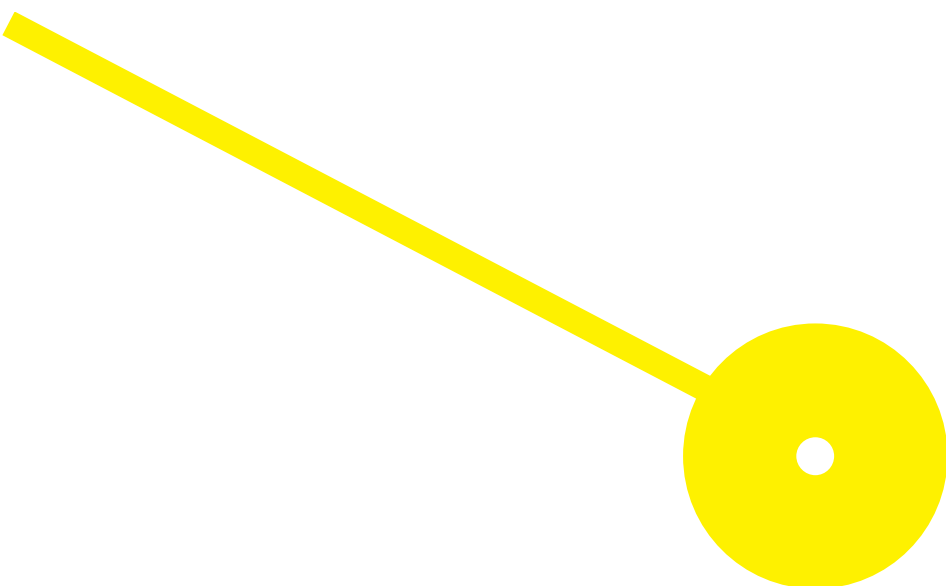




Pesquisa de *Salmonella spp.* em matrizes alimentares durante o ano 2021

Miriam João Conde Veiga

10/2022





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Pesquisa de *Salmonella spp.* em matrizes alimentares durante o ano 2021

Autor

Miriam João Conde Veiga

Orientadores

Professora Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa/Professora Especialista Análises Clínicas e Saúde Pública da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professor António Augusto Araújo Gomes/ Diretor Técnico da Biogerm SA/ Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professora Maria do Céu Ribeiro Lamas/Professora Especialista Análises Clínicas e Saúde Pública da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização em Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Quero agradecer desde já, às pessoas que sempre me apoiaram em tudo e tornaram a realização deste estágio possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer à professora Maria Manuela Amorim da Silva e Sousa e à professora Maria do Céu Ribeiro Lamas por serem excelentes coordenadoras de estágio, por todo o tempo que me dedicaram e por toda a paciência que tiveram comigo.

Em seguida, gostaria de agradecer ao Professor António Augusto Araújo por me ter acolhido com um sorriso nos lábios e me ter ajudado ao longo de todo o estágio.

Também quero agradecer a toda a equipa de Laboratório de Microbiologia por me elucidarem sobre diversos pormenores, pelas inúmeras vezes que me ajudaram quando precisei e pela boa disposição matinal.

Também quero fazer um especial agradecimento à minha mãe, ao meu namorado e a minha amiga Inês Chaves, por estarem sempre presentes durante o meu percurso académico, que implicou bons e maus momentos. E acima de tudo por nunca me terem deixado desamparada, e estarem sempre disponíveis para me aconselhar.

Por fim, quero agradecer a todos que estão presentes na minha vida, principalmente à minha família e amigos, que direta ou indiretamente me apoiaram.

Resumo

A *Salmonella spp.* é uma bactéria ubiqüitária, responsável por causar a salmonelose, a segunda zoonose mais comumente encontrada na União Europeia.

O estágio teve como principais objetivos, integrar conhecimentos e competências em diversas metodologias na vertente de Saúde Pública num laboratório de Microbiologia, e realizar análises microbiológicas a alimentos por métodos analíticos acreditados. No estudo de caso, foi determinar a frequência de *Salmonella spp.* em alimentos (crus e cozinhados) provenientes de Portugal Continental e Região Autónoma da Madeira no ano 2021.

Realizou-se um estudo descritivo e transversal, dos registos de dados de pesquisa de *Salmonella spp.* em alimentos no ano 2021 provenientes de Portugal. Os registos dos resultados foram divididos em 2 grupos pelo peso analisado e consoante o seu conteúdo, segundo a ISO 6579-1:2017.

Foram analisados 7147 registos de resultados de amostras de alimentos, das quais 112 obtiveram resultado positivo para *Salmonella spp.* por PCR em tempo real. Todas as 112 amostras foram confirmadas como positivas pelo método cultural.

A relevância da ausência de *Salmonella spp.* nos produtos alimentares está relacionada com as medidas de prevenção e controlo adotadas no âmbito dos procedimentos alimentares, pois a sua presença é um dos principais riscos em contexto de segurança alimentar.

Palavras-chave: Saúde Pública; Alimentos; *Salmonella*; PCR; Contaminação Alimentar.

Abstract

Salmonella spp. is a ubiquitous bacterium responsible for causing salmonellosis, the second most commonly zoonosis found in the European Union.

The main objectives of the internship were to integrate knowledge and skills in various methodologies in the field of Public Health in a Microbiology laboratory, and to carry out microbiological analyzes of foods by accredited analytical methods. In the case study, was to determine the frequency of *Salmonella spp.* in food (raw and cooked) from Mainland Portugal and Autonomous Region of Madeira in the year 2021.

A cross-sectional study was carried out, from Portugal records of *Salmonella spp.* in food in the year 2021. The results records were divided into 2 groups by the analyzed weight and according to their content, according to ISO 6579-1:2017.

7147 food sample result records were analyzed, of which 112 were positive for *Salmonella spp.* by real-time PCR. All 112 samples were confirmed positive by the culture method.

The relevance of the absence of *Salmonella spp.* in food products is related to the prevention and control measures adopted within the scope of food procedures, as its presence is one of the main risks in the context of food safety.

Keywords: Public Health; Food; *Salmonella*; PCR; Food Contamination.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACSP – Análises Clínicas e Saúde Pública

ADN – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *DexyriboNucleic Acid*

AFNOR – Associação Francesa de Normalização, do inglês *French Normalisation Association*

a_w – atividade da água, do Inglês *Water Activity*

BPW – Água Peptonada Tamponada, do Inglês *Buffered Peptone Water*

BS – Ágar Sulfito de Bismuto, do Inglês *Bismuth Sulfite agar*

CHROMO Salm. – CHROMO*salmonella*

ECDC – Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, do Inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do Inglês *European Food Safety Authority*

UE – União Europeia

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos, do Inglês *Food and Drug Administration*

HACCP – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, do Inglês *Hazard Analysis and Critical Control Points*

ISO – Organização Internacional de Normalização, do Inglês *International Organization for Standardization*

LDC broth – Caldo Lisina Descarboxilase, do Inglês *Lysine Descarboxylase broth*

MKTTn broth – Caldo Nutritivo de Tetrainato de Novobiocinona de Muller-Kauffmann, do Inglês *Muller-Kauffmann Tetrathionate-novobiocin broth*

NaCl – Cloreto de Sódio (Sal)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do Inglês *Polymerase Chain Reaction*

RVS broth – Caldo Nutritivo de Soja Rappaport-Vassiliadis, do Inglês *Rappaport-Vassiliadis Soya broth*

SC – Meio de Selenito Cistina, do Inglês *Selenite Cystine Medium*

TSI agar – Ágar Triplo Ferro Açucarado, do Inglês *Triple Sugar Iron agar*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

Ureia agar – Ágar de Ureia

XLD agar – Ágar de Desoxicolato-Lisina-Xilose, do Inglês *Xylose Lysine Deoxycholate agar*

Índice

Capítulo I – Estágio	1
1. Contextualização do estágio.....	1
2. Objetivos.....	1
3. Atividades desenvolvidas	2
3.1.1. Análises Microbiológicas de Águas	2
3.1.2. Análises Microbiológicas de Alimentos.....	3
3.1.2.1 Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	3
3.1.2.2 Extração de ADN de <i>Salmonella spp.</i> e detecção por PCR em tempo real	10
3.1.2.3 Validação dos resultados	13
Capítulo II – Estudo de caso: pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> em matrizes alimentares.....	16
1. Enquadramento teórico	16
1.1. Segurança alimentar.....	17
1.2. Características da <i>Salmonella spp.</i>	17
1.2.1. Epidemiologia.....	18
1.2.2. Patogénese e Transmissão	19
1.2.3. Diagnóstico.....	19
1.2.4. Prevenção, tratamento e controlo.....	20
2. Objetivo.....	20
3. Métodos	21
3.1. Estudo e amostra	21
3.2. Instrumentos e Procedimentos	21
3.3. Tratamento e análise de dados.....	22
4. Resultados.....	22
5. Discussão	25
5.1. Estágio	25
5.2. Estudo de caso.....	26
6. Conclusão	30
Referências Bibliográficas	32

Anexos	36
Anexo A – Diagrama/fluxograma do procedimento para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> em comida, rações e amostras ambientais da área de produção alimentar – adaptado da ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020(E).....	36
Anexo B – Composição e características dos meios de cultura utilizados para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> pela sequência da ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020(E).....	37
Anexo C – Guia de cálculo para a <i>Mix</i> do PCR da marca <i>BIO-Rad Laboratories, Inc.</i>	40
Anexo D – Descrição completa das amostras positivas de ambos os grupos para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	41
Anexo E – Fluxograma laboratorial da Biogerm.	43

Índice de Figuras

Figura 1: Colónias características para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> por método cultural nos meios XLD e CHROMO Salm, respetivamente.....	5
Figura 2: Confirmação dos resultados positivos através de testes bioquímicos antes da inoculação (A) e depois da inoculação (B). 1 – Meio líquido Lisina. 2 – Meio sólido inclinado TSI. 3 – Meio sólido inclinado Ureia. 4– Nutriente agar.....	7
Figura 3: Confirmação dos resultados positivos através de testes Serológicos antes da inoculação (A) e depois da inoculação (B). 1 – Soro fisiológico. 2 – Solução polivalente do soro antigénio O. 3 – Solução polivalente do soro antigénio H.....	9
Figura 4: Placa deep well de 96 poços no processo de extração de ADN de <i>Salmonella spp.</i> . 1 – Branco. 2 – Controlo positivo.....	10
Figura 5: Microplaca de PCR em tempo real com película. 1 – Branco. 2 – Controlo negativo. 3 – Controlo positivo.....	11
Figura 6: Vista geral do programa de PCR em tempo real. 6.1 – Gráfico da amplificação dos ciclos. 6.2 – Esquema da placa deep weel de 96 poços. 6.3 – Resultados para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	12
Figura 7: Amplificação do controlo positivo para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> no PCR em tempo real.....	13
Figura 8: Amplificação do controlo negativo para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> no PCR em tempo real.....	13
Figura 9: Fluxograma adaptado do protocolo da RAPID' <i>Salmonella</i>	14
Figura 10 – Meio seletivo CHROMO Salm, para <i>Salmonella spp.</i> . 10.1 – Colónias características de <i>Salmonella spp.</i> . 10.2 – Colónias de outras bactérias pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i>	15
Figura 11: Deteção da pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> em matrizes alimentares nos dois grupos em estudo.....	23

Índice de Tabelas

Tabela 1: Controlo de qualidade interno dos ensaios para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	5
Tabela 2: Interpretação dos testes bioquímicos – tabela adaptada da ISO 6579-1:2017.	9
Tabela 3: Diluições da cápsula RAPID' <i>Salmonella</i> – adaptado do protocolo da RAPID' <i>Salmonella</i>	15
Tabela 4: <i>Salmonella</i> spp. detetada em amostras com 10g $\pm$ 5%.....	23
Tabela 5: <i>Salmonella</i> spp. detetada em amostras com 25g $\pm$ 5%.....	24
Tabela 6: Divisão das amostras positivas com 25g $\pm$ 5% em alimentos prontos e não prontos a consumo.....	24

“A nossa recompensa está no esforço, não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa.”

Mahatma Gandhi

Capítulo I – Estágio

O presente relatório surge no âmbito da unidade curricular Estágio, para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública (ACSP), na área de especialização em Microbiologia e Saúde Pública, na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.Porto).

Este relatório é constituído por duas partes. A primeira consiste no relato das atividades desenvolvidas durante o estágio numa empresa de referência na área da Saúde Pública e a segunda na descrição do estudo de caso, em que é realizado o enquadramento teórico sobre a *Salmonella spp.* e a discussão dos registos de resultados das análises referentes à pesquisa de *Salmonella spp.* segundo a *International Organization for Standardization (ISO) 6579-1:2017 (1)*, de todas as amostras alimentares rececionadas no laboratório de Microbiologia durante o período de 1 de janeiro a 31 de dezembro de 2021, provenientes de Portugal Continental e Região Autónoma da Madeira.

1. Contextualização do estágio

O estágio curricular realizou-se na Biogerm SA (Maia, Portugal), laboratório de referência na área da Saúde Pública, onde são realizadas análises microbiológicas e químicas no controlo da qualidade alimentar, águas e ambiente, contemplando as mais recentes e avançadas metodologias – ensaios com Acreditação. Apresenta vários setores: laboratório de Microbiologia que está dividido em águas e alimentos; laboratório de Biologia Molecular e sala das confirmações. Os laboratórios da Biogerm estão sob coordenação do Diretor Técnico Dr. António Augusto Araújo. Este estágio incidu mais sobre o laboratório de Microbiologia de águas e alimentos, que decorreu no período de 3 de novembro de 2021 a 25 de janeiro de 2022.

2. Objetivos

Este estágio curricular contribuiu para compreender melhor o funcionamento e a dinâmica de um laboratório acreditado na vertente de Microbiologia em Saúde Pública.

Assim, teve como principais objetivos:

- Integrar conhecimentos e competências em diversas metodologias na vertente em Saúde Pública em particular na área da Microbiologia alimentar;
- Desenvolver a capacidade de trabalho em equipa num laboratório de Microbiologia;
- Acompanhar todo o processo desde a recolha/receção, manuseamento e análise microbiológica de amostras através de métodos analíticos acreditados segundo a ISO 6579-1:2017;

– Realizar metodologias de detecção por *Polimerase Chain Reaction* (PCR em tempo real) e confirmação por método cultural, na pesquisa de *Salmonella spp.* em diferentes alimentos (crus e cozinhados).

3. Atividades desenvolvidas

Neste estágio curricular observei e realizei diversas atividades, tais como:

- Recolha de amostras supervisionada por uma Técnica acreditada;
- Receção de amostras;
- Aplicação de técnicas de sementeira: sementeira por incorporação, sementeira por espalhamento à superfície e sementeira por filtração;
- Reconhecimento de diferentes tipos de meios de cultura para a área de diagnóstico e as respetivas condições de tempo de incubação e de temperatura;
- Utilização de diferentes kits de extração e detecção de ADN e PCR em tempo real para a pesquisa de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter spp.*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* e SARS-CoV-2 RNA.
- Análises microbiológicas a águas, alimentos, resíduos hospitalares, bancadas, utensílios e ar no laboratório de Microbiologia. Todas as análises microbiológicas consistem na realização do exame cultural – semear a amostra num meio de cultura apropriado e fornecer as condições necessárias ao crescimento *in vitro* dos microrganismos nela presentes, tendo como objetivo a análise e interpretação do crescimento microbiano em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL).

