em declarações ao 'Sol', a investigadora Paula Teixeira, da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto, indica que o número de casos está "acima do normal", mas que é a DGS o pode considerar como um surto de listeriose.

O 'Sol' noticia que, desde o início do ano, terão morrido 13 pessoas com esta infecção, todas pertencentes a grupos de risco: grávidas, recém-nascidos, idosos ou doentes crónicos.

A listeriose pode ser causada pela ingestão de alimentos contaminados, como leite não pasteurizado, vegetais crus mal lavados ou alimentos processados (como charcutaria), e tem um período de incubação médio de três semanas, de acordo com a informação veiculada pela DGS no comunicado difundido no seu site.

A doença pode ser assintomática, ou apresentar sintomas gripais e gastrointestinais, como diarreia.

Figura 1: Notícia referente ao surto de listeriose no dia 9 de agosto de 2010. Fonte: Pita (2012)

Na sequência desta notícia, foram abrangidos 42 estabelecimentos de retalho e seis indústrias. Uma amostra de queijo de vaca e cabra fresco apresentou contagem de *L. monocytogenes* superior a 100 ufc/g e o mesmo pulsótipo dos isolados clínicos. O estabelecimento industrial que produziu o queijo foi inspeccionado e cinco das seis amostras colhidas apresentaram-se positivas e com o pulsótipo isolado nos doentes envolvidos no surto, podendo este ser o foco ou um dos focos (Citado em Pita, 2012). Nestas visitas foram verificadas as condições higiénicas dos estabelecimentos, realizada a colheita de géneros alimentícios susceptíveis de poderem estar contaminados e efectuadas zaragatoas aos equipamentos e utensílios.

2.6.2 *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

Diversas estirpes de *E. coli* foram adquirindo fatores de virulência que lhes permitiu adaptar-se a novos nichos e, em alguns casos, a causar doenças graves. Existem seis grupos patogénicos de *E. coli* que afetam o intestino dos seres humanos: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) também chamada *E. coli* produtora de verotoxinas (VTEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que é um sub-grupo de STEC/VTEC; *E. coli* enteropatogénica (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli*

enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Farrokh *et al.*, 2012).

As STEC destacam-se pelo seu potencial zoonótico (Sousa, 2005) e geralmente os animais portadores destes microrganismos são assintomáticos. Atuam como uma importante causa de surtos de diarreia esporádica e epidémica (Sousa, 2005), podendo manifestar-se em graves quadros clínicos e ocasionar severas complicações sistémicas como a anemia hemolítica e a síndrome hemolítica urémica (SHU), caracterizada por insuficiência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, podendo até mesmo evoluir para a morte (Nataro e Kaper, 1998).

A transmissão de STEC pode ocorrer através da ingestão de carne mal cozida ou crua, verduras, legumes, água contaminada, leite não pasteurizado e também pelo contato direto com animais ou outras pessoas infetadas (Hunt, 2010; Aspán e Eriksson, 2010; Crump *et al.*, 2002). A viabilidade de STEC nas fezes de animais pode variar de semanas a meses e a sua persistência no solo favorece a infeção fazendo com que a exposição ambiental seja um fator de risco para a infeção humana (Caprioli *et al.*, 2005; Ogden *et al.*, 2002).

O termo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) foi originalmente utilizado para classificar subpopulações de STEC consideradas altamente patogénicas e responsáveis por casos severos em seres humanos, sendo o serotipo O157:H7 considerado altamente patogénico, originando colite hemorrágica e síndrome hemolítica urémica (Guth *et al.*, 2010). Na Tabela 5, pode-se observar as suas características.

Tabela 5: Resumo das características de *Escherichia coli* O157.

Microrganismo	<i>Escherichia coli</i> O157
Características	Gram-negativo; Anaeróbio Facultativo; Móvel; Família <i>Enterobacteriaceae</i> ; Mesófilo; Cresce a temperaturas de 7-10°C até aos 50°C (ótimo 37 °C); Mínimo para multiplicar a _w 0.95 e pH 4.4-8-5.
Fonte	Intestino e fezes de animais;
Significado	Associada a doenças de origem alimentar; Associado ao consumo de leite cru.
Doença	Infeção
Período de Incubação	3 a 8 dias (em média 4 dias)
Sintomas	Diarreia que pode tornar-se sanguinolenta; Febre e vômitos.
Duração	Dias a semanas
Modo de transmissão associado a alimentos	Ingestão de alimentos contaminados, designadamente leite cru, carne e vegetais. A contaminação fecal da água e a contaminação de alimentos através de contaminação cruzada também são potenciais fontes de infeção.
Medidas e procedimentos de controlo	Tratamento de leite cru (pasteurização de UHT); Boas práticas de higiene durante a produção e processamento; Evitar contaminação cruzada; Boa higiene pessoal; Controlo de pragas.
Taxa de mortalidade	2% em países desenvolvidos

Fonte: Adaptado de WHO (2008)

2.6.2.1 Serogrupos de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) associados a surtos

O primeiro relato de surto causado por uma STEC envolveu o serogrupo O157 e ocorreu nos Estados Unidos da América, nos estados de Oregon e Michigan em 1982. Estudos epidemiológicos revelaram que o surto ocorreu após a ingestão de hambúrguer de carne de uma rede de fast food (Riley *et al.*, 1983).

Entre 1989 e 1990, outro surto causado por uma STEC O157:H7 ocorreu nos Estado Unidos, em Missouri, devido à ingestão de água contaminada (Swerdlow *et al.*, 1992). Na Austrália, o primeiro surto causado por STEC, que foi associado ao serotipo O111:H-, ocorreu em 1995, no qual 21 pacientes desenvolveram síndrome hemolítica urémica. A ingestão de salsicha preparada com carne bovina foi identificada como a provável fonte de toxinfecção (Paton *et al.*, 1996). Em 1996, um surto ocorrido no Japão, envolveu 6.309 crianças de 62 escolas de Sakai, havendo 1.012 casos confirmados laboratorialmente, incluindo 197 casos de síndrome hemolítica urémica e três óbitos (Fukushima *et al.*, 1997).

Um surto causado por STEC ocorreu na Alemanha, entre maio e junho de 2011, por um serotipo até então não envolvido, ocasionando 3.222 casos, dos quais 810 evoluíram para síndrome hemolítica urémica. A cultura bacteriana foi caracterizada como pertencente ao serotipo O104:H4 e era portadora do gene *stx*. Algumas

características genéticas encontradas nesta cultura, são características enteroagregativa da patovar de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), indicando que a estirpe envolvida consiste num híbrido STEC-EAEC (Frank *et al.*, 2011).

Estudos com STEC têm revelado variações nos padrões epidemiológicos das toxinfecções causadas por estes microrganismos em diversas partes do mundo (Vaz *et al.*, 2004)

2.6.2.2 Fatores de virulência de STEC

As toxinas Shiga (Stx) constituem o principal fator de virulência das STEC, sendo possível caracterizar dois grupos principais: stx1, que difere em apenas um aminoácido da toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* serotipo 1; e Stx2 que possui uma similaridade em torno de 60% com Stx1 na sequência de aminoácidos (Hunt, 2010). Ambas possuem diferentes variantes antigénicas que podem ou não estar associadas com uma doença grave. Uma única célula pode possuir um ou mais genes *stx*, e a informação genética para a produção de Stx1 e Stx2 está localizada no genoma de bacteriófagos do tipo lambda integrados no cromossoma das STEC (Caprioli *et al.*, 2005). A literatura descreve que as células que produzem apenas Stx2 são mais patogénicas do que as que só produzem Stx1 ou ambas, estando mais frequentemente associadas à SHU (Paton e Paton, 1998; Stephan *et al.*, 2008)

Além das Stx, as STEC podem estar envolvidas numa aderência íntima que destrói as microvilosidades intestinais e induz a formação de uma estrutura em forma de pedestal caracterizando a lesão A/E (“*attaching and effacing*”) (Lorusso *et al.*, 2009). Estudos com células epiteliais em cultura revelaram que a lesão A/E envolve a ação conjunta da proteína da membrana externa, intimina, que é codificada pelo gene *eae* (China *et al.*, 1996).

2.6.2.3 Via de patogénese da STEC

As STEC necessitam ultrapassar alguns mecanismos de defesa do organismo para colonizar o intestino e como primeira barreira deparam-se com o baixo pH gástrico. Devido à capacidade de resistência à acidez de alguns serogrupos (incluindo o O157), esses microrganismos resistem a este ambiente (Paton e Paton, 1998; Gyles, 2007).

A produção da toxina shiga é o principal fator de virulência nas patologias causadas pelas STEC em seres humanos. Localmente a sua produção leva a danos nos vasos do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta ou colite hemorrágica. Ao cair na corrente sanguínea, a Stx liga-se aos receptores presentes no endotélio vascular, promovendo danos principalmente aos rins e ao sistema nervoso central, podendo levar ao desenvolvimento da síndrome hemolítica urémica (Gyles, 2007).

Após ligar-se ao receptor Gb3 na célula, a Stx sofre endocitose e é transportada por meio de vesículas revestidas pela proteína clatrina para o citoplasma da célula, onde se podem fundir com vesículas do lisossoma e serem destruídas (Paton e Paton, 1998). No caso de células que são suscetíveis à toxina, as vesículas são transportadas até ao retículo endoplasmático via complexo de Golgi e, durante este processo, a subunidade A é clivada pela enzima furina, gerando os fragmentos A1 e A2. O fragmento A1 livre tem atividade RNA N-glicosidase e interage com a unidade 60S do ribossoma. A subunidade A1 remove um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA eucariótico, promovendo a inibição da síntese proteica, causando a morte celular (Paton e Paton, 1998).

2.6.2.4 Aspectos clínicos e epidemiológicos de STEC em animais

As STEC podem ser encontradas no trato gastrintestinal de uma variedade de animais como suínos, ovinos, caprinos, cavalos, aves e até entre cães e gatos. Num estudo conduzido por Tristão e colaboradores (2007), 1562 das 2402 (65%) amostras fecais de bovinos, colhidas no estado do Rio de Janeiro e em 279 de 994 (28%) das amostras fecais colhidas de bovinos no Rio Grande do Sul, apresentavam *E. coli* produtora de toxina Shiga (Stx).

De acordo com o relatório técnico da EFSA (EFSA, 2011), relativo a dados europeus para o período de 2007 a 2009, 0,7% a 3,2% das amostras de carne fresca de ovinos foram positivas para STEC e nenhuma amostra mostrou ser positiva para STEC O157. Para o mesmo período, dados relativos à prevalência de STEC em animais, mostram que 0,9% a 20% das amostras provenientes de ovelha foram positivas para STEC e 0,3% a 3,1% destas amostras foram positivas para o serogrupo O157.

Os ovinos saudáveis também podem ser portadores assintomáticos de STEC, sendo importante o seu papel como fonte de infecção (Vettorato, 2008). Algumas células como as pertencentes ao serotipo O5:H- são predominantemente isoladas a partir de ovinos e raramente de outros animais (Beutin, 1993; Djordjevic *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2003). Os caprinos também são importantes e o serotipo O157:H7 já foi isolado a partir de leite de cabra não pasteurizado num surto ocorrido na República Checa (Bielaszewsk *et al.*, 1997).

O primeiro estudo feito com búfalos na América do Sul identificou 20 serogrupos distintos de STEC, sendo que mais de 50% destes estão associados com a doença em humanos (Oliveira *et al.*, 2007).

As células de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga também já foram isoladas a partir de dejetos de aves, como pombos e gaivotas (Makino *et al.*, 2000). Num estudo feito com galinhas poedeiras verificou-se a presença de STEC O157:H7, isoladas a partir de zangaratoas cloacais (Dipineto *et al.*, 2006).

2.7 Metodologia molecular baseada na reação em cadeia da polimerase - PCR

2.7.1 PCR convencional

A reacção de polimerase em cadeia (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80, permitindo amplificar mais de mil milhões de vezes regiões específicas de DNA (Kubista *et al.*, 2006). O princípio subjacente à técnica é extremamente simples: um segmento de DNA alvo de tamanho delimitado por dois primers oligonucleotídicos específicos é amplificado pela acção de uma DNA polimerase termo-estável. Este método é mais rápido e sensível e permite reduzir o tempo de análise até à obtenção de resultados. Os custos destes métodos são também reduzidos, excetuando-se o investimento inicial, o que é ótimo para a indústria (O'Grady *et al.*, 2008).

Um dos métodos moleculares é a reação em cadeia da polimerase vulgarmente conhecido por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que permite uma amplificação controlada *in vitro*, por enzimas, de um fragmento de DNA de interesse, de forma extremamente rápida. Com o PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a pesquisa rápida e fiável de diferentes marcadores genéticos (Brown, 2006).

A reação de amplificação ocorre em ciclos sucessivos, cada ciclo envolvendo um passo de desnaturação do DNA alvo, por aquecimento a 92-95°C; um passo de hibridação dos *primers* com as sequências complementares do DNA alvo a temperatura entre 50-60°C e um passo final de extensão enzimática dos *primers*, entre 68-72°C, em que a DNA polimerase promove a síntese das sequências compreendidas entre os dois *primers*. Os produtos resultantes da extensão dos *primers* a cada ciclo podem ser utilizados como alvo de amplificação no ciclo seguinte. Teoricamente o número de cópias do segmento de DNA delimitado pelos *primers*, duplica a cada ciclo de amplificação. Assim, 30 ciclos de PCR originam uma amplificação de cerca de 10^9 vezes (Taveira, 2000).

Em microbiologia clínica, os testes de diagnóstico laboratorial, baseados na amplificação por PCR têm sido usados desde os anos 90, principalmente na identificação de microrganismos de crescimento lento ou na pesquisa de organismos incapazes de crescer em cultura, situações específicas em que os métodos moleculares oferecem uma alternativa clara e inequívoca aos métodos tradicionais.

Diversos investigadores têm descrito a utilização de técnicas fundamentadas em PCR na deteção direta de microrganismos em alimentos (Gandra, 2006).

2.7.2 PCR em tempo real

O desenvolvimento da PCR em tempo real veio revolucionar o diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica (Espy *et al.*, 2006) e microbiologia alimentar. Este método difere da PCR convencional principalmente no que diz respeito à pesquisa do produto amplificado. Tradicionalmente esta fase é posterior à reação de PCR, implicando tempos de resposta mais longos e no caso de ser efectuada por electroforese em gel de agarose, com alguma perda de especificidade (Smith *et al.*, 2004). Na PCR em tempo real a pesquisa é efectuada concomitantemente com a amplificação, limitando o processo a um tubo fechado, o que elimina os riscos de contaminação inerentes à manipulação pós PCR (Corless *et al.*, 2000; Yamamoto, 2002).

As plataformas de PCR em tempo real disponíveis no mercado permitem níveis de sensibilidade e especificidade equivalentes ou mesmo superiores aos sistemas tradicionais, sendo mais simples de operar e requerendo menos trabalho manual técnico. A combinação da excelente sensibilidade e especificidade, menor risco de contaminação, facilidade de operação e rapidez, estabeleceu a PCR em tempo real como uma alternativa aos testes culturais tradicionais e imunoensaios (Espy *et al.*, 2006). Nos laboratórios de microbiologia, esta técnica pode ser utilizada na análise de expressão de genes (de virulência e/ou produção de toxinas) em alimentos, possui ampla aplicação para o estudo de RNA viral (Tang e Persing, 1999), sendo utilizado para deteção de norovírus em alimentos (Marin *et al.*, 2006).

Existem diversos instrumentos de PCR em tempo real disponíveis comercialmente. Estes variam, genericamente, no método de controlo de temperatura, no formato de pesquisa do produto amplificado, no tempo de resposta analítica e no número de amostras que podem ser testadas em cada ensaio (Cockerill, 2003).

