



**Bárbara da Costa  
Branco**

**Metodologia para deteção e diferenciação entre a  
estirpe vacinal e estirpes selvagens de *Salmonella*  
spp. por RT-PCR**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Bárbara da Costa  
Branco**

**Metodologia para deteção e diferenciação entre a  
estirpe vacinal e estirpes selvagens de *Salmonella*  
spp. por RT-PCR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Dr. Hugo Rafael da Silva Mateus Fernandes Guedes, Técnico Superior do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Unidade de Tecnologia e Segurança Alimentar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.).

## **O júri**

Presidente

**Professor Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves**  
Investigador Principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente

**Professora Doutora Carina Manuela Fernandes Almeida**  
Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Vogal – Orientador Externo

**Dr. Hugo Rafael da Silva Mateus Fernandes Guedes**  
Técnico Superior do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

## **agradecimentos**

Ao Dr. Hugo Guedes pela orientação deste trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos, por acreditar sempre em mim e pela sua boa disposição diária. Sem a sua ajuda este desafio final do meu percurso académico seria muito mais complicado. A si, o meu sincero agradecimento.

A todos os funcionários dos diferentes laboratórios do INIAV, I.P., em especial aos que me acompanharam diariamente: Ana Maria Silva, Engenheira Ana Pinheiro, Esperança Rodrigues e Manuela Amaral, que me trataram como uma colega de trabalho e me acolheram com amizade, respeito e boa disposição, auxiliando-me nas tarefas, confiando sempre no meu trabalho.

À Professora Sónia Mendo por todo o carinho e confiança que depositou em mim e por toda a sua disponibilidade, ainda que à distância, por ter perdido muito do seu tempo comigo e por ter sempre lutado juntamente com o Dr. Hugo para me proporcionarem um estágio único e excepcional.

À instituição em si, pela oportunidade e por me ter permitido desenvolver uma metodologia benéfica para a mesma, mas que foi extremamente enriquecedora e me ofereceu uma das melhores experiências da minha vida.

Aos meus pais por terem feitos esforços financeiros e emocionais para que eu pudesse terminar esta etapa, e também à minha família de coração por acreditarem em mim, pela ajuda, pelo apoio incondicional e pela força extraordinária que me transmitiram ao longo de todo este percurso académico.

À Rita por ser a minha companheira de escrita, mas também ao Rex e à Estrela por me darem força. Ao meu avô e à Nina por serem a minha proteção e estarem a olhar por mim.

Esta é a minha homenagem para vocês que contribuíram para a concretização deste meu objetivo de vida.

Muito obrigada.

**palavras-chave** *Salmonella* spp., **ttr**, **nhaA**, RT-PCR, PNCS, produção primária, alimentos, ISO 6579, análises microbiológicas, patógenos alimentares.

**resumo** A realização deste trabalho teve como principais objetivos o acompanhamento da rotina laboratorial do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) e o desenvolvimento e implementação de nova uma metodologia por PCR em tempo real (RT-PCR) que permita a confirmação de *Salmonella* após execução da norma ISO 6579:1-2017, e a distinção entre a estirpe vacinal e as estirpes selvagens de *Salmonella* presentes em amostras provenientes de produção primária.

A rotina laboratorial consistia a análise de amostras alimentares, ambientais e de produção primária, inseridas em diferentes atividades (e.g. Plano de Inspeção de Géneros Alimentícios, Plano Nacional de Controlo de *Salmonella*, Postos de Inspeção Fronteriços e Ensaio Interlaboratoriais). Todas as amostras foram analisadas tendo em conta os parâmetros microbiológicos estabelecidos para a pesquisa de *Campylobacter* spp., pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas, pesquisa de *Escherichia coli* STEC/VTEC, pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*, contagem de *Enterobacteriaceae* e de microrganismos a 30°C e pesquisa de *Salmonella* spp.

A vacinação contra *Salmonella* é uma medida importante no controlo de bandos de frangos, perus, galinhas poedeiras e reprodutoras. Por isso, é essencial detetar no menor tempo possível a presença desta bactéria e consequentemente o seu serotipo, permitindo saber qual a estirpe de *Salmonella* que está a infetar os bandos. Então, procedeu-se ao desenvolvimento de uma nova metodologia relativamente rápida (i.e., após duas horas), qualitativa (i.e., presença/ausência) para deteção e diferenciação de estirpes de *Salmonella* através de uma técnica por RT-PCR baseada na utilização de três sondas do tipo TaqMan, contendo uma delas bases de LNA, tornando-a mais específica para deteção do serotipo vacinal. As amostras alimentares são testadas diretamente da purificação de uma colónia em NA do meio XLD que irá para serotipificação. Caso haja fluorescência no canal HEX, significa que foi detetada a sequência do gene **ttr**, utilizado para testar a presença de *Salmonella*. No caso de amostras de produção primária, são retiradas cerca de 10 colónias do XLD para NA (i.e., se através do aspeto macroscópico se suspeitar que existem diferentes serotipos) e da placa de XLD que é analisada em Lisboa, para serotipificação, e é retirada uma colónia (já purificada) de modo a confirmar os resultados obtidos, na medida em que os testes de confirmação serológicos e biológicos são realizados a partir desta mesma colónia isolada. Aqui, espera-se que haja fluorescência no canal Cy5 (**nhaA-V**) que deteta o gene **nhaA** no caso de a estirpe ser vacinal. Se a estirpe for selvagem, não haverá curva de amplificação na corrida de RT-PCR visto existir uma sequência para estirpes selvagens que compete com os locais de ligação da sonda **nhaA-V**. Desta forma, e associando ao seguimento das primeiras fases da norma ISO 6579 é possível garantir o isolamento de *Salmonella* e a eliminação dos falsos positivos. A existência de um controlo interno de amplificação (IAC) que deteta a sequência do plasmídeo pUC19, através do canal ROX, fornece uma ferramenta importante para a indicação de falsos negativos, que possam ser causados por inibição da reação de PCR, provocada pelas diferentes matrizes, ou até por algum erro no funcionamento do termociclador.

Assim, foi possível concluir que a nova metodologia permite detetar *Salmonella* spp., após isolamento em meio XLD através da ISO 6579, e diferenciar a estirpe vacinal das selvagens, uma vez que o aspeto macroscópico obtido apresenta diferenças (i.e., aspeto côncavo no caso da estirpe vacinal e aspeto convexo no caso de estirpes selvagens). Foi ainda possível verificar que o caldo MKTTn favorecia o crescimento da estirpe vacinal e permitia com maior facilidade a sua deteção.

**keywords** *Salmonella* spp., *ttr*, *nhaA*, RT-PCR, PNCS, primary production, food, ISO 6579, microbiological analysis, foodborne pathogens..

**abstract** This project's main goals were to follow the Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (*National Institute for Agrarian and Veterinary Research* - INIAV, I.P.) laboratory daily routine and the development and implementation of a new methodology in real-time PCR (RT-PCR) that allowed the confirmation of *Salmonella* after the execution of normative ISO 6579:1-2017, and the distinction between vaccine and wildtype strains of *Salmonella* present in primary production's samples.

Laboratory daily routine consisted in the analysis of food, environmental and primary production samples, inserted in different activities (e.g., Food Inspection Plan, Airport and Seaport frontier analytical Support, *Salmonella* National Surveillance Plan and samples of interlaboratory assays. Every sample was analyzed taking into account the microbiological parameters established for the detection of *Campylobacter* spp., detection of staphylococcal enterotoxins, detection of *Escherichia.coli* STEC/VTEC, detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, enumeration of *Enterobacteriaceae* and plate count technique of microorganisms at 30°C and detection of *Salmonella* spp..

The vaccination in poultry is an important measure in control of *Salmonella* in the broilers, turkeys, laying and breeding hens. That is why it is essential to detect as fast as possible the presence of this bacteria and consequently its serotype, allowing us to know which *Salmonella*'s strain is infecting the flocks. Then, we proceeded to the development of a relatively fast (i.e., after two hours of the PCR run) and qualitative (i.e., presence/absence) new methodology for the *Salmonella* strains detection and differentiation through RT-PCR technique based on the utilization of three TaqMan probes, one of them containing LNA bases, making it more specific for vaccine serotype detection. The food samples are directly tested from the purification of a colony in NA plate of the XLD medium which will go to the serotyping. In case of a fluorescence detection in the HEX channel, a sequence of the *ttr* gene was detected, which is used to detect the presence of *Salmonella* spp.. In case of primary production samples, 10 colonies from XLD medium are inoculated into NA plate (i.e., if there is a suspicion of the existence of different serotypes through the macroscopic appearance) and from the XLD plates which go to Lisbon, for serotyping a colony is purified so it can confirm the obtained results, in so far as the serological and biological confirmation tests are performed from this isolated colony. Here is expected to exist fluorescence in channel Cy5 (*nhaA-V*) which detects the *nhaA* gene in case of the vaccine serotype. There will be no amplification curve in the RT-PCR assay in case of wildtype strain since there is a sequence for wildtype strains that compete with specific probes of vaccine strain for similar binding sites during RT-PCR. Therefore, and associating to the follow-up of the ISO 6579 first stages it is possible to assure the *Salmonella* isolation and the detection of false positive results. The existence of an internal amplification control (IAC) that detects the pUC19 plasmid's sequence, through the ROX channel, provides an important tool for the indication of false-negative results, that may be caused by the PCR reaction inhibition, caused by the different matrices, or even by an error in the thermocycle operation.

Therefore, it was possible to conclude that the new methodology allows to detect *Salmonella* spp., after isolation in the XLD medium, following ISO 6579, and differentiate the vaccinal strains from the wildtype once since the obtained macroscopic appearance reveals differences, i.e., concave appearance in the vaccinal strain's case and convex appearance in the wildtype strains. It was also possible to see that the MKTTn broth was the medium which favoured the vaccine strain growth and allowed a easier detection.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ENQUADRAMENTO GERAL.....	3
2.1 SEGURANÇA ALIMENTAR E RISCOS MICROBIOLÓGICOS.....	3
2.2 LEGISLAÇÃO PORTUGUESA E EUROPEIA EM MICROBIOLOGIA ALIMENTAR.....	5
2.3 MICRORGANISMOS PATOGENICOS: DOENÇAS E SURTOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE ALIMENTOS CONTAMINADOS..	6
2.3.1 CAMPYLOBACTER SPP.....	7
2.3.2 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS.....	10
2.3.3 ESCHERICHIA COLI STEC/VTEC.....	12
2.3.4 LISTERIA MONOCYTOGENES.....	15
2.3.5 SALMONELLA SPP.....	17
PARTE I – PCR EM TEMPO REAL PARA A DETEÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESTIRPES VACINAL E SELVAGENS DE SALMONELLA.....	23
2.4 METODOLOGIAS BASEADAS NA TÉCNICA PCR.....	23
2.4.1 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) CONVENCIONAL.....	23
2.4.2 PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	24
2.5 DETEÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES DE SALMONELLA.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 OBJETIVOS.....	32
3.2 ESTIRPES BACTERIANAS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DE CONSERVAÇÃO.....	33
3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELLA SPP. PELA NORMA ISO 6579-1:2017.....	34
3.4 EXTRAÇÃO DE ADN PARA PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	35
3.5 DESENHO DE PRIMERS E SONDAS.....	36
3.6 ENSAIOS DE RT-PCR E DEFINIÇÃO DO PERFIL TÉRMICO.....	37
3.7 DETEÇÃO DE SALMONELLA SPP. POR PCR EM TEMPO REAL.....	39
3.8 DETEÇÃO DE SALMONELLA ENTERITIDIS ESTIRPE VACINAL POR PCR EM TEMPO REAL.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 AMOSTRAGEM.....	39
4.2 ENSAIOS DE RT-PCR.....	40
4.3 APLICAÇÃO DA NOVA METODOLOGIA NA ROTINA LABORATORIAL.....	43
4.3.1 ENSAIOS DE RT-PCR EM AMOSTRAS CONHECIDAS.....	43
4.3.2 ENSAIOS DE RT-PCR EM AMOSTRAS REAIS.....	46
4.3.2.1 DETEÇÃO DE SALMONELLA SPP. EM AMOSTRAS REAIS POR RT-PCR.....	47
4.3.2.2 DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES DE SALMONELLA POR RT-PCR.....	48
4.3.3 ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E PRECISÃO.....	49
PARTE II – OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS: ROTINA LABORATORIAL.....	50
5. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS EM AMOSTRAS ALIMENTARES E AMBIENTAIS.....	50
5.1 AMOSTRAS.....	51
5.1.1 GÉNEROS ALIMENTÍCIOS DE ORIGEM ANIMAL E NÃO ANIMAL.....	51
5.1.2 AMOSTRAS DE PRODUÇÃO PRIMÁRIA.....	52
5.2 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	52
5.3 MÉTODOS DE DETEÇÃO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS.....	52
5.3.1 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS A 30°C.....	53
5.3.2 CONTAGEM DE ENTEROBACTERIACEAE EM PLACA.....	54
5.3.3 PESQUISA DE CAMPYLOBACTER SPP.....	56
5.3.4 PESQUISA DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS.....	56