Contudo, o meu estágio teve como foco de aprendizagem a Microbiologia dos alimentos, mais concretamente a pesquisa de *Salmonella spp.* (ISO 6579-1:2017), permitindo adquirir conhecimentos e competências mais consolidadas nesta área.

3.1.1. Análises Microbiológicas de Águas

Neste setor são analisados, microbiologicamente, diferentes tipos de águas: águas para consumo tratadas e não tratadas, águas de piscina, águas termais, águas de nascentes, águas de processo e águas de mergulho, entre outras.

Os parâmetros microbiológicos mais requisitados são a pesquisa de *Legionella pneumophila*, pesquisa e contagem de *Legionella spp.*, contagem de microrganismos viáveis a 22°C, 30°C e 37°C, contagem de *Clostridium perfringens*, bactérias coliformes totais, *Escherichia coli* (coliforme fecal), bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* e bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Sendo que,

a qualidade da água para o consumo humano (beber, cozinhar e/ou para preparar alimentos) pelo Decreto-Lei nº306/2007, é caracterizada pelo conjunto de valores de parâmetros microbiológicos e físico-químicos, respeitando o valor máximo ou o mínimo fixado para cada um dos parâmetros analisados, estabelece obrigações e normas de qualidade. (2)

3.1.2. Análises Microbiológicas de Alimentos

Os alimentos são matrizes mais densas e com carga microbiana elevada, comparativamente com as águas, sendo necessário o uso de meios de cultura mais específicos – seletivos e diferenciais. No laboratório de Microbiologia são analisados, microbiologicamente, todos os produtos alimentares prontos a consumo (alimentos confeccionados) e não prontos a consumo (alimentos não confeccionados/crus) que estão implementados na alimentação humana.

Os parâmetros microbiológicos mais requisitados são a pesquisa de *Salmonella spp.*, pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*, contagem de microrganismos a 30°C, leveduras a 25°C, bolores a 25°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-lácticas, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

3.1.2.1 Pesquisa de *Salmonella spp.*

A pesquisa de *Salmonella spp.* em alimentos, segundo a ISO 6579-1:2017 – *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella spp.* (Microbiologia da cadeia alimentar – Método horizontal para deteção, enumeração e serotipagem de *Salmonella spp.*), consiste em detetar a presença ou ausência da bactéria numa quantidade de produto, nomeadamente 10g ±5% e 25g ±5%. (1, 3)

Neste método, os alimentos referentes a 10g ±5% são produtos alimentares não prontos a consumo (alimentos crus) – carnes de suíno e bovina cruas. Os alimentos referentes 25g ±5% são produtos alimentares prontos e não prontos a consumo – carnes de aves cruas e cozinhadas e refeições pré-confeccionadas e confeccionadas. Todos os produtos alimentares são portadores de vários microrganismos, quando contaminados durante o processamento e armazenamento dos mesmos. Esses microrganismos, mesmo que estejam presentes em pequena quantidade, podem ser prejudiciais para a saúde humana. Assim, para assegurar o controlo microbiológico dos alimentos, é necessário proceder à pesquisa de microrganismos patogénicos.

Esta pesquisa de deteção consiste em 4 fases (Anexo A):

1. Pré-Enriquecimento em meio líquido não seletivo;
2. Enriquecimento em meio seletivo;
3. Isolamento seletivo;

4. Confirmação através de provas bioquímicas e serológicas.

Em relação à pesquisa de *Salmonella spp.*, esta pode estar presente no produto alimentar em quantidades muito pequenas, em comparação com outras bactérias da mesma família *Enterobacteriaceae* ou bactérias de famílias diferentes, sendo necessário meios de cultura específicos para a sua detecção em amostras de alimentos. A composição e as características específicas dos meios podem ser consultadas no Anexo B.

A primeira fase, pré-enriquecimento em meio líquido não seletivo, consiste numa fase em que todos os microrganismos presentes naquele alimento cru e/ou cozinhado possam proliferar num meio rico em nutrientes e em condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

Neste caso, para a pesquisa de *Salmonella spp.*, utiliza-se o meio água tamponada peptonada (BPW). Trata-se de um meio líquido, com a funcionalidade de pré-enriquecimento para o isolamento de *Salmonella spp.* em alimentos crus e/ou cozinhados. Assim, utiliza-se um saco estéril com alimento triturado, misturado e diluído (1:10) com o meio BPW (suspensão-mãe) à temperatura ambiente, posteriormente, é colocado na estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ (tempo onde o pico de crescimento exponencial dos microrganismos é atingido).

Após a primeira fase, é necessário que haja uma fase de enriquecimento, desta vez em meio seletivo que permita um crescimento contínuo da bactéria alvo e inibição das restantes.

Para tal, são utilizados o caldo nutritivo de soja Rappaport-Vassiliadis (RVS) e o caldo Nutritivo de Tetrinato de Novobiocinona de Muller-Kauffmann (MKTTn).

Transfere-se 0,1 ml da suspensão-mãe para 10 ml de meio seletivo de caldo RVS que incuba a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura do intestino humano, favorável ao desenvolvimento de *Salmonella spp.*) durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$ e 1 ml da suspensão-mãe para 10 ml de meio seletivo de caldo de MKTTn que incuba entre 34°C a 38°C por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Finalizada a segunda fase, procede-se à passagem de ambos os meios líquidos para meios sólidos seletivos, diferenciais e cromogéneos com o objetivo de obter colónias suspeitas isoladas. Assim, a partir de cada um dos meios anteriores (caldo RVS e caldo MKTTn) e utilizando uma ansa de 10 µl, semeia-se em três quadrantes para duas placas de meio Ágar de desoxicolato-lisina-xilose (XLD) e duas placas que contém um segundo meio isolante, neste caso, uma placa de meio CHROMO *salmonella* (CHROMO Salm.). De seguida, as 8 placas são incubadas entre 34°C a 38°C por $24\text{h} \pm 3\text{h}$ (Figura 1).



Figura 1: Colónias características para a pesquisa de *Salmonella* spp. por método cultural nos meios XLD e CHROMO Salm, respetivamente.

Por fim, é necessário confirmar as colónias suspeitas obtidas e selecionadas nos meios XLD e CHROMO Salm. através de provas bioquímicas e serológicas. Durante a fase de confirmação utiliza-se um controlo positivo e um controlo negativo para cada um dos meios de cultura que acompanham toda a fase – Tabela 1.

Para a confirmação de pesquisa de *Salmonella* spp. os testes bioquímicos utilizados, segundo a norma (1), são: Ágar Triplo Ferro Açucarado (TSI agar), Ureia agar (Ágar de Ureia) e Caldo Lisina Descarboxilase (LDC); e opcionalmente, podemos recorrer à deteção da β -Galactosidase e à reação do Indol. Já os testes serológicos utilizados são: a eliminação da auto aglutinação, deteção de antígenos O e de antígenos H; e opcionalmente, a deteção de antígenos VI.

Contudo, caso não seja possível obter colónias suspeitas isoladas nos meios anteriores, procede-se à repicagem de quatro colónias suspeitas para um meio sólido não seletivo, que incuba entre 34°C a 38°C por 24h $\pm$ 3h.

Tabela 1: Controlo de qualidade interno dos ensaios para a pesquisa de *Salmonella* spp.

Meio de cultura		Controlo qualitativo	
		Positivo	Negativo
TSI		<i>Salmonella</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Lisina		<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
Ureia		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Nutriente Agar		-----	-----
Soro	O	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i>
	H		

Provas bioquímicas de identificação de *Salmonella spp.*

a) TSI agar

Utilizando uma ansa de 1 µl, repica-se uma colónia suspeita isolada e inocula-se no meio inclinado sólido TSI, utilizando a técnica picada profunda (perfura-se o meio com a ansa até ao fundo do tubo) e espalhamento à superfície, que incuba a 37°C por 24h ± 3h.

Após a incubação, para a deteção de pesquisa de *Salmonella spp.*, é necessário que haja alterações quer no fundo do tubo como na superfície inclinada:

- No fundo do tubo, se o meio ficar amarelo é sinal que ocorreu fermentação da glucose (glucose positivo), manter a cor (vermelho-alaranjado) ou vermelho é sinal que não ocorreu fermentação da glucose (glucose negativo), preto houve formação de sulfureto hidrogénio e com presença de bolhas ou rachaduras significa que houve formação de gás através da fermentação da glucose;
- Na superfície inclinada, se o meio ficar amarelo é sinal que ocorreu fermentação da lactose e/ou sacarose (lactose e/ou sacarose positivo), se mantiver a cor (vermelho-alaranjado) ou vermelho é sinal que não ocorreu fermentação da lactose e/ou sacarose (lactose e/ou sacarose negativo).

Para as colónias típicas de *Salmonella spp.* o meio TSI alcalino apresenta cor vermelha na superfície inclinada, e cor amarela no fundo do tubo quando o meio está ácido com formação de gás (bolhas) e em 90% dos casos formação de sulfureto hidrogénio, dependendo do serotipo. (1)

b) Ureia agar

À semelhança do meio anterior, repica-se a colónia suspeita isolada e inocula-se no meio sólido inclinado ureia agar, com uma ansa de 1 µl utilizando a técnica da picada profunda, que incuba a 37°C por 24 ± 3h.

Finalizada a incubação para a deteção de pesquisa de *Salmonella spp.*, é necessário verificar se há alteração de cor do meio passando de bege para rosa-claro pois, a ureia é hidrolisada e vai haver libertação de amónia. Esta reação ocorre passado 2- 4h.

c) Caldo LDC

Utilizando novamente uma ansa de 1 µl e a colónia suspeita isolada, inocula-se no meio líquido LDC introduzindo a ansa no meio e agitando-a para que a colónia se funda com o meio envolvente. Incuba-se o tubo a 37°C por 24h ± 3h.

Este meio ao ser colocado na estufa altera a cor, passando de roxo para amarelo, devido à descarboxilação da lisina. Após a incubação, para a deteção de pesquisa de *Salmonella spp.*, a cor do meio tem de voltar à cor inicial ou roxa turva – reação positiva. Se mantiver o amarelo, é sinal de que não ocorreu reação.

d) Nutriente agar

Para este meio não seletivo, repica-se a colônia suspeita isolada e inocula-se no meio sólido inclinado, com uma ansa de 1 µl utilizando a técnica da picada profunda, que incuba a 37°C por 24 ± 3h.

Neste meio não existe reação positiva ou negativa, o meio não muda a cor, apenas é necessário que haja crescimento de colônias ao longo da superfície inclinada. As colônias presentes neste meio servem para, posteriormente, serem utilizadas nos testes serológicos.

Para se proceder à continuação dos testes e realizar as provas serológicas, é necessário que todos os meios das provas bioquímicas, descritos anteriormente, tenham reações positivas para a pesquisa de *Salmonella* spp. Na figura 2, está exposto um exemplo das provas bioquímicas para a pesquisa de *Salmonella* spp. antes e depois da inoculação de uma colônia suspeita isolada.



Figura 2: Confirmação dos resultados positivos através de testes bioquímicos antes da inoculação (A) e depois da inoculação (B). 1 – Meio líquido Lisina. 2 – Meio sólido inclinado TSI. 3 – Meio sólido inclinado Ureia. 4 – Nutriente agar.

Provas serológicas de identificação de *Salmonella* spp..

As provas serológicas, à semelhança das provas bioquímicas, são realizadas na mesma colônia suspeita para *Salmonella* spp. Essa colônia suspeita é testada em três momentos, através da técnica de aglutinação. Inicialmente a colônia é testada para ver se ocorre a auto aglutinação, em seguida para a detecção de antígenos O e por fim para a detecção de antígenos H. A interpretação dos resultados obtidos é realizada com o auxílio da Tabela 2.

a) Eliminação da auto aglutinação

Para saber se é possível testar aquela estirpe selecionada – colónia suspeita para *Salmonella spp.*, para a presença de antígenos O e antígenos H através da técnica de aglutinação, adiciona-se numa lâmina de vidro limpa uma gota de soro fisiológico utilizando uma ansa de 1µl. Após se homogeneizar bem com a ansa, realizam-se movimentos circulares com a lâmina suavemente durante 5 a 60 segundos.

Se a gota permanecer sem grânulos na suspensão, significa que podemos prosseguir e testar essa colónia suspeita para a presença de ambos os antígenos. Se a gota apresentar auto aglutinação – formação visíveis de grânulos, descarta-se essa colónia suspeita. É necessário repicar-se outra para recomençar a testagem.

b) Detecção de antígenos O

Para a detecção de antígenos O em *Salmonella spp.* utiliza-se a colónia suspeita selecionada anteriormente. Para isso, coloca-se uma gota da solução polivalente do soro anti-O numa lâmina de vidro limpa e, utilizando uma ansa de 1 µl, mistura-se a gota com a colónia selecionada até se obter uma suspensão homogénea e turva. Em seguida, pega-se na lâmina e, em movimentos circulares, balança-se suavemente durante 5 a 60 segundos.

Se verificar-se a formação de grânulos na suspensão, pode-se concluir que ocorreu aglutinação e é considerado uma reacção positiva.

c) Detecção de antígenos H

Para a detecção de antígenos H utiliza-se o mesmo método descrito na alínea anterior na mesma colónia suspeita. Contudo, utiliza-se uma gota da solução polivalente do soro anti-H. Se ocorrer aglutinação, a reacção é considerada positiva.

Tabela 2: Interpretação dos testes bioquímicos – tabela adaptada da ISO 6579-1:2017.

Testes bioquímicos	Auto aglutinação	Testes antigénicos	Interpretação
Típicos ¹	Não	Antigénios – O e H positivos (e antigénio – Vi positivo se testado)	Confirmado como <i>Salmonella spp.</i>
Típicos	Não	Antigénios – O e/ou H negativos	Pode ser <i>Salmonella spp.</i>
Típicos	Sim	Não se aplica devido à autoaglutinação.	
Atípico	-	-	Não confirmado como <i>Salmonella spp.</i>

Legenda: Resultados Típicos¹: TSI com bisel alcalino, acidez profunda, H₂S; lisina descarboxilase positiva; urease e β-galactosidade negativos.

Na Figura 3, podemos observar três gotas dispostas numa lâmina, a primeira gota referente ao soro fisiológico, a segunda referente à solução polivalente do soro antigénio O e a terceira, referente à solução polivalente do soro antigénio H. Todas as gotas foram homogeneizadas, individualmente, com a mesma colónia suspeita para a *Salmonella spp.* repicada do meio nutriente.