Em alguns casos existem sistemas automáticos de extração de ácidos nucleicos que complementam os equipamentos de pesquisa, sendo já uma realidade um sistema de extração, amplificação e pesquisa integrada que permite a automatização quase total. A rapidez da reação nestes equipamentos é possível devido à elevada razão área-volume da mistura de reação, normalmente depositada em recipientes longos e estreitos, bem como mecanismos de variação térmica altamente eficientes, por circulação de ar ou condutividade térmica (Csako, 2006). A maior eficiência da variação térmica aliada às características físicas dos recipientes de reação, permitem a desnaturação das cadeias de DNA em cerca de 1 segundo, possibilitando a realização de uma reação de PCR entre 30 a 60 minutos. Há ainda diferenças na forma de pesquisa (tipo de lâmpada ou laser) e também nos comprimentos de onda a que a fluorescência é detetada.

Para detetar o produto amplificado, é incorporado na mistura de reação um marcador fluorescente que se liga ao DNA durante a amplificação. Esta ligação pode ser inespecífica ou específica. Um sinal específico pode ser conseguido usando sondas

fluorogénicas, como as TaqMan® (Smith *et al.*, 2004). Em todos os casos referidos, a sonda é marcada com um fluoróforo numa extremidade e com um *quencher* na outra. A hibridação assegura a separação destas moléculas, interrompendo a absorção da fluorescência pelo *quencher*, o que, conseqüentemente resulta na emissão de fluorescência.

2.7.3 Sondas TaqMan®

As primeiras sondas fluorescentes desenvolvidas para PCR em tempo real foram as 5"nuclease, habitualmente designadas pela marca comercial - TaqMan®. Neste formato, um pequeno oligonucleotídeo é marcado com uma molécula *reporter* na extremidade 5" e uma molécula *quencher* na extremidade 3". Quando a sonda hibridiza com o alvo, em cada ciclo de extensão a actividade 5"-3" exonuclease da polimerase do DNA hidrolisa a sonda, libertando o *reporter*. A fluorescência emitida por esta molécula deixa de ser absorvida pelo *quencher*, sendo captada por um sistema óptico de deteção, como se pode observar na Figura 2 (Rybicki, 2001).

A molécula fluorescente livre (*reporter*) acumula-se após cada ciclo de PCR, podendo a sua intensidade ser captada em qualquer altura da reação, incluindo o passo de *annealing*, o que não acontece com as sondas de hibridação, cuja captura de fluorescência apenas pode ser efectuada precisamente na fase de hibridação.

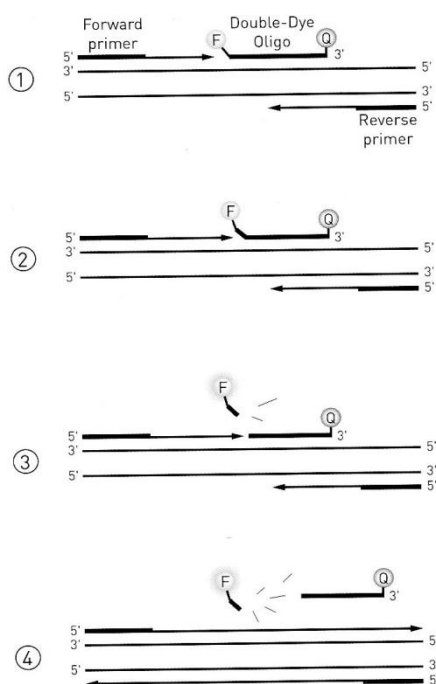


Figura 2: Esquema das sondas TaqMan emitidas por PCR em tempo real (Fonte:Eurogentec, 2004)

2.7.4 Sondas de hibridação - FRET

O princípio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) baseia-se na transferência de energia entre fluoróforos adjacentes, dependendo da distância entre eles. Neste formato são usadas duas sondas desenhadas de forma a hibridarem com o alvo numa configuração “cauda-cabeça” (Rodríguez-Lázaro, 2005). A sonda *upstream* está marcada com uma molécula fluorescente na extremidade 3’ e a sonda *downstream* está marcada com uma aceitadora na extremidade 5’. Se as duas sondas hibridarem com o produto de PCR alvo, a fluorescência emitida pelo fluoróforo na extremidade 3’ da primeira sonda é absorvida pelo fluoróforo aceitador na extremidade 5’ da segunda sonda. Este segundo fluoróforo é assim excitado, emitindo fluorescência num comprimento de onda detetado e medido no final de cada passo de hibridação, pelo sistema óptico do equipamento (Rodríguez-Lázaro, 2005).

As duas sondas alinhadas compreendem uma região de 40 a 50 pares de bases, apenas ocorrendo transferência de energia, logo, emissão de fluorescência, se a hibridação com o produto alvo ocorrer de forma exata, o que confere a este formato uma elevada especificidade (Rybicki, 2001).

A tecnologia FRET permite também a análise de curvas de amplificação do produto amplificado (Figura 3). Elevando lentamente a temperatura da reação, as sondas destacam-se do produto de PCR, perdendo-se o sinal fluorescente. A temperatura à qual metade do híbrido alvo-sonda se dissocia designa-se por temperatura de amplificação ou *melting* (T_m) e depende do conteúdo guanina/citosina da sequência e do comprimento do oligonucleotídeo (Simon *et al.*, 1996).

Ao contrário do que acontece com as sondas TaqMan®, um polimorfismo num único nucleótido não impede que o sinal fluorescente ocorra, mas a temperatura de *melting* correspondente será mais baixa. Assim, este formato pode ser usado para discriminar organismos, podendo ser usados diferentes fluoróforos, conforme a capacidade do sistema óptico de pesquisa da plataforma usada (Kubista *et al.*, 2006).

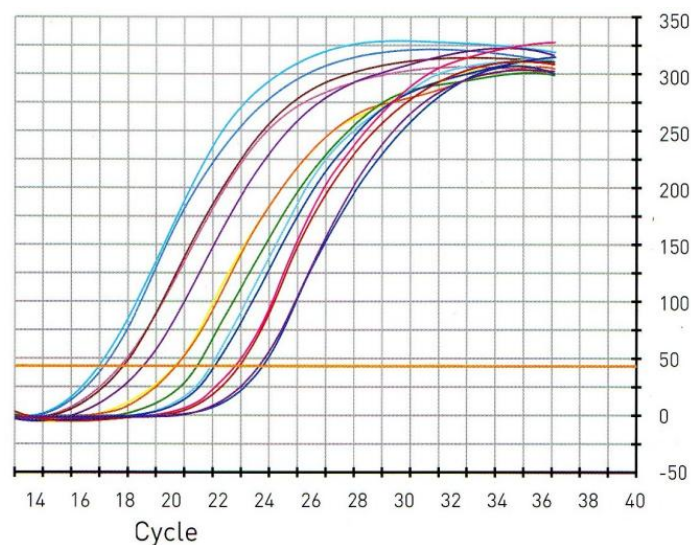


Figura 3: Exemplo de curvas de amplificação (Fonte: Eurogentec, 2004)

2.8 Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE)

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) é a autoridade administrativa nacional especializada no âmbito da segurança alimentar e de fiscalização económica. Esta autoridade, com estatuto de órgão de polícia criminal, foi criada pelo Decreto-Lei n.º 237/2005, de 30 de dezembro, revogado pelo Decreto-Lei n.º 274/2007, de 30 de julho, com exceção dos artigos n.º 32, 35º e 36º. Em 2012, a ASAE sofre uma nova reestruturação de acordo com a Decreto - Lei n.º 194/2012, de 23 de agosto, passando a incluir as atribuições da Comissão de Aplicação de Coimas em Matéria Económica e de Publicidade no Domínio da Economia. A ASAE tem como missão a avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, bem como a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas, nos setores alimentar e não alimentar.

O regulamento (CE) n.º. 882/2004 refere-se aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios, bem como as normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. Seguindo o disposto no regulamento, é elaborado pela ASAE o Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA).

Este plano é um plano de vigilância estabelecido anualmente, baseado no risco, que tem como objetivo assegurar e verificar que os géneros alimentícios, colocados no mercado, não põem em risco a segurança e saúde humana (ASAE, 2008). Esse objetivo pode ser atingido através da análise da conformidade dos géneros alimentícios, face ao determinado na legislação nacional e comunitária em vigor, em termos de parâmetros microbiológicos, químicos, e físicos, bem como em relação à sua rotulagem, apresentação/publicidade e práticas fraudulentas (ASAE, 2010a).

A Divisão de Riscos Alimentares (DRA) - unidade orgânica flexível da ASAE, integrada no Departamento de Riscos Alimentares e Laboratório (DRAL) – é responsável pelo planeamento, definição e coordenação do PNCA, ou seja, de verificar se os géneros alimentícios colocados no mercado não põem em risco a segurança e saúde dos consumidores, bem como averiguar as questões de salvaguarda dos interesses do consumidor ao nível da correcta e adequada informação, tornou-se indispensável fixar um quadro harmonizado de regras e critérios operacionais que assegurem a imparcialidade e eficácia na sua realização (ASAE, 2014).

As colheitas de amostras são programadas de modo a serem distribuídas ao longo do ano, devendo chegar-se a dezembro com a totalidade das amostras colhidas. Ainda, seja qual for o local de colheita, a amostragem ocorre sem aviso prévio e não é efetuada em alturas fixas e em dias de semana determinados.

Os Laboratórios de Microbiologia (LM), de Físico-Química (LFQ) e de Bebidas Alcoólicas e Produtos Vitivinícolas (LBPV) do DRAL, são as unidades responsáveis pelos ensaios realizados às amostras colhidas para posterior apreciação de todas as análises laboratoriais efetuadas às mesmas no âmbito deste plano (ASAE, 2014).

Após a verificação efectuada pela DRA de que o resultado do ensaio e/ou o respetivo rótulo não estão conformes, consoante a natureza da infração, esta divisão ficará responsável por emitir um parecer técnico circunstanciado ou por dar a possibilidade ao operador económico responsável pela colocação do produto no mercado de interpor recurso, se for caso disso.

3. Local de estágio e objetivos

O trabalho apresentado foi realizado na Divisão de Riscos Alimentares (DRA) da Direcção de Serviços de Riscos Alimentares e Laboratórios (DRAL), da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) em Lisboa, entre os meses de junho e novembro de 2014. Posteriormente foi também, efetuado trabalho no laboratorial de Microbiologia da ESACB para a serotipagem dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos das análises ao leite e queijo efetuadas na ASAE.

O trabalho que decorreu na ASAE teve como principal objetivo a aquisição de competências em contexto real do trabalho e, como coadjuvante, o conhecimento da estrutura organizacional da missão, dos valores e dos objetivos da ASAE, designadamente do domínio das competências da Divisão de Riscos Alimentares. Mais concretamente, o trabalho levado a cabo nos seis meses de estágio na ASAE permitiu: (1) Adquirir e compreender as noções do programa de gestão implementado na ASAE – Gestasae; (2) Participar na elaboração de pareceres técnicos referentes a resultados laboratoriais, no âmbito do controlo oficial levado a cabo pela ASAE, mediante a aplicação da legislação vigente adequada; (3) Efetuar um estudo relativo a queijos curados, usando os dados do controlo microbiológico realizado no âmbito do Plano Nacional de Colheita de Amostras com dados analíticos de 2013 e 2014 e por fim, em colaboração com uma queijaria do distrito de Castelo Branco para o fornecimento das amostras (4) Avaliar a presença de *L. monocytogenes* e de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em amostras de leite cru de ovelha e cabra usado no fabrico de queijo feito com leite cru.

Foram disponibilizadas as ferramentas necessárias ao seguimento dos objetivos, nomeadamente acesso à legislação nacional e regulamentação comunitária vigente no ordenamento jurídico do setor da área alimentar. As tarefas a realizar foram devidamente acompanhadas pelos colaboradores afetos à unidade orgânica, bem como o orientador no local de trabalho e através de diversos instrumentos de avaliação contínua, com o propósito de serem reconhecidas e validadas as competências adquiridas.

Os capítulos do trabalho que irão ser apresentados a seguir dizem respeito aos dois últimos objetivos referidos acima, nomeadamente os objetivos (3) e (4).

4. Análise de dados do PNCA de 2013 e 2014

Foi efetuada a recolha de dados relativos às análises microbiológicas efetuadas em 2013 e 2014 no âmbito do PNCA. Estes dados foram cedidos pela DRA e referem-se exclusivamente a amostras de queijo curado, colhidas ao longo de dois anos em todo o território nacional, no retalho, e sujeitas a determinações analíticas, de acordo com a legislação alimentar aplicável (União Europeia e Nacional). Os resultados obtidos são analisados e trabalhados de forma a obter uma visão do país no que concerne ao cumprimento das boas práticas de higiene e segurança alimentar (ASAE, 2012).

Os dados encontram-se registados em folha de cálculo (Excel), contendo a informação comum seguinte:

- Identificação do produto;
- Local de colheita;
- Determinação analítica (pesquisa de *Salmonella* em 25g, contagem de *E.coli* (ufc/g) e contagem de *Listeria monocytogenes* (ufc/g);
- Parecer técnico (conforme ou não conforme).

5. Estudo sobre *L. monocytogenes* e STEC em leite e queijo de pequenos ruminantes

Considerando o trabalho laboratorial foi igualmente levado a cabo um estudo sobre a presença de STEC e *L. monocytogenes* em amostras de leite cru de pequenos ruminantes (n=58) e queijo (n=2) provenientes de uma queijaria do distrito de Castelo Branco e dos produtores que fornecem leite à mesma queijaria.

5.1 Colheita de amostras

A colheita de amostras foi realizada em 36 explorações de leite numa área geográfica que abrange todo o distrito de Castelo Branco, em explorações. Nas visitas aos produtores foi realizada a colheita de 58 amostras de leite cru para copos de 100 mL esterilizados e devidamente codificados com o auxílio de um Auto de Colheita de Amostras, referido no Anexo I.

A colheita das amostras de leite foi efetuada em duas fases: no Verão (junho e julho) e no Outono/Inverno (novembro e janeiro). Logo após a colheita das amostras, estas foram transportadas, em arca refrigerada entre 0º e 4º, para o laboratório de Microbiologia da ASAE, onde se realizaram as seguintes análises: pesquisa de *Listeria monocytogenes* e pesquisa de STEC em 25 mL de leite. Foram colhidas duas amostras de queijo curado, as quais foram analisadas para pesquisa de *L. monocytogenes* e de STEC em 25g de amostra.

5.2 Pesquisa de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada pelo sistema PCR em tempo real, conforme o kit iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II (catálogo 357-8124, Bio-Rad). Na reação de PCR em tempo real, sondas específicas são utilizadas para detetar o DNA durante a amplificação, hibridizando com os alvos a amplificar. Estas sondas são ligadas a um fluoróforo, que emite fluorescência apenas quando hibridado com a sequência alvo. No kit iQ-Check *Listeria monocytogenes*, o fluoróforo FAM está ligado à sonda que hibrida com a sequência de DNA específica para *Listeria monocytogenes*. Como a quantidade de DNA alvo amplificado aumenta a cada ciclo de amplificação, intensidade de fluorescência também aumenta. Na ausência de DNA alvo, nenhuma fluorescência será detetada. De modo a controlar, em cada tubo de reação, se não existe inibição da reação de amplificação de DNA é incluído na mix da reação de PCR uma porção de DNA sintético "controlo interno". O controlo interno é amplificado ao mesmo tempo que o DNA alvo (*Listeria monocytogenes*) com uma sonda específica. A sequência de DNA do controlo interno é detetado por um segundo fluoróforo. A amplificação do controlo interno permite validar os resultados negativos da PCR. As

amostras e o produto alimentar previamente enriquecido por cultura ($23\text{h} \pm 1\text{h}$, em 30°C) em Listeria Special Broth (LSB, Bio-Rad) ou em caldo Fraser ($25\text{h} \pm 1\text{h}$ a 30°C).