5.3.5	PESQUISA DE ESCHERICHIA COLI STEC/VTEC .....	57
5.3.6	PESQUISA E CONTAGEM DE LISTERIA MONOCYTOGENES.....	58
5.3.7	PESQUISA DE SALMONELLA SPP. ....	59
5.4	CONTROLO DE QUALIDADE DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS .....	61
5.4.1	CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO.....	61
5.4.2	CONTROLO AMBIENTAL.....	62
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>
	ANEXO I – CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURANÇA APLICÁVEIS AOS GÉNEROS ALIMENTÍCIOS (ADAPTADO DO ANEXO I DO REGULAMENTO (CE) N.º 1441/2007).....	82
	ANEXO II - CASOS CONFIRMADOS, EM 2015, DE INFEÇÕES PROVOCADAS POR CAMPYLOBACTER SPP., ESCHERICHIA COLI STEC/VTEC, LISTERIA SPP., E SALMONELLA SPP. CONSULTADO A (ECDC, 2017), DISPONÍVEL EM <a href="http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx">HTTP://ATLAS.ECDC.EUROPA.EU/PUBLIC/INDEX.ASPX</a> .....	85
	ANEXO III – CATEGORIA DOS PRODUTOS TESTADOS EM PORTUGAL, NO ANO DE 2015, PARA A PRESENÇA DE CAMPYLOBACTER SPP. (EFSA & ECDC, 2016).....	86
	ANEXO IV - CATEGORIA DOS PRODUTOS TESTADOS EM PORTUGAL, NO ANO DE 2015, PARA A PRESENÇA DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (EFSA & ECDC, 2016).....	87
	ANEXO V - CATEGORIA DOS PRODUTOS TESTADOS EM PORTUGAL, NO ANO DE 2015, PARA A PRESENÇA DE ESTIRPES DE ESCHERICHIA COLI PRODUTORAS DA TOXINA SHIGA (EFSA & ECDC, 2016).....	88
	ANEXO VI - CATEGORIA DOS PRODUTOS TESTADOS EM PORTUGAL, NO ANO DE 2015, PARA A PRESENÇA DE LISTERIA MONOCYTOGENES (EFSA & ECDC, 2016).....	89
	ANEXO VII - CATEGORIA DOS PRODUTOS TESTADOS EM PORTUGAL, NO ANO DE 2015, PARA A PRESENÇA DE SALMONELLA SPP. (EFSA & ECDC, 2016).....	91
	ANEXO VIII – OBJETIVOS E AMOSTRAGEM DOS DIFERENTES PROGRAMAS DO PNCS.....	93
	ANEXO IX – PROCEDIMENTO PARA A DETEÇÃO DE SALMONELLA SPP. (ADAPTADO DA NORMA ISO 6579-1:2017).....	94
	ANEXO X – ESTIRPES SELECIONADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA NOVA METODOLOGIA POR RT-PCR.....	95
	ANEXO XI - ENSAIO DE RT-PCR PARA DEFINIÇÃO DO PERFIL TÉRMICO.....	98
	ANEXO XII – NOVA METODOLOGIA PARA DETEÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESTIRPES SELVAGENS E A ESTIRPE VACINAL DE SALMONELLA .....	119
	ANEXO XIII – ENSAIO DE RT-PCR DE AMOSTRAS HPA ENRIQUECIDAS EM RVS E MKTTN.....	120
	ANEXO XIV – ENSAIO DE RT-PCR DE AMOSTRAS HPA ENRIQUECIDAS EM MSRV.....	128
	ANEXO XV – FORMULAÇÃO TÍPICA DOS CALDOS RVS E MKTTN .....	136
	ANEXO XVI – ENSAIO DE RT-PCR DAS POOLS 3 E 4 DA AMOSTRAS HPA S0482, ISOLADAS EM NA.....	137
	ANEXO XVII – ENSAIO DE RT-PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE SALMONELLA EM AMOSTRAS ALIMENTARES. ....	145
	ANEXO XVIII – ENSAIO DE RT-PCR DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO PLANO PNCS. ....	149
	ANEXO XIX – ENSAIO DE RT-PCR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DOS PLANOS PIF E PNCS. ....	157
	ANEXO XX – ENSAIO RT-PCR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DOS PLANOS PIGA E PNCS.....	164
	ANEXO XXI – ENSAIO RT-PCR DE DIFERENTES ESTIRPES SELVAGENS DE SALMONELLA E DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO PLANO PNCS. ....	171
	ANEXO XXII – ENSAIO DE RT-PCR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO PLANO PNCS. ....	180
	ANEXO XXIII – ENSAIO DE RT-PCR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO PLANO PNCS. ....	188
	ANEXO XXIV – DADOS RELATIVOS AOS ENSAIOS DE RT-PCR E RESPECTIVA SEROTIPIFICAÇÃO EM AMOSTRAS DE PRODUÇÃO PRIMÁRIA REAIS.....	196
	ANEXO XXV - PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM DE MICRORGANISMOS A 30°C EM MEIO PCA (ADAPTADO DA NORMA ISO 4833-1:2013 (E).....	197
	ANEXO XXVI - PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM EM PLACA DE ENTEROBACTERIACEAE (ADAPTADO DA NORMA ISO 21528-2:2004).....	198
	ANEXO XXVII- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A DETEÇÃO E ESPECIAÇÃO DE CAMPYLOBACTER SPP. EM ALIMENTOS (ADAPTADO DA NORMA ISO/TS 10272-1:2006).....	199

ANEXO XXVIII- PROCEDIMENTO PARA A DETEÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS DO TIPO SEA A SEE EM QUEIJOS PROVENIENTES DE LEITES CRUS, DE ACORDO COM O CRITÉRIO 1.1.21 DO REGULAMENTO EC N.º 2073/2005 DE 25 DE NOVEMBRO DE 2005. ....	200
ANEXO XXIX - PROCEDIMENTO PARA A DETEÇÃO DOS GENES MAIS VIRULENTOS DE ESCHERICHIA COLI PRODUTORA DA TOXINA SHIGA (STEC/VTEC) E PARA A DETERMINAÇÃO DOS SEROGRUPOS O157, O111, O26, O103 E O145 (ADAPTADO DA NORMA ISO/TS 13136:2012). ....	201
ANEXO XXX - PROCEDIMENTO PARA DETEÇÃO E CONTAGEM DE LISTERIA MONOCYTOGENES (ADAPTADO DA NORMA ISO 11290-1:1996/AMD 1:2004 E ISO 11290-2:1998/AMD 1:2004). ....	202
ANEXO XXXI – PROCESSOS INTERNOS E EXTERNOS DE CONTROLO DE QUALIDADE REALIZADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR DO INIAV, I.P.. ....	203

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> CASOS CONFIRMADOS DE INFEÇÃO POR <i>CAMPYLOBACTER</i> , POR MÊS, DE 2008 A 2015 NA UNIÃO EUROPEIA/ÁREA ECONÓMICA EUROPEIA (EFSA & ECDC, 2016). .....	9
<b>FIGURA 2.</b> DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÉNERO <i>CAMPYLOBACTER</i> NA UNIÃO EUROPEIA EM 2015 (ADAPTADO DE EFSA & ECDC, 2016). .....	9
<b>FIGURA 3.</b> CASOS CONFIRMADOS DE INFEÇÃO POR ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUTORAS DA TOXINA SHIGA, DE 2008 A 2015, POR MÊS, NA UNIÃO EUROPEIA/ÁREA ECONÓMICA EUROPEIA (EFSA & ECDC, 2016). .....	13
<b>FIGURA 4.</b> DISTRIBUIÇÃO PELO SEROGRUPO O DOS CASOS CONFIRMADOS DE INFEÇÃO POR STEC EM 2015 (ADAPTADO DE EFSA & ECDC, 2016). .....	14
<b>FIGURA 5.</b> CASOS CONFIRMADOS DE INFEÇÃO POR <i>LISTERIA SPP.</i> , DE 2008 A 2015, POR MÊS, NA UNIÃO EUROPEIA/ÁREA ECONÓMICA EUROPEIA (EFSA & ECDC, 2016). .....	16
<b>FIGURA 6.</b> CASOS CONFIRMADOS DE INFEÇÃO POR ESTIRPES DE <i>SALMONELLA</i> , DE 2008 A 2015, POR MÊS, NA UNIÃO EUROPEIA/ÁREA ECONÓMICA EUROPEIA (EFSA & ECDC, 2016). .....	18
<b>FIGURA 7.</b> SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> MAIS REPORTADOS NA UNIÃO EUROPEIA EM 2015 (ADAPTADO DE EFSA & ECDC, 2016). .....	20
<b>FIGURA 8.</b> GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR: FLUORESCÊNCIA VERSUS NÚMERO DE CICLOS, DO SOFTWARE CFX-96™, BIO-RAD®. .....	25
<b>FIGURA 9.</b> COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE ADN E LNA (ADAPTADO DE JENSEN, SINGH, KUMAR, WENGEL, & JACOBSEN, 2001). .....	26
<b>FIGURA 10.</b> RESPIRAÇÃO DO TETRATIONATO POR <i>SALMONELLA</i> (ADAPTADO DE THIENNIMITR ET AL., 2012). .....	30
<b>FIGURA 11.</b> QUANDO HÁ CRESCIMENTO/TURVAÇÃO EM AMBOS OS MEIOS, COMO REPRESENTA A PRIMEIRA IMAGEM À ESQUERDA, ESTAMOS PERANTE UMA ESTIRPE SELVAGEM. QUANDO APENAS HÁ CRESCIMENTO NO MEIO B, A ESTIRPE É DO TIPO VACINAL. EXCEPCIONALMENTE, PODERÁ EXISTIR UMA ESTIRPE SELVAGEM AUXOTRÓFICA MUITO RARA COMO REPRESENTA A ÚLTIMA IMAGEM. .....	32
<b>FIGURA 12.</b> POSIÇÃO DOS PRIMERS E DAS SONDAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE RT-PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DA ESTIRPE VACINAL NA REGIÃO GENÓMICA RELEVANTE (46 682 – 46 884 NT, NHAA), REFERENTE A <i>S. ENTERITIDIS</i> P125109. OS SNPs ENTRE AS ESTIRPES VACINAIS E A ESTIRPE VACINAL ENCONTRA-SE INDICADOS E NEGRITO (ADAPTADO DE MAURISCHAT ET AL., 2015). .....	39
<b>FIGURA 13.</b> COLÓNIAS CARACTERÍSTICAS DE <i>SALMONELLA</i> EM MEIO XLD (À ESQUERDA) E CS (À DIREITA), A PARTIR DE MSRV. 44	
<b>FIGURA 14.</b> REPICAGEM DE COLÓNIAS PRESUMIVELMENTE DIFERENTES DOS MEIOS XLD E CS, PROVENIENTES DE RVS (POOL 1), MKTTN (POOL 2) E MSRV (POOLS 3 E 4), PARA TUBOS COM ÁGUA ULTRAPURA (À ESQUERDA) E MEIO NA (À DIREITA). . 45	
<b>FIGURA 15.</b> AMPLIFICAÇÃO DO GENE NHAA PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESTIRPES VACINAIS E SELVAGENS DE <i>SALMONELLA</i> , POR RT-PCR, NA AMOSTRA SO482 (POOL 3 E 4, ASSINALADAS NA FIGURA COM P3 E P4), INCLUINDO O CONTROLO POSITIVO ( <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> ESTIRPE VACINAL) PARA O GENE NHAA ESPECÍFICO PARA ESTIRPES VACINAIS, ASSINALADO A LARANJA. O CONTROLO NEGATIVO PARA OS DOIS GENES ALVO ( <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC® 25923™) ENCONTRA-SE ASSINALADO A VERDE. ....	45
<b>FIGURA 16.</b> AMPLIFICAÇÃO DO CONTROLO INTERNO DE AMPLIFICAÇÃO (IAC) EM AMOSTRAS REAIS PERTENCENTES AO PLANO NACIONAL DE CONTROLO DE <i>SALMONELLA</i> . .....	46
<b>FIGURA 17.</b> AMPLIFICAÇÃO DO GENE TTR NA AMOSTRA ALIMENTAR 526 DO PLANO PIGA, INCLUINDO O CONTROLO POSITIVO PARA O GENE TTR ( <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> ATCC® 13076™, ASSINALADO A VERMELHO) POR RT-PCR. O CONTROLO NEGATIVO PARA O GENE TTR ( <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC® 25923™) ENCONTRA-SE ASSINALADO A VERDE. ....	47
<b>FIGURA 18.</b> AMPLIFICAÇÃO DO GENE TTR EM AMOSTRAS DO PIF (656 E 657) E DO PNCS (681,694,695 E 696), INCLUINDO O CONTROLO POSITIVO PARA O GENE TTR ( <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> ATCC® 13076™, ASSINALADO A VERMELHO) POR RT-PCR. O CONTROLO NEGATIVO PARA O GENE TTR ( <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC® 25923™) ENCONTRA-SE ASSINALADO A VERDE. ....	48
<b>FIGURA 19.</b> AMPLIFICAÇÃO DO GENE TTR NA AMOSTRA ALIMENTAR 708, INCLUINDO O CONTROLO POSITIVO PARA O GENE TTR ( <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> ATCC® 13076™, ASSINALADO A VERMELHO) POR RT-PCR. O CONTROLO NEGATIVO PARA O GENE TTR ( <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC® 25923™) ENCONTRA-SE ASSINALADO A VERDE. ....	48
<b>FIGURA 20.</b> AMPLIFICAÇÃO DO GENE NHAA PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESTIRPES VACINAIS E SELVAGENS DE <i>SALMONELLA</i> , POR RT-PCR, NAS AMOSTRAS DO PNCS 839 E 859, INCLUINDO O CONTROLO POSITIVO ( <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> ESTIRPE VACINAL) PARA O GENE NHAA ESPECÍFICO PARA ESTIRPES VACINAIS, ASSINALADO A LARANJA. O CONTROLO NEGATIVO PARA OS DOIS GENES ALVO ( <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC® 25923™) ENCONTRA-SE ASSINALADO A VERDE. ....	49

<b>FIGURA 21.</b> PLACAS DO MEIO PCA RESULTANTES DAS DILUIÇÕES SUCESSIVAS DE UM LEITE PARA A CONTAGEM DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBICOS. ....	54
<b>FIGURA 22.</b> COLÓNIAS CARACTERÍSTICAS NO MEIO VRBG AGAR, PARA CONTROLO INTERNO DO MEIO DE CULTURA. ....	55
<b>FIGURA 23.</b> CONFIRMAÇÃO DE COLÓNIAS SUSPEITAS PELA FERMENTAÇÃO DA GLUCOSE NA IMAGEM A, EM QUE O TUBO 1 (À ESQUERDA) E TUBO 2 (DO MEIO) CORRESPONDEM A DUAS COLÓNIAS SUSPEITAS E O TUBO 3 (À DIREITA) CORRESPONDE A UM TUBO PRÉ-INOCULADO (CONTROLO). A IMAGEM B CORRESPONDE AO CRESCIMENTO EM MEIO NA E A IMAGEM C AO TESTE DA PRODUÇÃO DE OXIDASE PARA CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA. ....	55
<b>FIGURA 24.</b> COLÓNIAS CARACTERÍSTICAS DE ESCHERICHIA COLI EM MEIO TBX. ....	58
<b>FIGURA 25.</b> DIFERENCIAÇÃO ENTRE LISTERIA MONOCYTOGENES (À ESQUERDA NA PLACA) E LISTERIA INNOCUA (À DIREITA NA PLACA) EM MEIO OCLA, PELA PRESENÇA DE HALOS OPACOS EM L. MONOCYTOGENES. ....	59
<b>FIGURA 26.</b> A IMAGEM A CORRESPONDE À AMOSTRA 496 (ANEXO XVIII) COM OS TESTES BIOQUÍMICOS A DEMONSTRAR UMA ESTIRPE QUE NÃO SALMONELLA PELO ANEL COR CEREJA NO CALDO TRIPTOFANO (PRIMEIRO TUBO À ESQUERDA), A NÃO DESCARBOXILAÇÃO DA LISINA (TERCEIRO TUBO) E A FORMAÇÃO DE AMÓNIA (COR CEREJA NO TUBO DA UREIA, O ÚLTIMO); A IMAGEM B REPRESENTA OS TESTES CLARAMENTE NEGATIVOS PARA SALMONELLA DA AMOSTRA 527; E POR FIM, A IMAGEM C CORRESPONDE À AMOSTRA 526 (ANEXO XVIII), COM OS TESTES BIOQUÍMICOS A CONFIRMAREM O GÉNERO SALMONELLA. ....	61
<b>FIGURA 27.</b> GALERIA DE IDENTIFICAÇÃO DE CONFIRMAÇÃO DE UMA AMOSTRA SUSPEITA DE SALMONELLA, PROVENIENTE DE UMA COLÓNIA ISOLADA EM NA. ....	61