A solução polivalente do soro antigénio O e do soro antigénio H apresentam aglutinação, sendo mais visível na solução polivalente do soro antigénio H devido à alta concentração de grânulos na superfície. Assim, a colónia suspeita selecionada foi positiva para ambas as reações, trata-se de uma colónia de *Salmonella spp.*

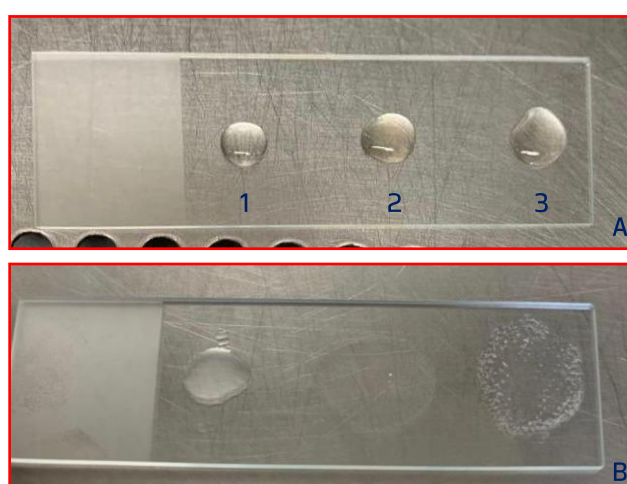


Figura 3: Confirmação dos resultados positivos através de testes Serológicos antes da inoculação (A) e depois da inoculação (B). 1 – Soro fisiológico. 2 – Solução polivalente do soro antigénio O. 3 – Solução polivalente do soro antigénio H.

3.1.2.2 Extração de ADN de *Salmonella* spp. e detecção por PCR em tempo real

Na Biogerm para o processo de extração de ADN de *Salmonella* spp. e detecção por PCR em tempo real utiliza-se o kit iQ-Check *Salmonella* II, 3578123 da marca Bio-Rad Laboratories, Inc. Este kit permite a realização da extração de ADN de *Salmonella* spp. e é constituído por:

- Reagente A: *Lysis reagent* (reagente lise) 1 x 20 ml;
- Reagente B: *Fluorescent probes* (sondas fluorescentes) 1 x 0,55 ml;
- Reagente C: *Amplification mix* (amplificador da mix) 1 x 4,4 ml;
- Reagente D: *Negative PCR control* (controlo de PCR negativo) 1 x 0,5 ml;
- Reagente E: *Positive PCR control* (controlo de PCR positivo) 1 x 0,25 ml.

Para iniciar o processo de extração de ADN de *Salmonella* spp., e com base no protocolo iQ-Check *Salmonella* II, 3578123, é necessário retirar 100 µl de cada saco de enriquecimento, 100 µl de um branco – BPW e 100 µl de um controlo positivo – contaminado com cultura, para cada um dos poços correspondentes numa placa deep well de 96 poços (Figura 4). O branco e o controlo positivo acompanham todo o processo de extração. O branco tem como função perceber se houve ou não contaminação durante este processo. O controlo positivo serve para provar que o kit deteta amostras positivas mesmo quando se obtém todas as amostras com resultados negativos.

Em seguida, adiciona-se mais 100 µl de reagente Lise (reagente A) em cada um desses poços e coloca-se a placa deep well de 96 poços num bloco termostatzado com agitação, a 95–100°C durante 15–20 minutos com uma agitação de 1,300 rpm. Durante esse período prepara-se uma mix para o PCR, descrito na tabela fornecida pelo próprio kit no Anexo C.

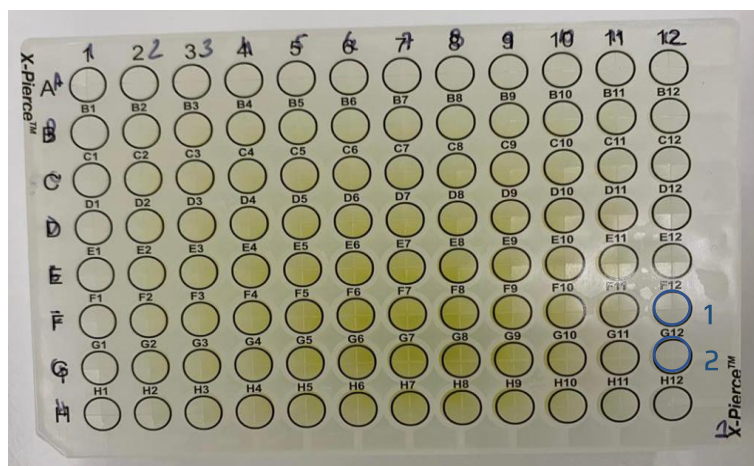


Figura 4: Placa deep well de 96 poços no processo de extração de ADN de *Salmonella* spp.. 1 – Branco. 2 – Controlo positivo.

Em algumas aplicações, incluindo na microbiologia, o PCR em tempo real é uma ferramenta valiosa para investigar surtos de origem alimentar e identificar as bactérias responsáveis. Tem alta sensibilidade e especificidade, menos tempo de processamento e maior probabilidade de detetar os patogénicos bacterianos. É capaz de detetar uma única bactéria ou uma única cópia de sequência alvo de ADN. (4, 5) Porém, são propensos a resultados falso-positivos se as bactérias presentes já estiverem mortas. (6) Este método molecular foi descrito em 1985, por Kary Mullis na Califórnia (USA). (7) Representou um dos avanços a nível de diagnóstico alimentar mais significativo, porque agiliza a obtenção de resultados e diminui o risco de contaminação da amostra num curto espaço de tempo e em tempo real. Assim, em 1993, proporcionou-lhe receber um prémio nobel. Consiste na combinação entre a metodologia de PCR convencional e um mecanismo que deteta sinais de fluorescência. As sondas mais utilizadas no PCR em tempo real são as sondas TaqMan (5'exonuclease). Quando é detetada a fluorescência de uma amostra acima do *background* (ruído de fundo) é denominado de *cycle threshold* (CT). (8, 9) Neste caso, para a pesquisa de *Salmonella spp.* o PCR em tempo real demora cerca de 2h, o que permite ao laboratório dar um resultado fidedigno até ao dia a seguir após a recolha e análise do alimento.

Para o PCR em tempo real, é necessário acrescentar um controlo negativo – do kit o reagente D, para garantir que não haja contaminação nesta fase. Todos os controlos situam-se sempre no final da placa *deep well* de forma, a minimizar o risco de contaminação (Figura 5). O PCR é altamente suscetível a contaminações, sendo fundamental ter cuidados como: criar salas com um ambiente adequado para cada etapa de reação do PCR, estabelecer um fluxo de trabalho, desinfetar a zona de trabalho constantemente e usar materiais específicos apropriados (como pontas com filtro). (10)

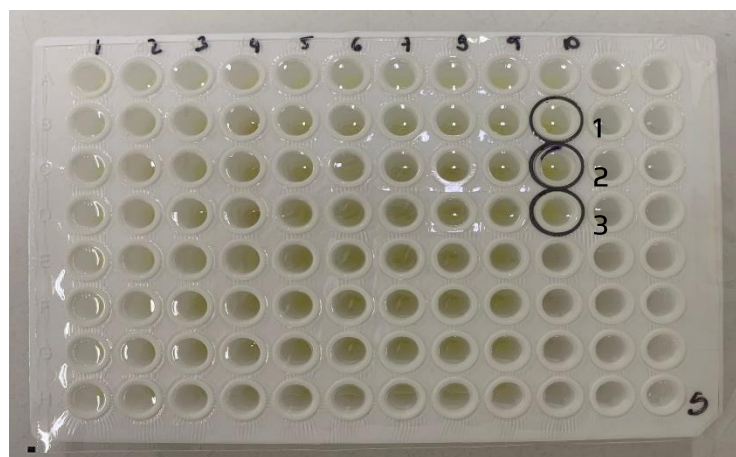


Figura 5: Microplaca de PCR em tempo real com película. 1 – Branco. 2 – Controlo negativo. 3 – Controlo positivo.

Após preparar a *mix* para o PCR, transfere-se 45 µl de *mix* para cada poço de uma microplaca de PCR com 96 poços, adiciona-se 5 µl de cada amostra com a ajuda de uma pipeta multicanal 1-10 µl e 5 µl do controlo negativo. Em seguida, a placa de PCR é tapada com uma película adaptada para o PCR em tempo real e centrifuga 10 segundos para se obter uma homogeneização mais eficaz de todos os componentes – *mix* e amostra, garantindo que nenhum componente fica retido nas paredes, por forma a que ocorra incorporação total na preparação final o que ajuda na eliminação de partículas de ar que se formam durante a pipetagem e que dificultam a leitura. Posteriormente, a placa é introduzida no termociclador.

Finalizada a corrida do PCR em tempo real, é possível visualizar se todas as amostras amplificaram, em específico os controlos positivo e negativo; a disposição das amostras na placa de *deep well* de 96 poços; o número da amostra correspondente ao poço selecionado e por fim o resultado obtido – positivo ou negativo (Figura 6).

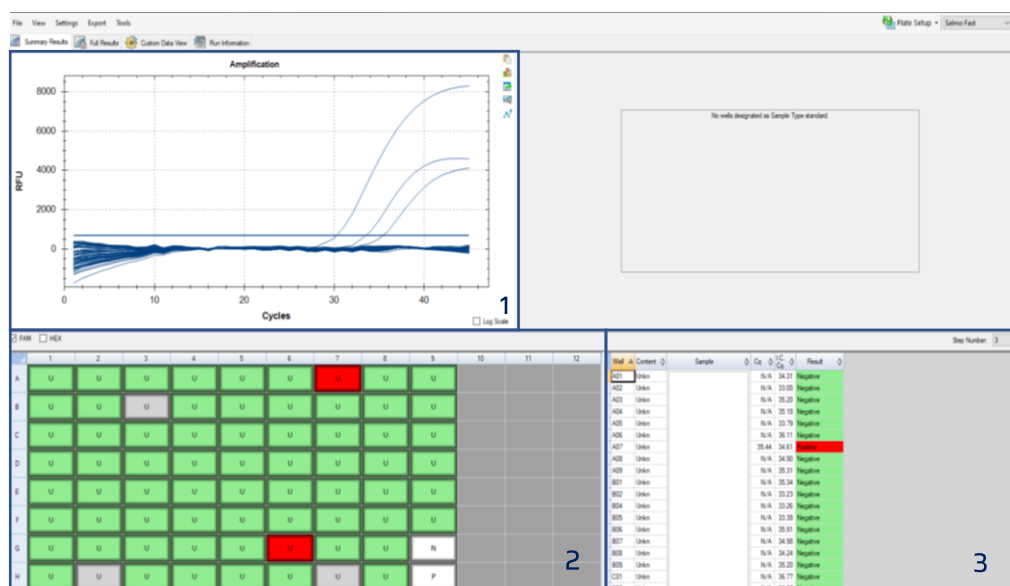


Figura 6: Vista geral do programa de PCR em tempo real. 6.1 – Gráfico da amplificação dos ciclos. 6.2 – Esquema da placa *deep well* de 96 poços. 6.3 – Resultados para a pesquisa de *Salmonella spp.*

Na Figura 7, está representado um gráfico de amplificação do controlo positivo. É possível observar a curva de amplificação do controlo positivo interno (IPC) – linha verde, este controlo serve para perceber se a corrida de PCR correu de forma adequada. Se a curva verde não estiver amplificada ocorreu inibição durante o processo. A linha azul corresponde à curva de amplificação do controlo positivo. Os eixos X e Y refere-se aos ciclos e a fluorescência, respetivamente.

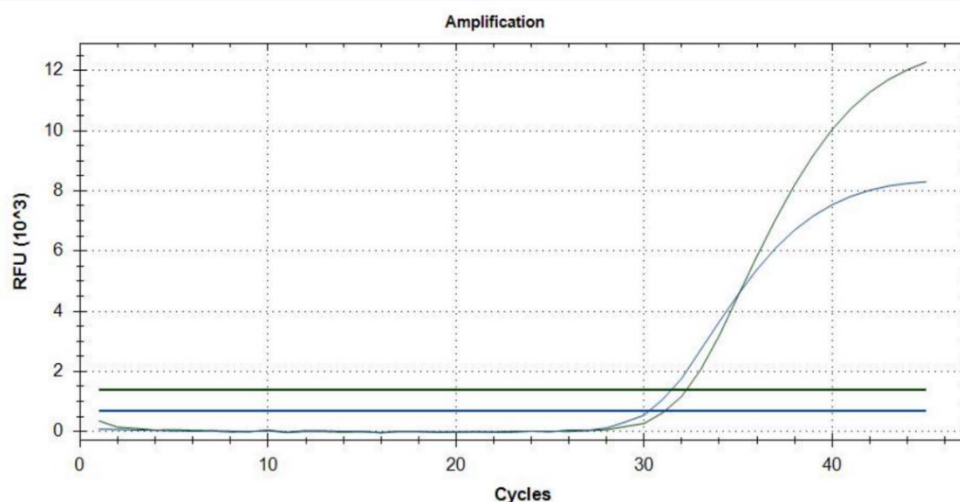


Figura 7: Amplificação do controlo positivo para a pesquisa de *Salmonella* spp. no PCR em tempo real.

À semelhança do gráfico anterior, na Figura 8, está representado um gráfico de amplificação, porém do controlo negativo. Neste gráfico é possível observar que não ocorreu amplificação do controlo negativo – linha azul.

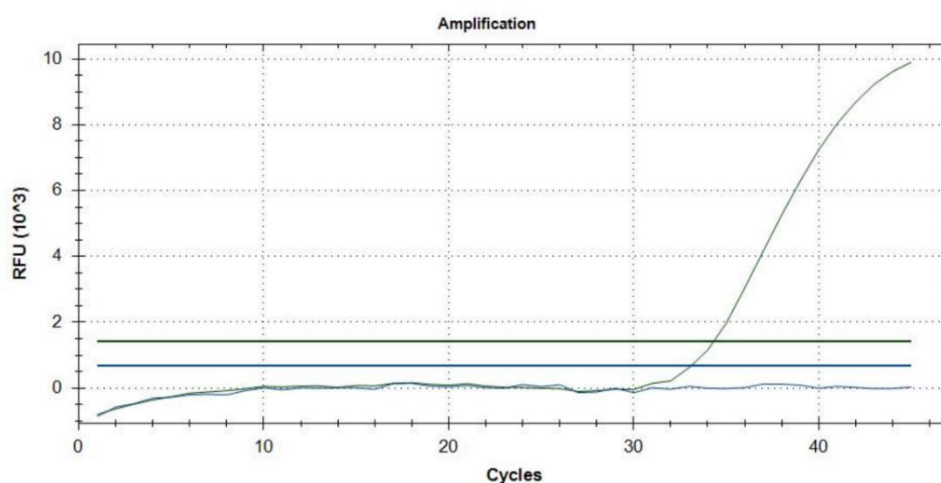


Figura 8: Amplificação do controlo negativo para a pesquisa de *Salmonella* spp. no PCR em tempo real.

3.1.2.3 Validação dos resultados

Para a validação de resultados são utilizados métodos diferentes na Biogerm de Portugal Continental e na Biogerm da Região Autónoma da Madeira para a pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos.

Na Biogerm de Portugal Continental, utilizam-se dois métodos distintos e complementares: método molecular – AFNOR-BRD 07/06-07/04 e método cultural – confirmação dos resultados positivos ISO

6579-1:2017/Amd1:2020. O método molecular serve para detetar a presença ou ausência da bactéria nas amostras analisadas por PCR em tempo real utilizando o Kit iQ-Check *Salmonella* II, 3578123 da marca *Bio-Rad Laboratories, Inc.* Este método está descrito no ponto 3.1.3. Já o método cultural, segundo a ISO 6579-1:2017 /Amd1:2020, serve para detetar a presença da *Salmonella spp.* em amostras de alimentos analisadas pelo método anterior – confirmação desses resultados positivos. Este método está descrito no ponto 3.1.2.1.