O kit iQ-Check™ é composto por vários reagentes (Tabela 6) que devem ser armazenados entre 2°C e 8°C .

Tabela 6: Componentes do kit iQ-Check™ para a pesquisa de *L. monocytogenes*.

Referência	Reagente	Quantidade
A	Reagente de lise	1 tubo (20 mL)
B	Sondas fluorescentes	1 tubo (0,55mL)
C	Mix de amplificação	2 tubos (2 x 2,2 mL)
D	Controlo negativo de PCR	1 tubo (0,5 mL)
E	Controlo positivo de PCR	1 tubo (0,25 mL)
F	Pérolas de lise	1 tubo (17,6 mL)

Fonte: Catalog: 357-8124, iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II Kit - User Guide

5.2.1 Enriquecimento

Para o estudo da presença de *L. monocytogenes* é muito vantajosa a utilização de meios de enriquecimento, de modo que as bactérias presentes em reduzidas concentrações possam multiplicar-se até quantidades possíveis de se detetarem por métodos moleculares (Liu, 2008).

A partir de 25 mL de leite cru ou de 25g da pasta do queijo curado, realizou-se um pré-enriquecimento em 225 mL de caldo LSB (*Listeria Special Broth*, Bio-Rad), pré-aquecido. A incubação decorreu durante 25 horas a 30°C .

5.2.2 Extração de DNA das amostras e amplificação

Antes da extracção do DNA, preparou-se o reagente de lise, agitando-o previamente num placa de agitação para homogeneização do reagente de lise completo (reagente A + reagente F).

Adicionou-se 100 μL de reagente de lise completo para uma placa *deep well*, com uma micropipeta de 200 μL . O reagente de lise esteve em constante agitação, com o objetivo de se manter em suspensão as pérolas de lise. De seguida, transferiu-se 100 μL de amostra enriquecida e selou-se com o filme de vedação pré-perfurada (Passo 1 da Figura 4). Colocou-se a incubar a $95\text{-}100^\circ\text{C}$ durante 15-20 min a 1.300 rpm num

agitador de placas (Passo 2 da Figura 4). Preparou-se a *mix* de PCR e distribuiu-se 45 μ L em microplacas de PCR (Passo 3 da Figura 4). Adicionou-se 5 μ L de amostra após lise ou reagente D (controlo negativo) ou reagente E (controlo positivo) a cada um dos poços com *mix* de PCR e selaram-se as microplacas (Passo 4 da Figura 4). Por fim, deu-se início à amplificação no equipamento de PCR em tempo real (CFX96 Touch Real-Time PCR Thermal Cycler da Bio-Rad) (Passo 5 da Figura 4).

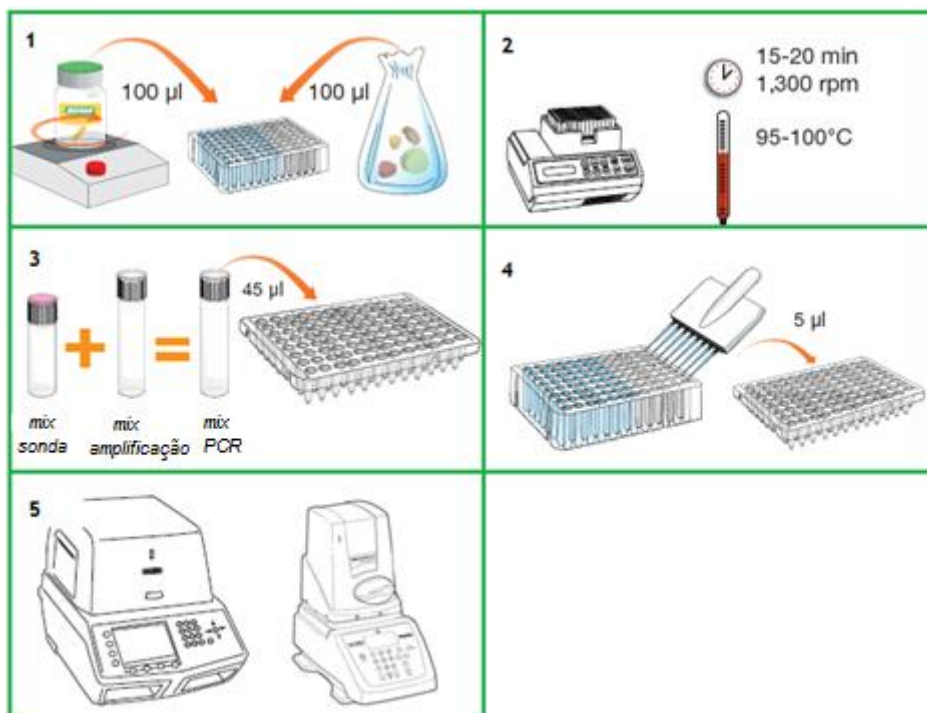


Figura 4: Imagem representativa da extração e amplificação das amostras. Adaptado: Catalog: 357-8124, iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II Kit - User Guide

5.2.3 Interpretação e análise de resultados

A interpretação dos resultados do PCR em tempo real é feita através de um *software*.

Antes da interpretação dos resultados da análise, é necessário verificar o resultado dos controlos negativo e positivo. Para que a amplificação do DNA seja válida, os controlos devem apresentar os resultados resumidos na Tabela 7, caso contrário, a reação de PCR necessita de ser repetida. Os resultados são interpretados por análise aos valores do Ct de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limiar).

Tabela 7: Interpretação dos resultados com o controlo positivo e negativo, na deteção do controlo interno e *L. monocytogenes*.

	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (FAM)	Pesquisa do controlo interno
Controlo negativo	Ct = N/A*	28 ≤ Ct ≤ 40
Controlo positivo	26 ≤ Ct ≤ 36	N/ significativo

*O *software* indica um valor de Ct = N / A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não faz aumentar significativamente acima do ruído de fundo, e, portanto, não cruza o limiar.

A amostra positiva de *L. monocytogenes* deve ter um valor Ct ≥ 10 para o fluoróforo FAM. Se o valor de Ct é inferior a 10, devemos verificar se os dados da curva de amplificação são regulares (com uma linha de base plana, seguido por um rápido aumento de fluorescência e, em seguida, um achatamento para fora). Se a curva parece correta, pode ser considerada uma amostra positiva para *L. monocytogenes*. A amostra é considerada como uma amostra negativa para *L. monocytogenes* se não houver nenhum valor Ct em FAM e se o controlo interno tiver um valor de Ct superior ou igual a 28 e inferior ou igual a 40. Para melhor compreensão dos resultados, podemos ver o resumo na Tabela seguinte.

Tabela 8: Interpretação dos resultados na pesquisa de *L. monocytogenes*.

Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (FAM)	Pesquisa do controlo interno	Interpretação
Ct ≥ 10	N/ Significativo	Positivo
Ct = N/A	Ct ≥ 28	Negativo
Ct = N/A	Ct = N/A	Inibição*

*Quando a deteção de *L. monocytogenes* e do controlo interno dá um valor Ct = N / A, a amostra deve ser testada novamente, mas diluída (1/10).

5.2.4 Confirmação dos resultados positivos

A confirmação da presença de *L. monocytogenes* após o ensaio de PCR em tempo real foi efetuado pela inoculação da cultura enriquecida no caldo LSB durante 24h no meio Rapid L'mono (Bio-Rad). Este meio foi validado pela AFNOR de acordo com o protocolo ISO 16140, para a pesquisa de *L. monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* em todos os alimentos, produtos para consumo humano de acordo com a norma NF EN ISO 11290-1, e, também, amostras ambientais.

O meio de cultura Rapid L'mono Agar (Bio-Rad) baseia-se na deteção específica de *L. monocytogenes* e na sua incapacidade para metabolizar a xilose. Após 24h de incubação, as culturas de *L. monocytogenes* formam colónias azuis sem halo amarelo. Os resultados foram posteriormente apresentados como “ausente em 25 g ou 25 mL” ou “presente em 25g ou 25 mL” de amostra analisada.

Posteriormente, como confirmação suplementar da identificação dos isolados selecionados, foi usado o teste bioquímico API Listeria, (bioMérieux, França)

realizado de acordo com as instruções do fabricante a partir das colónias com características suspeitas.

5.3 Pesquisa de genes de virulência em *E.coli* produtora de toxina Shiga por PCR em tempo real

A pesquisa de *E.coli* produtora de toxina Shiga foi realizada pelo sistema PCR *multiplex* em tempo real, conforme o kit iQ-Check™ STEC VirX (catálogo 357-8139, Bio-Rad). Os reagentes prontos para uso do PCR contêm oligonucleotídeos (*primers* e sondas fluorescentes de cadeia dupla) específico para genes de virulência STEC (*stx1*, *stx2* e *eae*), bem como a DNA polimerase e nucleótidos. Dois fluoróforos estão ligados a cada sonda que hibrida com as sequências de DNA alvo, seja para *stx1* e *stx2* ou *eae*. Tal como acontece na *L. monocytogenes*, para ocorrer uma amplificação de DNA com sucesso em cada tubo de reação, é utilizado um material sintético de DNA, "controlo interno", que está incluído na mistura de reação. Este controlo é amplificado com uma sonda específica, ao mesmo tempo que a sequência de DNA alvo é detetado. Ele permite a validação de qualquer resultado negativo. Este método permite uma simples determinação da presença ou ausência dos genes de virulência STEC em todos os produtos alimentares e amostras ambientais, previamente enriquecidas num caldo de enriquecimento específico. O teste iQ-Check™ é composto por um kit que requer alguns componentes semelhantes aos referidos no kit para a pesquisa de *L. monocytogenes* (Tabela 6), com diferença no tipo de sondas a utilizar, o que neste caso são específicas para STEC.

5.3.1 Enriquecimento

A partir de 25 mL de leite cru ou de 25g de queijo curado, realizou-se um enriquecimento em 225 mL de caldo SEB (*STEC Enrichment Broth*, Bio-Rad), pré-aquecido. A incubação decorreu durante 16 a 22 horas a 41,5°C.

5.3.2 Extração do DNA das amostras e amplificação

Antes de extrair o DNA, preparou-se o reagente de lise (reagente A) agitando-o previamente num placa de agitação para homogeneização.

Adicionou-se 100 µL de reagente de lise completo para uma placa *deep well*, com uma micropipeta de 200 µL. O reagente de lise esteve em constante agitação, com o objetivo de se manter em suspensão. De seguida, transferiu-se 100 µL da amostra enriquecida e selou-se com o filme de vedação pré-perfurada. Colocou-se a incubar a 95-100°C durante 15-20 min a 1.300 rpm num agitador de placas. Preparou-se a *mix* de PCR e distribuiu-se 20 µL em microplacas de PCR. Adicionou-se 5 µL de amostra após lise ou controlo negativo do kit ou controlo positivo do kit a cada um dos poços

com *mix* de PCR e selamos as microplacas. Por fim, deu-se início à amplificação no equipamento de PCR em tempo real (CFX96 Touch Real-Time PCR Thermal Cycler da Bio-Rad) Este procedimento é equivalente ao da Figura 3, com a diferença de aqui se pipetar 20 µL da mistura de PCR para as microplacas.

5.3.3 Interpretação e análise de resultados

A interpretação dos resultados do PCR é feita através de um *software*.

Antes de interpretar os resultados da amostra, é necessário verificar o controlo negativo e positivo. Para que a amplificação do DNA seja válida, os controlos devem ter os resultados resumidos na Tabela 9, caso contrário, a reação de PCR necessita de ser repetida. Os resultados são interpretados por análise aos valores do Cq de cada amostra (o ciclo no qual curva de amplificação cruza o limiar).

Tabela 9: Interpretação dos resultados com o controlo positivo e negativo, na deteção dos genes *stx1/stx2*, *eae* e controlo interno.

	Pesquisa de <i>stx1/stx2</i> (FAM)	Pesquisa de <i>eae</i> (canal Cy5)	Pesquisa do controlo interno (canal HEX)
Controlo Negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Controlo Positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	N/Significativo

*O *software* indica um valor de Ct = N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não faz aumentar significativamente acima do ruído de fundo, e, portanto, não cruza o limiar.

A amostra positiva de STEC deve ter um valor Cq ≥ 10 para o fluoróforo FAM e para o fluoróforo Cy5. Se o valor de Cq para os dois fluoróforos é inferior a 10, verificar se os dados da curva de amplificação são regulares (com uma linha de base plana, seguido por um rápido aumento de fluorescência e, em seguida, um achatamento para fora). Se a curva parece correta, pode ser considerada uma amostra positiva para os genes de virulência STEC. A amostra é positiva para genes de virulência *stx1 / stx2*, se o valor Cq de FAM é ≥ 10 e o valor Cq para Cy5 é N/A. Por outro lado, se o valor Cq de FAM é N/A e o valor Cq para Cy5 é ≥ 10, a amostra é positiva para o gene de virulência *eae*.

Devemos considerar a amostra negativa para os genes de virulência se não há valor Cq em FAM, nenhum valor Cq em Cy5, e o controle interno tem um Cq ≥ 26.

Para melhor interpretação dos resultados, podemos ver o resumo na Tabela 10.

Tabela 10: Interpretação dos resultados com pesquisa dos genes *stx1/stx2*, *eae* e controlo interno.

Pesquisa de <i>stx1/stx2</i> (FAM)	Pesquisa de <i>eae</i> (canal Cy5)	Pesquisa do controlo interno (canal HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	N/ Significativo	Positivo
Cq ≥ 10	Cq = N/A	N/ Significativo	Positivo <i>stx1/stx2</i> , Negativo <i>eae</i>
Cq = N/A	Cq ≥ 10	N/ Significativo	Positivo <i>eae</i> , Negativo <i>stx1/stx2</i>
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição*

*Quando a pesquisa dos genes *stx1/stx2*, *eae* e do controlo interno dá um valor Cq = N / A, a amostra deve ser testada novamente, mas diluída (1/10).

Por fim, os resultados são expressos como pesquisa de STEC “ausente em 25g ou 25 mL” ou “presente em 25g ou 25 mL” de amostra analisada.

5.4 Serotipagem de *L. monocytogenes* por PCR Multiplex

Das três amostras com pesquisa positiva para *L. monocytogenes* foram obtidos onze isolados que, após purificação e confirmação da espécie, foram sujeitos a serotipagem por PCR Multiplex no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Biologia da ESACB, de acordo com o procedimento descrito em Pintado e Goulão (2013).

Os isolados sujeitos a serotipagem foram provenientes das amostras de leite cru de cabra LCP23/L2 (n=2) e LCP24/L1 (n=7) e da amostra de queijo elaborado com o leite LCP24/L1 (n=2).

O método da Amplificação por Reacção de Polimerização em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) Multiplex para serotipagem de *L. monocytogenes* foi inicialmente descrito por Doumith *et al.* (2004) e permite separar os quatro serotipos mais prevalentes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b) de *L. monocytogenes* em 4 serogrupos distintos. As características dos cinco primers usados na reacção de amplificação encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 11: Sequência dos nucleótidos usados na serotipagem molecular de *L. monocytogenes*.