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> ALGUNS DOS MÉTODOS NORMALIZADOS PARA A DETECÇÃO E CONTAGEM DE DIFERENTES MICRORGANISMOS E/OU TOXINAS. ....	5
<b>TABELA 2.</b> LISTAGEM DE ALGUNS MEMBROS DA FAMÍLIA CAMPYLOBACTERIACEAE E DAS DOENÇAS ASSOCIADAS EM HUMANOS (ADAPTADO DE HUMPHREY ET AL., 2007).....	8
<b>TABELA 3.</b> CARACTERÍSTICAS DE ALGUMAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS MAIS COMUNS (ADAPTADO DE PINCHUK ET AL., 2010).....	11
<b>TABELA 4.</b> EXEMPLOS DE CARACTERÍSTICAS DA FEBRE ENTÉRICA E DA SALMONELOSE NÃO TIFOIDE (ADAPTADO DE ANDINO & HANNING, 2015).....	21
<b>TABELA 5.</b> ALGUNS TIPOS DE FICHEIROS NO SOFTWARE CFX-96™, BIO-RAD®. ....	25
<b>TABELA 6.</b> TOTAL DE ESTIRPES UTILIZADAS PARA DESENVOLVIMENTO DA NOVA METODOLOGIA. ....	33
<b>TABELA 7.</b> SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS E DAS SONDAS DO TIPO TAQMAN UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE RT-PCR. ....	37
<b>TABELA 8.</b> ENSAIOS DE RT-PCR PARA OTIMIZAÇÃO DO DESENHO DO PERFIL TÉRMICO. ....	38
<b>TABELA 9.</b> RESULTADOS ESPERADOS E OBTIDOS APÓS ENSAIO DUPLEX DAS 105 ESTIRPES INICIAIS PROVENIENTES DO NA.....	40
<b>TABELA 10.</b> EXEMPLIFICAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA NORMA ISO 6579 PARA DESCARTAR FALSOS POSITIVOS OBTIDOS PELOS ENSAIOS DE RT-PCR. ....	42
<b>TABELA 11.</b> PROCEDIMENTO REALIZADO SEGUNDO A NORMA ISO 6579-1:2017 PARA IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA POR RT-PCR. ....	43
<b>TABELA 12.</b> CARACTERÍSTICAS DE CAMPYLOBACTER SPP. (ADAPTADO DE ISO/TS 10272-1:2006). ....	56
<b>TABELA 13.</b> CONTROLOS POSITIVO E NEGATIVO PARA AS DIFERENTES ANÁLISES REALIZADAS NO LMA DO INIAV, I.P.....	62

## ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALOA	Agar Listeria Ottavani & Agosti
APHA	Animal and Plant Health Agency
ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
BPW	<i>Buffered Peptone Water</i> (referido por APT - Água Peptonada Tamponada)
CAA	Controlo Oficial de Alimentação Animal
CE	Comunidade Europeia
CEEA	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
CFA	CampyFood ID
CPA	Superfamília dos antiporte monovalentes catião/anião
CS	<i>ChromoSalmonella</i>
CSB/CFL	Câmara(s) de Segurança Biológica ou Câmara(s) de Fluxo Laminar
DEC	<i>Escherichia coli diarrheagenic</i> (que causam diarreia)
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados
ECDC	<i>European Center for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças)
EcNhaA	Antiporte NhaA em <i>Escherichia coli</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)
EIEC	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELFA	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
EPEC	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> enteropatogénicas
ETEC	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénicas
EU-RL	<i>European Reference Laboratory</i> (Laboratório Europeu de Referência)
Eurostat	Gabinete de Estatística da União Europeia
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Estados Unidos da América)
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i> (Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência)
GHP	<i>Good Hygiene Practice</i> (Boas Práticas de Higiene)
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i> (Boas Práticas de Fabrico)
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)
HPA	<i>Health Protection Agency</i> (Agência de Proteção da Saúde)
<i>i.e.</i>	<i>id est</i>
IAC	<i>Internal Amplification Control</i> (Controlo Interno de Amplificação)
INIA	Instituto Nacional de Investigação Agrária
INIAV, I.P.	Instituto Nacional de Alimentação Agrária e Veterinária, I.P.
INRB	Instituto Nacional dos Recursos Biológicos
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera

<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> (Organização Internacional de Normalização)
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
<b>LMA</b>	Laboratório de Microbiologia dos Alimentos
<b>LNA</b>	<i>Locked Nucleic Acids</i> (Ácidos Nucleicos Bloqueados)
<b>LNIV</b>	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
<b>mCCD</b>	<i>Modified charcoal cefoperazone Deoxycholate</i>
<b>MKTTn</b>	<i>Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin</i>
<b>MRSA</b>	Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina
<b>MSRV</b>	<i>Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis</i>
<b>NA</b>	<i>Nutrient Agar</i>
<b>NRL</b>	<i>National Reference Laboratory</i> (Laboratório Nacional de Referência)
<b>OCLA</b>	<i>Oxoid Chromogenic Listeria Agar</i>
<b>PCA</b>	<i>Plate Count Agar</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em Cadeia)
<b>PIF</b>	Postos de Inspeção Fronteiriços
<b>PIGA</b>	Plano de Inspeção de Géneros Alimentícios
<b>PNCS</b>	Plano Nacional de Controlo de <i>Salmonella</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reactivas de Oxigénio)
<b>RVS</b>	<i>Rappaport-Vassiliadis Soya</i>
<b>RT-PCR</b>	PCR em Tempo Real
<b>SE</b>	Enterotoxina estafilocócica
<b>SHU</b>	Síndrome Hemolítica Urémica
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo específico de um nucleótido)
<b>STEC/EHEC</b>	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga (sinónimo de VTEC – estirpe de <i>Escherichia coli</i> produtora de Verocitotoxina)/ enterohemorrágicas
<b>StNhaA</b>	Antiporte NhaA em <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2
<b>Stx</b>	Genes da toxina Shiga (sinónimo de <b>vtx</b> )
<b>Stx</b>	Toxina Shiga (sinónimo de Vtx)
<b>TBX</b>	<i>Tryptone Bile X-glucuronide agar</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de <i>Melting</i>
<b>TSA</b>	<i>Tryptone Soya Agar</i>
<b>TSI</b>	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
<b>EU</b>	União Europeia
<b>UEIS-TSA</b>	Unidade(s) Estratégica(s) de Investigação e Serviços – Tecnologia e Segurança Alimentar
<b>ufc</b>	Unidade formadora de colónias
<b>VRBGA</b>	<i>Violet red bile glucose agar</i>
<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Sequenciação Total do Genoma)
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde, OMS)
<b>XLD</b>	<i>Xylose Lysine Dehoxycolate</i>

## 1. Introdução

O estágio curricular é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Microbiologia da Universidade de Aveiro, tendo este sido iniciado a 10 de outubro de 2016 e finalizado a 10 de julho de 2017, sob a orientação da Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Dr. Hugo Rafael da Silva Mateus Fernandes Guedes, Técnico Superior do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Unidade de Tecnologia e Segurança Alimentar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.). Durante o intervalo referido foi desenvolvida uma nova metodologia, através da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em Tempo Real (RT-PCR) que permite a deteção de *Salmonella spp.*, em amostras suspeitas em meio Rappaport-Vassiliadis semissólido modificado (MSRV) e após repicagem para meio Xylose Lysine Deoxycholate (XLD). Sendo uma reação multiplex (*i.e.*, duas sondas diferentes que se ligam a alvos diferentes), permite a distinção entre a estirpe vacinal de *Salmonella* e estirpes selvagens. Foram realizadas outras atividades tais como o acompanhamento das análises de rotina, controlo ambiental, auditorias interna e externa e controlos de qualidade interno e externo (*e.g.*, ensaios interlaboratoriais) e ambiental do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos (LMA). O plano de atividades desenvolvido teve como objetivos a aquisição e aprofundamento de conhecimentos, aptidões e prática relacionadas com a Microbiologia e Segurança Alimentar e Veterinária que decorreu em ambiente laboratorial acreditado durante nove meses, com um total previsto de 1458 horas realizadas.

O Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV) é o Laboratório de Estado, da área de competências da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, que desenvolve atividades de investigação nas áreas agrónoma e veterinária. Esta denominação, criada em 2012, resultou da fusão das atribuições relacionadas com a investigação agrária (Instituto Nacional de Investigação Agrária, INIA) e veterinária (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, LNIV) do antigo Instituto Nacional dos Recursos Biológicos I.P. (INRB), tendo as atribuições deste, relativas às áreas das pescas e da aquicultura, sido incorporadas no Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P. (IPMA). Esta junção permitiu uma diminuição dos custos e o aumento da produtividade, associadas a um melhor suporte técnico e aconselhamento científico, a uma centralização dos Laboratórios Nacionais de Referência (NRL), a uma rápida resposta analítica assim como a prevenção de duplicação de métodos nos laboratórios mais pequenos. Assim, constituiu-se um Laboratório distribuído por locais-chave, em oito distritos.

O LMA pertence a uma das Unidades Estratégicas de Investigação e Serviços, nomeadamente à de Tecnologia e Segurança Alimentar (UEIS-TSA), cujos objetivos passam pelas atividades de investigação, desenvolvimento, experimentação e inovação. Situado no Pólo de Vairão, o LMA é constituído por oito salas de trabalho laboratorial, nas quais as salas D.5 e D.6 se designam por «Preparatório», onde se preparam e se distribuem meios de cultura, e se realiza o controlo dos mesmos, de acordo com a norma ISO 11133:2014, onde se preparam e autoclavam os materiais cirúrgicos (*e.g.*, pinças, bandejas, tesouras e colheres) e onde é realizada a verificação interna de micropipetas. A pesquisa da presença de enterotoxinas estafilocócicas em queijos é feita na sala D.7 por se tratar de um método imunológico (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*, ELFA) e na sala D.8, que contém duas Câmaras de Segurança Biológica/Câmaras de Fluxo Laminar (CSB/CFL) e



uma bancada central, realizam-se as colheitas das amostras alimentares, ambientais e de produção primária, nas respetiva CSB/CFL. Nesta sala também se procede à preparação das suspensões iniciais das amostras e executam-se as diluições e incorporações para a enumeração de microrganismos. Na sala D.9 é feita a leitura e repicagem das placas das amostras, realizam-se testes de confirmação bioquímicos e serológicos, e a coloração de Gram. As estufas de 25°C, 37°C (para amostras alimentares), 37°C (para amostras provenientes de produção primária) e 30°C (contagem de microrganismos e controlo ambiental) encontram-se na sala D.10. A sala D.11 contém os equipamentos necessários à realização dos testes de biologia molecular (*End-Point* PCR e RT-PCR). A sala D.12 contém vários frigoríficos e a estufa de 41.5°C (Produção Primária e Alimentos). Na sala D.13, encontra-se o equipamento para a realização de eletroforese em gel.

Durante todo o período de estágio foi possível acompanhar a rotina laboratorial para compreender o conceito de segurança alimentar, os perigos que colocam em causa esta segurança e quais as suas consequências (*i.e.*, doenças de origem alimentar), e em paralelo trabalhar na pesquisa para o desenvolvimento da metodologia diferenciadora de estirpes vacinal e selvagens de *Salmonella* em RT-PCR. A rotina consiste na aplicação de diferentes planos comunitários, seguindo a evolução das políticas e da legislação aplicada aos géneros alimentícios e a outras amostras tais como o Plano de Inspeção de Géneros Alimentícios (PIGA) que visa assegurar o cumprimento das obrigações relativas à vigilância de zoonoses e de agentes zoonóticos previstas no Decreto-Lei N.º 193/2004 do Conselho de 17 de Dezembro, relativa às medidas de proteção contra zoonoses e certos agentes zoonóticos em animais e produtos de origem animal a fim de evitar focos de infeção e de intoxicação, bem como as obrigações constantes em outras disposições do Regulamento (CE) N.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril e do Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril. Também são analisadas amostras de produtos para consumo humano ou outros produtos tais como alimentos refrigerados, congelados, embalados ou produtos da pesca dos Postos de Inspeção Fronteiriço (PIF), sejam portos ou aeroportos. O Plano Nacional de Controlo de *Salmonella* (PNCS) é cumprido para bandos de reprodução, bandos de galinhas poedeiras, em frangos e em bandos de perus, e o Controlo Oficial da Alimentação Animal (CAA) que, ao abrigo do Regulamento (CE) N.º 882/2004, valida as diversas atividades dos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais, em todas as suas fases, desde a produção primária de alimentos para animais até à sua colocação no mercado, incluindo a alimentação de animais produtores de géneros alimentícios e a importação de alimentos para animais provenientes de países terceiros.

Como o INIAV, I.P. é um Laboratório Nacional de Referência e de modo a ser feito um controlo de qualidade externo, são ainda realizados ensaios interlaboratoriais para *Salmonella* spp., estirpes de *Escherichia coli* produtoras da toxina Shiga (STEC), *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes*, provenientes dos Laboratórios Europeus de Referência (EU-RL), da Agência de Proteção da Saúde (*Health Protection Agency*, HPA) e da Agência de Saúde Animal e de Plantas (*Animal and Plant Health Agency*, APHA). As amostras analisadas no INIAV, I.P. provêm de alimentos de origem animal e vegetal para consumo humano, alimentos para animais, produção primária (*e.g.*, botas para esfregaço, fezes e forro dos ninhos dos animais) e são colhidas pelas direções regionais, veterinários oficiais e por particulares de diversas regiões de Portugal.

O objetivo do presente estágio curricular no LMA do INIAV consistiu principalmente no desenvolvimento e implementação de uma metodologia de deteção e de diferenciação de estirpes de *Salmonella* por RT-PCR na rotina do laboratório. Para além deste objetivo, também foi interessante o acompanhamento da rotina já existente, executando as diferentes normas de pesquisa e contagem dos microrganismos em diferentes matrizes, analisados neste laboratório, através das respetivas normas da Organização Internacional de Padronização (ISO). Esta metodologia traz vantagens não só pela possibilidade da redução nos gastos de consumíveis como também, entre 2 a 3 dias após a receção das amostras, ser exequível confirmar se é *Salmonella* ou não, e caso seja, em amostras provenientes da produção primária, diferenciar-se o serotipo vacinal dos selvagens. Assim, o apoio aos produtores, por parte do INIAV, I.P. vai de encontro aos objetivos estabelecidos, facilitando a libertação dos bandos de aves, evitando perdas económicas pela demora no tempo de análise.

## 2. Enquadramento geral

### 2.1 Segurança alimentar e riscos microbiológicos

A segurança alimentar tem-se tornado um conceito cada vez mais recorrente na sociedade atual, uma vez que os produtos alimentares são cada vez mais processados, comercializados e amplamente distribuídos a nível mundial, criando insegurança por parte dos consumidores face aos alimentos que consomem e quais os efeitos nocivos desse consumo. O estilo de vida da população tem sido alterado na medida em que são consumidos mais produtos prontos para consumo ou são feitas mais refeições fora do ambiente familiar, adicionando o facto de existir uma maior esperança média de vida resultando no envelhecimento da população e na sua vulnerabilidade. Atualmente o conceito reconhecido oficialmente pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) estabelece que a segurança alimentar existe «quando as pessoas têm, a qualquer momento, acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos que permitam satisfazer as suas necessidades nutricionais e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável».