Na Biogerm da Região Autónoma da Madeira, utiliza-se o método cultural – AFNOR – BRD 07/11-12/05, do kit RAPID'*Salmonella* da marca *Bio-Rad Laboratories, Inc.* Utiliza-se outro método devido ao número de amostras ser consideravelmente inferior ao número de amostras analisadas em Portugal Continental. Este kit é fácil, económico e rápido de utilizar pois, consiste apenas num meio líquido seletivo para o enriquecimento, num meio sólido seletivo para o isolamento das colónias suspeitas, uma cápsula – RAPID'*Salmonella* e a fase de confirmação para a pesquisa de *Salmonella spp.* é realizada através de testes serológicos (Figura 9).

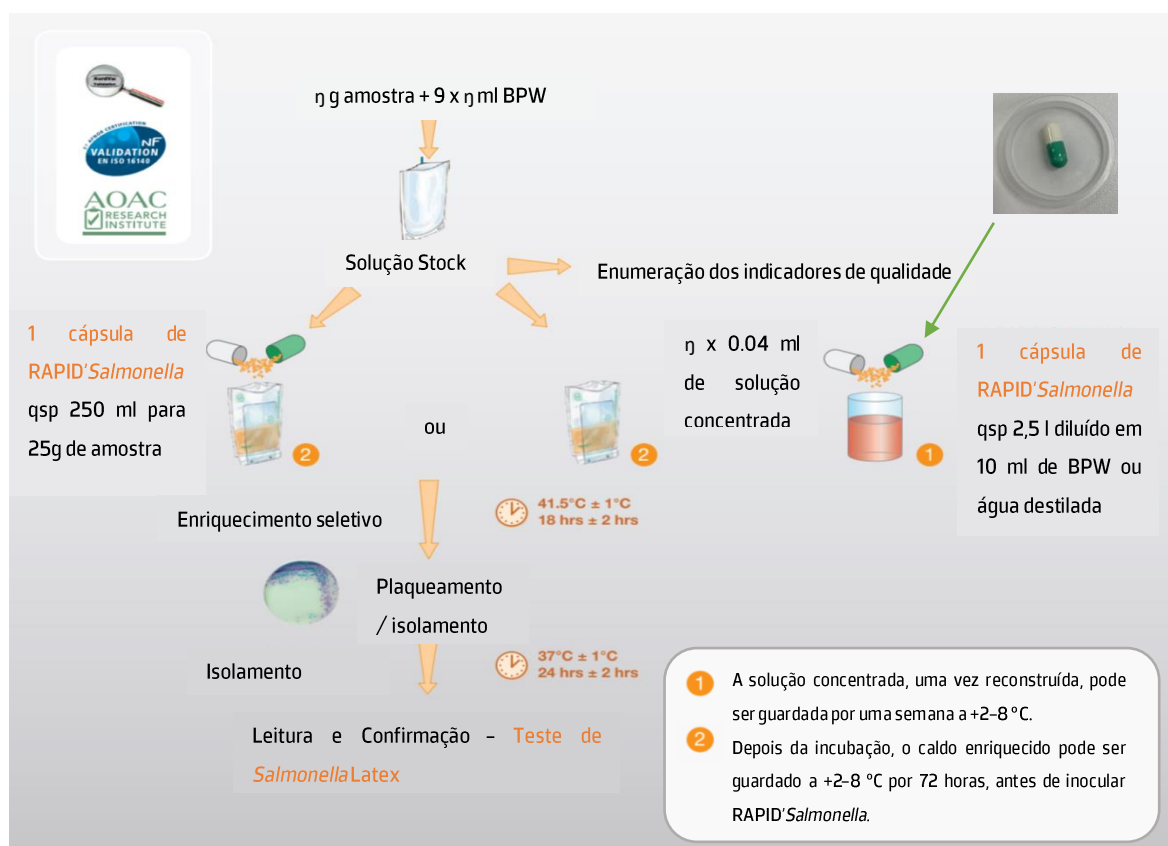


Figura 9: Fluxograma adaptado do protocolo da RAPID'*Salmonella*.

A cápsula – RAPID'*Salmonella*, contém um suplemento seletivo e dependendo da quantidade de amostra de alimento analisada, utiliza-se a Tabela 3 para calcular as diluições necessárias. Se a quantidade de amostra analisada for de 25g $\pm$ 5%, utiliza-se a cápsula inteira.

Tabela 3: Diluições da cápsula RAPID'*Salmonella* – adaptado do protocolo da RAPID'*Salmonella*.

Amostra em g (=)	BPW em ml (=9 x n)	Solução da cápsula RAPID' <i>Salmonella</i> em ml (=n x 0,04)
1	9	0,04
2	18	0,08
3	27	0,12
4	36	0,16
10	90	0,4
25	225	1
50	450	2
100	900	4

Na Figura 10, está exemplificado a distinção entre colônias características de *Salmonella* spp. e colônias de outras bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* no meio CHROMO Salm. As colônias características de *Salmonella* spp. apresentam cor púrpura, enquanto as colônias de outras bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* apresentam cor azulada.

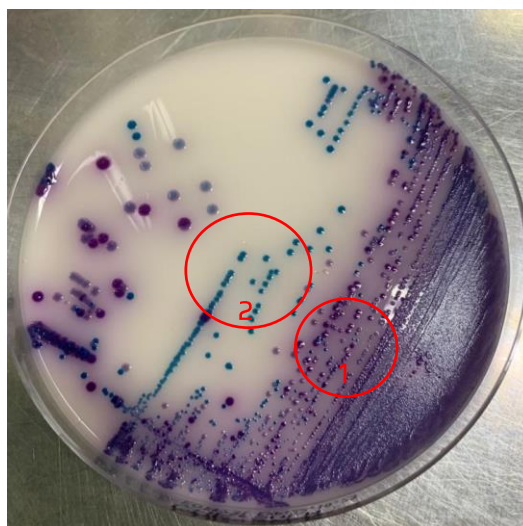


Figura 10 – Meio seletivo CHROMO Salm, para *Salmonella* spp.. 10.1 – Colônias características de *Salmonella* spp.. 10.2 – Colônias de outras bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Por fim, na fase de confirmação, seleciona-se uma colónia característica e suspeita para *Salmonella spp.* e através da técnica de aglutinação realiza-se o teste de *Salmonella* Latex. Se ocorrer aglutinação a reação é positiva e se não ocorrer aglutinação a reação é negativa.

Assim, o resultado para a deteção da *Salmonella spp.* em amostras de alimentos é emitido em menos de 42h e o método é validado pela AFNOR de acordo com a norma ISO 16140, e pelo Instituto de Pesquisa AOAC. (11, 12)

Capítulo II – Estudo de caso: pesquisa de *Salmonella spp.* em matrizes alimentares

1. Enquadramento teórico

Nas últimas décadas, tem existido uma expansão a nível tecnológico e científico, promovendo alternativas no processamento alimentar que podem ser uma oportunidade para as bactérias patogénicas e contaminantes de origem alimentar se disseminarem e se tornarem ameaças à saúde pública. (13–15)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogénicos é responsável por 94 milhões de casos de gastroenterite e pela morte de 1,8 milhões de pessoas por ano em todo o mundo. (14–16)

Desde 1980 tem-se vindo a observar um aumento de doenças transmitidas por alimentos. (15, 17) O consumo de alimentos contaminados é, atualmente, um grave problema económico e de saúde pública em todo o mundo, com maior frequência em países emergentes. (18, 19)

Os alimentos podem ser contaminados por substâncias prejudiciais à saúde humana. (20) Quando estas contaminações são detetadas, obrigam à eliminação do(s) alimento(s), com consequentes perdas financeiras e socioeconómicas. (13)

Neste âmbito a principal fonte de contaminação dos alimentos é a contaminação cruzada “termo geral que se refere à transferência, direta ou indireta, de bactérias ou vírus de um produto contaminado para um produto não contaminado”, e ocorre durante as etapas de processamento. (18, 21) Esta contaminação decorre de inúmeros fatores como: mãos não lavadas corretamente, contaminação de tábuas de corte, facas, aventais e bancadas. (21)

Atualmente, a *Salmonella spp.* é uma das bactérias patogénicas mais comumente encontrada nas amostras de alimentos (14, 22, 23), sendo por isso considerada um grave problema de saúde pública devido ao elevado risco de morbilidade, mortalidade e impacto económico significativo. (13, 24, 25)

Sendo a presença de *Salmonella spp.* de tolerância zero em alimentos, implica a necessidade de realizar testes microbiológicos obrigatórios nas amostras de alimentos para se detetar a sua presença. (26) A

metodologia de referência para a sua deteção, em amostras de alimentos, é o método cultural certificado pela ISO 6579-1:2017. (1, 3, 14, 27)

No entanto, este método envolve um laborioso processo de cultura e enriquecimento em meios seletivos requerendo mais de 4 dias para obter os resultados. Nos últimos anos, a técnica de PCR em tempo real evoluiu como uma ferramenta de última geração para a deteção de *Salmonella spp.*, pois apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, permitindo assim obter resultados mais rapidamente. (4, 5, 14, 27)

1.1. Segurança alimentar

A segurança alimentar e a qualidade dos alimentos são uma preocupação da OMS. (13, 20, 28) Atualmente existem guidelines para controlar os riscos biológicos, tais como, Boas Práticas de Higiene e de Fabrico (BPHF), *Hazard Analysis and Critical Control* (HACCP), Controlos de Processo, Controlos Aplicados à Cadeia de Distribuição e Controlos Sanitários. (29)

Para evitar a disseminação de bactérias patogénicas é igualmente importante a consciencialização do consumidor, que poderá contribuir para a redução da carga microbiológica inicial e/ou impedir o crescimento de microrganismos presentes nos produtos alimentares. (21, 30)

1.2. Características da *Salmonella spp.*

A *Salmonella spp.* pertence à família *Enterobacteriaceae*. (13, 15) Foi identificada pela primeira vez em 1900 por Lignières, em homenagem ao Veterinário Patologista Daniel Elmer Salmon que, em 1885, isolou bactérias designadas de *Salmonella cholerae-suis* em suínos e, posteriormente, associou a bactéria à doença *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Cholerae-suis*. (31)

A classificação e a nomenclatura do género *Salmonella* sofreram várias modificações ao longo dos anos e ainda não estão totalmente definidas. Engloba um grande grupo taxonómico com mais de 2 500 serotipos diferentes e é composto por três espécies: *Salmonella bongori*, *Salmonella subterranea* e *Salmonella enterica*. (15, 32-34)

Atualmente, utiliza-se o esquema Kauffmann-White, que classifica e divide o género em serotipos com base na composição dos antígenos O (somáticos), H (flagelar) e Vi (capsulares de virulência). Dos três antígenos, o antígeno O é altamente polimórfico, classificando a *Salmonella spp.* em sorogrupos A, B, C1, C2, D e E. O antígeno Vi trata-se de um polissacarídeo capsular e está presente em alguns serotipos de *Salmonella spp.* como, por exemplo, na *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Typhi*. (15, 34-36)

A *Salmonella spp.* tem forma de bacilo pequeno (0,7 – 1,5 x 2,5 µm), Gram negativo, não formadoras de esporos, com flagelos e fímbrias. É anaeróbia facultativa, oxidase negativa e catalase positiva. (13, 15, 16, 32)

Apesar de ser encontrada ubiquamente na natureza, o seu habitat nativo é o trato intestinal dos humanos e dos animais. É o caso da *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Typhi* e *Paratyphi* altamente adaptadas ao homem e a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Cholerae-suis* e *Gallinarum* altamente adaptadas para os suínos e as galinhas, respetivamente. (16, 37)

Tem grande capacidade de adaptação e resistência e por isso consegue sobreviver em ambientes extremos. (13) É capaz de crescer numa ampla faixa de temperatura, entre 2 e 54 °C, com temperatura ótima de crescimentos situada nos 37 °C. Embora, seja possível observar um crescimento abaixo de 7 °C, o mesmo apenas acontece em meios bacteriológicos e não em alimentos. Acima de 48 °C, está mais suscetível a mutações. É suscetível a técnicas de esterilização com altas temperaturas, como a pasteurização. Cresce em pH entre 4 e 9,5, sendo o pH ideal entre 6,5 e 7,5. Relativamente à atividade da água (a_w), os valores ideais para o desenvolvimento são valores inferiores a 0,93 no caso dos alimentos e entre 0,945 e 0,999 em meios de laboratório, sendo o valor ótimo de 0,995. Porém, embora não haja crescimento abaixo de $a_w = 0,93$, a *Salmonella spp.* sobrevive, e o tempo de sobrevivência aumenta à medida que a atividade da água diminui. Ou seja, em alimentos com baixa humidade, como por exemplo, em massas, manteiga de amendoim e chocolate, a sobrevivência é medida em meses. (31) O NaCl é utilizado como um soluto para diminuir a atividade da água e como conservante em alimentos, verificando-se que a partir de 3–4% de NaCl o crescimento de *Salmonella spp.* é inibido. (31, 38)

1.2.1. Epidemiologia

A Salmonelose é uma doença que está associada à infeção por *Salmonella spp.* em humanos, causando surtos em todo o mundo, principalmente em países emergentes, incluindo África, Ásia e América Latina. Está diretamente relacionada com o consumo de produtos alimentares e água contaminados, contacto com fezes ou contaminação cruzada por outros produtos alimentares. (13, 15, 39–41) As contaminações podem ocorrer em vários pontos, desde a produção, processamento, distribuição, comercialização, manuseamento e preparação das refeições. (24)

Pode ser isolada a partir de produtos alimentares crus e cozinhados ou junção de ambos, são exemplos: carnes de novilho/bovino, suíno e de aves, peixes, mariscos, ovos, laticínios, legumes, café, arroz, massas e refeições confeccionadas ou pré-confeccionadas. (14, 22, 32, 37, 42–45) Ainda assim, é menos provável que seja isolada em vegetais ou produtos não derivados de carne, em comparação com alimentos de origem animal. (16)

É a segunda zoonose (doença ou infecção transmitida naturalmente entre animais vetembrados e humanos) de origem alimentar mais comumente relatada na União Europeia (EU). A intoxicação alimentar pode afetar qualquer pessoa, especialmente recém-nascidos, grávidas, idosos e doentes imunodeprimidos, causando sintomas ligeiros a graves como gastroenterite, diarreia, vômitos e desidratação; e em casos extremos provocar a morte do indivíduo. (13, 15, 40, 43, 46, 47)

A infecção é classificada como febre tifoide ou febre entérica – não tifoide, dependendo da intensificação e proliferação da infecção no corpo humano. A febre tifoide é causada pela *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Typhi* e está tradicionalmente associada à *Salmonella spp.*. É uma infecção sistêmica febril não zoonótica e manifesta-se quatro vezes mais que a febre não tifoide, que se trata de uma infecção localizada causada pela *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Paratyphi*, tradicionalmente associada à *Salmonella não tifoide spp.* (NTS). (48, 49)