Gene Alvo	Sequência do Primer (5'-3')	Produtos (bp)	Especificidade	Concentração final (µM)
<i>Lmo0737</i>	For: AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC Rev: ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC	691	<i>L. monocytogenes</i> ser. 1/2a, 1/2c, 3a, 3c	1.0
<i>Lmo1118</i>	For: AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA Rev: CGG CTT GTT CCG CAT ACT TA	906	<i>L. monocytogenes</i> ser. 1/2c, 3c	1.5
<i>ORF2819</i>	For: AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT Rev: CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG	471	<i>L. monocytogenes</i> ser. 1/2b, 3b, 4b, 4d 4e	1.0
<i>ORF2110</i>	For: AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA Rev: CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC	597	<i>L. monocytogenes</i> ser. 4b, 4d, 4e	1.0
<i>prs</i>	For: GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G Rev: CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G	370	<i>Listeria</i> spp.	0.2

For - Forward; Rev - Reverse

Fonte: Doumith *et al.* (2004)

Após a corrida electroforética e a coloração do gel num banho com brometo de etídio, analisaram-se as imagens obtidas e classificaram-se os 11 isolados de *L. monocytogenes* num dos seguintes serogrupos: *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a, 3a; *L. monocytogenes* serogrupo 1/2b, 3b, 7; *L. monocytogenes* serogrupo 1/2c, 3c; *L. monocytogenes* serogrupo 4b, 4d, 4e, em função dos produtos de amplificação obtidos.

5.5 Serotipagem de *E.coli* produtora de toxina Shiga por PCR em tempo real

No caso das amostras positivas para STEC a serotipagem foi realizada pelo sistema PCR *multiplex* em tempo real, usando o kit iQ Check™ STEC SerO (refª 357-8140 da Bio-Rad). As STEC são definidas pela presença dos genes *stx1/ stx2*. O gene *eae* (intimina) é também, um marcador de virulência. O mais conhecido serotipo de STEC é a *E. coli* O157: H7 para o qual existe uma política de "tolerância zero" na América do Norte. Esta política é implementada no setor das carnes e surtos associados, assim como em produtos láteos.

No contexto da ISO, uma amostra positiva para ambos os alvos *stx1 /stx2* e *eae* deve ser avaliada para a presença dos serogrupos (O111 e O157: H7), (O103/O145 e O26) e (O45 e O121) recorrendo ao kit iQ-Check STEC SerO.

5.5.1 Amplificação das amostras por PCR

A serotipagem foi realizada em algumas horas, depois de se obterem os resultados da pesquisa de *E.coli* produtora de toxina Shiga, através do iQ-Check™ STEC VirX. Os reagentes prontos para uso do PCR contêm oligonucleotídeos (*primers* e sondas fluorescentes de cadeia dupla) específicos para os seis maiores serogrupos de STEC e, também, *E. coli* O157: H7, bem como a polimerase do DNA enucleótidos. Dois fluoróforos estão ligados a cada sonda que hibrida com o sequências de DNA alvo. Tal como acontece na pesquisa de STEC, para ocorrer uma amplificação com sucesso de DNA em cada tubo de reação, é utilizado um material sintético de DNA "controlo interno" que está incluído na mistura de reação. Este controlo é amplificado com uma sonda específica, ao mesmo tempo que a sequência de DNA alvo é detetado. Ele permite a validação de qualquer resultado negativo. Os resultados são emitidos no Sistema CFX96™ da Bio-Rad. Este método permite uma maneira simples de determinar os principais sorogrupos STEC em todos os produtos alimentares e amostras ambientais. Este inclui os seguintes passos: pesquisa de *E.coli* produtora de toxina Shiga por PCR em tempo real (iQ-Check STEC VirX), serotipagem de *E.coli* produtora de toxina Shiga por PCR em tempo real (iQ-Check STEC SerO) e interpretação e análise dos resultados. O kit iQ-Check™ STEC SerO é composto por vários reagentes (Tabela 12). Foram preparados 3 mix's de amplificação de acordo

com o guia de cálculo PCR mix. Deste modo, preparou-se para o SerO1: reagente C e B1, SerO2: reagente C e B2 e SerO3: reagente C e B3.

Tabela 12: Componentes do kit iQ-Check™ STEC SerO.

Referência	Reagente	Quantidade
B1	Sondas fluorescentes	1 tubo
	(O157:H7 e O111)	(0,18 mL)
B2	Sondas fluorescentes	1 tubo
	(O26, O103 e O145)	(0,18 mL)
B3	Sondas fluorescentes	1 tubo
	(O45 e O121)	(0,18 mL)
C	Mix de amplificação	1 tubo
		(1,65 mL)
D	Controlo negativo de PCR	1 tubo
		(0,5 mL)
E	Controlo positivo de PCR	1 tubo
		(0,25 mL)

Fonte: Catalog: 357-8140, iQ-Check™- STEC SerO - User Guide

Após a preparação das *mix's*, colocou-se 20 µL de cada um destes *mix's* em 3 poços, organizados por grupos. Adicionou-se 5 µL de amostra após lise ou reagente D (controlo negativo) ou reagente E (controlo positivo) nos poços de cada grupo e selou-se hermeticamente os poços da placa. Em seguida, colocou-se a microplaca no termociclador e dá-se início à amplificação.

5.5.2 Interpretação e análise de resultados

A interpretação dos resultados do PCR é feita através de um *software*.

Antes de interpretar os resultados da amostra, é necessário verificar o controlo negativo e positivo. Para que a amplificação do DNA seja válida, os controlos devem ter os resultados resumidos na Tabela 13, caso contrário, a reação de PCR necessita de ser repetida. Os resultados são interpretados por análise aos valores do Cq de cada amostra (o ciclo no qual curva de amplificação cruza o limiar).

Tabela 13: Interpretação dos resultados com o controlo positivo e negativo.

	Alvo 1 (FAM)	Alvo 2 (canal Cy5)	Pesquisa do controlo interno (canal HEX)
Grupo SerO1	O111	O157:H7	
Controlo Negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Controlo Positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	N/Significativo
Grupo SerO2	O103 e O145	O26	
Controlo Negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Controlo Positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	N/Significativo
Grupo SerO3	O45	O121	
Controlo Negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Controlo Positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	N/Significativo

*O *software* indica um valor de Cq = N / A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não faz aumentar significativamente acima do ruído de fundo, e, portanto, não cruza o limiar.

Uma amostra positiva para qualquer um dos serogrupos alvo deve ter um valor de 10 em ≥ Cq em FAM ou Cy5. Se nas amostras não houver nenhum valor Cq (Ct = N / A) ou Cy5 para FAM, ou, se a curva não é uma curva típica de amplificação, o controlo interno para que a amostra deve ser analisada da seguinte forma: esta amostra é considerada como negativa para o serogrupo se há há valor Cq em FAM, ou em Cy5, e o controlo interno apresenta Cq ≥ 26; o controlo interno não deve ter um valor Cq (Cq = N / A), pois este provavelmente indica uma inibição da reação de PCR; se o valor Cq para o controlo interno for <26, não é possível interpretar o resultado. Para melhor interpretação dos resultados, podemos ver o resumo na tabela 14.

Tabela 14: Interpretação dos resultados para os serogrupos.

Pesquisa do alvo 1 (FAM)	Pesquisa do alvo 2 (canal Cy5)	Pesquisa do controlo interno (canal HEX)	Interpretação
Ser01 (O111)	Ser01 (O157:H7)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	N/Significativo	Positivo O111 e O157:H7
Cq ≥ 10	Cq = N/A	N/Significativo	Positivo O111
Cq = N/A	Cq ≥ 10	N/Significativo	Positivo O157:H7
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição
Ser02 (O103/O145)	Ser02 (O26)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	N/Significativo	Positivo O103 e/ou O145 e O26
Cq ≥ 10	Cq = N/A	N/Significativo	Positivo O103 e/ou O145
Cq = N/A	Cq ≥ 10	N/Significativo	Positivo O26
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição
Ser03 (O45)	Ser03 (O121)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	N/Significativo	Positivo O45 e O121
Cq ≥ 10	Cq = N/A	N/Significativo	Positivo O45
Cq = N/A	Cq ≥ 10	N/Significativo	Positivo O121
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição

6. Resultados e discussão

6.1 Avaliação de dados do PNCA de 2013 e 2014

No âmbito do PNCA foram analisadas pela ASAE, em 2013 e 2014, um total de, respetivamente, 86 e 41 amostras de queijo curado produzido com leite cru, adquiridas em grandes superfícies e queijarias a nível nacional. Considerando que cada amostra é constituída por cinco unidades de amostra (de acordo com o Reg. 2073/2005 para o parâmetros analisados) e que, para o caso do queijo, cada unidade de amostra é um queijo, podemos dizer que durante os anos de 2013 e 2014 foram analisados 635 queijos.

Os perigos que os géneros alimentícios apresentam a nível microbiológico constituem uma importante fonte de doenças de origem alimentar para o ser humano. Neste sentido, importa garantir que os géneros alimentícios não contenham microrganismos (nem as suas toxinas e metabolitos) em quantidades que possam representar um risco inaceitável para a saúde humana. A fim de contribuir para a protecção da saúde pública e evitar interpretações divergentes nos diferentes Estados-Membros, foram estabelecidos, mediante Regulamentação Comunitária (Reg. (CE) 2073/2005, de 15 de novembro), critérios de segurança harmonizados em matéria de aceitabilidade dos alimentos, designadamente no que se refere à presença de certos microrganismos patogénicos.

Assim, no que concerne ao género alimentício em causa, “Queijos curados produzidos com leite cru”, considerando que este género alimentício se encontrava disponível para consumo, que é produzido com leite cru e que é um “pronto para consumo”, ou seja, que é destinado ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, os critérios de segurança estabelecidos são:

1. a contagem de *Listeria monocytogenes* (ufc/g). (incluídas na categoria 1.2- Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, excepto os destinados a lactantes e a fins medicinais específicos);
2. a pesquisa de *Salmonella* em 25g (incluídas na categoria 1.11. Queijo, manteiga e natas fabricados com leite cru ou leite que tenha sido submetido a tratamento térmico mais fraco que a pasteurização).

No Anexo III, estão apresentados os resultados da avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado no ano 2013, no que concerne à apreciação de cada uma das amostras com base nos resultados das cinco unidades analisadas para pesquisa de *Salmonella* em 25g, contagem de *E. coli* (ufc/g) e contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g). Neste caso, a amostra é avaliada como conforme ou não conforme, com base nos resultados obtidos pelas cinco unidades de cada amostra relativamente à pesquisa de *Salmonella* em 25g e à contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g) e tendo em consideração os critérios microbiológicos constantes no Reg. (CE) 2073/2005 ausência de *Salmonella* em todas as cinco unidades analisadas de cada

amostra e contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g) inferior a 10^2 em todas as cinco unidades analisadas de cada amostra).

Assim, e considerando os resultados para o ano 2013, verificamos que, das 86 amostras analisadas, 5 revelaram-se não conformes para a contagem de *Listeria monocytogenes* (ufc/g) e as restantes (94%) revelaram-se conformes para os parâmetros analisados (Figura 5). Verifica-se que as cinco amostras não conformes são provenientes da região da Serra da Estrela e de Azeitão (Anexo III).

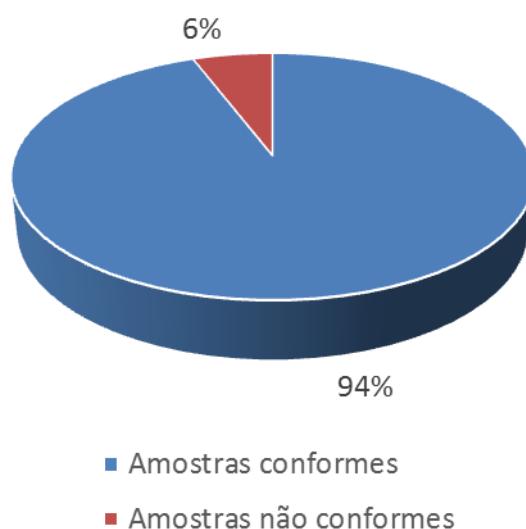


Figura 5: Não conformidades de amostras de queijo curado no ano 2013.

Em 2012, a pesquisa de produtos lácteos provenientes da região centro foi maior, devido a um alerta vindo de Espanha que alertava para a presença no mercado de um lote de queijo contaminado com *L. monocytogenes* proveniente de Portugal. Como consequência foram intensificadas as colheitas na região de proveniência do referido produto (região centro) para pesquisa de *L. monocytogenes* (ASAE, 2012. Citado em Dias, 2013)

Os resultados da avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado no ano 2014 estão apresentados no Anexo IV. As amostras foram analisadas quanto à pesquisa de *Salmonella* em 25g, contagem de *E. coli* (ufc/g) e contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g).

Assim, considerando os resultados para o ano 2014, foi detetada *Salmonella* em 25g de queijo de ovelha curado, numa das unidades que constituem a amostra. Este resultado é considerado não conforme porque não está de acordo com os padrões estabelecidos pelo Reg. (CE) nº 2073/2005, que obriga à ausência desse microrganismo em 25g de alimento.

Foi também detetada *L. monocytogenes* numa amostra de queijo de ovelha e cabra curado. Das cinco unidades analisadas desta amostra, só uma tinha uma contagem superior ao limite constante no Reg. (CE) 2073/2005 ($m = 100$ ufc/g), com $1,2 \times 10^2$. As restantes unidades tinham uma contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g) de $1,0 \times 10^1$, $1,0 \times 10^1$, $1,0 \times 10^1$, e $7,3 \times 10^1$, ou seja, inferiores ao limite referido anteriormente. Não obstante, a amostra é considerada não satisfatória para este critério microbiológico, o qual se aplica a géneros alimentícios que se encontram no mercado e durante o seu período de vida útil, como é o caso.

A presença de *L. monocytogenes* em queijo curado fabricado com leite cru pode ser resultado da utilização de matéria-prima contaminada, do incumprimento de boas práticas de higiene na produção do queijo ao longo de toda a cadeia e da existência de contaminações cruzadas (Pintado, 2009).

Dados recolhidos em surtos de listeriose sugerem que os alimentos incriminados continham contagens elevadas de *L. monocytogenes*, cerca de 10^6 ufc/g (United States Department of Health and Human Services, 2003), o que realça a necessidade de minimizar a exposição humana a altas populações da bactéria. Dados revelados no ano a seguir (FAO/WHO, 2004) sugerem que contagens menores do que 10^2 ufc/g em alimentos não são infetantes, mas não excluem essa possibilidade. Assume-se que contagens inferiores a 10^3 ufc/g possam causar doença em populações susceptíveis (United States Department of Health and Human Services, 2007). Apesar da controvérsia sobre os valores da dose mínima de infeção para *L. monocytogenes*, considera-se o critério de “ausência em 25 gramas” como o limite para a categoria de alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o seu crescimento, antes de deixarem de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do setor alimentar que o produziu. (FAO/WHO, 2004; Reg. (CE) nº 2073/2005).

Dado o histórico registado em queijos produzidos com leite cru, foi também efetuada a contagem de *E. coli* em todas as amostras relativas ao ano de 2014, visto este parâmetro ser utilizado no Reg. 2073/2005, como “indicador do nível de higiene”, em géneros alimentícios semelhantes ao analisado. Nesse sentido, foi possível verificar que 21 em 41 amostras apresenta pelo menos uma unidade de amostra com valores $\geq 10^2$ de *E. coli* (ufc/g), sendo possível concluir que a apreciação é insatisfatória. Apesar do regulamento referido anteriormente não estipular o critério “contagem de *E. coli*” como critério de higiene para queijos fabricados com leite cru, dado se tratar de um alimento pronto para consumo, e tendo em atenção os “Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer” (Santos *et al.*, 2005), segundo os quais a amostra é considerada não satisfatória no caso de contagens de *E. coli* (ufc/g) superiores ou iguais a 10^2 , é possível perceber a elevada contaminação dos queijos analisados, indicando prováveis falhas de higiene no fabrico do mesmo. De referir que, os critérios de higiene indicam se o processo de produção funciona de modo aceitável, estabelecendo um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em

conformidade com a legislação alimentar. Nesse sentido, tendo em conta os valores encontrados e o potencial patogénico que certas estirpes de *E. coli* possuem para a saúde pública, torna-se evidente a necessidade de implementação de medidas corretivas que visem melhorar a higiene do processo, nomeadamente, e tendo em conta a natureza do género alimentício em si, que deverão incluir especialmente um melhor controlo das matérias-primas (leite cru).