Os fatores mais implicados no desenvolvimento de doenças (ou infeções) de origem alimentar é o manuseamento e processamento de produtos alimentares pelo Homem, a contaminação cruzada (*e.g.*, contaminação de um alimento pela utilização de um equipamento já contaminado por outro produto) e a utilização de temperaturas inadequadas na conservação e preparação dos produtos alimentares (de Souza & da Silva, 2002). Uma vez que as contaminações microbiológicas em alimentos constituem um enorme risco para a saúde pública, devido à gravidade das doenças associadas ao consumo destes alimentos e ao grande número de produtos e microrganismos que podem estar envolvidos, deve assegurar-se um bom armazenamento e uma boa higiene durante a produção dos alimentos de modo a reduzir o risco de infeção (Adamus-Bialek & Wawszczak, 2015). Atualmente são utilizados sistemas de controlo de qualidade no setor alimentar para prevenir e minimizar os riscos microbiológicos em alimentos, através da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (*Hazard Analysis and Critical Control Points*, HACCP), e Códigos de Boas Práticas de Fabrico (*Good Manufacturing Practices*, GMP) e de

Higiene (*Good Hygiene Practice, GHP*), de forma a avaliar o produto acabado. Estes sistemas são elaborados com base em riscos conhecidos e não, necessariamente, em potenciais riscos que se possam vir a desenvolver. Como é o caso do programa de HACCP que consiste na identificação, avaliação, controlo e prevenção de perigos em todos os estágios do processo de produção do alimento (de Souza & da Silva, 2002). O Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, prevê apenas a aplicação de Códigos de Boas Práticas Agrícolas e de Higiene adequadas às explorações, não obrigando a aplicação dos princípios da HACCP.

A presença de microrganismos nos alimentos pode ter um efeito benéfico ou prejudicial para a saúde humana. Desde há muito tempo que as bactérias são utilizadas na produção de alimentos (*e.g.* leite e derivados, pão, cerveja) e estão presentes em quase todos os produtos alimentares vendidos (Adamus-Bialek & Wawszczak, 2015). Os alimentos devem ser monitorizados em termos de concentração de metais pesados, quantidade de pesticidas e nitratos, presença de antibióticos e contaminação microbiana, visto que o consumo de alimentos contaminados representa um elevado risco de envenenamento podendo levar à morte (Mead *et al.*, 1999). Assim, as doenças alimentares podem ter origem química ou biológica. A contaminação química é feita, normalmente, devido a conservantes, corantes, antibióticos e pesticidas, apresentando-se como uma ameaça para toda a sociedade, enquanto os contaminantes microbianos ameaçam especialmente pessoas pertencentes a grupos de alto risco (*e.g.*, crianças, idosos, grávidas e pacientes imunodeprimidos). Estes grupos de alto risco devem ter em atenção a qualidade e a origem dos produtos consumidos, e segundo a agência do departamento de saúde dos Estados Unidos da América (*Food and Drug Administration, FDA*), existem diferentes categorias de alimentos que devem ser evitados por estes grupos, tais como carne crua ou mal cozinhada, marisco fumado ou parcialmente cozinhado, moluscos, peixe cru, leite cru ou não pasteurizado e os seus derivados (*e.g.*, queijos e iogurtes), ovos crus e mal cozinhados ou alimentos que os contêm, vegetais mal lavados e por fim, sumos de fruta e/ou vegetais não pasteurizados (FDA, s.d.). A contaminação de origem biológica é causada por agentes patogénicos e/ou pelas suas toxinas, tais como bactérias, fungos, vírus e parasitas, denominando-se por agentes patogénicos de origem alimentar (Thomas *et al.*, 2013; Zhao, Lin, Wang, & Oh, 2014). As bactérias constituem o grupo mais importante, tanto pela sua diversidade como pela sua incidência nos alimentos, nos quais em condições favoráveis, são capazes de se multiplicar rapidamente originando diversas doenças (Veiga *et al.*, 2009). Entre os agentes bacterianos mais conhecidos e que são responsáveis por um maior número de surtos de origem alimentar estão *Escherichia coli* O157:H7 e outras estirpes produtoras da toxina Shiga (STEC), *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp., *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* e *Clostridium perfringens* (Law, Ab Mutalib, Chan, & Lee, 2015).

As doenças de origem alimentar podem ser causadas através de três mecanismos diferentes, seja pela ingestão oral de microrganismos viáveis (*i.e.*, infeção), pela ingestão de toxinas que os mesmos produzem, mas em quantidades suficientes para desenvolver uma patologia (*i.e.*, intoxicação), ou por uma combinação de ambos (*i.e.*, toxico infeção) (de Souza & da Silva, 2002). Estas doenças têm aumentado nos últimos anos, resultando em graves problemas de saúde humana (Bhatt, Nagar, Nagar, & Tyagi, 2016) e, de acordo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, WHO*) cerca de 600 milhões de pessoas ficaram doentes após

consumirem alimentos contaminados em 2015, é estimado que 420 000 pessoas morrem anualmente devido a infeções alimentares (WHO, 2015). Contudo, e apenas devido a doenças que originam diarreia, estima-se que cerca de 230 000 pessoas morrem todos anos (WHO, 2015). É então necessário, detetar estes agentes patogénicos de origem alimentar e reconhecer os problemas associados com a segurança e saúde humanas (Bhatt *et al.*, 2016).

Os alimentos e a água constituem as principais fontes de agentes patogénicos de origem microbiana nos países em desenvolvimento, uma vez que são ótimos ambientes para o seu crescimento (Zhao *et al.*, 2014; Bhatt *et al.*, 2016). O número e a composição de espécies de microrganismos dependem das condições ambientais que estimulam ou inibem o seu crescimento, que incluem a atividade da água, temperatura, humidade relativa do ar, pH do ambiente, pressão residual, disponibilidade de oxigénio e presença de sais (catiões e aniões), de acordo com Muller (1990), citado por Adamus-Bialek & Wawszczak (2015). Devido às condições específicas de crescimento dos microrganismos patogénicos a análise microbiológica dos alimentos é processada através de vários métodos normativos, segundo normas da Organização Internacional de Normalização (ISO) (Tabela 1). Devido à propagação de microrganismos nos alimentos, a infeção alimentar causada por fatores biológicos deve ser sempre reportada. Atualmente existe uma variedade de técnicas já desenvolvidas para analisar as amostras alimentares e detetar estes agentes patogénicos. A deteção destes agentes através dos métodos convencionais é demorada e requer bastantes consumíveis, no entanto, os métodos rápidos constituem uma boa alternativa ou complemento visto serem mais eficientes, sensíveis e mais específicos (Bhatt *et al.*, 2016). De um modo geral, estas técnicas desempenham um papel fundamental na prevenção e no tratamento de doenças com origem no consumo de alimentos contaminados (Bhatt *et al.*, 2016).

**Tabela 1.** Alguns dos métodos normalizados para a deteção e contagem de diferentes microrganismos e/ou toxinas.

Norma ISO /Regulamento	Microrganismo e/ou toxina
ISO/TS 10272-1:2006	Deteção de <i>Campylobacter</i> spp..
ISO 4833-1:2013 (E)	Contagem de Microrganismos a 30°C.
ISO 21528-2:2004	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> .
Critério 1.1.21 do Regulamento EC N.º 2073/2005 de 25 de novembro de 2005	Deteção de enterotoxinas estafilocócicas.
ISO/TS 13136:2012	Deteção de <i>Escherichia coli</i> STEC.
ISO 11290	Deteção e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> .
ISO 6579-1:2017	Deteção de <i>Salmonella</i> spp.

## 2.2 Legislação Portuguesa e Europeia em microbiologia alimentar

De acordo com o Decreto-Lei N.º 193/2004, a proteção da saúde humana contra doenças e infeções que sejam direta ou indiretamente transmissíveis entre os animais e o homem é extremamente importante. Estas doenças – ou zoonoses -, quando são transmitidas através dos alimentos, para além de colocarem em risco a saúde humana, causam prejuízos económicos na indústria alimentar. Assim, a qualidade microbiológica dos alimentos tornou-se num fator essencial para os operadores do setor alimentar bem como para as autoridades competentes, cujo dever é fazer cumprir a legislação alimentar, definida pelas «disposições legislativas,

regulamentares e administrativas que regem os géneros alimentícios em geral e a sua segurança em particular, a nível quer comunitário quer nacional, abrangendo todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios, bem como de alimentos para animais produzidos para, ou dados a, animais produtores de géneros alimentícios», de acordo com o Decreto-Lei N.º 193/2004.

Na União Europeia foram estabelecidos critérios microbiológicos para alimentos específicos, aplicáveis ao longo do ciclo de produção e transformação dos alimentos, incluindo as indústrias de exportação e importação. Deste modo, os géneros alimentícios não devem conter microrganismos, toxinas ou metabolitos que representem risco para a saúde pública. O Regulamento (CE) N.º 853/2004 estabelece regras específicas para os operadores das empresas do sector alimentar no que se refere à higiene dos géneros alimentícios de origem animal. Estas regras complementam as previstas no Regulamento (CE) N.º 852/2004 e são aplicáveis aos produtos de origem animal transformados e não transformados. Relativamente aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais, aos géneros alimentícios e às normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais está em vigor o Regulamento (CE) N.º 882/2004.

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (Anexo I), existem critérios microbiológicos estabelecidos para certos microrganismos, incidindo particularmente sobre *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, mas também sobre microrganismos mesófilos aeróbicos, Enterobacteriaceae, enterotoxinas estafilocócicas e *Escherichia coli*. Este regulamento também abrange as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do setor alimentar, quando aplicarem as medidas de higiene gerais e específicas, tais como critérios de higiene dos processos, regras gerais em matéria de amostragem e preparação de amostras para análise. Os métodos de referência para a pesquisa destes microrganismos são realizados de acordo com as normas ISO pertinentes e as diretrizes do *Codex Alimentarius*.

### 2.3 Microrganismos patogénicos: doenças e surtos associados ao consumo de alimentos contaminados

As doenças de origem alimentar são, usualmente, definidas como doenças de natureza infecciosa e/ou tóxica causadas por agentes zoonóticos, sendo «qualquer vírus, bactéria, fungo, parasita ou outra entidade biológica suscetível de provocar uma zoonose» (Decreto-Lei N.º 193/2004), que entram no nosso corpo através da ingestão de alimentos (Hunt, Abeyta, & Tran, 1998; Rosenquist, Bengtsson, & Hansen, 2007). De acordo com o Decreto-Lei N.º 193/2004 é importante assegurar a vigilância das zoonoses, dos agentes zoonóticos e das resistências microbianas conexas, assim como deverá proceder-se a uma investigação epidemiológica adequada dos focos patogénicos de origem alimentar, de forma a que possam ser recolhidas informações necessárias na comunidade para permitir a avaliação das tendências e das origens das doenças/infeções. Entre as zoonoses e os agentes zoonóticos a incluir na vigilância encontram-se a brucelose, campilobacteriose, equinococose, listeriose, salmonelose e triquinoses com os respetivos agentes, tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* e ainda estirpes de

*Escherichia coli* verotoxigénicas. A troca de informações relacionadas com estas zoonoses e com os agentes é muito importante para descrever tendências e severidade dos surtos.

Anualmente é emitido um relatório elaborado pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*, EFSA) em colaboração com o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) que visa sumariar as tendências e as fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e os surtos com origem no consumo de alimentos contaminados, na União Europeia (UE). Em 2015, registaram-se cerca 222 913 casos de infeção por *Campylobacter* spp., 5 901 casos de *Escherichia coli* STEC, 2 206 de *Listeria* spp. e 94 625 de *Salmonella* spp. (Anexo II).

### 2.3.1 *Campylobacter* spp.

A família Campylobacteriaceae compreende bactérias de Gram negativo em forma de espiral com cerca de 18 espécies e 6 subespécies (Tabela 2) (Humphrey, O'Brien, & Madsen, 2007). Estas bactérias diferem de outros agentes patogénicos associados a surtos e doenças de origem alimentar por apresentarem um melhor crescimento a 41.5°C em atmosfera de microaerofilia com aproximadamente 10% de dióxido de carbono, 5% de oxigénio e 85% de azoto (Hunt *et al.*, 1998; ISO 10272, 2006; Rosenquist *et al.*, 2007). As espécies patogénicas para o homem apresentam um intervalo de temperatura limitante para o seu crescimento (*i.e.*, entre 30°C a 46°C), e por isso são denominadas espécies termófilas (Humphrey *et al.*, 2007). Estas espécies são ubíquas na natureza, sendo transportadas no intestino de diversos animais e contaminam diversos alimentos crus, sejam de origem animal ou vegetal. Embora quase sempre sejam inócuas, podem causar infeções no sistema reprodutor em certas espécies de animais domésticos, levando ao aborto e/ou à infertilidade (Humphrey *et al.*, 2007). Contudo, são principalmente conhecidas como agentes patogénicos zoonóticos transmitidos pelos alimentos. A maior parte destas infeções por *Campylobacter* são originadas pelas espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, no entanto, em certos países em desenvolvimento a espécie *Campylobacter upsaliensis* também tem sido associada a estas infeções. O género *Campylobacter* pode causar doenças graves em pessoas infetadas, contudo as diferenças no comportamento deste agente patogénico no homem e nos restantes animais ainda não são totalmente compreendidas, mas é provável que sejam devidas a diferentes expressões genéticas bacterianas nos diferentes hospedeiros (Humphrey *et al.*, 2007). A infeção por *C. jejuni* é o fator mais comum de predisposição a diferentes neuropatias periféricas e reumáticas, tais como a síndrome Guillain-Barré e a variante não-paralisante da síndrome de Miller-Fisher (Nachamkin, 2002). Contudo, nem todas as estirpes de *C. jejuni* possuem a capacidade de causar estas doenças e mesmo as estirpes associadas a estas duas síndromes apresentam diferenças entre si (Takahashi, Koga, Yokoyama, & Yuki, 2005).