1.2.2. Patogénese e Transmissão

A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *Typhi* causa salmonelose tifoide que, de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), se não for tratada, pode resultar em uma taxa de mortalidade de 10%. Neste caso, a dose de infecção é de 1000 UFC, que é muito maior do que a dose de infecção necessária para ocorrer os sintomas associados a uma salmonelose não tifoide (tão baixa quanto 1 UFC/mL), embora a perigosidade dos efeitos colaterais seja maior para a salmonelose tifoide. (15)

A *Salmonella spp.* pode transmitir-se de várias formas distintas, sendo que duas das principais vias de transmissão são a vertical e horizontal. Na transmissão vertical a bactéria é transmitida de pais para filhos, tendo um impacto significativo na infecção por *Salmonella enterica* em aves. Pois, a bactéria tem a capacidade de colonizar o sistema reprodutivo das galinhas, o que origina uma infecção transovariana, infectando os ovos em desenvolvimento, ovidutos e ovário. Já a transmissão horizontal ocorre pelas vias aérea ou fecal-oral, como por exemplo, em ração ou alimentos e água contaminada. (13)

Porém, também é necessário ter atenção à contaminação cruzada (transferência direta ou indireta de bactérias ou vírus de um produto contaminado para um produto não contaminado), que é uma das principais vias de transmissão de *Salmonella spp.* aos humanos por meio de alimentos contaminados. (16, 18, 21, 22)

1.2.3. Diagnóstico

Para garantir a segurança alimentar e reduzir surtos de doenças, é crucial existir métodos rápidos e sensíveis para detetar a contaminação por *Salmonella spp.* nos alimentos. (22)

No regulamento da Comissão Europeia (CE) nº 2073/2005 sobre critérios microbiológicos para alimentos, a *Salmonella spp.* é considerada uma bactéria patogénica cuja presença, por si só, em alimentos prontos a consumo – porção de 25g $\pm$ 5%, é suficiente para ser considerada um fator de risco para a saúde pública. Para tal, analisa-se os alimentos com base em métodos convencionais de cultura recomendados pela ISO 6579-1: 2017 devido à sua sensibilidade excecional pois, são capazes de detetar 1 UFC/25g de alimentos. Estes regulamentos são compatíveis com a abordagem de HACCP, que são usados na maioria dos países, incluindo os países da União Europeia, para estabelecer controlos adequados para a identificação de *Salmonella spp.* em alimentos prontos para consumo, de modo a garantir que esta esteja ausente quando forem ingeridos pelos consumidores. (15)

1.2.4. Prevenção, tratamento e controlo

Com a globalização, o consumo de alimentos originários de diferentes países do mundo é mais acessível e, conseqüentemente, existe uma necessidade crescente de determinar um sistema de vigilância e monitorização da segurança alimentar. (5, 13)

A *Salmonella spp.* não é apenas responsável por infeções ligeiras a graves, mas também por infeções potencialmente fatais em grávidas, recém-nascidos, idosos e doentes imunodeprimidos. (13) Nestes casos será necessário o recurso à antibioterapia. (50) Contudo, com o uso abusivo de antibióticos, a *Salmonella spp.* tem aumentado a sua resistência aos antibióticos. (39, 51) Atualmente, a bactéria é resistente a antibióticos comuns, como ceftriaxona e ciprofloxacina. (48, 52, 53)

De acordo com a OMS, a *Salmonella spp.* está listada como um dos patógenos mais preocupantes do mundo ocupando o oitavo lugar na lista de prioridades globais de bactérias resistentes a antibióticos que exigem pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Deste modo, nos últimos tempos, investigadores tem prestado muita atenção aos bacteriófagos como tratamento médico alternativo, já que possuem elevada especificidade, segurança e bom efeito bacteriostático. (52)

Assim, por forma a controlar e prevenir o risco de infeção por *Salmonella spp.*, aumentar a consciencialização, garantir medidas higiénicas adequadas (saneamento), administrar vacinas em aves saudáveis (principal foco de contaminação a nível alimentar) e analisar alimentos para consumo são fatores essenciais de intervenção. (13, 48, 53)

2. Objetivos

Este estudo de caso tem como objetivos:

– Determinar a frequência no registo dos resultados de *Salmonella spp.* obtidos por métodos de PCR em tempo real e cultural em alimentos (crus e cozinhados), provenientes de Portugal Continental e Região

Autónoma da Madeira, durante o período de 1 de janeiro a 31 de dezembro de 2021, analisados no laboratório de Microbiologia da Biogerm;

- Verificar se existe maior frequência de amostras positivas em alimentos prontos e não prontos a consumo no grupo 25g $\pm$ 5%;
- Testar as hipóteses: H_0 : "A prevalência de *Salmonella spp.* não difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%" e H_1 : "A prevalência de *Salmonella spp.* difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%".

3. Métodos

3.1. Estudo e amostra

Realizou-se um estudo observacional descritivo transversal. A amostra foi constituída pelos registos de resultados da pesquisa de *Salmonella spp.* em amostras de alimentos com 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5% segundo a ISO 6579-1:2017 (1), provenientes de Portugal Continental e da Região Autónoma da Madeira, no período de 1 de janeiro a 31 de dezembro de 2021.

No grupo de 10g $\pm$ 5%, as amostras analisadas foram agrupadas em três grupos para facilitar a análise de resultados: 1) carne de suíno; 2) carne de novilho/ bovino; e 3) carne mista constituída por carne de suíno e novilho/bovino. Visto que, apenas a carne de suíno e novilho/ bovino podem ser analisadas por 10g $\pm$ 5%, todas as outras carnes são excluídas e foram analisadas por 25g $\pm$ 5%. No entanto, a carne de suíno pode ser analisada por 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5% a pedido do cliente.

Relativamente ao grupo de 25g $\pm$ 5%, as amostras analisadas foram agrupadas em carne de aves constituída por codornizes, frango, pato e peru; carne de suíno (a pedido dos clientes) e outros que se refere a todos os alimentos que não fazem parte do grupo das carnes (ostras frescas, peixe perca, porções de folhas de espinafres, queijo curado e sandes de pasta de atum).

3.2. Instrumentos e Procedimentos

Os dados para a amostragem foram recolhidos no programa fileMaker Pro Advanced, limitando a pesquisa de *Salmonella spp.* em amostra de alimentos com 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%, no período pré-definido. Os registos de resultados da pesquisa de *Salmonella spp.* tratados neste estudo foram obtidos segundo os procedimentos implementados pela Biogerm de Portugal Continental e da Região Autónoma da Madeira.

Foram analisados 7147 resultados de amostras de produtos alimentares, tendo sido divididos mediante o seu peso e consoante o conteúdo, formando dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5% (ISO 6579-1:2017). Posteriormente, na Biogerm de Portugal Continental, foram analisados por PCR em tempo real e, quando positivas para a *Salmonella spp.*, foram confirmados por método cultural. Na Biogerm da Região Autónoma da Madeira foram analisados apenas pelo método cultural.

As hipóteses para este estudo de caso foram:

- H₀: A prevalência de *Salmonella spp.* não difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%.
- H₁: A prevalência de *Salmonella spp.* difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%.

3.3. Tratamento e análise de dados

O tratamento de dados foi realizado pela análise de frequências absolutas e relativas. Para testar as hipóteses foi considerado $p < 0,05$. Todos os dados foram sistematizados no programa Microsoft Office Excel[®] 2019, e os resultados apresentados em tabelas e gráficos.

4. Resultados

Das 7147 amostras de alimentos, 577 (8,07%) são provenientes da Biogerm da Região Autónoma da Madeira e 6570 (91,93%) da Biogerm de Portugal Continental.

Da Biogerm da Região Autónoma da Madeira, 352 amostras pesavam 10g $\pm$ 5% e 225 amostras pesavam 25g $\pm$ 5%, o que representa 61,01% e 38,99%, respetivamente. Enquanto, da Biogerm de Portugal Continental, 2280 amostras pesavam 10g $\pm$ 5% (34,70%) e 4290 amostras pesavam 25g $\pm$ 5% (65,30%).

No total de amostras, 2632 amostras pesavam 10g $\pm$ 5% e 4515 amostras pesavam 25g $\pm$ 5%, o que representa 36,8% e 63,2%, respetivamente.

Posteriormente, todas as amostras foram analisadas por PCR em tempo real para obter um resultado rápido para a deteção de ADN de *Salmonella spp.*. Foi detetada, a presença de *Salmonella spp.*, em 112 (1,57%) amostras de ambos os grupos (Figura 11):

- 10g $\pm$ 5%: 8,93% (referente a 10 amostras provenientes da Biogerm da Região Autónoma da Madeira) e 51,79% (referente a 58 amostras provenientes da Biogerm de Portugal Continental), dando um total de 68 amostras positivas para a deteção de ADN de *Salmonella spp.*

– 25g $\pm$ 5%: 1,79% (referente a 2 amostras provenientes da Biogerm da Região Autónoma da Madeira) e 37,50% (referente a 42 amostras provenientes da Biogerm de Portugal Continental), o que representa 44 amostras positivas.

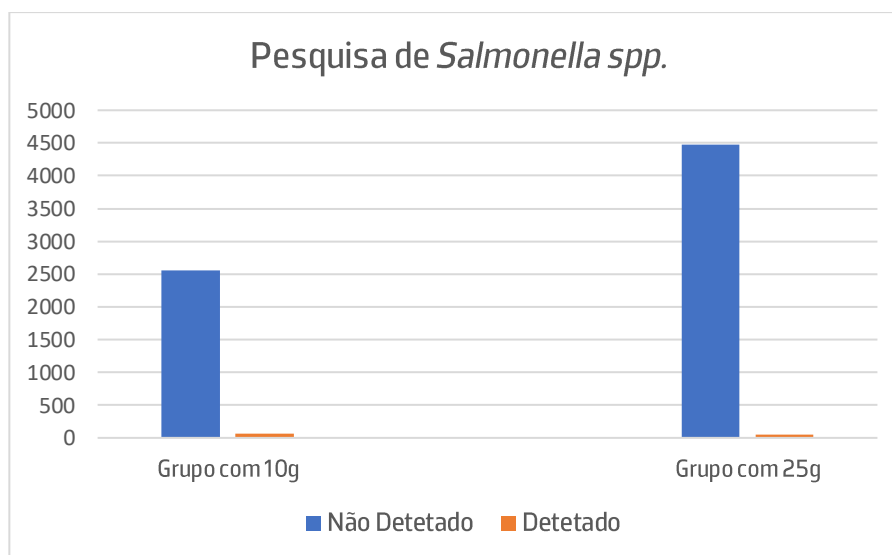


Figura 11: Detecção da pesquisa de *Salmonella* spp. em matrizes alimentares nos dois grupos em estudo.

As 112 amostras positivas de ambos os grupos estão descritas e agrupadas conforme o tipo de alimento:

- 10g $\pm$ 5%: carne de suíno, novilho/ bovino e mista (carne de suíno, novilho/ bovino) na Tabela 4;
- 25g $\pm$ 5%: carne de aves (codornizes, frango, pato, peru), carne de suíno e outros (ostras frescas, peixe perca, porções de folhas de espinafres, queijo curado e sandes de pasta de atum) na Tabela 5. E posteriormente, a divisão dessas amostras em alimentos crus e prontos a consumo, na Tabela 6.

Sendo que, todas as amostras, de ambos os grupos, estão descritas mais detalhadamente no Anexo D.

Tabela 4: *Salmonella* spp. detetada em amostras com 10g $\pm$ 5%.

Tipo de amostra	Número de amostras positivas (%)
Carne de novilho/bovino	10 (14,70)
Carne de suíno	45 (66,18)
Carne mista (suíno, novilho/bovino)	13 (19,12)
Total	68 (100)

Tabela 5: *Salmonella spp.* detetada em amostras com 25g $\pm$ 5%.

Tipo de amostra	Número de amostras positivas (%)
Carne de suíno	13 (29,55)
Carne de aves (codornizes, frango, pato, peru)	26 (59,09)
Outros	5 (11,36)
Total	44 (100)

Tabela 6: Divisão das amostras positivas com 25g $\pm$ 5% em alimentos prontos e não prontos a consumo.

	Tipo de amostra	Número de amostras positivas (%)
Alimentos não prontos a consumo	Carne de suíno	13 (29,55)
	Carne de aves (codornizes, frango, pato, peru)	26 (59,09)
	Ostras frescas	1 (2,27)
	Peixe perca	1 (2,27)
	Porções de folhas de espinafres	1 (2,27)
Alimentos prontos a consumo	Sandes de pasta de atum	1 (2,27)
	Queijo curado	1 (2,27)
Total		44 (100)

Depois de se realizarem os testes PCR em tempo real (AFNOR-BRD 07/06-07/04) (12), as 112 amostras que obtiveram resultado positivo para a detecção de pesquisa de *Salmonella spp.*, foram confirmadas por método cultural (ISO 6579-1:2017/Amd1:2020).

Segundo as hipóteses testadas neste estudo de caso e pela análise estatística inferencial, a prevalência de *Salmonella spp.* difere significativamente ($p < 0,05$) entre os dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%. Assim, aceita-se a H_1 : "A prevalência de *Salmonella spp.* difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%".

5. Discussão

5.1. Estágio

Neste estágio curricular, foi possível vivenciar a experiência de estar num laboratório de referência na área da Saúde Pública, onde são realizadas análises microbiológicas através de ensaios acreditados. A realização deste estágio permitiu-me observar e compreender o fluxograma da Biogerm; ter contacto direto com a área de Microbiologia das Águas e dos Alimentos; fazer parte do dia-a-dia da equipa de trabalho; executar as normas de higiene e segurança aplicadas ao longo de todos os procedimentos; contactar com as diversas metodologias e aplicar e aprofundar os conhecimentos e competências adquiridos no 1º ano de mestrado em ACSP.

O estágio teve como foco de aprendizagem a Microbiologia dos alimentos, mais concretamente a pesquisa de *Salmonella spp.*. Foi possível compreender, em específico, a dinâmica e a organização do laboratório de Microbiologia de alimentos desde a recolha de amostras, entrada das mesmas, processamento e interpretação de resultados (Anexo E), assim como as metodologias – ISO 6579-1:2017 (1) e PCR em tempo real.

Relativamente à ISO 6579-1:2017, o procedimento para a identificação de *Salmonella spp.* demora mais de 4 dias, trata-se de um processo pormenorizado e extenso com diversas fases. (10, 14) Foi possível aprender a distinguir as quatro fases de deteção e em que cada uma consiste, desde os meios de cultura específicos envolventes, as respetivas condições de tempo de incubação e de temperatura como ainda, saber distinguir colónias suspeitas e características das outras colónias da mesma família presentes no meio. A confirmação dessas colónias suspeitas e características para a *Salmonella spp.* é, posteriormente, realizada através de testes bioquímicos e serológicos.

Neste âmbito, os meios utilizados são o meio líquido Lisina e os meios inclinados TSI, nutriente e Ureia. Relativamente aos testes serológicos, só são realizados quando se obtém positividade em todos os meios referidos. Assim, se tal não se verificar, a bactéria em estudo não é *Salmonella spp.*. Na Biogerm, os testes serológicos utilizados são: soro fisiológico, uma solução polivalente do soro antigénio O e do soro antigénio H.