A partir da avaliação dos dados do PNCA referentes ao ano 2014 (Anexo IV), podemos igualmente concluir que o número de amostras não conformes para queijo curado foi de 5%, apresentando apenas 2 amostras não conformes em 41 amostras no total (Figura 6).

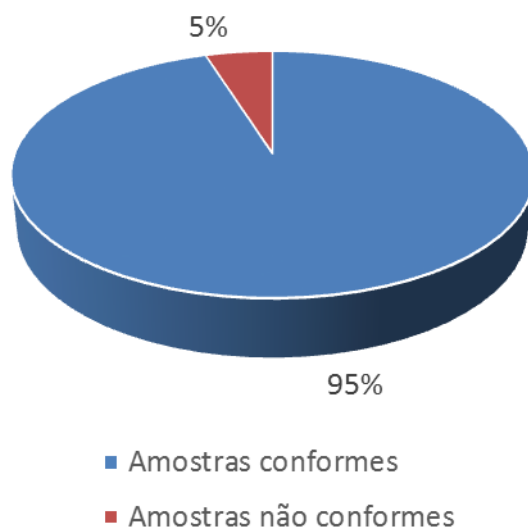


Figura 6: Não conformidades de amostras de queijo curado no ano 2014

6.2 Pesquisa de *L. monocytogenes* nas amostras de leite e queijo

Relativamente à pesquisa de *L. monocytogenes*, foram analisadas um total de 58 amostras de leite cru, entre junho de 2014 e janeiro de 2015, sendo 34 amostras de leite cru de ovelha e 24 amostras de leite cru de cabra (ANEXO II). As amostras de leite analisadas são provenientes de 36 produtores de leite cru de pequenos ruminantes.

Foram igualmente analisadas as pastas de duas amostras de queijo curado, sendo um destes queijos proveniente de leite analisado no âmbito deste estudo.

Tendo em conta que a bibliografia refere uma maior prevalência deste microrganismo no Inverno (Lamont *et al.*, 2013), o presente estudo foi pensado de forma a efetuar a colheita de amostras de leite em duas épocas do ano (Verão e Outono/Inverno). No entanto, tal não foi possível para todos os produtores. Apenas foi possível repetir as colheitas de amostra de leite de 19 produtores.

Com base nos resultados obtidos para as amostras de leite de ovelha (Tabela 15) e para as amostras de leite de cabra (Tabela 16), podemos afirmar que apenas se obtiveram resultados de pesquisa positiva para *L. monocytogenes* em duas amostras de leite de cabra (8,3% do total de amostras de leite de cabra analisadas), sendo todas as amostras de leite de ovelha negativas para esta pesquisa. Considerando o total de amostras analisadas (n=58), verificou-se uma prevalência de *L. monocytogenes* de 3,4%. Estes resultados são um pouco inferiores aos referidos por Pereira (2000) que analisou 78 amostras de leite cru de pequenos ruminantes tendo encontrado 7,7% de amostras positivas para *L. monocytogenes* em 25 mL de leite. Num estudo que abrangeu um maior número de amostras de leite cru de ovelha e cabra (n=677), analisadas entre 1995 e 2002 no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Pintado e Felício (2002), encontraram uma percentagem de amostras de leite contaminado com *L. monocytogenes* de 6,2%.

Tabela 15: Resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* e STEC em 25 mL em leite de ovelha.

Leites	Data da Colheita	Data das ordenhas	Tipo de ordenha	Conservação	Deteção de genes de virulência de STEC		Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (25 mL)
					<i>stx1/stx2</i>	<i>eae</i>	
LOP1/L1	30/06/2014	27/6 até 30/6	Mecânica	3,3°C	Neg.	Pos.	Neg.
LOP2/L1	30/06/2014	27/6 até 30/6	Mecânica	3,0°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP3/L1	30/06/2014	27/6 até 30/6	Manual	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP4/L1	30/06/2014	27/6 até 30/6	Mecânica	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP5/L1	30/06/2014	27/6 até 30/6	Manual	-	Pos.	Pos.	Neg.
LOP6/L1	30/06/2014	27/6 até 30/6	Manual	3,5°C	Pos.	Neg.	Neg.
LOP13/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Manual	3,8°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP14/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Mecânica	3,0°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP15/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Manual	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP16/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Mecânica	3,8°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP17/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Manual	3,8°C	Pos.	Neg.	Neg.
LOP18/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Manual	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP25/L1	14/07/2014	10/07 até 14/07	Manual	8°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP26/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	7°C	Pos.	Neg.	Neg.
LOP28/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	8°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP30/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	4°C	Pos.	Neg.	Neg.
LOP31/L1	14/07/2014	10/07 até 14/07	Manual	10°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP32/L1	14/07/2014	10/07 até 14/07	Mecânica	7°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP33/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP34/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	4°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP1/L2	24/11/2014	24/11	Manual	3°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP2/L2	24/11/2014	20/11 até 24/11	Mecânica	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP3/L2	24/11/2014	20/11 até 24/11	Mecânica	2,8 °C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP4/L2	24/11/2014	21/11 até 24/11	Manual	4°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP5/L2	24/11/2014	21/11 até 24/11	Mecânica	3,1°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP6/L2	24/11/2014	21/11 até 24/11	Manual	4°C	Pos.	Neg.	Neg.
LOP13/L2	19/01/2015	16/01 até 18/01	Manual	3,1 °C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP14/L2	19/01/2015	16/01 até 19/01	Mecânica	2,8 °C	Neg.	Pos.	Neg.
LOP15/L2	19/01/2015	16/01 até 18/01	Manual	2,8 °C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP16/L2	19/01/2015	16/01 até 19/01	Manual	3,1 °C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP17/L2	19/01/2015	16/01 até 19/01	Manual	3,1°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP20/L2	19/01/2015	15/01 até 18/01	Manual	5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP21/L2	19/01/2015	15/01 até 19/01	Manual	3°C	Pos.	Pos.	Neg.
LOP22/L2	19/01/2015	15/01 até 19/01	Manual	3°C	Pos.	Pos.	Neg.

Tabela 16: Resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* e STEC em 25 mL em leite de cabra.

Leites	Data da colheita	Data das ordenhas	Tipo de ordenha	Conservação	Deteção de genes de virulência de STEC		Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (25 mL)
					<i>stx1/stx2</i>	<i>eae</i>	
LCP7/L1	01/07/2014	28/6 até 1/7	Mecânica	3,8°C	Pos.	Neg.	Neg.
LCP8/L1	01/07/2014	28/6 até 1/7	Manual	4,0°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP9/L1	01/07/2014	27/6 até 1/7	Manual	3,5°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP10/L1	01/07/2014	29/6 até 1/7	Mecânica	3,8°C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP11/L1	01/07/2014	28/6 até 1/7	Mecânica	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP12/L1	01/07/2014	27/6 até 1/7	Mecânica	3,2°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP19/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Mecânica	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP20/L1	07/07/2014	04/07 até 07/07	Manual	3,8°C	Pos.	Neg.	Neg.
LCP21/L1	08/07/2014	03/07 até 08/07	Manual	3,2°C	Neg.	Neg.	Neg.
LCP22/L1	08/07/2014	03/07 até 08/07	Manual	3,8°C	Neg.	Neg.	Neg.
LCP23/L1	08/07/2014	03/07 até 08/07	—	3,5°C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP24/L1	14/07/2014	10/07 até 13/07	Manual	8°C	Neg.	Neg.	Pos.
LCP27/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	7°C	Neg.	Neg.	Neg.
LCP29/L1	14/07/2014	11/07 até 14/07	Manual	10°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP7/L2	25/11/2014	20/11 até 25/11	Mecânica	2,5°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP8/L2	25/11/2014	20/11 até 25/11	Manual	3,8°C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP9/L2	25/11/2014	21/11 até 25/11	Manual	3,8°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP10/L2	25/11/2014	20/11 até 24/11	Mecânica	2,9°C	Neg.	Neg.	Neg.
LCP11/L2	25/11/2014	21/11 até 24/11	Mecânica	2,5°C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP12/L2	25/11/2014	22/11 até 25/11	Mecânica	2,5 °C	Neg.	Pos.	Neg.
LCP18/L2	19/01/2015	16/01 até 18/01	Manual	3,2 °C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP19/L2	19/01/2015	16/01 até 18/01	Manual	4°C	Pos.	Pos.	Neg.
LCP23/L2	19/01/2015	15/01 até 19/02	Mecânica	-	Pos.	Pos.	Pos.
LCP24/L2	19/01/2015	-	Manual	-	-	-	Neg.

As duas amostras de leite de cabra com pesquisa positiva para *L. monocytogenes* correspondem às amostras com as referências LCP24/L1 e LCP23/L2.

A amostra LCP24/L1 foi colhida em julho na queijaria, tendo o leite sido transportado em bilhas até à queijaria pelo próprio produtor. Com base no registo da temperatura do leite no momento da colheita da amostra (Anexo I), verificou-se que esta era de 8°C, o que representa um valor elevado tendo em conta a temperatura máxima de 6°C referida na legislação (Reg. (CE) n.º 853/2004) para leite conservado proveniente de ordenhas com mais de um dia (neste caso a amostra de leite analisada provinha de leite recolhido ao longo de quatro dias de ordenha). Uma amostra de leite proveniente deste produtor foi novamente analisada em janeiro de 2015, tendo-se verificado um resultado negativo para a pesquisa de *L. monocytogenes* em 25 mL de amostra.

Várias hipóteses podem ser colocadas que justifiquem a presença desta bactéria em leite cru, entre elas a excreção de leite contaminado por animais com listeriose clínica ou subclínica e deficientes práticas de higienização. Relativamente ao primeiro

aspecto, a excreção de *L. monocytogenes* por animais assintomáticos está documentada e Pintado *et al.* (2009) referem a excreção de *L. monocytogenes* por uma ovelha em doses que variam entre $2,0 \times 10$ e $1,4 \times 10^3$ ufc/mL de leite. *L. monocytogenes* é uma bactéria psicrotrofica, capaz de se multiplicar a temperaturas de refrigeração, pelo que a sua presença no leite mesmo que em doses iniciais baixas pode tomar proporções preocupantes se o período de armazenamento do leite for elevado e se a temperatura usada for superior à recomendada. No caso do leite LCP24/L1 ambas as situações se verificam.

Como referido anteriormente, o leite LCP24/L1 foi transportado em bilhas até à queijaria. O facto de não haver condições de refrigeração no leite conservado em bilhas é um factor que potencia a multiplicação de microrganismos do leite, incluindo os microrganismos patogénicos como *L. monocytogenes*. Num estudo efetuado por Pereira (2000), verificou-se uma maior prevalência de *L. monocytogenes* em amostras colhidas de bilhas (15,4%) do que em amostras colhidas de tanques de refrigeração (6,2%).

Relativamente às deficientes práticas de higienização, Sinha (2000) refere que o local de ordenha deve merecer especiais cuidados de limpeza e higiene. *L. monocytogenes* é uma bactéria que forma biofilmes, o que torna esta bactéria difícil de eliminar nos utensílios e equipamento que contactam com o leite, durante a ordenha mas também durante a sua conservação e transporte. O leite LCP24/L1 foi ordenhado manualmente, pelo que também é de considerar a higiene das mãos do ordenhador um potencial foco de contaminação.

Ainda em relação à higienização, a qualidade microbiológica da água usada para higienizar superfícies alimentares é da máxima importância, podendo constituir uma fonte de contaminação. Ramos (2014) efetuou um estudo sobre a qualidade microbiológica de diferentes amostras de água usada em explorações leiteiras de pequenos ruminantes, a maioria das quais comum a este trabalho, tendo verificado que, de um total de 23 explorações leiteiras, 78% apresentaram resultados microbiológicos insatisfatórios para as amostras de água analisadas. O maior número de incumprimentos foi registado nos parâmetros das bactérias coliformes totais e nos microrganismos viáveis totais a 36°C, seguido dos microrganismos viáveis totais a 22°C, *E. coli*, enterococos intestinais e *Clostridium perfringens*.

Dado que a água usada na higienização pode ser uma fonte de contaminação por *L. monocytogenes*, foi efetuada a pesquisa deste microrganismo em 25 mL de água usada na higienização pelo produtor do leite LCP24/L1, para verificarmos a possível contaminação do leite por esta via. De referir que a água deste produtor é proveniente de uma nascente e que não sofre tratamento. O resultado da análise mostrou que a água deste produtor estava contaminada com *L. ivanovii* (espécie patogénica para os animais) e com *L. seeligeri*. Apesar de não se ter encontrado *L. monocytogenes*, não devemos excluir a hipótese de esta não ter sido a/uma das fontes de contaminação do leite, já que apenas foi efetuada uma análise e que encontrámos

outras duas espécies de *Listeria* que, apresentando idênticas capacidades de sobrevivência, podem ser usadas como indicadoras da presença de *L. monocytogenes*.

Como referido anteriormente, para além da amostra LCP24/L1 também a amostra LCP23/L2 apresentou um resultado positivo para a pesquisa de *L. monocytogenes* em 25 mL de leite. Esta amostra foi colhida em janeiro, sendo constituída por leite de cinco dias de ordenha. Dado que na exploração que forneceu o leite LCP23/L2 é usada ordenha mecânica, podemos considerar aqui como possíveis fontes de contaminação a formação de biofilmes no equipamento de ordenha e deficientes práticas de higienização no geral, para além da excreção de *L. monocytogenes* por parte de animais com listeriose clínica ou subclínica. Não foi possível analisar a água usada nesta exploração, no entanto obteve-se a informação de que a mesma provém de uma barragem e apresenta qualidade insatisfatória.

De referir que uma amostra de leite proveniente do mesmo produtor referido acima, a amostra LCP23/L1, analisada em julho de 2014, apresentou um resultado negativo para a pesquisa de *L. monocytogenes* em 25 mL.

A queijaria apenas forneceu para análise duas amostras de queijo curado de mistura (ovelha e cabra), um dos quais elaborado com leite cujo resultado tinha dado pesquisa positiva para *L. monocytogenes*, o leite LCP24/L1. Os resultados da análise feita aos dois queijos curados permitem-nos constatar que o queijo que foi elaborado com o leite LCP24/L1 apresentava *L. monocytogenes*, sendo a outra amostra de queijo negativa para esta pesquisa.

Tendo em conta que o leite cru usado na produção do queijo referido anteriormente apresentou pesquisa positiva para *L. monocytogenes*, é legítimo pensar que a fonte de contaminação mais provável do queijo foi o leite usado no seu fabrico. A par das boas práticas de fabrico, a qualidade da matéria-prima é fundamental na garantia de um produto final seguro. De acordo com Pintado (2009), o leite contaminado com *L. monocytogenes* que foi usado no fabrico de queijo de ovelha curado foi a principal fonte de contaminação de um lote de queijos e do ambiente da respetiva queijaria. Após o isolamento da bactéria no leite, no queijo e em zaragatoas efetuadas a superfícies na queijaria foi feita a serotipagem molecular, a tipagem por *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e a tipagem por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), tendo-se concluído que a fonte de contaminação tinha sido o leite cru contaminado com *L. monocytogenes* do serogrupo 4b, 4d, 4e, proveniente duma ovelha portadora assintomática daquele microrganismo.