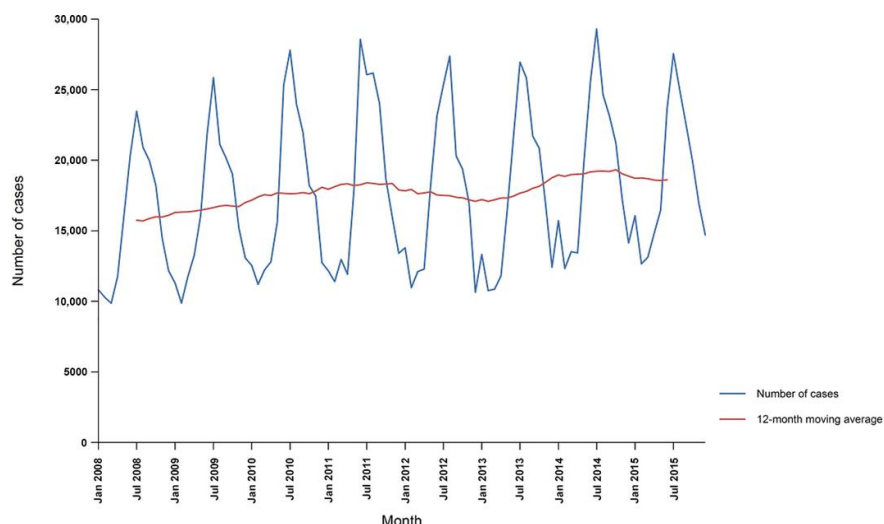
**Tabela 2.** Listagem de alguns membros da família *Campylobacteriaceae* e das doenças associadas em humanos (adaptado de Humphrey *et al.*, 2007).

Espécie	Fontes conhecidas	Doenças associadas
<i>C. coli</i>	Suínos, aves, bovinos e ovinos	Gastroenterite, septicémia
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Homem	Gastroenterite, gastrite, septicémia
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Aves, suínos, bovinos, ovinos, cães, gatos, água, coelhos e insetos	Gastroenterite, septicémia, meningite, aborto, proctite, SGB <sup>1</sup>
<i>C. lari</i>	Aves, água, cães, gatos, macacos, focas	Gastroenterite, septicémia
<i>C. upsaliensis</i>	Cães e gatos	Gastroenterite, septicémia
<i>C. hominis</i>	Humanos	Gastroenterite em imunodeprimidos
<i>C. mucosalis</i>	Suínos	Nenhuma (até 2007)

<sup>1</sup> SGB: Síndrome de Guillain–Barré

A infecção por *Campylobacter* (ou campilobacteriose) pode ter um período de incubação de 1 a 10 dias, com a maioria dos doentes a apresentar sintomas clínicos a partir do quarto dia. É uma infecção caracterizada por diarreia profusa, muitas vezes acompanhada por hemorragias (particularmente em crianças), dor abdominal aguda, febre, mal-estar, náuseas e, ocasionalmente, vômitos (Adak, Long, & O’Brien, 2002). A recuperação passa pela manutenção de um equilíbrio de fluídos adequado e por repouso, tal como acontece com outras infecções entéricas. A antibioterapia para infecções ligeiras por *Campylobacter* raramente é indicada, uma vez que a resistência microbiana a antibióticos, especialmente macrólidos e fluoroquinolonas, tem aumentado em *Campylobacter*. De acordo com Helms, Simonsen, Olsen, & Mølbak, 2005 relataram evidências de que pacientes infetados com estirpes resistentes a antibióticos apresentaram doenças invasivas, e até morte, face a pacientes infetados com estirpes sensíveis a antibióticos. Estes factos aumentam a necessidade de limitar a utilização de antimicrobianos na clínica veterinária e medicinal de modo a prevenir a ocorrência de resistências.

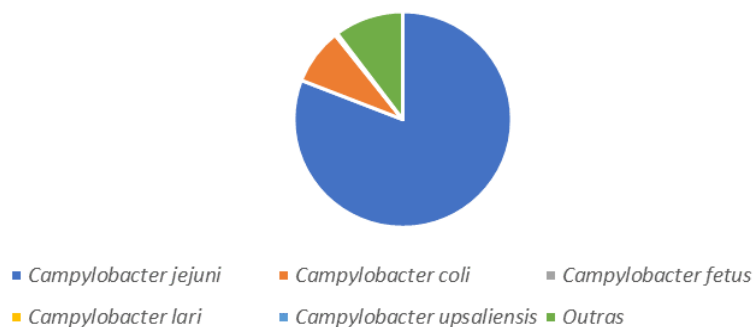
A infecção por *Campylobacter* tem sido a zoonose mais reportada na UE desde 2005, com 229 213 casos confirmados em humanos em 2015 (Figura 1) representando um decréscimo de 7 605 casos, comparativamente com os dados relativos a 2014. E foi também em 2015 que pela primeira vez 27 Estados-membro, incluindo Portugal reportaram esta infecção. Contudo, o aumento dos casos reportados em alguns países nos últimos anos reflete não só alterações na exposição a esta bactéria como também melhorias nos sistemas de vigilância epidemiológica (Emborg *et al.*, 2015). Uma das características proeminentes da epidemiologia de *Campylobacter* é a sua sazonalidade (Humphrey *et al.*, 2007), com um aumento das infecções nos meses de verão e início de outono, bem proeminente entre 2008 e 2015 (EFSA & ECDC, 2016). Têm sido observados picos de infecção no inverno podendo ser atribuídos às refeições tradicionais de Natal e de Ano Novo, especialmente as servidas com carne de frango (Bless *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Casos confirmados de infeção por *Campylobacter*, por mês, de 2008 a 2015 na União Europeia/Área Económica Europeia (EFSA & ECDC, 2016).

O Chipre, Letónia, Lituânia, Polónia, Roménia e Reino Unido foram os países com maior número de hospitalizações, entre os 17 países que forneceram dados relativos a esta informação. O número de mortes atribuídas a esta infeção aumentou de 25, de 2014, para 59, em 2015 (EFSA & ECDC, 2016).

Cerca de metade dos casos reportados relataram a espécie de *Campylobacter* associada à infeção, nos quais, 81% dos casos estão associados a *Campylobacter jejuni*, 8.4% a *Campylobacter coli*, 0.2% a *Campylobacter fetus*, 0.1% a *Campylobacter lari* e 0.09% a *Campylobacter upsaliensis*. Outras espécies representaram 10.3% dos casos, contudo a grande maioria foram referidos a nível nacional como «*C. jejuni*/*C. coli*/*C. lari* não diferenciados» (Figura 2) (EFSA & ECDC, 2016).



**Figura 2.** Distribuição das espécies do género *Campylobacter* na União Europeia em 2015 (Adaptado de EFSA & ECDC, 2016).

Em relação aos alimentos, a carne de frango foi considerada a nível europeu e a nível nacional (Anexo III) a principal fonte desta doença em humanos em 2015, e não foi detetada a presença de *Campylobacter* em unidades testadas de leite cru de vaca destinado ao consumo humano direto ou para pasteurização (EFSA & ECDC, 2016).

A presença de *Campylobacter* spp. é relativamente elevada em alimentos chave como carne de aves, em particular na carne de frango, pois estas espécies animais apresentam maiores níveis de consumo (Humphrey *et al.*, 2007), então, a UE propôs um projeto - o CamCon - cujo objetivo era melhorar o controlo de *Campylobacter* na produção primária na Europa, e assim



permitir uma produção de «frangos de baixo risco». Este projeto era constituído por um consórcio de seis Estados-membro (Dinamarca, Holanda, Polónia, Portugal, Espanha e Reino Unido) e um Estado-não-membro (Noruega), representando assim diferentes partes da Europa. Os resultados demonstraram as iniciativas de biossegurança para reduzir a prevalência de *Campylobacter* nos países nórdicos e ocidentais (EFSA & ECDC, 2016).

### 2.3.2 Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas são membros de uma família com mais de 20 exotoxinas estafilocócicas e estreptocócicas relacionadas funcionalmente e que partilham sequências homólogas (Pinchuk, Beswick, & Reyes, 2010). Estas proteínas bacterianas são conhecidas por serem pirogénicas e estarem associadas a doenças importantes para o Homem (*e.g.*, intoxicações alimentares e a síndrome do choque tóxico) (Pinchuk *et al.*, 2010). Estas toxinas são maioritariamente produzidas pela espécie *Staphylococcus aureus* (estafilococos, em linguagem comum) um agente patogénico ubíquo e oportunista de Gram positivo que coloniza o Homem e também animais domésticos, contudo existem outras espécies que também se apresentam enterotoxigénicas (Pinchuk *et al.*, 2010). Estima-se que cerca de 20% da população em geral transporta esta bactéria (Kluytmans & Belkum, 1997), sendo as narinas o local de colonização mais frequente em seres humanos, aumentando o risco de infeções quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas. A infeção tem um período curto de incubação desde alguns minutos até 6 a 7 horas, a partir do momento que a toxina está pré-formada e os sintomas incluem náuseas, vómitos, dores abdominais e diarreia (Pinchuk *et al.*, 2010). A resistência destas toxinas à inativação por proteases gastrointestinais (incluindo pepsina, tripsina, renina e papaína) (Le Loir, Baron, & Gautier, 2003) permite que se mantenham ativas no intestino. von Eiff, Becker, Machka, Stammer, & Peters, (2001) concluíram que a frequência de infeções é maior em portadores do que em não portadores e que os não portadores adquirem as infeções através de alimentos contaminados, ou quando portadores contaminam os alimentos através da manipulação e preparação dos mesmos (Pinchuk *et al.*, 2010).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria anaeróbia facultativa formadora de colónias de cor amarela que possuem alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) ou dupla ( $\alpha + \beta$ ) hemólise em meio de cultura agar de sangue (Morandi, Brasca, Andrighetto, Lombardi, & Lodi, 2009). Este agente patogénico é versátil e pode causar uma ampla gama de infeções devido aos fatores de virulência que possui e que estão maioritariamente associados a enzimas, citotoxinas, exotoxinas e toxinas esfoliativas. A função principal destas enzimas é transformar os componentes do hospedeiro em nutrientes, para que as bactérias os possam utilizar para o seu crescimento. As exotoxinas incluem as enterotoxinas estafilocócicas e toxinas da síndrome do choque tóxico (Pinchuk *et al.*, 2010). A maior parte dos genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas estão localizados em elementos móveis tais como plasmídeos, profagos e ilhas de patogenicidade (Lindsay, Ruzin, Ross, Kurepina, & Novick, 1998). Além disso, a transferência horizontal de genes entre estas estirpes não é rara, podendo envolver a transferência de mais do que uma enterotoxina (Varshney *et al.*, 2009).

Embora existam diferentes enterotoxinas estafilocócicas (SE), apenas algumas delas foram mais estudadas. As mais comuns são SEA e SEB, e tal como demonstra a Tabela 3, a SEA é a toxina mais comum nas intoxicações alimentares e a toxina SEB, embora também associada a

estas intoxicações, foi estudada pelo seu potencial uso como uma arma biológica por inalação, tal como descrito por Ler *et al.*, (2006), citado por Pinchuk *et al.*, (2010).

**Tabela 3.** Características de algumas enterotoxinas estafilocócicas mais comuns (Adaptado de Pinchuk *et al.*, 2010).

Enterotoxinas estafilocócicas	Característica
SEA	Intoxicações alimentares (muito associada).
SEB	Uso como arma química.
SEC	Isolada de animais.
SED	Intoxicações alimentares.
SEE	Intoxicações alimentares.
SEF	Síndrome de choque tóxico.
SEG	Intoxicações alimentares (pouco associada).
SEH	Intoxicações alimentares.
SEI	Intoxicações alimentares (pouco associada).

No relatório sumário da UE, os surtos causados por toxinas bacterianas incluíam aqueles que estão associados com as toxinas produzidas pelas espécies *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* (EFSA & ECDC, 2016). Em 2015, 20 Estados-membro reportaram 849 surtos, representando 19.5% do total dos mesmos, causando 8 847 casos de infeção, 497 hospitalizações e 3 mortes. Dezasseis Estados-membro reportaram 434 surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas, representando mais de metade dos surtos por toxinas bacterianas, tal como em 2014, o país com maior número de surtos foi a França (91.7%) (EFSA & ECDC, 2016). O queijo foi o veículo mais implicado em 39 surtos de forte evidência destas toxinas, maioritariamente em ambiente familiar seguido de locais públicos (*e.g.*, restaurantes, cafés, bares, hotéis e serviço de *catering*). Na quase totalidade dos surtos de fraca evidência, o veículo mais implicado foram os alimentos compostos (*i.e.*, vários ingredientes) seguidos da carne e os seus subprodutos, peixe e subprodutos, vegetais e sumos, ovos, crustáceos e moluscos e por fim, o queijo. E pelo contrário, os surtos de fraca evidência foram mais frequentes em locais públicos (EFSA & ECDC, 2016).

Os critérios de segurança alimentar presentes no Regulamento (CE) N.º 2073/2005 do Parlamento Europeu e da Comissão face aos contaminantes microbiológicos de origem não zoonótica referem-se à presença de histamina, *Cronobacter sakazakii* e enterotoxinas estafilocócicas. Doze Estados-membro, incluindo Portugal (Anexo IV), e 1 Estado-não-membro reportaram em 2015 estas toxinas em 19 das 2 309 amostras testadas provenientes de matrizes originadas de leite (produtos lácteos) e derivados. Apenas 8 Estados-membro submeteram dados para a presença de 2.4% de enterotoxinas estafilocócicas noutros alimentos, em 871 amostras testadas (EFSA & ECDC, 2016).

Segundo Buzby *et al.*, (2004), citado por EFSA & ECDC (2016) as intoxicações alimentares pelo consumo de alimentos contaminados com estas enterotoxinas foram o segundo tipo de doenças de origem alimentar mais reportado devido à pasteurização e/ou descontaminação insuficientes das fontes originárias dos produtos, ou pela sua contaminação durante a preparação por indivíduos transportadores de *Staphylococcus aureus*. Além disso, uma vez que *S. aureus* cresce numa ampla gama de temperaturas e de pH, e que as proteínas destas toxinas têm a capacidade de resistir ao calor e ao ácido, significa que também pode crescer em vários alimentos. Portanto, quando alimentos contaminados com estirpes produtoras destas

enterotoxinas são deixados a temperaturas que permitem o rápido crescimento destas bactérias (*e.g.*, quando a refrigeração é inadequada) torna-se uma fonte comum de surtos (EFSA & ECDC, 2016).

Um problema reconhecido é o aumento das estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que são perigosas devido à sua resistência à maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica. Estas evidências sugerem a necessidade da realização de investigações adicionais para desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas melhoradas, visando a neutralização ou o comprometimento das enterotoxinas induzidas pela ativação das respostas imunitárias pró-inflamatórias (Pinchuk *et al.*, 2010).