Em relação à metodologia PCR em tempo real, aplicada para a pesquisa de *Salmonella spp.* e em conjunto com a ISO 6579-1:2017, foi possível aprender: a processar a extração de ADN de *Salmonella spp.* em amostras de alimentos; a introduzir corretamente os dados; a analisar os gráficos e como prevenir as contaminações. O PCR é altamente suscetível a contaminações pois, é possível analisar diversas amostras ao mesmo tempo na mesma placa, para isso é necessário estabelecer um fluxo de trabalho e uso de materiais específicos apropriados. (10) A inclusão desta metodologia, com alta sensibilidade e

especificidade, funciona como método de triagem nas amostras de alimentos, permite dar uma resposta rápida (demora cerca de 2h) e emitir um resultado em menos de 48h para o cliente (quando o resultado é negativo). (4, 5) Porém, exige pessoal qualificado e equipamentos e reagentes com custo elevado. Também pode ocorrer inibições do PCR pois, certas matrizes alimentares podem conter interferências de PCR e falsos positivos por vários motivos, como as contaminações e as bactérias presentes não serem viáveis – são detetadas por PCR mas não crescem na fase de enriquecimento. (6, 10) Assim, efetua-se a confirmação das amostras positivas por PCR em tempo real pelo método cultural.

Relativamente à validação de resultados para a pesquisa de *Salmonella spp.*, os mesmos são validados segundo a AFNOR, aplicadas às diferentes metodologias usadas nos laboratórios da Biogerm, conforme o número de amostras analisadas. Ambos os métodos são da mesma casa comercial. Porém, o método que está implementado na Biogerm da Região Autónoma da Madeira é mais fácil, económico e rápido de utilizar pois, o número de amostras de alimentos analisados é consideravelmente inferior, comparativamente com a Biogerm de Portugal Continental.

5.2. Estudo de caso

A frequência de *Salmonella spp.* nos alimentos analisados, provenientes de Portugal Continental e Região Autónoma da Madeira foi 1,57%. Comparativamente a outros estudos similares, desenvolvidos em Portugal e em outros países, este é um valor baixo. (45, 54–61) O estudo realizado por Nguyen DT e colaboradores (2016) no Vietname demonstrou uma frequência bastante elevada (55,75%). Este valor pode estar relacionado com o facto de as amostras terem sido recolhidas durante um período mais longo (outubro de 2012 a março de 2015) e serem provenientes de vários pontos do sistema de distribuição de alimentos da cidade Ho Chi Minh. Uma frequência aproximada (49%) já tinha sido encontrada no estudo realizado na Malásia em 1995. (58) Neste estudo, também as amostras foram recolhidas de restaurantes, cantinas e mercados em três cidades (Kajang, Serdang e Kuala Lumpur). Valores mais aproximados ao encontrado neste estudo, apesar de serem mais elevados, foram observados no estudo realizado em Marrocos por Zahli e colaboradores (2022) (9,84%), e no estudo de Ejo e colaboradores (2016), desenvolvido na Etiópia (5,47%). No primeiro estudo, as amostras foram recolhidas aleatoriamente em diferentes pontos da região de Tetouan, no período de novembro de 2016 a outubro de 2018. Enquanto no segundo estudo, as amostras de alimentos de origem animal foram recolhidas aleatoriamente de restaurantes, hotéis, cafés e pastelarias em Gondar (Noroeste da Etiópia), no período de fevereiro de 2014 a dezembro de 2015. Assim, o período de recolha de amostras associado à metodologia por amostragem aleatória de vários pontos geográficos ou do sistema de distribuição de alimentos, as diferenças nos

padrões de qualidade alimentar implementados nestes países, poderão estar na base da discrepância dos valores obtidos.

De qualquer forma, a prevalência obtida neste estudo está relacionada com a implementação de programas de qualidade e controlo dos riscos, assim como de campanhas sobre sustentabilidade e segurança alimentar (do prado ao prato, por exemplo).

Contudo, estudos desenvolvidos noutros países, nomeadamente na Estónia (2014) (55) e em Marrocos (2009) (59), obtiveram frequências de contaminação por *Salmonella spp.* mais baixas – 0,54% e 0,91%, respetivamente. O primeiro estudo, baseou-se na recolha de amostras em várias indústrias alimentares durante cinco anos (2008–2012), enquanto no estudo desenvolvido em Marrocos as amostras foram recolhidas de restaurantes, hotéis, snack bares e empresas públicas e privadas em várias cidades (maioritariamente em Casablanca, Tanger, Rabat e Marrakech), no período de março de 2002 a dezembro de 2005. Fundamentalmente, a diferença na prevalência de *Salmonella spp.* nos dois estudos, deve-se ao facto de as amostras terem sido recolhidas no âmbito de verificação dos procedimentos da própria indústria alimentar e do controlo oficial efetuado pela autoridade competente (55) e de análises de rotina da *Food Control* (controlo de comida) do Instituto Pasteur (59).

Segundo dados da *European Food Safety Authority* (EFSA) em 22 países da Europa, no ano 2020, a frequência de contaminação de *Salmonella spp.* foi ainda mais baixa 0,15%, originando 694 surtos de origem alimentar, dos quais houve 812 hospitalizações e 7 mortes. Demonstra assim, que estão a ser cumpridos os critérios de higiene de acordo com o regulamento (CE) nº2073/2005. Os produtos alimentares reportados como os principais veículos de transmissão de *Salmonella spp.* foram os ovos e os seus derivados (responsável por 37 surtos), carne de suíno e produtos com o mesmo (11 surtos), e produtos de panificação (9 surtos). De salientar que Portugal, Bulgária, Chipre, Eslovénia e Grécia não tiveram nenhum surto de Salmonelose registado. (60)

Segundo dados da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) num estudo realizado em 27 países da UE e 9 países fora da UE, no período de 2016–2020, registou-se o menor número de casos de Salmonelose em 2020 (52702 casos; 13,71 casos por cada 100000 habitantes), resultando numa diminuição de 29,7% (incluindo o Reino Unido) ou 32,8% (excluindo o Reino Unido) em comparação com o ano 2019. Este decréscimo deve-se à saída do Reino Unido da UE e da pandemia da COVID-19. Estes 52702 casos originaram 6149 hospitalizações e 57 mortes. Em países como Portugal, Bulgária, Grécia, Irlanda, Itália e Roménia registaram o menor número de surtos de Salmonelose ($\leq 4,4$ casos por cada 100000 habitantes). (60)

A maioria das amostras de alimentos analisadas para a pesquisa de *Salmonella spp.* são provenientes da Biogerm de Portugal Continental e isso deve-se ao facto da distribuição geográfica da população portuguesa se concentrar maioritariamente no Continente (250769 habitantes na Região Autónoma da

Madeira e 10094033 habitantes em Portugal Continental, segundo o Instituto Nacional de Estatística). (62)

Verificou-se que a maioria das amostras provenientes da Biogerm de Portugal Continental são referentes ao grupo de 25g $\pm$ 5% (alimentos prontos e não prontos a consumo) já da Biogerm da Região Autónoma da Madeira são referentes ao grupo de 10g $\pm$ 5% (alimentos não prontos a consumo). Possivelmente esta situação, deve-se ao menor número de supermercados, escolas, hospitais e lares na Região Autónoma da Madeira. Visto que, se trata de um controlo de Saúde Pública por ser um microrganismo de tolerância zero em alimentos, o foco para a pesquisa de *Salmonella spp.* são as comidas comercializadas e as refeições pré-confeccionadas e confeccionadas em cantinas escolares, hospitais, atividades de tempos livres (ATL) e lares, de forma a abranger o maior número de alimentos possível. (13, 25, 26)

Todas as amostras de alimentos foram analisadas por PCR em tempo real, das quais resultaram 112 amostras positivas, que foram posteriormente, também confirmadas por método cultural.

De acordo com os resultados do total de amostras analisadas e positivas, verificou-se uma contaminação superior no grupo de 10g $\pm$ 5%, comparativamente com o grupo 25g $\pm$ 5% (60,71% e 39,29%, respetivamente). Tal, pode estar relacionado com o facto de todas as amostras de alimentos constituintes desse grupo serem crus – amostras não prontas a consumo, ou seja, não houve qualquer tipo de ação pelo calor e, conseqüentemente, a possibilidade de eliminação da *Salmonella spp.*. Enquanto, no grupo de 25g $\pm$ 5% a maioria das amostras de alimentos estão prontas a consumo – alimentos confeccionados. Contudo, de acordo com a ISO, a carne de suíno pode ser analisada em 10g $\pm$ 5% e 25g $\pm$ 5%. (1) Os clientes que optam por fazer a pesquisa de *Salmonella spp.* em 25g $\pm$ 5%, preferem que seja analisada uma maior quantidade de produto, por forma a terem uma confiança maior no resultado obtido. Esta opção é maioritariamente feita por empresas de grandes dimensões.

No grupo de 10g $\pm$ 5%, nas 68 amostras de alimentos positivas, a carne de suíno apresenta a maior percentagem de contaminação (66,18%), mesmo se compararmos apenas a carne de novilho/bovino com a carne mista (carne de suíno, novilho/bovino) verificamos que, a carne mista apresenta maior contaminação (19,12%), pois contém a carne de suíno. Assim, neste grupo, a carne de suíno tem predisposição para a contaminação da *Salmonella spp.* sendo necessário que este tipo de carne seja bem confeccionada. Estes resultados estão em conformidade com outro estudo realizado em Portugal durante 2009–2011, em que as amostras foram recolhidas por todo o território nacional no âmbito do Programa Nacional de Controle de *Salmonella* em animais produtores de alimentos e alimentos de origem animal, de acordo com as diretrizes da Decisão da Comissão 2007/407/EC, onde foi observado 60,35% de prevalência de contaminação por *Salmonella spp.*. (56) Contrariamente, nos estudos realizados no Vietname (54), Itália (61) e Estónia (55) observam-se prevalências inferiores, nomeadamente, 33,74%, 2,51% e 0,43%. Este estudo realizado na Itália, no período de outubro de 2018 a outubro de 2021, focou-

se na análise de amostras de carcaças de suínos. Demonstrou que existe uma correlação direta entre a distância de onde os animais são criados até aos matadouros (quanto maior for essa distância, maior será a prevalência esperada de *Salmonella spp.*), talvez pelo aumento do tempo durante o transporte, as condições precárias de higiene e o contacto próximo entre os animais. Para além disso, demonstrou também, que a prevalência de *Salmonella spp.* aumenta de acordo com o peso do animal, mas não com o seu tamanho. (61) Na carne bovina, a prevalência obtida (14,70%), é mais baixa relativamente ao estudo realizado em Portugal (29,94%) e no Vietname (23,96%) (54, 56); e mais alta quando comparada com a prevalência encontrada no estudo realizado na Estónia (0,14%), provavelmente por este ser um estudo de controlo justificando assim a discrepância de valores obtidos. (55)

Relativamente ao grupo de 25g $\pm$ 5%, nas 44 amostras positivas, podemos concluir que, a carne de aves (59,09%) é onde existe o foco da contaminação. A prevalência obtida na carne de aves não foi encontrada em nenhum dos estudos já referidos (Vietname= 22,98%; Portugal= 14,71%; Estónia= 10,96%; e Marrocos (região de Tetouan) = 9,84%). (45, 54-56) No entanto, no estudo realizado em 2020, com a participação de 22 países da UE, a prevalência obtida na carne de aves e em produtos alimentares à base de carne de aves foi o grupo que apresentou valores percentuais mais elevados (1,6%). (60)

O uso inadequado de utensílios já utilizados em outros alimentos; pouca higiene das bancadas onde serão manuseados alimentos prontos a consumo (alface, tomates, pão, ...); aventais contaminados do corte de carne cruas e posteriormente usados para secar/limpar as mãos, entre outros, contribuem para o aumento da contaminação cruzada entre os alimentos prontos e não prontos a consumo. (21) Como os alimentos prontos a consumo não vão sofrer processamento térmico, os microrganismos existentes terão condições para se desenvolverem e contaminar os consumidores. Variando entre sintomas ligeiros a graves, pode em casos extremos provocar a morte do indivíduo. (13, 16, 46) Daí ser crucial a monitorização do controlo e implementação de novas medidas que diminuam a contaminação de *Salmonella spp.* em todos os alimentos – prontos e não prontos a consumo. Ainda neste contexto, é igualmente importante investir na literacia da população para que os indivíduos saibam controlar a contaminação cruzada, contribuindo para que a frequência da *Salmonella spp.* em alimentos prontos a consumo contaminados por alimentos não prontos a consumo possa diminuir. Esta diminuição pode também ser promovida pela utilização de um sistema de organização dentro do frigorífico (separar os alimentos prontos e não prontos a consumo), separar ambientes na cozinha na altura da confeção da comida, higienizar frequentemente as mãos e as bancadas, comprar alimentos em locais com programas de controlo de higiene e segurança implementados (supermercados e minimercados), cozinhar bem os alimentos não prontos a consumo e desinfetar bem os alimentos prontos a consumo.

Na carne de suíno, tal como verificado no grupo 10g $\pm$ 5%, também neste grupo apresenta uma elevada percentagem de contaminação (29,55%). Enquanto, no grupo alimentar “outros”, apresentam um valor

mais baixo (11,36%), em comparação com os restantes grupos. No entanto, a presença de *Salmonella spp.* no queijo curado e na sarda de pasta de atum (Tabela 6, pág. 23) é preocupante pois são alimentos prontos a consumo, enquanto os restantes ainda serão confeccionados podendo eliminar a bactéria por ação do calor.

Pela análise estatística inferencial, a prevalência de *Salmonella spp.*, neste estudo, difere significativamente ($p < 0,05$) entre os dois grupos: 10g $\pm 5\%$ e 25g $\pm 5\%$. Como podemos verificar, o grupo 10g $\pm 5\%$ apresenta uma prevalência de *Salmonella spp.* de 60,71% enquanto, o grupo 25g $\pm 5\%$ apresenta 39,29%. Assim, rejeita-se a hipótese nula “A prevalência de *Salmonella spp.* não difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm 5\%$ e 25g $\pm 5\%$ ” e aceita-se a H_1 : “A prevalência de *Salmonella spp.* difere significativamente entre os dois grupos: 10g $\pm 5\%$ e 25g $\pm 5\%$ ”.

De um modo geral, podemos concluir que a *Salmonella spp.* encontra-se predominantemente em alimentos crus ou mal confeccionados e como se trata de um microrganismo patogénico com tolerância zero em alimentos devido à alta taxa de mortalidade e morbilidade, sendo um grave problema de Saúde Pública, é crucial que a sua monitorização seja contínua de modo a prevenir casos e futuros surtos. Em associação, deverá promover-se a higiene pessoal dos operadores; cozinhar os alimentos adequadamente; evitar a contaminação cruzada; manter os alimentos armazenados em temperaturas adequadas e, por isso, consideradas seguras e evitar a utilização/consumo de alimentos de fontes inseguras. (42)

6. Conclusão

Este estágio teve duração de três meses, ao longo do qual foi possível desenvolver competências profissionais e pessoais, uma visão realista do funcionamento de um laboratório de Saúde Pública, na vertente de Microbiologia; interligar e aplicar os conhecimentos adquiridos durante o Mestrado em ACSP e integrar uma equipa multidisciplinar. Tornou-se, desta forma, uma experiência única e bastante enriquecedora, que me permitiu ter uma noção mais esclarecedora sobre a relevância laboratorial no contexto da Saúde Pública em Portugal.