6.3 Pesquisa de STEC nas amostras de leite

Relativamente à pesquisa de STEC, foram analisadas um total de 57 amostras de leite cru de ovelha e cabra, em junho/julho e novembro/janeiro, onde 34 amostras são leite cru de ovelha e 23 de leite cru de cabra (ANEXO II). As amostras de leite colhidas são provenientes de 35 produtores de leite cru de pequenos ruminantes.

Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que num total de 34 amostras de leite cru de ovelha, os genes de virulência *stx1/stx2* mostraram estar presentes em 32 amostras (94%) e 29 amostras (85%) mostraram também ser positivas para o gene *eae*.

Relativamente ao leite cru de cabra, num total de 23 amostras, a pesquisa dos genes de virulência *stx1/stx2* mostraram estar presentes em 10 amostras (43%) e 16 amostras (70%) mostraram também ser positivas para o gene *eae*.

Observa-se ainda a presença simultânea da combinação dos genes *stx1/stx2* e *eae* no leite cru de ovelha em 27 amostras (79%), enquanto no leite cru de cabra essa situação ocorre em apenas 8 amostras (35%).

Como podemos constatar pelos resultados, a prevalência de STEC nas amostras de leite cru analisadas é muito elevada, qualquer que seja o ponto de comparação, em particular no caso das amostras de leite de ovelha.

O controlo de STEC na produção leiteira só pode ser alcançado por um conjunto de medidas ao longo de toda a cadeia alimentar. A combinação ideal destas medidas continua a ser estudada e são necessárias mais pesquisas para melhorar a avaliação da prevalência e dos números ao longo da cadeia alimentar e da eficácia das medidas de controlo, desenvolvendo métodos reconhecidos para análises baratas e rápidas (Farrokh *et al.*, 2012). Aliás, os testes de STEC ao produto final não são uma estratégia de controlo eficaz, logo, seria ineficaz para definir um critério microbiológico, porque as taxas de contaminação em alimentos suspeitos são muito baixas.

Em 2013, 5 países dos EM apresentaram dados provenientes de ovinos e caprinos. No total, 799 unidades foram testadas e dessas unidades constatou-se que 22,7% foram positivas para STEC. Em 2012, a proporção de STEC foi menor com 9,3% (EFSA, 2015).

De acordo com a EFSA (2015), com base em dados da EU para o período entre 2009 e 2013, verificou-se uma clara tendência sazonal nos casos confirmados de STEC, com mais casos notificados nos meses de Verão. No caso do nosso estudo verificou-se que a presença de STEC tende a ser aproximadamente a mesma no Verão e no Inverno.

6.4 Serotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*

A análise dos dois géis de electroforese obtidos após PCR *Multiplex* dos onze isolados provenientes das três amostras com pesquisa positiva para *L. monocytogenes* permitiu-nos concluir que todos os isolados pertenciam ao serogrupo 4b, 4d e 4e.

Na Figura 7 temos a imagem de um dos géis obtidos. Na posição 1, 2, 3 e 4 temos culturas anteriormente serotipadas e que foram usadas como referência para, respetivamente, *L. monocytogenes* serogrupo 1/2b, 3b, 7, *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a, 3a, *L. monocytogenes* serogrupo 4b, 4d, 4e e *L. monocytogenes* serogrupo 1/2c, 3c. Nas posições 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 estão os perfis dos sete isolados provenientes da amostra de leite LCP24/L1, verificando-se que todos eles pertencem ao serogrupo 4b, 4d, 4e.

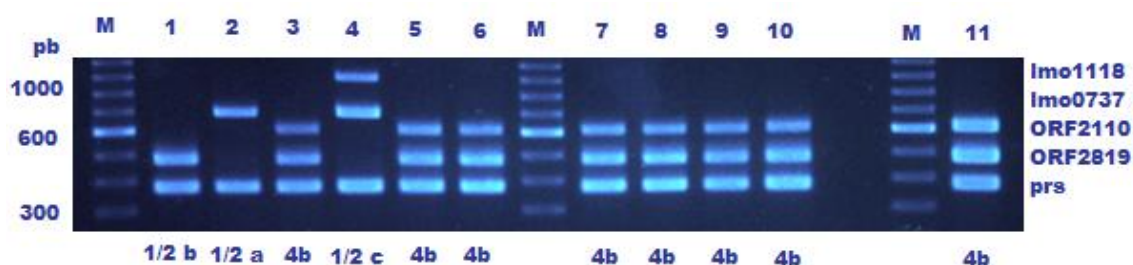


Figura 7: 1º gel obtido após serotipagem de *L. monocytogenes* por *Multiplex* PCR.

M - marcador; 1, 2, 3 e 4 - *L. monocytogenes* de culturas anteriormente serotipadas e representativas de cada um dos quatro serogrupos; 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 - *L. monocytogenes* da amostra LCP24/L1

Na Figura 8 temos a imagem do segundo gel. Na posição 1, 2, 3 e 4 temos culturas anteriormente serotipadas e que foram usadas como referência para os quatro serogrupos, à semelhança do que sucedeu com o gel anterior. Nas posições 5 e 6 estão os perfis dos dois isolados provenientes da amostra de leite LCP23/L2 e nas posições 7 e 8 estão os perfis dos dois isolados provenientes da amostra de queijo, verificando-se que todos eles pertencem ao serogrupo 4b, 4d, 4e.

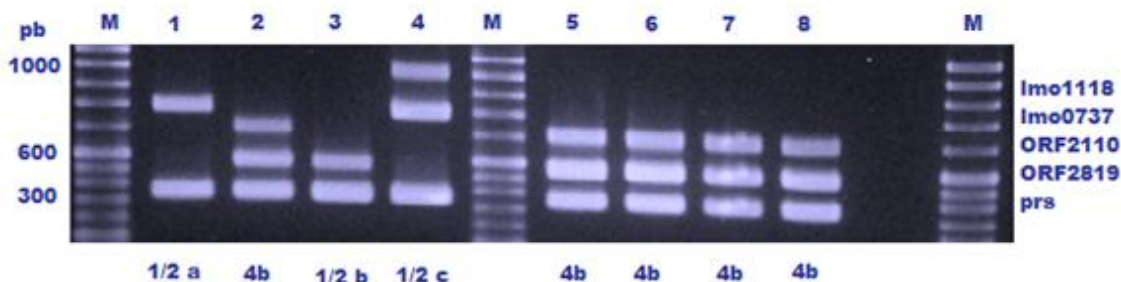


Figura 8: 2º gel obtido após serotipagem de *L. monocytogenes* por *Multiplex* PCR.

M - marcador; 1, 2, 3 e 4 - *L. monocytogenes* de culturas anteriormente serotipadas e representativas de cada um dos quatro serogrupos; 5 e 6 - *L. monocytogenes* da amostra LCP23/L2, 7 e 8 - *L. monocytogenes* de queijo

A presença deste serogrupo causa preocupação, pois inclui o serotipo 4b que é o responsável pelo maior número de casos de listeriose em humanos (Goulão, 2010).

O serogrupo 4b, 4d, 4e aqui detetado para o queijo vai ao encontro dos resultados obtidos por Barroso (2011), o qual aplicou esta mesma técnica, obtendo de todos os 6 isolados de amostras de queijos portugueses que analisou, o serogrupo 4b, 4d, 4e.

A EFSA (2015) relata que os serotipos mais comuns em 2013 foram 1/2a (57,5%) e 4b (34,3%), seguido de 1/2b (6,4%), 1/2c (1,4%), 3a e 3b (ambos a 0,2%). O ano de 2013 foi o segundo ano em que os países puderam relatar o método de serotipagem por PCR, pois tinham mudado as suas técnicas moleculares baseadas na serotipagem. Há ainda a informação que sete países Estados-Membros conseguiram fornecer dados sobre esta variável em 2013 (representando 35,1% de todos os casos confirmados). O serogrupo mais comum analisado por PCR foi 1/2a e 3a (44,7%), seguido de 4b, 4d, 4e (44,6%), 1/2b, 3b e 7 (7,8%) e 1/2c e 3c (2,9%).

6.5 Serotipagem de STEC

Os pequenos ruminantes têm sido identificados como um dos principais reservatórios para STEC (Reitsma *et al.*, 1996). Embora a transmissão de STEC nos seres humanos seja frequentemente associada com o consumo de carne crua ou mal cozida, as STEC também se manifestaram em leite cru e nos produtos lácteos, como causa de doença (EspíE *et al.*, 2008). O desenvolvimento de métodos rápidos para a deteção de estirpes patogénicas e STEC são essenciais para garantir a segurança dos produtos alimentares. Os dados sobre os sorogrupos de STEC (baseadas em antígenos O) foram relatados por 24 países, em 2013 (EFSA, 2015). *Escherichia coli* O157: H7 foi o primeiro serotipo isolado de STEC no início de 1980 e está implícita na maioria dos surtos e de casos de HUS (Karmali *et al.*, 2010 e Riley *et al.*, 1983). No entanto, outros serotipos, tais como *E. coli* O26: H11, *E. coli* O103: H2, *E. coli* O145: H28, e *E. coli* O111: H8, também têm sido associados com surtos (Lin *et al.*, 2011). Note-se que a serotipagem só é realizada para as amostras em que os genes *stx1/stx2* estão presentes.

Um total de 25 em 34 amostras (74%), ou seja, mais de metade das amostras na primeira fase de colheita de amostras foram avaliadas para a presença de serogrupos associados a STEC (Tabela 17).

Observando os resultados podemos ver que 18 em 25 amostras (72%) da primeira fase continham pelo menos um dos serogrupos pesquisados. O serogrupo mais frequente nas amostras foi o 045/O121 (64%), destacando-se o serogrupo 045 (56%), seguido do serogrupo 026 e 0103/O145 (40%), destacando-se os serogrupos 0103/O145 (32%). Apenas uma amostra (4%), a LOP16/L1 se revelou positiva para o serotipo O157:H7 em leite de ovelha e curiosamente contém, igualmente, o maior número de serogrupos identificados. O serotipo mais frequente nas amostras, 045 foi

identificado tanto para leite cru de ovelha como em leite de cabra. A presença de uma maior diversidade de serotipos é prevalente em amostras que contenham a combinação dos genes *stx1/stx2/eae*.

Tabela 17: Resultados das amostras serotipadas por PCR em tempo real na primeira fase.

	Ser 01		Ser 02		Ser 03	
	0111	0157:H7	0103/145	026	045	0121
LOP2/L1(<i>stx1/stx2/eae</i>)				√	√	
LOP3/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√			√
LOP4/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√		√	√
LOP5/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP6/L1 (<i>stx1/stx2</i>)					√	
LCP7/L1 (<i>stx1/stx2</i>)						
LCP10/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LCP11/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√			
LOP13/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)					√	
LOP14/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√			
LOP15/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP16/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)		√	√	√	√	√
LOP17/L1 (<i>stx1/stx2</i>)						
LOP18/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)					√	
LCP19/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√			√
LCP20/L1 (<i>stx1/stx2</i>)						
LCP23/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)					√	
LCP25/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√		√	
LOP26/L1 (<i>stx1/stx2</i>)					√	
LOP28/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√	√	√	
LOP30/L1 (<i>stx1/stx2</i>)					√	
LOP31/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)					√	
LOP32/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP33/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)					√	
LOP34/L1 (<i>stx1/stx2/eae</i>)				√	√	

Os resultados da segunda fase podem ser contemplados na Tabela 18. Um total de 17 em 24 amostras (71%), ou seja, mais de metade das amostras foram avaliadas para a presença de serogrupos associados a STEC.

Tabela 18: Resultados das amostras serotipadas por PCR em tempo real na segunda fase

	Ser 01		Ser 02		Ser 03	
	0111	0157:H7	0103/145	026	045	0121
LOP1/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√	√	√	√
LOP2/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP3/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP4/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√			
LOP5/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)		√				
LOP6/L2 (<i>stx1/stx2</i>)						
LOP8/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP13/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√		√	
LOP15/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√	√	√	
LOP16/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)				√	√	
LOP17/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)			√			
LCP18/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)				√	√	
LCP19/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)				√		
LOP20/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)						
LOP21/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)					√	
LOP22/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)				√	√	
LCP23/L2 (<i>stx1/stx2/eae</i>)				√	√	

Observando os resultados podemos ver que 12 em 17 amostras (71%) continham pelo menos um dos serogrupos identificados. O serogrupo mais frequente nas amostras foi o 026 e 0103/0145 (71%), destacando-se o serogrupo 026 (41%), seguido do serogrupo 045/0121 (53%), destacando-se o serogrupo 045 (47%). Apenas uma amostra (6%), a LOP5/L2 foi identificada para o serogrupo 0157:H7 em leite de ovelha. O serogrupo mais frequente nas amostras, 045 foi reconhecido tanto para leite cru de ovelha como em leite de cabra. Apesar de só existir uma única

amostra com gene *stx1/stx2* (LOP6/L2), a presença de uma maior diversidade de serogrupos continua a ser prevalente em amostras que contenham a combinação dos genes *stx1/stx2/eae*, visto na amostra LOP6/L2 não ter sido constatado nenhum serogrupo.

De forma a consolidar esta análise, foi possível estabelecer um serogrupo predominante neste estudo que foi o O45 em ambas as fases. Por outro lado, a presença de uma maior diversidade de serogrupos continua a ser prevalente em amostras que contenham a combinação dos genes *stx1/stx2/eae*. A grande diversidade de serogrupos vai ao encontro dos resultados obtidos por Farrokh *et al.* (2012) onde refere que ovinos e cabras parecem ter diferentes e variados serogrupos de STEC em comparação com bovinos. Segundo a EFSA (2015), o serogrupo mais comumente reportado pelos EM em 2013 foi, como em anos anteriores, o O157 (48,9% dos casos) e foi principalmente detetado em ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) e na carne dos mesmos. Adianta ainda a informação de que a proporção de STEC encontrado em ovinos e cabras foi maior do que a proporção encontrada em bovinos e em bovinos de carne.

A importância do grupo STEC aumentou desde o primeiro relato de uma infecção de origem alimentar causada por *E. coli* O157:H7 (Riley *et al.*, 1983). O risco associado ao consumo de leite de cabra não pasteurizado é documentado na literatura (Bialaszewski *et al.*, 1997; McIntyre *et al.*, 2002), que refere que na maior parte dos casos, os isolados de STEC em pacientes são do serogrupo O157.

O consumo direto de leite cru continua a ser um risco elevado e há uma grande evidência na bibliografia, destacando os diferentes tipos de agentes patogénicos que pode ser transmitida por este produto, e os surtos que foram atribuídos a esta origem. Baylis (2009) refere ainda que comparando com outros agentes patogénicos bacterianos, a *E. coli* O157: H7 associada a outras espécies de *E. coli* podem causar doenças graves e ainda levar a morte. Baylis (2009) diz ainda que embora tenham havido surtos associados a STEC, a ocorrência de STEC em leite cru é baixa e portanto, a análise microbiológica do produto final para STEC é pouco provável que resulte em reduções significativas no risco associado para o consumidor (Anónimo, 2003) e a monitorização de STEC no dia-a-dia não reduziria significativamente a ocorrência de casos associados.

O fabrico de queijo feito com leite cru é comum em alguns países e tem aumentado noutros. Estes resultados mostram a complexidade da situação actual, especialmente quando se trata de avaliação de risco desses produtos. Estudos com queijo em que tenha sido confirmado *E. coli* O157, revela que este serogrupo é ainda capaz de sobreviver ao processo de maturação dos queijos e aos vários períodos de armazenamento.