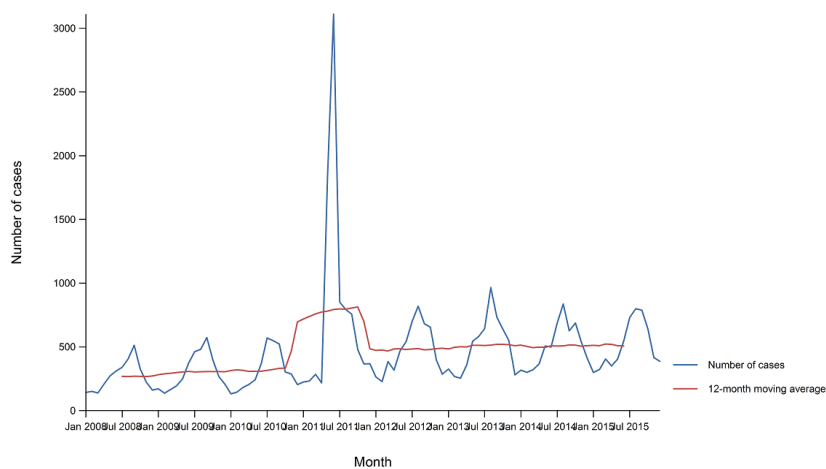
### 2.3.3 *Escherichia coli* STEC/VTEC

O género *Escherichia* consiste em bacilos anaeróbios facultativos de Gram negativo pertencentes à família *Enterobacteriaceae* de acordo com Ewing (1986), citado por Gomes *et al.*, (2016). Segundo Conway (1996), citado por Gomes *et al.*, (2016), a espécie *Escherichia coli* está amplamente distribuída no ambiente e é a principal colonizadora do intestino grosso em animais de sangue quente. Embora a maioria das estirpes seja inócua no cólon e raramente cause doenças em indivíduos saudáveis, existem algumas estirpes patogénicas que podem causar doenças intestinais e extraintestinais em indivíduos saudáveis ou imunodeprimidos (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004). A diarreia é um dos problemas de saúde pública e uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em bebés e crianças (WHO, 2012). Alguns países africanos, asiáticos e latino-americanos são das regiões mais afetadas com diarreia e com mortes mais frequentemente associadas às más condições de higiene e de saneamento, à educação insuficiente e à pouca água tratada disponível (Croxen *et al.*, 2013). As estirpes de *E. coli* envolvidas em doenças que causam diarreia são um dos agentes etiológicos mais importantes, uma vez que estas estirpes evoluíram pela aquisição, através da transferência horizontal de genes, de um conjunto particular de características que persistiram com sucesso no hospedeiro (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013). De acordo com o grupo de determinantes de virulência adquiridos, foram formadas combinações específicas que determinam os patótipos (*i.e.*, grupos de virulência) de *E. coli* atualmente conhecidos, denominados por *E. coli diarrheagenic* (*i.e.*, que causa diarreia) (DEC) (Nataro & Kaper, 1998). Os patótipos diferem em relação aos locais de colonização em hospedeiros preferenciais, mecanismos de virulência e os sintomas e consequências clínicas adicionais, sendo classificados como estirpes de *E. coli* enteropatogénicas (EPEC), enteromorrágicas (produção de toxina Shiga) (EHEC/STEC), enteroagregativa (CEEA), enterotoxigénicas (ETEC) e enteroinvasiva (EIEC) (Gomes *et al.*, 2016).

As estirpes de *Escherichia coli* produtoras da toxina Shiga (Stx), também conhecidas por *E. coli* produtoras de verocitotoxinas (STEC/VTEC) (Melton-Celsa, 2014) são agentes patogénicos zoonóticos causadores de epidemias frequentes e potencialmente fatais de origem alimentar ou devido ao consumo de água contaminada, com um espetro clínico que inclui diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urémica (SHU) (Gomes *et al.*, 2016). Esta síndrome, que não apresenta terapias específicas ou vacinas de prevenção, de acordo com Guth *et al.*, (2010), citado por Gomes *et al.*, (2016) é caracterizada por falência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica angiopática, podendo levar à morte de crianças (Majowicz *et al.*, 2014). Entre todas as estirpes de STEC, o serogrupo O157:H7 é aquele com maior associação mundial com esta

síndrome e mais frequentemente isolado do Homem, expressando o antigénio 157 somático (O) e o antigénio 7 flagelar (H) (Kaper & O'Brien, 2014). No entanto, outros serogrupos, incluindo os O26, O45, O103, O111, O121 e O145, que transportam os genes *stx* também têm sido associados a infeções em humanos, de acordo com Gould *et al.*, (2013), citado por Gomes *et al.*, (2016).

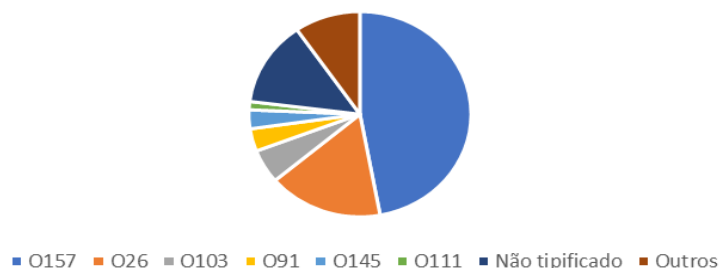
A infeção por estirpes de *E. coli* STEC foi a quarta zoonose mais comum a ser reportada na UE no ano de 2015, com 5 901 casos confirmados, resultando apenas em 8 mortes. As elevadas taxas de hospitalização foram reportadas na Grécia, Itália e Letónia (EFSA & ECDC, 2016). No verão de 2011, devido a um surto de enormes dimensões provocado por STEC enteroagregativa O104:H4 na Alemanha (Muniesa, Hammerl, Hertwig, Appel, & Brussow, 2012) e associado a outros 15 países, criou-se um pico dominante e claro, confirmando a tendência sazonal dos surtos (Figura 3) (EFSA BIOHAZ Panel, 2013; EFSA & ECDC, 2016).



**Figura 3.** Casos confirmados de infeção por estirpes de *Escherichia coli* produtoras da toxina Shiga, de 2008 a 2015, por mês, na União Europeia/Área Económica Europeia (EFSA & ECDC, 2016).

A notificação de infeções pelos diferentes serogrupos das estirpes STEC (*i.e.*, baseado nos antigénios O) é obrigatória na maioria dos Estados-membro, na Islândia, na Noruega e na Suíça, à exceção de 6 Estados-membro, em que a notificação se baseia num sistema voluntário (Bélgica, França, Itália, Luxemburgo e Espanha) ou noutro sistema (Reino Unido). Portugal apresentou registos pela primeira vez em 2015, e assim, o denominador da população global aumentou, levando a uma taxa ligeiramente inferior em relação a 2014 (EFSA & ECDC, 2016). A vigilância de infeções por STEC em França centra-se na investigação pediátrica da SHU e em Itália baseia-se, principalmente, no registo nacional de dados relativos a esta síndrome. O diagnóstico destas infeções em humanos é geralmente feito por cultura a partir de amostras de fezes (*i.e.*, diagnóstico direto) e pela deteção de anticorpos para *E. coli* no soro, em caso de SHU (*i.e.*, diagnóstico indireto). O diagnóstico por deteção direta da toxina ou dos genes da toxina por PCR sem isolamento prévio da estirpe está a aumentar (EFSA & ECDC, 2016). A taxa de notificação após o surto de 2011 foi mais elevada entre 2012 e 2015 do que em anos anteriores, mas estabilizou a partir de 2014. O serogrupo mais reportado, tal como em anos anteriores, foi o serogrupo O157, representando 41.7% de todos os serogrupos e é seguido dos serogrupos O26, O103, O91, O145 e O111 (Figura 4). A proporção relativa do O157 a outros serogrupos tem diminuído, possivelmente devido ao aumento da informação relativa aos serogrupos, desde o

surto de 2011, ou à existência de mais laboratórios com a capacidade de testarem os restantes serogrupos e até pelo aumento da utilização da técnica PCR (ou de métodos baseados em PCR) para deteção destas estirpes (EFSA & ECDC, 2016). A proporção de estirpes STEC não tipificáveis também aumentou em 2015. Os serogrupos O157 e O26 estão entre os serogrupos mais reportados nos casos da SHU (EFSA & ECDC, 2016).



**Figura 4.** Distribuição pelo serogrupo O dos casos confirmados de infecção por STEC em 2015 (Adaptado de EFSA & ECDC, 2016).

Cerca de 3% das amostras alimentares e 7% das amostras animais testadas foram positivas para a presença destas bactérias (Anexo V). A carne de origem caprina e ovina constituíram o maior número de amostras positivas, seguida da carne de ruminantes selvagens, queijo, leite cru e seus derivados de diferentes origens e da carne de origem bovina. Em fruta e em vegetais a proporção de STEC foi bastante baixa (cerca de 0.2%), assim como em sementes germinadas (ou rebentos) em que os critérios microbiológicos para a sua análise estão bem estabelecidos na UE, e num total de 925 amostras analisadas destes rebentos, apenas 2 foram positivas em 12 Estados-membro (EFSA & ECDC, 2016). Os animais que apresentaram maior frequência desta infecção foram as ovelhas e as cabras, representando 18.5% das amostras positivas e o gado bovino e suíno com 8.3% (EFSA & ECDC, 2016).

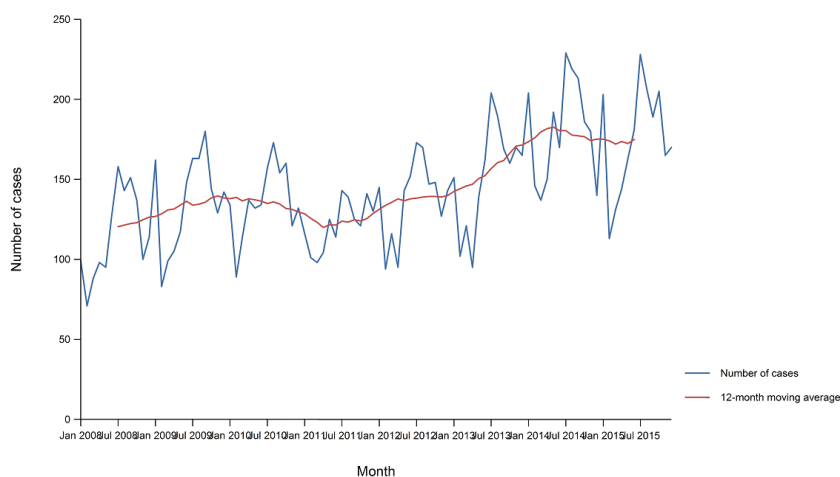
As amostras positivas têm sido semelhantes em quantidade, tanto em amostras alimentares como em animais, devido à adoção por muitos Estados-membro e estados-não-membro da norma ISO/TS 13136:2012, que exemplifica um método capaz de detetar qualquer estirpe de *E. coli* produtora da toxina Shiga, independentemente do serogrupo a que pertence, devido à deteção dos genes *stx* e *eae* (ISO/TS 13136:2012). Esta norma também tem permitido concluir que o serogrupo O26 tem sido bastante reportado e que os serogrupos O26 e O157 têm sido os mais associados na UE à SHU, sendo que o serogrupo O157 tem sido o mais reportado tanto em surtos como em casos esporádicos em humanos e o mais identificado nesta síndrome em crianças (EFSA BIOHAZ Panel, 2013; EFSA & ECDC 2015a, 2013). A proporção de amostras testadas utilizando este método normativo de referência para a deteção de STEC em alimentos, ou métodos equivalentes, atingiu 82% no ano de 2015 (EFSA & ECDC, 2016), representando um aumento significativo face à proporção de 2014 (41%) (EFSA & ECDC 2015b). Devido ao número desigual de amostras entre os países que notificam os casos destas infeções há a introdução de uma tendência seletiva nas estimativas da prevalência de STEC e na distribuição dos serogrupos. Contudo, a utilização de um método normativo comum entre os diferentes Estados-membro e Estados-não-membro vai de encontro aos princípios das normas e permite uma análise mais sensível e homogénea dos resultados, podendo permitir a compreensão da presença deste agente zoonótico nos alimentos e nos animais (EFSA & ECDC, 2016).

A presença de *E. coli* STEC no ambiente é também motivo de preocupação, uma vez que esta bactéria pode sobreviver no solo, nos dejetos dos animais, nas pastagens e na água, representando veículos importantes de transmissão (Lascowski *et al.*, 2013). Tendo em conta que os dejetos dos animais (*e.g.*, de galinhas) são muito úteis como fertilizantes orgânicos para o solo na agricultura, a deteção destas estirpes nestes fertilizantes orgânicos representa um risco significativo de segurança para a saúde pública (Puño-Sarmiento *et al.*, 2014).

#### 2.3.4 *Listeria monocytogenes*

As espécies pertencentes ao género *Listeria* caracterizam-se por serem bacilos de Gram positivo, compreendendo 17 espécies, entre as quais *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii*, incluindo as espécies recentemente classificadas por *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* (den Bakker *et al.*, 2014) *Listeria booriae* e *Listeria newyorkensis* (Weller, Andrus, Wiedmann, & den Bakker, 2015). Entre estas espécies, *Listeria monocytogenes* é a espécie mais frequentemente associada aos casos de listeriose (ou infeção por *Listeria*) em humanos, uma doença grave de origem alimentar considerada de vigilância prioritária a nível europeu (Lomonaco, Nucera, & Filipello, 2015; EFSA & ECDC, 2016) devido à elevada morbilidade, hospitalizações e mortalidade (EFSA & ECDC, 2016). *L. monocytogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa e muito difundida no ambiente, sendo uma bactéria oportunista que pode causar infeções sistémicas tais como meningite, encefalite ou endocardite, podendo ser potencialmente fatais em indivíduos imunodeprimidos e em idosos. Contudo, apesar de serem infeções relativamente raras também podem afetar mulheres grávidas, provocando abortos, partos prematuros, nados-mortos ou infeções neonatais (WHO/FAO, 2004; Lomonaco *et al.*, 2015; EFSA & ECDC, 2016). Esta bactéria é facilmente transmitida através de géneros alimentícios prontos para consumo (Lomonaco *et al.*, 2015) e tem a capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração e de tolerar um pH baixo (*e.g.*, valores de pH entre 3 a 4, típicos de alimentos ácidos) (Miller, 1992; Sleator, Gahan, & Hill, 2003; Liu, 2006), suportando e adaptando-se a vários ambientes de stress. Embora uma grande variedade de alimentos, tais como carne e laticínios (Lemon, Higgins, & Kolter, 2007) possa estar contaminada com *L. monocytogenes*, surtos e casos esporádicos de listeriose são predominantemente associados a alimentos prontos para consumo (Preußel *et al.*, 2015). Este agente patogénico pode colonizar, no formato de biofilmes, equipamentos de processamento dos alimentos persistindo por longos períodos de tempo nos mesmos, e conseqüentemente, uma variada gama de alimentos pode ser contaminada durante a fase de colheita, mas na sua maioria é durante o seu processamento. A capacidade de produzir biofilmes (*i.e.*, comunidades de microrganismos que aderem a uma superfície, com estrutura heterogénea exibindo conjuntos agregados celulares distribuídos ao longo da matriz exopolissacarídica) (Costerton *et al.*, 1987, 1994; Dubey & Ben-Yehuda, 2011) por alguns serotipos (Kathariou, 2002) confere proteção contra o stress que é habitual em ambientes onde os alimentos são processados, de acordo com Møretrø Langsrud (2004) citado por Pan, Breidt, & Kathariou, (2009). A formação de um biofilme tem sido considerada como uma resposta das células bacterianas ao stress face às condições desfavoráveis, tais como falta de nutrientes, alterações osmóticas e de pH, radicais de oxigénio, desinfetantes e antibióticos (Gandhi & Chikindas, 2007).