Atualmente os laboratórios, quer privados quer públicos, desempenham funções fundamentais na colaboração da criação de programas melhores de controlo de qualidade e segurança alimentar face ao aumento que se tem verificado ao longo do tempo de bactérias patogénicas e contaminantes de origem alimentar, pois são altamente prejudiciais, que podem afetar qualquer pessoa.

Através da revisão da literatura, foi possível constatar que a *Salmonella spp.* é, atualmente, uma bactéria patogénica comumente encontrada nas matrizes alimentares. A doença associada ao consumo de alimentos contaminados por *Salmonella spp.* – salmonelose, é a segunda zoonose relatada pela União

Europeia. Isto, deve-se ao facto desta bactéria ubiqüitária ter grande capacidade de adaptação e resistência e conseguir transmitir-se de várias formas distintas, assumindo-se como um grave problema na Saúde Pública. Na prevenção da saúde individual e comunitária, o rigor e a evolução das normas de segurança alimentar, introduziu no setor alimentar um aumento da responsabilidade por parte dos produtores e processadores, em regular e controlar as práticas de produção e em implementar métodos de controlo de microrganismos patogénicos, como as BPHF e HACCP.

Relativamente aos dados obtidos neste estudo, verificou-se maior frequência de contaminação nos alimentos não prontos a consumo. Sendo que, estes alimentos crus contaminados ainda vão sofrer processamento térmico, fazendo com que haja uma grande probabilidade de eliminação da contaminação. Porém, o facto destes alimentos estarem contaminados pode originar a que outros alimentos, prontos a consumo, se contaminem, por contaminação cruzada, por exemplo. Esta é, efetivamente, uma das principais vias de transmissão de *Salmonella spp.* nos humanos.

Por se tratar de um microrganismo de tolerância zero em alimentos, apesar de todas as medidas já existentes, ainda se verifica valores elevados. Por isso, é muito importante a consciencialização sobre a necessidade de implementação de BPH para evitar a disseminação de *Salmonella spp.*, incutir estratégias de bons hábitos no âmbito do manuseamento de alimentos em contexto industrial, hoteleiro ou doméstico.

Este estudo permitiu evidenciar que, apesar das boas práticas introduzidas no controlo de qualidade e segurança alimentar, a prevalência de alguns produtos alimentares contaminados por *Salmonella spp.* em Portugal ainda é elevada. Tal, realça a necessidade de aumentar a literacia sobre os riscos inerentes à produção, ao processamento alimentar e controlo de microrganismos junto da comunidade produtora, distribuidora e consumidora. Futuramente, seria importante continuar a deteção de *Salmonella spp.* em alimentos, utilizando métodos de deteção mais rápidos e económicos, de forma a obter resultados fidedignos no menor tempo possível para poder-se tomar ações mais céleres na contenção de diversos surtos de origem alimentar.

Referências Bibliográficas

1. Standardization IOo. ISO 6579-1: Microbiology of the Food Chain–Horizontal Method for the Detection and Enumeration and Serotyping of *Salmonella* spp.—Part 1: Detection of *Salmonella* spp. ISO—International Organization of Standardization Geneva, Switzerland; 2017.
2. Decreto-Lei nº306/2007 de 27 de agosto, Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Diário da República nº164.: Portugal.; 2007.
3. Mooijman KA. The new ISO 6579-1: A real horizontal standard for detection of *Salmonella*, at last! Food Microbiol. 2018;71:2–7.
4. Wan J, Zheng L, Kong L, Lu Z, Tao Y, Feng Z, et al. Development of a rapid detection method for real-time fluorescent quantitative PCR of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in ready-to-eat fruits and vegetables. Lwt. 2021;149:111837.
5. Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi GN. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 2004;18(5):333–9.
6. Huang C, Mahboubat BY, Ding Y, Yang Q, Wang J, Zhou M, et al. Development of a rapid *Salmonella* detection method via phage-conjugated magnetic bead separation coupled with real-time PCR quantification. Lwt. 2021;142:111075.
7. Masoodi KZ, Lone SM, Rasool RS. Chapter 19 – Polymerase chain reaction (PCR). In: Masoodi KZ, Lone SM, Rasool RS, editors. Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology: Academic Press; 2021. p. 109-16.
8. Gandra E, Gandra T, Mello W, Godoi H. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos = Molecular techniques applied to food microbiology. Acta Scientiarum : Technology. 2008;30.
9. Talkington DF. PCR Detection of Microbial Pathogens. Emerging Infectious Diseases. 2013;19(8).
10. Furtado R, Coelho A, Morais M, Leitão AL, Saraiva M, Correia CB, et al. Comparison of ISO 6579–1, VIDAS Easy SLM, and SureFast® *Salmonella* ONE Real-time PCR, for *Salmonella* Detection in Different Groups of Foodstuffs. Food Analytical Methods. 2021;15(2):276–84.
11. ISO. ISO-16140. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ISO; 2016.
12. BIO-RAD Laboratories I. Validated for the detection of *Salmonella* spp. 2021.
13. Bakhshandeh B, Sorboni SG, Haghighi DM, Ahmadi F, Dehghani Z, Badii A. New analytical methods using carbon-based nanomaterials for detection of *Salmonella* species as a major food poisoning organism in water and soil resources. Chemosphere. 2021;287(Pt 3):132243.
14. Kumaravel S, Jian S-E, Huang S-T, Huang C-H, Hong W-Z. Convenient and ultrasensitive detection of live *Salmonella* using ratiometric electrochemical molecular substrates. Analytica Chimica Acta. 2022;1190:339244.
15. Silva NFD, Magalhaes J, Freire C, Delerue-Matos C. Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment. Biosens Bioelectron. 2018;99:667–82.
16. Shen W, Chen H, Geng J, Wu RA, Wang X, Ding T. Prevalence, serovar distribution, and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from pork in China: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Food Microbiology. 2022;361:109473.
17. Lim W, Harrison MA. Effectiveness of UV light as a means to reduce *Salmonella* contamination on tomatoes and food contact surfaces. Food Control. 2016;66:166–73.

18. Alves Â, Santos-Ferreira N, Magalhães R, Ferreira V, Teixeira P. From chicken to salad: Cooking salt as a potential vehicle of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* cross-contamination. Food Control. 2022;137:108959.
19. Raza J, Asmat TM, Mustafa MZ, Ishtiaq H, Mumtaz K, Jalees MM, et al. Contamination of ready-to-eat street food in Pakistan with *Salmonella* spp.: Implications for consumers and food safety. Int J Infect Dis. 2021;106:123–7.
20. Mahmudiono T, Olegovich Bokov D, Abdalkareem Jasim S, Kamal Abdelbasset W, Dinora MK. State-of-the-art of convenient and low-cost electrochemical sensor for food contamination detection: Technical and analytical overview. Microchemical Journal. 2022;179:107460.
21. Carrasco E, Morales-Rueda A, García-Gimeno RM. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. Food Research International. 2012;45(2):545–56.
22. Shang Y, Ye Q, Cai S, Wu Q, Pang R, Yang S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets. Lwt. 2021;142:110999.
23. Menchetti L, Taticchi A, Esposto S, Servili M, Ranucci D, Branciari R, et al. The influence of phenolic extract from olive vegetation water and storage temperature on the survival of *Salmonella Enteritidis* inoculated on mayonnaise. Lwt. 2020;129:109648.
24. Merino L, Procura F, Trejo FM, Bueno DJ, Golowczyc MA. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. Food Res Int. 2019;119:530–40.
25. Tadesse G, Gebremedhin EZ. Prevalence of *Salmonella* in raw animal products in Ethiopia: a meta-analysis. BMC Res Notes. 2015;8:163.
26. Ye Y, Wang B, Huang F, Song Y, Yan H, Alam MJ, et al. Application of in situ loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods. Food Control. 2011;22(3–4):438–44.
27. Temelli S, Kahya S, Eyigor A, Carli KT. Incidence of *Salmonella Enteritidis* in chicken layer flocks in Turkey: results by real-time polymerase chain reaction and International Organization for Standardization culture methods. Poult Sci. 2010;89(7):1406–10.
28. Wu K-J, Wu C, Fang M, Ding B, Liu P-P, Zhou M-X, et al. Application of metal-organic framework for the adsorption and detection of food contamination. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2021;143:116384.
29. Muckey M, Huss AR, Yoder A, Jones C. Research Note: Evaluating the roles of surface sanitation and feed sequencing on mitigating *Salmonella Enteritidis* contamination on animal food manufacturing equipment. Poult Sci. 2020;99(8):3841–5.
30. Alves D, Cerqueira MA, Pastrana LM, Sillankorva S. Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*. Food Res Int. 2020;128:108791.
31. Cox JM, Pavic A. SALMONELLA | Introduction. 2014:322–31.
32. Mukhopadhyay S, Ramaswamy R. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. Food Research International. 2012;45(2):666–77.
33. Longo A, Losasso C, Vitulano F, Mastroilli E, Turchetto S, Petrin S, et al. Insight into an outbreak of *Salmonella Choleraesuis* var. Kunzendorf in wild boars. Vet Microbiol. 2019;238:108423.
34. Heyndrickx M, Pasmans F, Ducatelle R, Decostere A, Haesebrouck F. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. Vet J. 2005;170(3):275–7.
35. Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. Res Microbiol. 2007;158(2):122–7.

36. Teh CSJ, Lau MY, Chong CW, Ngoi ST, Chua KH, Lee WS, et al. One-step differential detection of *Salmonella enterica* serovar *Typhi*, serovar *Paratyphi* A and other *Salmonella* spp. by using a quadruplex real-time PCR assay. *J Microbiol Methods*. 2021;183:106184.
37. Jones FT. A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. *Journal of Applied Poultry Research*. 2011;20(1):102–13.
38. (ASAE) Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. *Salmonella*. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/salmonella.aspx>.
39. Yang X, Huang J, Wu Q, Zhang J, Yang S, Wang J, et al. Occurrence, serovars and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in retail ready-to-eat food products in some Chinese provinces. *Lwt*. 2022;154:112699.
40. de Freitas CG, Santana AP, da Silva PH, Goncalves VS, Barros Mde A, Torres FA, et al. PCR multiplex for detection of *Salmonella Enteritidis*, *Typhi* and *Typhimurium* and occurrence in poultry meat. *Int J Food Microbiol*. 2010;139(1–2):15–22.
41. Kljujev I, Raicevic V, Vujovic B, Rothballer M, Schmid M. *Salmonella* as an endophytic colonizer of plants – A risk for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*. 2018;115:199–207.
42. O'Bryan CA, Ricke SC, Marcy JA. Public health impact of *Salmonella* spp. on raw poultry: Current concepts and future prospects in the United States. *Food Control*. 2022;132:108539.
43. Newton K, Withenshaw SM, Cawthraw SA, Davies R. In-depth farm investigations and an exploratory risk factor analysis for the presence of *Salmonella* on broiler farms in Great Britain. *Prev Vet Med*. 2021;197:105498.
44. Casado–Castillo F, Kobayashi T, Sekar P, Streit J, Molano De Pena I. Prosthetic hip infection due to *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *IDCases*. 2021;25:e01170.
45. Zahli R, Scheu AK, Abrini J, Copa–Patiño JL, Nadia A, Nadia SS, et al. *Salmonella* spp: Prevalence, antimicrobial resistance and molecular typing of strains isolated from poultry in Tetouan–Morocco. *Lwt*. 2022;153:112359.
46. Giacometti F, Pezzi A, Galletti G, Tamba M, Merialdi G, Piva S, et al. Antimicrobial resistance patterns in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Escherichia coli* isolated from bivalve molluscs and marine environment. *Food Control*. 2021;121:107590.
47. Palomares Velosa JE, Riaño Sánchez S, Martínez Marín A, Cedié Becerra NM. Prevention of exposure to zoonoses in rural Latin America: Social ecological factors in a diverse regional context. *One Health*. 2022;15:100444.
48. Saddler K, Castro–Lainez MT, Deliz–Aguirre R, Munoz J, Aguilar Espinal JA, Sierra–Hoffman M, et al. Nontyphoidal *Salmonella* purulent pericarditis presenting with pericardial tamponade in a patient on infliximab therapy. *IDCases*. 2019;15:e00500.
49. Clare B. Inflammasome activation by *Salmonella*. *Curr Opin Microbiol*. 2021;64:27–32.
50. Bajpai VK, Baek K–H, Kang SC. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 2012;45(2):722–34.
51. Petrovic J, Babic J, Stojanov I, Velhner M. The Change in Antimicrobial Resistance Profile of Meat Chain-associated *Salmonella* in Serbia. *Procedia Food Science*. 2015;5:231–4.
52. Li J, Li Y, Ding Y, Huang C, Zhang Y, Wang J, et al. Characterization of a novel Siphoviridae *Salmonella* bacteriophage T156 and its microencapsulation application in food matrix. *Food Res Int*. 2021;140:110004.
53. Elafify M, Darwish WS, El-Toukhy M, Badawy BM, Mohamed RE, Shata RR. Prevalence of multidrug resistant *Salmonella* spp. in dairy products with the evaluation of the inhibitory effects of

ascorbic acid, pomegranate peel extract, and D-tryptophan against *Salmonella* growth in cheese. Int J Food Microbiol. 2022;364:109534.

54. Nguyen DT, Kanki M, Nguyen PD, Le HT, Ngo PT, Tran DN, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC beta-lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. Int J Food Microbiol. 2016;236:115–22.

55. Kramarenko T, Nurmoja I, Kärssin A, Meremäe K, Hörman A, Roasto M. The prevalence and serovar diversity of *Salmonella* in various food products in Estonia. Food Control. 2014;42:43–7.

56. Clemente L, Manageiro V, Ferreira E, Jones-Dias D, Correia I, Themudo P, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. Int J Food Microbiol. 2013;167(2):221–8.

57. Ejo M, Garedew L, Alebachew Z, Worku W. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Animal-Origin Food Items in Gondar, Ethiopia. Biomed Res Int. 2016;2016:4290506.

58. Arumugaswamy RK, Rusul G, Abdul Hamid SN, Cheah CT. Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia. Food Microbiology. 1995;12:3–8.

59. Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, Piana A, Cohen N, Ennaji MM, et al. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. Journal of infection in developing countries. 2009;3(1):35–40.

60. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal. 2021;19(12).