7. Considerações finais

Na vertente da Saúde Pública Veterinária, é importante enfatizar que de acordo com o Reg. (CE) 2073/2005 de 15 de novembro, todos os agentes de infeção alimentar potencialmente veiculados pelo queijo, apenas *L. monocytogenes* e *Salmonella* são de notificação obrigatória como indicadores de segurança de queijo curado, estando STEC definida como notificação obrigatória apenas para rebentos. Esta é a realidade mesmo sabendo que a transmissão de STEC para humanos pode ocorrer através da ingestão de carne mal cozida ou crua, verduras, legumes, água contaminada, leite não pasteurizado e também pelo contato direto com animais ou outras pessoas infetadas (Hunt, 2010).

Face aos resultados obtidos neste trabalho para STEC, em que 27 das 34 amostras de leite cru de ovelha e 8 das 23 amostras de leite cru de cabra foram positivas para os genes de virulência *stx1/stx2* e *eae*, conclui-se que a prevalência desta bactéria é muitíssimo elevada, o que nos leva a questionar as boas práticas de produção de leite, em todas as vertentes. É necessário uma maior sensibilidade para as questões de saúde pública e um maior grau de exigência, acompanhado de um maior acompanhamento e apoio técnico aos produtores, para que a qualidade microbiológica do leite usado no fabrico do queijo possa melhorar.

No decorrer deste estudo foram identificadas duas amostras positivas para *L. monocytogenes* em leite cru de cabra, o qual é usado no fabrico de queijo curado feito com leite cru. Na sequência deste resultado foi sugerido efetuar uma investigação sobre o foco de contaminação, o qual pudesse orientar medidas que conduzissem à sua erradicação. De referir ainda que todas as 34 amostras de leite de ovelha foram negativas para a pesquisa deste microrganismo.

Portugal é o único, de 17 países da Europa, que não têm activo pelo menos um sistema de vigilância e é dos únicos Estados Membros em que a listeriose não é de notificação obrigatória, o que dificulta a deteção precoce de surtos.

Sugere-se a utilização do Kit Embrapa de Ordenha Manual® para caprinos leiteiros. Este kit é uma tecnologia criada no Brasil que contribui para o desenvolvimento sustentável em explorações de caprinos. A correta utilização favorece a higiene do leite, por meio da redução de microrganismos com consequente controlo de mastites nos rebanhos.

A ASAE enquanto órgão de controlo e fiscalização da área alimentar é essencial na defesa da Saúde Pública.

Com os resultados da avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado no ano 2013, foi possível concluir que no total das amostras, 6% revelaram-se não conformes para a contagem de *L. monocytogenes* (ufc/g) e as restantes (94%) revelaram-se conformes para os parâmetros analisados. Em relação ao ano 2014

concluiu-se que o número de amostras não conformes para queijo curado foi de 5% estando as restantes (95%) conformes. Esta análise permite constatar que a maioria das amostras de queijo colhidas no ano 2013 contaminadas com *L. monocytogenes* provinham maioritariamente da região centro.

Através da análise dos dados do PNCA 2013 e 2014, verifica-se uma aparente diminuição do número de amostras positivas para *L. monocytogenes*. Esta ilação poderá dever-se ao papel positivo que a ASAE tem vindo a desenvolver, não só na fiscalização e controlo de géneros alimentícios, mas também no papel pedagógico junto dos produtores e consumidores.

Sendo o PNCA um plano activo e que prevê a realização de colheitas de amostras a *L. monocytogenes* rotineiramente, seria vantajoso que os isolados destas amostras fossem tipadas, permitindo monitorizar os tipos moleculares encontrados nos géneros alimentícios, aliando as funcionalidades da autoridade competente (ASAE) com o desenvolvimento científico.

8. Referências bibliográficas

- Adams, M.; Moss, M.** (2008) Food microbiology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry
- Almeida, G.; Gibbs, P.; Hogg, T.; Teixeira, P.** (2006) Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. BMC Infectious Diseases, 6: 153
- Anónimo** (2003) Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in Foodstuffs. European Commission — Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium
- ASAE** (2008) Plano Nacional de Colheita de Amostras, Documento de trabalho. Gabinete Técnico e Pericial, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), Lisboa
- ASAE** (2009) Relatório Final Plano Nacional de Colheita de Amostras 2008, Gabinete Técnico Pericial, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), Lisboa
- ASAE** (2010) Plano Nacional de Colheita de Amostras 2010, Documento de trabalho. Gabinete Técnico Pericial, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), Lisboa
- ASAE** (2012) Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Laboratórios e Técnico Pericial
- ASAE** (2014) Plano Nacional de Colheita de Amostras 2015, Documento de trabalho. Divisão de Riscos Alimentares, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), Lisboa
- Aspán, A.; Eriksson, E.** (2010) Verotoxigenic *E. coli* O157:H7 from Swedish cattle isolates from prevalence studies versus strains linked to human infections – a retrospective study, 6: 1-10
- Baptista, P.; Armando, V.** (2003) Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Forvisão - Consultadoria em formação integrada, lda.
- Barroso, J.** (2011) Isolamento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. e susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes usados na indústria alimentar. Relatório do trabalho de fim de curso. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco
- Baylis, C.** (2009) Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Microbiology Department, Chipping Campden, Gloucestershire, UK
- Beutin, L.; Steinrück, H.; Zimmermann, S.; Scheutz F.** (1993) Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. Journal of Clinical Microbiology, 31: 2483-2488
- Bielaszewsk, M.; Janda, J.; Bláhová, K.** (1997) Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. Epidemiology & Infection, 119: 299-305
- Bille, J.; Blanc, S.; Schmid, H.; Boubaker, K.; Baumgartner, A.; Siegrist, H.; Tritten, L.; Lienhard, R.; Berner, D.; Anderau, R.; Treboux, M.; Ducommun, M.; Malinverni, R.; Genné, D.; Erard, H.; Waespi, U.** (2006) Outbreak of human listeriosis. Eurosurveillance, 11: 91-93
- BIOMÉRIEUX** (2003) - Manual de meios de cultura e suplementos
- Blanco, M.; Blanco, E.; Mora, A.; Rey, J.; Alonso, M.; Hermoso, M.; Hermoso, J.** (2003) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. Journal of Clinical Microbiology, 41: 1351-1356
- Britz, T.; Robinson, R.** (2008) "Advance Dairy Science and Technology". Blackwell Publishing Ltd, 312

- Brown, T.** (2006) Gene Cloning and DNA Analysis. Blackwell Publishing, UK
- Büla, J.; Bille, J.; Glauser, P.** (1995) An epidemic of foodborne listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases*, 20: 66 –72
- Caprioli A.; Morabito, S.; Brugère, H.; Oswald, E.** (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission, 36: 289-311
- Carrique-Mas, J.; Hökeberg, I.; Andersson, Y.; Arneborn, M.; Tham, W.; Danielsson-Tham, L.; Osterman, B.; Leffler, M.; Steen, M.; Eriksson, E.; Hedin, G.; Giesecke, J.** (2003) Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? *Epidemiology and Infection*, 130: 79-86
- CDC** (2010) *Escherichia coli* O157:H7: general information. Centers for Disease Control and Prevention
- CDC** (2011) Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with the Consumption of Hog Head Cheese Louisiana, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60: 401-405
- Chambel, L.; Sol, M.; Fernandes, I.; Barbosa, M.; Zilhão, I.; Barata, B.; Jordan, S.; Perni, S.; Shama, G.; Adrião, A.; Faleiro, L.; Requena, T.; Peláez, C.; Andrew, W.; Tenreiro, R.** (2007) Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 52-63
- China, B.; Pirson, V.; Mainil, J.** (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Application Environmental Microbiology*, 62: 3462-3465
- Churchill, T.; Lee, H.; Hall, C.** (2006) Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 64: 141-170
- Chaturongakul, S.; Raengpradub, S.; Wiedmann, M.; Boor, K.** (2008) Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16: 388-396
- Cockerill, R.** (2003) Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127: 1112-1120
- Corless, E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Kaczmarek, B.; Fox, J.** (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1747-1752
- Crump, A.; Sulka, C.; Langer, J.; Schaben, C.; Crielly, S.; Gage, R.; Baysinger, M.; Moll, M.; Withers, M.; Toney, M.; Hunter, B.; Hoekstra, M.; Wong, K.; Griffin, M.; Gilder, V.** (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *New England Journal of Medicine*, 347: 555-560
- Csako, G.** (2006) Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clinica Chimica Acta*, 363: 6-31
- Demeu, F.; Lopes, M.; Costa, G.; Rocha, C.; Santos, G.; Neto, A.** (2001) Influência do Descarte Involuntário de Matrizes no Impacto Econômico da Mastite em Rebanhos Leiteiros. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1413-7054
- Dias, D.** (2013) Prevalência de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos. Relatório do Trabalho final de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade de Evora
- Dipineto, L.; Santaniello, A.; Fontanella, M.; Lagos, K.; Fioretti, A.; Menna, F.** (2006) Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 293-5

- Djordjevic**, P.; Hornitzky, A.; Bailey, G.; Gill, P.; Vanselow, B.; Walker, K.; Bettelheim, A. (2001) Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2017-2021
- Downes**, P.; Ito, K. (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association
- Doumith**, M.; Buchrieser, C.; Glaser, P.; Jacquet, C.; Martin, P. (2004) Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3819-3822
- EMBRAPA** (2012) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Leite. Agência de Informação
- Eurogentec** (2004) Your one-stop-shop real-time PCR supplier. EGT Group, Belgium
- EspiÉ**, E.; Grimont, F.; Mariani-Kurkdjian, P.; Bouvet, P.; Haeghebaert, S.; Filliol, I.; Loirat, C.; Decludt, B.; Vaillant, V.; Valk, H. (2008) Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27: 595- 601
- Espy**, J.; Uhl, R.; Sloan, M.; Buckwalter, P.; Jones, F.; Vetter, A.; Yao, D.; Wengenack, L.; Rosenblatt, E.; Cockerill, R.; Smith, F. (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165-256
- European Food Safety Authority** (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9: 136-158
- European Food Safety Authority** (2015) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13: 3991
- FAO e IDF** (2013) Guia de boas práticas na pecuária de leite. Produção e Saúde Animal Diretrizes, Roma
- FAO/WHO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) (2004) Risk assessments of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report, Geneva
- Farber**, M.; Peterkin, I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55: 476-511
- Farrokh**, C.; Jordan, K.; Glass, K.; Oppegaard, H.; Raynaud, S.; Thevenot, D.; Condrón, R.; Reu, D.; Govaris, A.; Heggum, k.; Heyndrickx, M.; Hummerjohann, J.; Lindsay, D.; Miszczycha, S.; Moussiégt, S.; Verstraete, K.; Cerf, O. (2012) Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*
- Frank**, C.; Werber, D.; Cramer, P.; Askar, M.; Faber, M.; An Der Heiden, M.; Bernard, H.; Fruth, A.; Prager, R.; Spode, A.; Wadl, M.; Zoufaly, A.; Jordan, S.; Kemper, J.; Follin, P.; Müller, L.; King, A.; Rosner, B.; Buchholz, U.; Stark, K.; Gérard, K. (2011) Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – Preliminary report. *The New England Journal of Medicine*, 365: 1771-1780
- Frazier**, C. (1993) *Microbiologia de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España, 681
- Fukushima**, H.; Hashizume, T.; Kitani T. (1997) The massive outbreak of *E. coli* O157 infections by food poisoning among the elementary school children in Sakai, Japan in 1996 In: III International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Baltimore, 111

Gandra, A. (2006) *Multiplex PCR para detecção de S. aureus, S.intermedius e S. hyicus em leite UHT artificialmente contaminado.* Tese de doutoramento em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas;

Gaulin, C.; Ramsay, D.; Ringuette, L; Ismaïl, J. (2003) First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. *Canada Communicable Disease Report*, 29: 181-186

Gaya, P.; Saralegui, C.; Medina, M. (1996) Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in raw caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 79: 1936-19194

Goulão, F. (2010) CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes* ser. 4b POR AMPLIFIED FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM “AFLP”. Tese de Mestrado em Engenharia zootécnica. Universidade dos Açores

Goulet, V.; Brohier, S. (1989) Listeriosis in France in 1986: survey of hospital laboratories. *Pathologie Biologie*, 37: 206–211

Goulet, V.; Jacquet, C.; Martin, P.; Vaillant, V.; Laurent, E.; Valk, H. (2006) Surveillance of human listeriosis in France, 2001–2003. *Eurosurveillance*, 11: 79

Guth, C.; Prado, V.; Rivas, M. (2010) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Latin America*; 65-83

Guerra, M.; Mclauchlin, J.; Bernardo, A. (2001) *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 16: 423-429

Gyles, L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Animal Science Journal*, 85: 45-62

Haenlin, W. (2001) Past, present and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, 84: 2097-2115

Health Canada (2009) Lessons learned: public health agency of Canada’s response to the 2008 listeriosis outbreak;

Heredia, N., Wesley, I. & García, S. (2009) *Microbiologically Safe Foods*, A. Jonh Wiley & Song, Inc;

Hunt, M. (2010) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, p. 21-45;

ISO 11290 (1996) International Standard. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – part 1: detection method. International Organization for Standardization, Genève;

Kalantzopoulos, G.; Dubeuf, P.; Vallerand, F.; Pirisi, A.; Casalta, E.; Lauret, A.; Trujillo, T. (2002) Characteristics of the sheep and goat milks: Quality and hygienic stakes for the sheep and goat dairy setors. FIL-IDF - Hygiene and Safety - International Dairy Federation, Meeting 28 September;

Karmali, A.; Gannon, V.; Sargeant, M. (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140: 360–370

Kubista, M.; Andrade, M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjoback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A.; Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125

Kuhn, M.; Scortti, M.; Vázquez-Boland, A. (2008) Pathogenesis. *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press

Lablé, G.; Garcia, S. (2001) *Guide to foodborne pathogens*. New York: John Wiley and Sons;

- Lamont, F.;** Sobel, J.; Mazaki-tovi, S.; Kusanovic, P.; Vaisbuch, E.; Kim, K.; Uldbjerg, N.; Romero, R. (2013) Listeriosis in Human Pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine*, 39: 227-236
- Leite, P.;** Rodrigues, R.; Ferreira M.; Ribeiro, G.; Jacquetc, C.; Martinc, P.; Brito, L. (2006) Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 106: 111-121
- Lin, A.;** Sultan, O.; Lau, K.; Wong, E.; Hartman, G.; Lauzon, R. (2011) O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiology*, 28: 478- 483
- Liu, D.** (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 645-659
- Liu, D.** (2008) Epidemiology. Handbook of *Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press
- López, V.;** Suárez, M.; Chico-Calero, I.; Navas, J.; Martínez-Suárez, V. (2006) Foodborne *Listeria monocytogenes*: are all the isolates equally virulent? *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 224-234
- López, V.;** Villatoro, D.; Ortiz, S.; López, P.; Navas, J.; Dávila, C.; Martínéz-Suárez, V. (2008) Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Science*, 78: 130-134
- Lorusso, V.;** Dambrosio, A.; Quaglia, C.; Parisi, A.; La Salandra, G.; Lucifora, G.; Mula, G.; Virgilio, S.; Carosielli, L.; Rella, A.; Dario, M.; Normanno, G. (2009). Verocytotoxinproducing *Escherichia coli* O26 in raw water buffalo (*Bubalus bubalis*) milk products in Italy. *Journal of Food Protection*, 72: 1705-1708
- Ludwig, W.;** Schleifer, K.; Whitman, B. (2009) Family III. *Listeriaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Georgia
- Lundén, J.;** Tolvanen, R.; Korkeala, H. (2004) Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87: 6-12
- MacDonald, D.;** Whitwam, R.; Boggs, J.; MacCormack, J.; Anderson, K.; Reardon, J.; Saah, J.; Graves, L.; Hunter, S.; Sobel, J. (2005) Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical Infectious Diseases*, 40: 677-682
- Makino, S.;** Kobori, H.; Asakura, H.; Watarai, M.; Shirahata, T.; Ikeda, T.; Takeshi, K.; Tsukamoto, T. (2000) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology & Infection*, 125: 55-61
- Marin, A.;** Lemos, A.; Freitas, I. (2006) Detecção de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, 20: 46-50
- Martins, L.;** Vasconcelos, M. (2001) Queijos tradicionais portugueses. Qualidade e factores de tipicidade. *Via Láctea*, 16-20
- McLaughlin, J.;** Greenwood, H.; Pini, N. (1990) The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *International Journal Food Microbiology*, 10: 255-262
- McIntyre, L.;** Fung, J.; Paccagnella, A.; Isaac-Renton, J.; Rockwell, F.; Emerson, B.; Preston, T. (2002) *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Canada Communicable Disease Report*, 28: 6-8
- Mena, C.;** Almeida, G.; Carneiro, L.; Teixeira, P.; Hogg, T.; Giggs, A. (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food microbiology*, 21: 213-216