Os casos de listeriose em humanos confirmados na UE em 2015, indicam uma taxa de incidência de 0.46 casos por 100 000 habitantes, com taxas elevadas de letalidade (17.7%) e de hospitalização (97.4% dos casos em que a hospitalização é conhecida). Esta é a zoonose com proporção mais elevada de hospitalizações na UE (EFSA & ECDC, 2016), resultando no maior número de mortes desde 2008 (*i.e.*, 270 mortes) em 19 Estados-membro, sendo a França e a Alemanha os países com maior registo de mortes devido a esta zoonose (75 e 45 mortes, respetivamente). A partir de 2008 também foi possível observar um padrão sazonal com largos picos de casos de listeriose no verão, seguidos de picos menores no inverno (Figura 5). Desde que há vigilância na UE desta infeção, a maior parte dos casos foram reportados em pessoas com mais de 64 anos. O aumento das infeções por *Listeria*, em parte, pode ser explicado pelo envelhecimento da população na maior parte do Estados-membro da UE, de acordo com a Eurostat (2016), citado por EFSA & ECDC, (2016), pelo que é importante aumentar a consciencialização da população em geral, e em particular da mais velha, para esta zoonose e para os alimentos de risco.



**Figura 5.** Casos confirmados de infeção por *Listeria* spp., de 2008 a 2015, por mês, na União Europeia/Área Económica Europeia (EFSA & ECDC, 2016).

Portugal reportou pela primeira vez casos de listeriose em 2015. Espanha, Malta, Suécia, Estónia e Finlândia foram os países com maior número de registos, sendo que Espanha em 2015 melhorou o seu sistema de vigilância epidemiológica para *Listeria*, o que resultou num aumento de quase 37% nos casos confirmados descritos. Pelo contrário, os países com menor número de casos foram a Bulgária, Croácia e Roménia, sendo que o Chipre e o Luxemburgo não reportaram casos de listeriose (EFSA & ECDC, 2016). A deteção de *Listeria* por métodos moleculares, tais como PCR multiplex (Cocolin, Rantsiou, Iacumin, Cantoni, & Comi, 2002; Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet, & Martin, 2004; Chen & Knabel, 2007; Liu *et al.*, 2015) e PCR em tempo real (Hein *et al.*, 2001; Barbau-Piednoir, Botteldoorn, Yde, Mahillon, & Roosens, 2013) fornecem uma poderosa ferramenta para investigar a fonte de contaminações por *Listeria*. As maiores vantagens destes métodos face aos métodos convencionais são a rapidez na obtenção de resultados e a precisão dos mesmos.

Estudos desenvolvidos por (Barros *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2013) defendem que a presença de qualquer espécie pertencente ao género *Listeria* num ambiente específico podem indicar a presença de outras espécies, incluindo *L. monocytogenes*. Assim, a eliminação e prevenção da

contaminação por *Listeria* em produtos alimentares e no ambiente onde são processados é crucial para reduzir as perdas económicas na indústria alimentar (Phraeaphaisarn *et al.*, 2017). O Regulamento (CE) N.º 1441/2007 impõe critérios de segurança alimentar para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, nos quais esta bactéria foi detetada tanto qualitativamente (*i.e.*, presença/ausência, utilizando métodos de deteção), de acordo com a norma ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004, e/ou quantitativamente (*i.e.*, contagem de unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) ou por ml (ufc/ml), utilizando métodos de contagem), com um limite de 100 ufc/g ou por ml, utilizando a norma ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Embora alimentos de charcutaria e queijos de pasta mole e semi-mole tenham sido inicialmente considerados nas categorias de alimentos de alto risco para listeriose em humanos, os resultados dos inquéritos de vigilância alimentar e das investigações de surtos em todo o mundo na última década, aumentaram significativamente a lista de alimentos implicados (*e.g.* carne, peixe, laticínios, produtos da pesca, frutas e saladas prontos para consumo) (Garner & Kathariou, 2016). Ao nível da transformação, a categoria alimentar com maiores níveis de não-conformidades dos critérios microbiológicos para *Listeria* foi «produtos de pesca», seguida de «outros produtos prontos para consumo», «produtos cárneos, exceto derivados de salsicha» e «outros produtos lácteos prontos para consumo». Os alimentos prontos para consumo com maiores níveis de não conformidade ao nível do retalho são «produtos de pesca» e queijos de pasta mole e semi-mole (EFSA & ECDC, 2016). Das espécies animais testadas, as que apresentaram maior quantidade de amostras positivas foram os animais ruminantes domésticos (*e.g.*, gado bovino, caprino e ovino), que também representaram o maior número de amostras reportadas. No entanto, *Listeria* spp., (principalmente *Listeria monocytogenes*) também foi um patógeno reportado em porcos, cavalos, cães, gatos, raposas, entre outros animais selvagens, devido à ubiquidade deste género bacteriano no ambiente (EFSA & ECDC, 2016). Em Portugal, tanto na contagem como na deteção, as categorias onde o não cumprimento foi mais elevado foram nos produtos cárneos cozinhados e prontos para consumo e nos queijos (Anexo VI).

### 2.3.5 *Salmonella* spp.

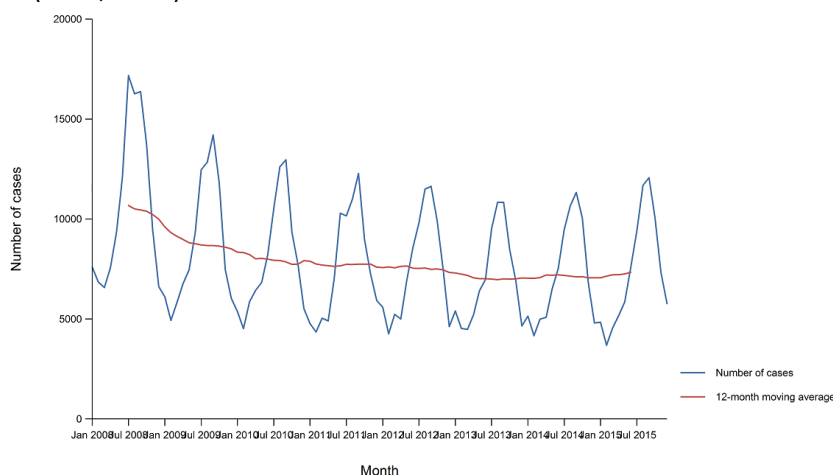
O género *Salmonella* compreende bactérias anaeróbias facultativas de Gram negativo em forma de bacilo. Pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são agentes patogénicos de grande importância clínica tanto para o homem como para outros animais (Grimont & Weill, 2007). Este género agrupa 2 espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (Tindall, Grimont, Garrity, & Euzéby, 2005) e de acordo com Malorny *et al.*, (2011), citado por Andino & Hanning (2015), 6 subespécies e inclui mais de 2 500 serotipos (Grimont & Weill, 2007; Guibourdenche *et al.*, 2010). *S. enterica* subdivide-se nas subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, com base em modificações bioquímicas e genómicas (Brenner, Villar, Angulo, Tauxe, & Swaminathan, 2000). A maioria das espécies pertencentes a este género são fermentadoras de lactose, produtoras de sulfureto de hidrogénio, oxidase negativas e catalase positivas. Propriedades bioquímicas como a capacidade de crescer num meio rico em citrato como única fonte de carbono, a descarboxilação da lisina e a não hidrólise da ureia também permitem a identificação de *Salmonella* (Jensen & Hoorfar, 2000).

O principal nicho dos serotipos de *Salmonella* é o trato intestinal de humanos e de animais criados na indústria pecuária. Contudo, também pode estar presente no trato intestinal



de aves selvagens, répteis e até insetos. Alimentos para animais, o solo, os ninhos e a matéria fecal constituem as principais fontes mais comuns de *Salmonella* na indústria pecuária (Sanchez, Hofacre, Lee, Maurer, & Doyle, 2002; Hoelzer *et al.*, 2011). Quando os organismos contaminados excretam *Salmonella* nas fezes, os insetos e outros animais podem transmitir estas espécies a um elevado número de locais e, geralmente, a águas poluídas, sendo que a sua presença indica contaminação fecal, de acordo com Abulreesh (2012), citado por Andino & Hanning (2015). Quando os animais, e até humanos, consomem água poluída podem transmitir a bactéria através da matéria fecal, permitindo assim a continuação do ciclo de contaminação.

Assim como nas restantes doenças infecciosas, o decurso e a resposta do doente à infeção por *Salmonella* (ou salmonelose) depende de diversos fatores, tais como a dose de inoculação e a imunidade do hospedeiro (Sanderson & Demerec, 1965). Na UE em 2015 foram reportados um total de 94 625 casos devido a infeção por *Salmonella* (Figura 6), representando um aumento de 1.9% em notificações relativamente a 2014, resultando em 126 mortes em 10 dos 28 Estados-membro que forneceram estes dados. Contudo, a tendência desta zoonose tem diminuído desde 2008 (EFSA & ECDC, 2016). A salmonelose tem sido uma das maiores fontes de surtos e doenças associada ao consumo de alimentos na UE, causando perdas económicas significativas, sendo estimado pela EFSA de que os custos investidos na salmonelose humana rondam os 3 mil milhões de euros anuais (EFSA, 2014).



**Figura 6.** Casos confirmados de infeção por estirpes de *Salmonella*, de 2008 a 2015, por mês, na União Europeia/Área Económica Europeia (EFSA & ECDC, 2016).

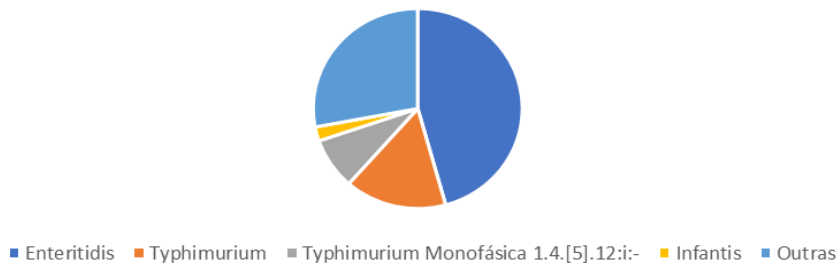
Assim como em anos anteriores, os dois serotipos que representaram maior percentagem dos casos confirmados em humanos foram *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, com 45.7% e 15.8%, respetivamente. Sendo que o número de casos associados a *S. Enteritidis* aumentou, e os associados a *S. Typhimurium* diminuiu, exceto o número de casos relacionados com estirpes de *S. Typhimurium* monofásicas 1,4,[5],12:i:- que regressou ao número de 2013 após uma diminuição em 2014 (Figura 7). Os casos associados ao quarto serotipo mais comum, *Salmonella* Infantis, continuam a decrescer e após o surto de 2011-2012, relacionado com *Salmonella* Stanley, o número de casos associados continua a ser elevado (EFSA & ECDC, 2016).

Em relação aos alimentos (Anexo VII), as elevadas ocorrências do não cumprimento com os critérios exigidos na UE para *Salmonella* foram encontradas em alimentos de origem animal, que têm como destino ser cozinhados antes do consumo, tais como a carne picada e carne

preparada de aves. *Salmonella* é um dos agentes zoonóticos mais frequentemente encontrados em carne de frango (6.5%) e de peru (4.6%), enquanto em carne de porco e de bovino a percentagem é mais baixa (1.7% e 0.2%, respetivamente) (Sanchez *et al.*, 2002; EFSA & ECDC, 2016). Esta espécie raramente é encontrada em ovos de mesa (0.9%). Os alimentos prontos para consumo representam um risco para os consumidores, nos quais 1.1% e 0.7% das amostras de carne de frango e de peru, respetivamente, foram positivas. Foi descrita uma notável presença de *Salmonella* em sementes secas na Grécia e na Holanda, associadas, principalmente às atividades de inspeção fronteiriça (EFSA & ECDC, 2016).

Vinte e um Estados-membro reportaram 5.13% de unidades positivas para *Salmonella*, num total 4 546 unidades de alimentos para animais de origem animal e vegetal (Anexo VII), este valor representa um aumento de 3.8% face a 2014. Embora tenham sido reportadas diferentes matrizes, 3 404 amostras eram provenientes de rações derivadas do feijão de soja, com 3.7% de média para a presença de *Salmonella*. Nos alimentos finais para as diferentes espécies, em 2015, as amostras testadas apresentaram uma prevalência baixa de positivos, com 1.20% dos 2 248 alimentos para gado bovino, 0.51% das 2 754 amostras para porcos e 0.67% das 7 961 amostras para aves (EFSA & ECDC, 2016).

Em 2015, a prevalência a nível da UE de bandos de aves com serotipos positivos para *Salmonella* foi muito baixa, tal como em 2014, para todas as categorias de animais abrangidas pela execução dos programas nacionais de controlo de *Salmonella*, *i.e.*, para bandos de reprodução de *Gallus gallus*, bandos de galinhas poedeiras, bandos de frangos e criação e engorda de bandos de perus. A introdução destes programas, ao longo do tempo, permitiu verificar uma tendência declinante estatisticamente significativa na prevalência a nível da UE de bandos com serotipos positivos para *Salmonella* para todas as categorias, com exceção dos bandos de criação de perus (EFSA & ECDC, 2016). O serotipo mais reportado da espécie *G. gallus* foi, em 2015, *S. Infantis* contando com 33.6% de todos os isolados reportados, seguido por *S. Enteritidis* com 15.8% e *S. Mbandaka* com 6.7%. Estes 3 serotipos foram confirmados pelo quarto ano consecutivo como os mais frequentes isolados de *G. gallus* (EFSA & ECDC, 2016). Quanto aos bandos de galinhas poedeiras os serotipos frequentemente mais reportados foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, representando 41.2% e 11.1% dos isolados, respetivamente. Assim, como para isolados a partir de bandos de frangos com *S. Infantis*, *S. Enteritidis* e *S. Mbandaka* como os serotipos mais isolados, representando 38.7%, 11.6% e 7.2%, respetivamente. Contudo, os serotipos mais encontrados na carne de frango foram *S. Infantis* e *S. Enteritidis*. No que diz respeito aos perus, o Reino Unido reportou exclusivamente elevados números de *S. Derby* (EFSA & ECDC, 2016), e no resto da EU os serotipos mais frequentemente encontrados nesta carne foram *S. Stanley*, *S. Newport* e *S. Bredeney*. Em porcos, *S. Typhimurium* correspondeu a mais de metade dos 2 401 isolados e *S. Derby* foi o segundo serotipo mais encontrado. Assim, como foi reportado em anos anteriores para o gado bovino, o serotipo mais comum tem sido *S. Typhimurium*, representando 43.2% dos isolados, *S. Dublin* com 26% dos isolados, foi o segundo serotipo mais reportado na UE e *S. Coeln* foi identificado em 6.7% dos isolados. Em 2015, 21.3% dos isolados de carne de origem bovina foram identificados como *S. Typhimurium* e 10.7% como *S. Derby* (Figura 7) (EFSA & ECDC, 2016). Contudo os resultados para outras espécies pecuárias devem ser interpretados com precaução devido à inexistência de programas nacionais de controlo de *Salmonella* para essas espécies animais (EFSA & ECDC, 2016).