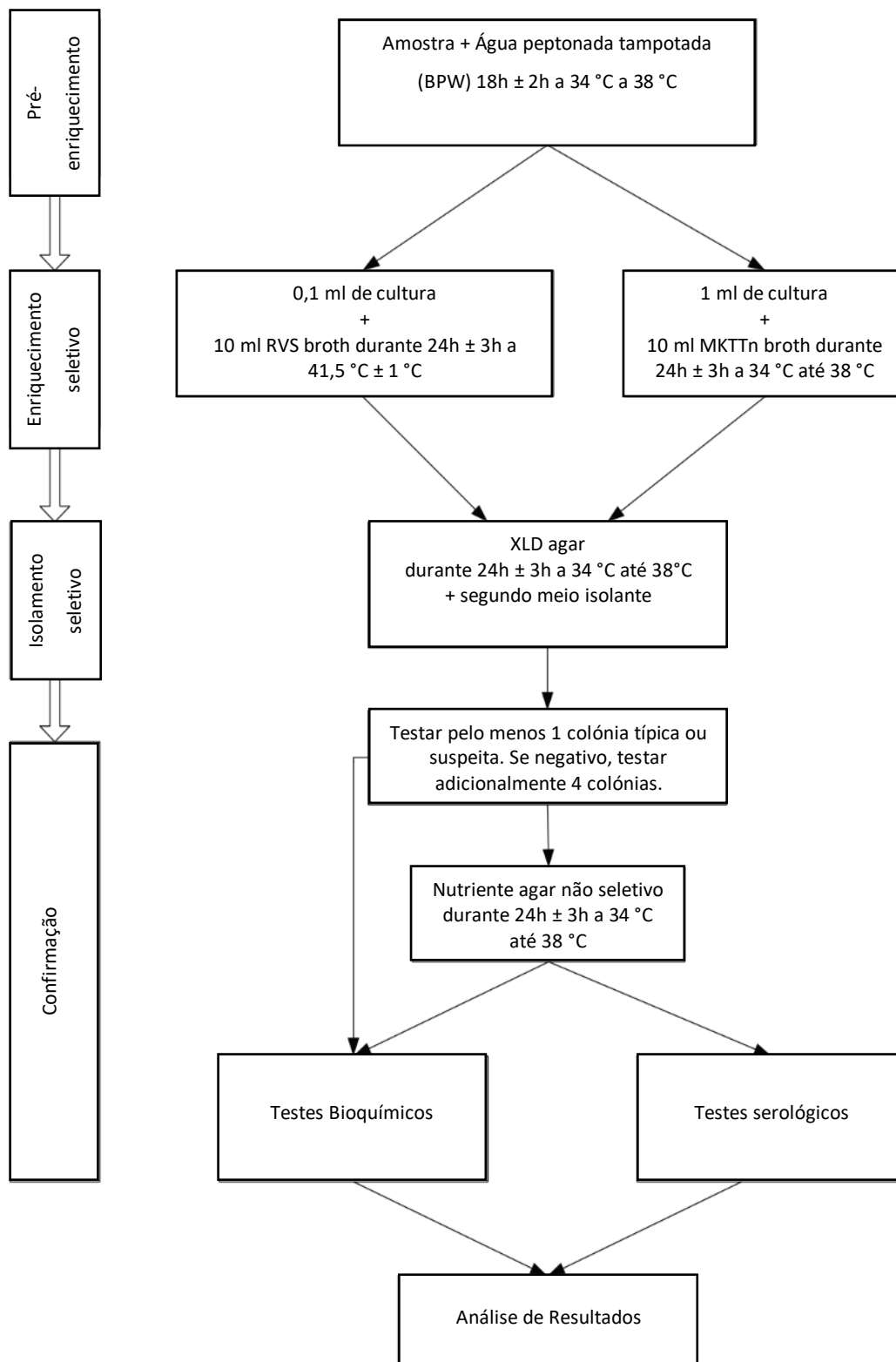
61. Chalias A, Grispoldi L, Cenci Goga B. A risk assessment model for *Salmonella* spp. in swine carcasses. EFSA J. 2022;20(Suppl 1):e200405.

62. Censos 2021 Instituto Nacional de Estatística (INE)2021 [Available from: https://www.ine.pt/scripts/db_censos_2021.html].

Anexos

Anexo A – Diagrama/fluxograma do procedimento para a pesquisa de *Salmonella spp.* em comida, rações e amostras ambientais da área de produção alimentar – adaptado da ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020(E).

ISO 6579-1:2017(E)



Anexo B – Composição e características dos meios de cultura utilizados para a pesquisa de *Salmonella spp.* pela sequência da ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020(E).

A. BPW

Composição do meio		Características
Peptona	10,0 g	Meio líquido de pré-enriquecimento seletivo para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> em amostras de alimentos (ISO 6579-1:2017), com pH 7.2 ± 0.2 a 25°C num saco estéril com 5000 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor beje.
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0 g	
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g	
Fosfato de Potássio Desidrogenado (KH_2PO_4)	1,5 g	
Água (H_2O)	1 000 ml	

B. Caldo RVS

Composição do meio		Características
Enzima Digestiva de Soja	5,0 g	Meio líquido seletivo de enriquecimento para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> , com pH de 5.2 ± 0.2 a 25°C num tubo estéril com 10 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor azul-escuro. Produzido pela Biogerm, SA.
Cloreto de Sódio (NaCl)	8,0 g	
K_2HPO_4	0,2 g	
Fosfato de Potássio Desidrogenado (KH_2PO_4)	1,4 g	
Água (H_2O)	1 000 ml	

C. Caldo MKTTn

Composição do meio		Características
Extrato de Carne	4,3 g	Meio líquido de enriquecimento para a <i>Salmonella spp.</i> , com pH de 8.2 ± 0.2 a 25°C num tubo estéril com 10 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor beje-esverdeado com precipitado. Produzido pela Biogerm, SA.
Digestão enzimática de caseína	8,6 g	
Cloreto de Sódio (NaCl)	2,6 g	
Carbonato de Cálcio (CaCO_3)	38,7 g	
($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	47,8 g	
Bile de Boi para uso bacteriológico	4,78 g	
Brilho Verde	9,6 mg	
Água (H_2O)	1 000 ml	

D. XLD agar

Composição do meio		Características
Extrato de Levedura	3,0 g	Meio sólido seletivo para o isolamento e diferenciação de elementos patogénicos entéricos gram-negativos – <i>Salmonella spp.</i> , com pH de 7.4 ± 0.2 a 25°C numa placa Stacker estéril de 90 mm, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor vermelho alaranjado. Colónias vermelhas com centro preto.
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0 g	
Xilose	3,75 g	
Lactose	7,5 g	
Sacarose	7,5 g	
Hidroclorato de L-Lisina	5,0 g	
Tiosulfato de Sódio	6,8 g	
Citrato de Ferro III amónio	0,8 g	
Vermelho Fenol	0,08 g	
Desoxiclorato de Sódio	1,0 g	
Agar	9 g a 18 g *	
Água (H ₂ O)	1 000 ml	
* Depende da intensidade do gel de agar.		

E. Meio Não Seletivo – Nutriente agar

Composição do meio		Características
Extrato de Carne	3,0 g	Meio inclinado favorável para o crescimento bacteriano, com pH de 7.4 ± 0.2 a 25°C num tubo estéril com 7 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor bege. Produzido pela Biogerm, SA.
Peptona	5,0 g	
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0 g	
Agar	9 g a 18 g *	
Água (H ₂ O)	1 000 ml	
* Depende da intensidade do gel de agar.		

F. TSI agar

Composição do meio		Características
Extrato de Levedura	3,0 g	Meio inclinado para a identificação de <i>Enterobacteriaceas</i> , detetando fermentação de três açúcares: glucose, sacarose e lactose; produção de sulfureto hidrogénio e gás, com pH de 7.4 ± 0.2 a 25°C num tubo estéril com 7 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor vermelho alaranjado. Produzido pela Biogerm, SA.
Extrato de Carne	3,0 g	
Peptona	20,0g	
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0 g	
Lactose	10,0 g	
Glucose	1,0 g	
Sacarose	10,0 g	
Tiosulfato de Sódio	0,3 g	
Citrato de Ferro III	0,3 g	

Vermelho Fenol	0,024 g	
Agar	9 g a 18 g *	
Água (H ₂ O)	1 000 ml	
* Depende da intensidade do gel de agar.		

G. Ureia agar

Composição do meio		Características
Peptona	1,0g	Meio inclinado para a detecção da atividade da urease Proteus e de algumas <i>Enterobacteriaceas</i> , com pH de 6.8 ± 0.2 a 25°C num tubo estéril com 8 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor bege. Produzido pela Biogerm, SA.
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0 g	
Glucose	1,0 g	
Fosfato de Potássio Desidrogenado (KH ₂ PO ₄)	2,0 g	
Vermelho Fenol	0,012 g	
Agar	9 g a 18 g *	
Água (H ₂ O)	1 000 ml	
* Depende da intensidade do gel de agar.		

H. Caldo LDC

Composição do meio		Características
Extrato de Carne	3,0 g	Meio líquido para a detecção da produção da lisina descarboxilase pela <i>Salmonella spp.</i> e outras <i>Enterobacteriaceas</i> , com pH de 6.8 ± 0.2 a 25°C num tubo estéril com 10 ml de meio, conservar a uma temperatura entre 2 a 8°C. O meio apresenta cor roxa. Produzido pela Biogerm, SA.
Monocloridrato de L-Lisina	5,0 g	
Glucose	1,0 g	
Roxo Bromocresol	0,015 g	
Água (H ₂ O)	1 000 ml	

Anexo C – Guia de cálculo para a Mix do PCR da marca **BIO–Rad Laboratories, Inc.**

PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when preparing the PCR mix, add the total number of samples and controls to be analyzed and find the corresponding volumes of reagent B and reagent C in the table.

Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, µl	Amplification Mix Reagent C, µl	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, µl	Amplification Mix Reagent C, µl	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, µl	Amplification Mix Reagent C, µl
1	5	40	33	178	1,400	65	351	2,800
2	11	86	34	184	1,500	66	356	2,900
3	16	130	35	189	1,500	67	362	2,900
4	22	173	36	194	1,600	68	367	2,900
5	27	216	37	200	1,600	69	373	3,000
6	32	259	38	205	1,600	70	378	3,000
7	38	302	39	211	1,700	71	383	3,100
8	43	346	40	216	1,700	72	389	3,100
9	49	389	41	221	1,800	73	394	3,200
10	54	432	42	227	1,800	74	400	3,200
11	59	475	43	232	1,900	75	405	3,200
12	65	518	44	238	1,900	76	410	3,300
13	70	562	45	243	1,900	77	416	3,300
14	76	605	46	248	2,000	78	421	3,400
15	81	648	47	254	2,000	79	427	3,400
16	86	691	48	259	2,100	80	432	3,500
17	92	734	49	265	2,100	81	437	3,500
18	97	778	50	270	2,200	82	443	3,500
19	103	821	51	275	2,200	83	448	3,600
20	108	864	52	281	2,200	84	454	3,600
21	113	907	53	286	2,300	85	459	3,700
22	119	950	54	292	2,300	86	464	3,700
23	124	994	55	297	2,400	87	470	3,800
24	130	1,000	56	302	2,400	88	475	3,800
25	135	1,100	57	308	2,500	89	481	3,800
26	140	1,100	58	313	2,500	90	486	3,900
27	146	1,200	59	319	2,500	91	491	3,900
28	151	1,200	60	324	2,600	92	497	4,000
29	157	1,300	61	329	2,600	93	502	4,000
30	162	1,300	62	335	2,700	94	508	4,100
31	167	1,300	63	340	2,700	95	513	4,100
32	173	1,400	64	346	2,800	96	518	4,100

Visit bio-rad.com/foodscience for more information.

Bio-Rad is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions. iQ-Check is a registered trademark of Bio-Rad Europe, GmbH in certain jurisdictions. All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Web site bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 43 01 877 89019 **Belgium** 32 03 710 53 00 **Brazil** 55 11 3065 7550
Canada 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 36 01 459 6192 **Denmark** 45 04 452 10 00 **Finland** 35 08 980 422 00 **France** 33 01 479 593 00
Germany 49 089 3188 4393 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 01 459 6190 **India** 91 124 4029300 **Israel** 972 03 963 6050 **Italy** 39 02 49486600
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 31 0 318 540 666 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 47 0 233 841 30
Poland 36 01 459 6191 **Portugal** 351 21 4727717 **Russia** 7 495 721 14 04 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 36 01 459 6193 **Spain** 34 091 49 06 580
Sweden 46 08 555 127 00 **Switzerland** 41 0617 17 9555 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311 **United Arab Emirates** 971 4 8187300
United Kingdom 44 01923 47 1301



Anexo D – Descrição completa das amostras positivas de ambos os grupos para a pesquisa de *Salmonella* spp.

<i>Salmonella</i> spp. detetada em amostras com 10g±5%		
Tipo de amostra	Frequência absoluta	Frequência Relativa (%)
Almôndegas de novilho	2	2,94
Almôndegas mistas temperadas com colorau	1	1,47
Bife de novilho embalado – Vácuo	2	2,94
Bochechas de suíno frescas com osso – Vácuo	1	1,47
Bochechas de suíno frescas sem osso – Vácuo	1	1,47
Carne de suíno temperada	1	1,47
Carne picada de bovino	3	4,41
Carne picada de bovino e suíno	1	1,47
Carne picada de novilho	2	2,94
Carne picada de suíno	7	10,29
Chouriço fresco	1	1,47
Coração de suíno fresco	1	1,47
Entrecosto de suíno fresco	1	1,47
Espetada de suíno com pimentos ± 3kg	1	1,47
Fêvera da Pá de suíno	1	1,47
Fêvera para enchido	1	1,47
Hambúrguer de novilho não temperado	1	1,47
Hambúrgueres de novilho e suíno	11	16,18
Língua de suíno congelado	1	1,47
Línguas de suíno ± 5kg – Vácuo	1	1,47
Panados de suíno	8	11,76
Perna de suíno – Granel	1	1,47
Redenho de suíno ± 5Kg – Vácuo	1	1,47
Salsicha fresca de suíno – Granel	2	2,94
Salsicha fresca de suíno temperado com molho para salsichas e massa de alho	1	1,47
Salsicha fresca picante	5	7,35
Salsicha fresca picante – Granel	5	7,35
Salsichas de suíno temperadas com ervas	1	1,47
Salsichas de suíno temperadas com rosado	1	1,47
Tripa de suíno	1	1,47
Tripa enfarinhada	1	1,47
Total	68	100

Salmonella spp. detetada em amostras com 25g ±5%		
Tipo de amostra	Frequência absoluta	Frequência Relativa (%)
1/2 Queijo curado	1	2,72
Carne picada de aves	12	27,27
Codornizes temperadas	1	2,72
Entrecosto de suíno	1	2,72
Escápula da pá de suíno congelado	1	2,72
Espetada de Frango 1Kg	1	2,72
Filete de Perca	1	2,72
Gordura sem couro de Suíno	3	6,82
Hambúrguer de frango	1	2,72
Hambúrguer de frango não temperado	1	2,72
Ostras frescas	1	2,72
Paio York fatiado com 90g	1	2,72
Panados de peru	1	2,72
Peito de frango temperado fresco	1	2,72
Peito de peru 1Kg – Vácuo	1	2,72
Perna de frango temperada fresca	1	2,72
Perna de pato com pele embalada – Vácuo	5	11,36
Perna frango não calibrada congelada	1	2,72
Pontas de entremeada de suíno	1	2,72
Porções de folhas de espinafres	1	2,72
Redenho de suíno	1	2,72
Rim de suíno	1	2,72
Sandes de pasta de atum	1	2,72
Secretos de suíno	2	4,55
Toucinho gordo sem couro de suíno	1	2,72
Trimming túbaro	1	2,72
Total	44	100

Anexo E – Fluxograma laboratorial da Biogerm.