Nataro, P.; Kaper, B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 142-201

Nolla-Salas, J.; Anto, M.; Almela, M.; Coll, P.; Gasser, I.; Plasencia, A. (1993) Incidence of listeriosis in Barcelona, Spain, in 1990. The collaborative study group of listeriosis of Barcelona. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 12: 157-161

Nunes, F. (2004) Leite mecanismos de produção. FENALAC, Federação Nacional das Cooperativas de Produtores de Leite, Vila do Conde

O'Brien, D.; Laveck, D.; Thompson, R.; Formal, B. (1992) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 146: 763-769

Ogden, D.; Hepburn, F.; Macrae, M.; Strachan, C.; Felon, R.; Rusbridge, M.; Pennington, H. (2002) Long term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following and outbreak associated with sheep at a scout camp. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 100-104

O'Grady, J.; Sedano – Balbás, S.; Maher, M.; Smith, T.; Barry, T. (2008) Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiology*, 25: 75-84

OIE (2005) Terrestrial Manual *Listeria monocytogenes*

Okutani, A.; Okada, Y.; Yamamoto, S.; Igimi, S. (2004) Nation wide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiology and Infection*, 132: 769-772

Oliveira, S. (1986) Queijo: Fundamentos Tecnológicos. São Paulo: Editora da UNICAMP

Oliveira, G.; Brito, F.; Carvalho, R.; Guth, C.; Gomes, A.; Vieira, A.; Kato, A.; Ramos, I.; Vaz, M.; Irino, K. (2007) Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5945-5948

Ooi, T.; Lorber, B. (2005) Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40: 1327-1332

Paton, W.; Ratcliff, M.; Doyle, M.; Seymour-Murray, J.; Davos, D.; Lanser, A.; Paton, C. (1996) Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1622-1627

Paton, C.; Paton, W. (1998) Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 450-479

Pereira, D.; Pintado, C. (2000) Incidência de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp. em leite cru de ovelha. Livro de Actas do Congresso Internacional Food Safety. Porto

Pfeifer, I.; Burger, J.; Brenig, B. (2004) Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genetics*, 5: 30-36

Pine, L.; Malcolm, B.; Brooks, B.; Daneshvar, I. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 245-254

Pintado, C.; Felício, M. (2002) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk, cheese, cheese brine and environmental surface samples from the Beira Baixa region of Portugal. FEMS Symposium on The Versatility of *Listeria* Species, 10-11 Outubro 2002, Izmir, Turquia

Pintado, C.; Oliveira, A.; Pampulha, M., Ferreira, M. (2005) Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22: 79-85

Pintado, C.; Grant, A.; Halford-Maw, R.; Hampton, D.; Ferreira, M.; McLauchlin, J. (2009) Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 569-575

Pintado, C.; Goulão, M. (2013) Aula Prática de Serotipagem de *Listeria monocytogenes* por Multiplex PCR. Disciplina de Microbiologia Avançada do Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Pita, J. (2012) Surto de Listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo – Investigações e Medidas Implementadas pela ASAE. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

Premaratne, R.; Lin, W.; Johnson, E. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3046–3048

Radostits, M.; Gay, C.; Blood, C.; Hinchcliff, W. (2007) *Veterinary Medicine – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. W.B.Saunders, 603-700

Ramos, M. (2014) Avaliação da qualidade da água utilizada em explorações de leite de pequenos ruminantes. Relatório de estágio em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Ray, B. (2004) *Fundamentals food microbiology*. CRC Press. Boca Raton. USA, 321-345

Regulamento (CE) n.º 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. *Jornal Oficial da União Europeia*

Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*

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

Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*

Regulamento (CE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011, relativo à rotulagem e informação de géneros alimentícios

Reitsma, C.; Henning, R. (1996) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, 59: 460–464

Riedel, G. (1992) *Controle Sanitário dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 320

Riley, W.; Remis, R.; Helgerson, D.; McGee, B.; Wells, G.; Davis, R.; Hebert, J.; Olcott, S.; Johnson, M.; Hargrett, T.; Blake, A.; Cohen, L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine*, 308: 681-685

Roberts, A.; Baird-Parker, A.; Tompkin, R. (1996) *Microorganisms in foods*. (ICMSF): microbial specifications of food pathogens. London: Blackie Academic & Professional

Rocourt, J.; Jacquet, C.; Reilly, A. (2000) Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 197-209

Rodríguez-Lázaro, D.; Pla M.; Scortti M.; Monzó, H.; Vázquez-Boland, J. (2005) A Novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes*, that Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 9008–9012

Rybicki, E. (2001) PCR Primer design and reaction optimization

Santos, M., Correia, C., Cunha, M., Saraiva, M., Novais, R. (2005) Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – CSAN. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 66-68

Schuchat, A.; Swaminathan, B.; Broome, C. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 169-183

Siddiqi, R.; Khan, M. (1989) Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl. Bakteriologie*, 271: 146-152

Simon, M.; Gray, D.; Cook, N. (1996) DNA Extration and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold – Smoked Salmon. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 822-824

Smith, K.; Diggle, M.; Clarke, S. (2004) Automation of a fluorescence-based multiplex PCR for the laboratory confirmation of common bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 115-117

Sinha, O. (2000) Clean milk production and support services. Small-scale milk collection and processing in developing countries. FAO Animal Production Service, Rome, Italy

Sousa, C. (2005) The strategies of *Escherichia coli* pathotypes and health surveillance. *Brazilian Journal of Health Surveillance*, 1: 65-70

Stephan, R.; Schumacher, S.; Corti, S.; Krause, G.; Danuser, J.; Beutin, L. (2008) Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of Dairy Science*, 91: 2561–2565

Swaminathan, B.; Gerner-Smidt, P. (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9: 1236-1243

Swerdlow, D.; Woodruff, B.; Brady, R.; Griffin, P.; Tippen, S.; Donnel, Jr.; Geldreich, E.; Payne, B.; Meyer, Jr.; Wells, J.; Greene, D.; Bright, M.; Bean, N.; Blake, P. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine*, 117: 812-819

Tristão, L.; Gonzalez, A.; Coutinho, C.; Cerqueira, A.; Gomes, M.; Irino, K.; Guth, B.; Andrade, J. (2007) Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*, 119: 358-365

Taillefer, C.; Boucher, M.; Laferrière, C.; Morin, L. (2010) Perinatal Listeriosis: Canada's 2008 Outbreaks. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 32: 45-48

Tang, Y.; Persing, D. (1999) Molecular detection and identification of microorganisms. *Manual of clinical microbiology*, 215-244

Taveira, N. (2000) Pesquisa e Identificação Molecular de Microrganismos. In *Microbiologia*, 3: 37

United States Department of Health and Human Services (2003) Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration, 572

United States Department of Health and Human Services (2007) Bad Bug Book: Food and Drug Administration: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. *Listeria monocytogenes*. Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration 99-103

Valk, H.; Jacquet, C.; Goulet, V.; Vaillant, V.; Perra, A.; Simon, F.; Desenclos, J.; Martin, P. (2005) Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Eurosurveillance*

Vázquez-Boland, J.; 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. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 584-640

Vaz, T.; Irino, K.; Kato, M.; Dias, A.; Gomes, T.; Medeiros, M.; Rocha, M.; Guth, B. (2004) Virulence properties and characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 903-905

Veiga, A.; Carrilho, E.; Silva, L.; Dias, M.; Seabra, M.; Borges, M.; Fernandes, P.; Nunes, S. (2009) Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*, 33-37

Vettorato, M. (2008) Estudo da frequência e caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC) isoladas de ovinos no estado de São Paulo. Universidade de São Paulo

Vít, M.; Olejník, R.; Dlhý, J.; Karpíšková, R.; Částková, J.; Příkazský, V.; Příkazská, M.; Beneš, Č.; Petráš, P. (2007) Outbreak of listeriosis in the Czech Republic, late 2006 – preliminary report. *Eurosurveillance*, 12

Wagner, M.; McLauchlin, J. (2008) *Biology. Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press

WHO (2008) Food disease outbreaks: guidelines for investigation and control: World Health Organization. Geneva, Switzerland, 14-43

WHO (1988) Foodborne listeriosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 66: 421-428

Yamamoto, Y. (2002) PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 508-514

Yucel, N.; Ulusoy, H. (2006) A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. *Food Control*, 17: 383-388

Zocche, F.; Bersot, L.; Barcellos, V.; Paranhos, J.; Rosa, S.; Raymundo, N. (2002) Microbiological and physicalchemistry quality of pasteurized milks produced in the west region, Parana. *Archives of Veterinary Science*, 7: 59-67

Zunabovic, M.; Domig, K.; & Kneifel, W. (2010) Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. *Food Science and Technology*, 44: 351-362

9. Anexos

ANEXO I

Auto de Colheita de amostras de leite cru

Data da colheita: _____

Local da colheita: _____

Funcionário que executa: _____

PRODUTO

Designação da amostra: **Leite Cru**

Código da Amostra: _____/L_____/14

Volume/quantidade: **100mL**

CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE

O produto encontrava-se à temperatura de _____ °C , foi colocado em:-----

mala térmica com _____ termoacumuladores, -----

viatura frigorífica, refrigeração congelação, tendo sido programado o termóstato da viatura para a temperatura de _____ graus, -----

e vai ser entregue no laboratório de Microbiologia da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, onde se realizarão as seguintes análises: pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25 mL e pesquisa de STEC em 25mL.

ORDENHA

Data(s) das ordenha(s): _____

Horário da(s) ordenha(s) _____

Tipo de ordenha:-----

manual

mecânica

ANEXO II

Amostras de leite cru de ovelha e cabra colhidas no âmbito do estudo

Designação da amostra	Código da amostra	Local da Colheita	Data da colheita	Estação
Leite cru de ovelha	LOP1/L1/14	Fundão	30/06/2014	Verão
Leite cru de ovelha	LOP2/L1/14	Fundão	30/06/2014	
Leite cru de ovelha	LOP3/L1/14	Covilhã	30/06/2014	
Leite cru de ovelha	LOP4/L1/14	Covilhã	30/06/2014	
Leite cru de ovelha	LOP5/L1/14	Covilhã	30/06/2014	
Leite cru de ovelha	LOP6/L1/14	Belmonte	30/06/2014	
Leite cru de cabra	LCP7/L1/14	Castelo Branco	01/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP8/L1/14	Castelo Branco	01/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP9/L1/14	Castelo Branco	01/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP10/L1/14	Castelo Branco	01/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP11/L1/14	Proença-a-Nova	01/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP12/L1/14	Proença-a-Nova	01/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP13/L1/14	Fundão	07/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP14/L1/14	Fundão	07/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP15/L1/14	Belmonte	07/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP16/L1/14	Belmonte	07/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP17/L1/14	Belmonte	07/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP18/L1/14	Belmonte	07/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP19/L1/14	Fundão	07/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP20/L1/14	Fundão	07/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP21/L1/14	Queijaria	08/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP22/L1/14	Queijaria	08/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP23/L1/14	Queijaria	08/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP24/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LCP25/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP26/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP27/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP28/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de cabra	LCP29/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP30/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP31/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP32/L1/14	Queijaria	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP33/L1/14	Fundão	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP34/L1/14	Belmonte	14/07/2014	
Leite cru de ovelha	LOP1/L2/14	Atalaia	24/11/2014	Outono/Inverno
Leite cru de ovelha	LOP2/L2/14	Fundão	24/11/2014	
Leite cru de ovelha	LOP3/L2/14	Fundão	24/11/2014	
Leite cru de ovelha	LOP4/L2/14	Fundão	24/11/2014	
Leite cru de ovelha	LOP5/L2/14	Fundão	24/11/2014	
Leite cru de ovelha	LOP6/L2/14	Fundão	24/11/2014	
Leite cru de cabra	LCP7/L2/14	Castelo Branco	25/11/2014	
Leite cru de cabra	LCP8/L2/14	S. Vicente da Beira	25/11/2014	
Leite cru de cabra	LCP9/L2/14	Castelo Branco	25/11/2014	
Leite cru de cabra	LCP10/L2/14	Castelo Branco	25/11/2014	
Leite cru de cabra	LCP11/L2/14	Castelo Branco	25/11/2014	
Leite cru de cabra	LCP12/L2/14	Castelo Branco	25/11/2014	
Leite cru de ovelha	LOP13/L2/15	Fundão	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP14/L2/15	Fundão	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP15/L2/15	Fundão	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP16/L2/15	Fundão	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP17/L2/15	Belmonte	19/01/2015	
Leite cru de cabra	LCP18/L2/15	Fundão	19/01/2015	
Leite cru de cabra	LCP19/L2/15	Fundão	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP20/L2/15	Queijaria	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP21/L2/15	Queijaria	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LOP22/L2/15	Queijaria	19/01/2015	
Leite cru de ovelha	LCP23/L2/15	Queijaria	19/01/2015	
Leite cru de cabra	LOP24/L2/15	Queijaria	20/01/2015	

ANEXO III

Resultados da avaliação microbiológica dos dados do PNCA 2013

Identificação do produto	Ponto de Colheita	Apreciação da amostra com base nos resultados das cinco unidades analisadas para a Pesquisa de <i>Salmonella</i> em 25g de queijo	Apreciação da amostra com base nos resultados das cinco unidades analisadas para a contagem de <i>L.monocytogenes</i> (ufc/g)	Apreciação da amostra com base nos resultados das cinco unidades analisadas para a contagem de <i>E.coli</i> (ufc/g)	Parecer Técnico
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Supermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Supermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Frutaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de mistura	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Não conforme	Conforme	N/ conforme
Queijo de ovelha curado seco	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Não conforme	Conforme	N/ conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Não conforme	Conforme	N/ conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo Serra da Estrela	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Empreendimento	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo Serra da Estrela	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Supermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Supermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Não conforme	Conforme	N/ conforme
Queijo de ovelha curado seco	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Queijo cabra Transmontano	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de cabra	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de ovelha	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de Azeitão	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Charcutaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo Nisa DOP	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de cabra	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo Serpa DOP	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de ovelha amanteigado	Supermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de ovelha	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de ovelha	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Mercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de Évora DOP	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Não conforme	Conforme	N/ conforme
Queijo de Azeitão	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de Azeitão	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Queijo de ovelha e cabra curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de cabra curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Mercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de cabra	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado gordo	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de cabra	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo amarelo da Beira Baixa DOP	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo Serra da Estrela DOP	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo terrincho velho DOP	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo cabra curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo cabra curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo curado de cabra	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de Castelo Branco	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado com sal	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Queijaria	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de cabra curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo Serra da Estrela	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de cabra curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado	Supermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Queijo de ovelha curado amanteigado	Hipermercado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

ANEXO IV

Resultados da avaliação microbiológica dos dados do PNCA 2014