**Figura 7.** Serotipos de *Salmonella* mais reportados na União Europeia em 2015 (Adaptado de EFSA & ECDC, 2016).

As aves que estão infetadas com a maior parte dos serotipos não demonstram sintomas clínicos de doença dificultando assim o diagnóstico. No entanto, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, dois serotipos não móveis, causam doença em aves domésticas, mas muito raramente em humanos, sendo específicos para o hospedeiro, causando a doença Pullorum e a febre tifoide, respetivamente (Rettger, 1909). Em humanos, a salmonelose manifesta-se através de gastroenterite, septicemia ou febre entérica. Esta última é causada pelos serotipos patogénicos e que são específicos do homem, *S. enterica* Typhi e *S. enterica* Paratyphi (Connor & Schwartz, 2005; Crump, Ram, Gupta, Miller, & Mintz, 2008). A gravidade da doença pode variar pela resistência de cada indivíduo e pelo seu sistema imunitário, assim como pela virulência do isolado de *Salmonella*. *Salmonella* Typhi é uma espécie móvel, não fermentadora da lactose, que causa a maior parte dos casos endémicos e epidémicos de febre tifoide no mundo (Connor & Schwartz, 2005; Crump *et al.*, 2008). De acordo com Rodriguez (2006), citado por Andino & Hanning (2015), tal como na febre entérica, a salmonelose não tifoide é transmitida via fecal-oral, contudo, ao contrário de *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, as estirpes não tifoídes não são restritas a humanos. Existem muitos serotipos associados a surtos de origem alimentar, tais como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Heidelberg* (Rabsch, Tschäpe, & Bäumlér, 2001), *S. Infantis*, *S. Hadar* e *S. Virchow* (Abubakar *et al.*, 2007; Hendriksen *et al.*, 2011) e têm reservatórios em animais destinados ao consumo humano (Rabsch *et al.*, 2001). Este tipo de infeção caracteriza-se por gastroenterites ou bacteriemia, e sintomas que envolvem náuseas, vômitos e diarreia, com duração aproximada de uma semana, podendo induzir condições crónicas, que incluem artrite reativa assética e a síndrome de Reiter. *S. Infantis* tem sido classificada como o terceiro serotipo mais frequente a infetar humanos (Galanis *et al.*, 2006). No entanto, *S. Virchow*, recentemente tornou-se um dos serotipos mais predominantes nos países da UE, sendo incluído no top 5 (Bonalli *et al.*, 2011). Este serotipo é conhecido por estar associado a infeções invasivas em humanos e à resistência a diversos antibióticos (Tabela 4) (Mani, Brennand, & Mandal, 1974; Jones *et al.*, 2008).

**Tabela 4.** Exemplos de características da febre entérica e da salmonelose não tifoide (Adaptado de Andino & Hanning, 2015).

Características	Febre entérica	Salmonelose não tifoide
Hospedeiro natural	Homem	Animais (pecuária), répteis e insetos
Serotipos associados	<i>S. Typhi</i> e <i>S. Paratyphi</i>	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Newport</i> e <i>S. Heidelberg</i>
Período de incubação	7-14 dias	6-12 horas
Sintomas mais comuns	Febre, bradicardia, mialgia, manchas no peito	Náuseas, vômitos, febre, calafrios, dor abdominal e mialgia
Tratamento	Fluoroquinolonas (5–7 dias), Cloranfenicol e Amoxicilina <sup>a</sup>	Antibioterapia não é recomendada em doenças sistêmicas
Vacinação	Disponível nas áreas endémicas <sup>c</sup>	Fluoroquinolonas <sup>b</sup> Não disponível

<sup>a</sup>Dependendo dos padrões locais de resistência aos antibióticos, gravidade da doença, disponibilidade e custo.

<sup>b</sup>Fluoroquinolonas são geralmente preferidas se o tratamento antibiótico for adequado.

<sup>c</sup>Vacinas licenciadas disponíveis. A eficácia da vacina é de 60 a 80% e a proteção até 7 anos.

O Regulamento (CE) N.º 1003/2005 da Comissão relativo à execução do Regulamento (CE) N.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, que se refere ao objetivo comunitário de controlo e redução da prevalência de determinados serotipos de *Salmonella*, nomeadamente de 5 serotipos de *Salmonella*: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Hadar* e *S. Virchow* em bandos de *G. gallus*. Consequentemente, estes 5 serotipos de *Salmonella* foram tornados prioritários pela UE no controlo da entrada de aves de capoeira e dos seus produtos, devido ao risco significativo que representam para a saúde pública (Snow *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2010). De modo a prevenir a infeção por *Salmonella* são necessários bons programas de monitorização e de deteção deste agente zoonótico e um aumento das práticas de segurança alimentar, métodos de intervenção pós-colheita (*e.g.*, descontaminação) e de pasteurização de ovos, podem reduzir os fatores de risco para a infeção de *Salmonella* em galinhas poedeiras (Howard, O'Bryan, Crandall, & Ricke, 2012). De acordo com Andrews (2007), citado por Chiang *et al.*, (2016), além do método de biotipagem para a identificação de *Salmonella*, os serotipos de *Salmonella* são determinados por lipopolissacáridos (antigénio O) e estruturas flagelares (antigénio H) com base no esquema de classificação de Kauffmann-White. Todas estas etapas são demoradas, dispendiosas e complexas (Fitzgerald, Sherwood, Gheesling, Brenner, & Fields, 2003). Assim, é necessária uma deteção rápida e precisa para os 5 serotipos de *Salmonella* em amostras de alimentos. Ao longo das últimas décadas, a técnica de PCR foi frequentemente utilizada para a deteção de *Salmonella* e de outros agentes patogénicos transmitidos pelos alimentos (Pathmanathan *et al.*, 2003; Chiu, Chen, Hwang, & Tsen, 2005; Hendriksen *et al.*, 2011).

A pesquisa de *Salmonella* não é feita apenas em alimentos, mas também em amostras provenientes da fase de produção primária (*e.g.*, fezes e botas para esfregaço) da espécie *G. gallus*, inserida no Plano Nacional de Controlo de *Salmonella* (PNCS), em Portugal. Os pintainhos podem adquirir *Salmonella* via transmissão vertical, através dos progenitores, mas a transmissão horizontal pelo ambiente onde se encontram (*i.e.*, instalações), transporte, alimentação e determinados vetores, incluindo humanos, roedores e insetos, pode representar um problema significativo (Wales, Breslin, & Davies, 2006; Foley, Lynne, & Nayak, 2007). Entre os produtos comercializados, os ovos contaminados normalmente resultam em infeções em bandos adquiridas via *Salmonella* persistente no ambiente e estão associadas ao serotipo *Salmonella*

Enteritidis (van de Giessen, Ament, & Notermans, 1994; Kinde *et al.*, 1996; Wales, Breslin, & Davies, 2006). Assim, têm sido feitos esforços no que diz respeito ao desenvolvimento de estratégias efetivas de controlo contra infeções por *S. Enteritidis* em bandos de aves, incluindo a utilização de vacinas (Campagnari *et al.*, 2007). Muitas das aves pertencentes à espécie *G. gallus* são vacinadas com uma estirpe de *S. Enteritidis* mutante, geneticamente estável e duplamente atenuada, que sofreu mutagénese química para ser auxotrófica (*i.e.*, de acordo com a IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* - é a incapacidade de um organismo de sintetizar um composto orgânico necessário ao seu crescimento) (McNaught & Wilkinson, 1997) para a adenina e a histidina (ade<sup>-</sup>/his<sup>-</sup>), com o objetivo de impedir o crescimento de outras estirpes. A imunização das aves com esta vacina tem como objetivo reduzir a colonização, a persistência e a invasão do trato intestinal e dos órgãos internos por *S. Enteritidis*. Assim, ao vacinar as aves contra a salmonelose, aumenta-se a segurança de todas as pessoas que manipulam ovos e carne destas aves ao longo da cadeia de produção e, conseqüentemente, aumenta-se também a segurança dos alimentos destinados ao consumidor. A adenina e a histidina são aminoácidos indispensáveis para a viabilidade de alguns microrganismos. Enquanto a maioria deles é capaz de sintetizá-las, a estirpe de *S. Enteritidis* utilizada nesta vacina perdeu esta característica durante o processo de seleção química. Após a vacinação, o suprimento de adenina e histidina é realizado através da sua disponibilidade no trato digestivo das aves, onde a vacina se consegue proliferar. É uma vacina segura, mesmo sendo uma vacina viva, pois quando esta estirpe vacinal é exposta às condições ambientais, seja por excreção do animal ou pela morte do mesmo, a estirpe não encontra situações ideais de viabilidade e acaba por morrer, conferindo segurança e possibilitando a diferenciação rápida e simples entre a estirpe vacinal e as estirpes selvagens. Esta, mimetiza a via de infeção natural estimulando uma resposta imune completa e persistente, que abrange um fenómeno inibitório pela exclusão de estirpes selvagens por competição com a estirpe vacinal, imunidade local pela produção de anticorpos no trato gastrointestinal, imunidade celular uma vez que se trata de uma resposta natural das aves a uma estirpe homóloga de *S. Enteritidis*, e a imunidade mediada por células que protege contra o estágio intracelular da infeção. Por fim, a imunidade humoral na medida em que esta vacina contribui para a eliminação da *S. Enteritidis* no intestino e, em menor grau, no fígado e baço. Os anticorpos propiciam uma eficiente opsonização mediada por macrófagos e a destruição das bactérias. A administração desta vacina pode ser feita a partir do primeiro dia de idade através da água de bebida, spray ou por via ocular, a segunda dose deve ser aplicada entre a quarta e a sexta semana de idade e uma terceira dose pode ser aplicada pelo menos três semanas antes do início de produção ou ser substituída por uma vacina inativadas. A associação de vacinas vivas e inativas aumentam os níveis de anticorpos que circulam e ampliam o espectro de ação contra outros serotipos de *Salmonella*, tais como *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Infantis* e *S. Virchow*.

Os programas do PNCS da DGAV (*i.e.*, bandos de frangos, bandos de reprodução, galinhas poedeiras e perus) (Anexo VIII), a serem aplicadas a nível nacional (Continente, Açores e Madeira) desde o ano de 2015, foram elaborados tendo por base a seguinte legislação comunitária: Regulamento (CE) N.º 2160/2003, Regulamento (CE) N.º 1177/2006 da Comissão de 1 de agosto de 2006 e Regulamento (UE) N.º 200/2012 da Comissão de 8 de março, sendo que a unidade epidemiológica para efeitos de implementação do presente programa é o bando (*i.e.*, «o conjunto de aves de capoeira de uma mesma espécie, aptidão e idade, com o mesmo estatuto sanitário,

mantidas no mesmo local ou recinto que constituem uma única unidade epidemiológica; no caso de aves de capoeira mantidas em pavilhões, o bando inclui o conjunto de aves que partilham o mesmo volume de ar», em conformidade com o disposto no Regulamento (CE) N.º 2160/2003. Assim, certas estirpes selvagens que sejam positivas nos bandos implicam o abate dos mesmos o mais rápido possível, surgindo a necessidade de diferenciar resultados positivos entre as estirpes vacinal e as estirpes selvagens. Como o INIAV, I.P. é o laboratório nacional de referência para salmoneloses em animais, as análises obrigatórias para o produtor de deteção são realizadas neste laboratório, assim como a serotipificação de todas as amostras positivas a *Salmonella* spp.. Quanto maior o tempo de libertação dos bandos, maiores são os gastos com os mesmos antes de irem para abate, então, testou-se um procedimento por RT-PCR, de modo a substituir a serotipificação, aumentando a rapidez de diferenciação entre as estirpes vacinal e selvagens. Assim, não só se reduzem perdas económicas para os produtores como também se evitam toxico-infeções pelo consumo dos animais ou dos seus subprodutos. Esta nova metodologia agiliza o processo de distinção pois, aproximadamente, em 2 horas é possível obter uma distinção que pela serotipificação só é feita entre 3 a 5 dias úteis.

## PARTE I – PCR EM TEMPO REAL PARA A DETEÇÃO E DIFERENÇAÇÃO ENTRE ESTIRPES VACINAL E SELVAGENS DE *SALMONELLA*

### 2.4 Metodologias baseadas na técnica PCR

#### 2.4.1 Reação de polimerização em cadeia (PCR) convencional

Os métodos convencionais baseados na cultura dos microrganismos para deteção e enumeração dos mesmos em diferentes matrizes alimentares ou ambientais são demorados e requerem a utilização de muitos consumíveis (Chen, Healey, Regan, Laksanalamai, & Hu, 2017), constituindo custos elevados para os laboratórios. Até recentemente, os métodos microbiológicos utilizados eram baseados apenas na cultura dos microrganismos, e apesar de estarem normalizados pela Organização Internacional de Normalização (ISO) e de serem utilizados por laboratórios por todo o mundo, a abordagem baseada apenas na cultura dos microrganismos trazia baixa especificidade e falha na deteção (*e.g.*, quando as células estão num estado viável não cultivável), comprometendo assim a segurança microbiológica dos produtos testados (Josefsen, 2009).

De acordo com van der Zee (2000), citado por Josefsen (2009), a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) revolucionou os métodos microbiológicos para deteção dos microrganismos patogénicos, pela sua rapidez, sensibilidade, especificidade, custo e potencial de automatização. No entanto, a falta de normalização, validação e capacidade de diferenciação entre os microrganismos viáveis e os não viáveis dificultou a implementação de métodos baseados em PCR na rotina laboratorial, de acordo com Hoorfar (2003), citado por Josefsen (2009). A técnica mais convencional da PCR surge, então, como uma solução e/ou complemento aos métodos convencionais, pelo rápido poder de deteção de bactérias patogénicas que consiste na amplificação enzimática *in vitro* de uma sequência de um ADN alvo (Chen *et al.*, 2017), aumentando o número de cópias dessa região específica com o objetivo de produzir cópias suficientes para as análises necessárias. No ensaio de PCR, 2 primers complementares à

terminação 3' de ambas as cadeias, *sense* e *anti-sense*, do ADN alvo permitem a síntese da sequência a ser amplificada. Estes 2 primers, após serem desenhados são misturados numa reação tamponada (denominada *mix* ou *master-mix*), que inclui a ADN polimerase, desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTPs), cofatores enzimáticos (*e.g.* cloreto de magnésio, MgCl<sub>2</sub>) e a amostra de ADN (Chen *et al.*, 2017).

O protocolo de PCR consiste, geralmente, em 3 passos controlados pela temperatura: (I) a desnaturação da dupla cadeia em cadeia simples a 95°C, (II) a hibridização (ou *annealing*), na qual ocorre a ligação dos 2 primers às regiões complementares do ADN alvo, a diferentes temperaturas, de acordo com a temperatura de melting (T<sub>M</sub>), por 30 a 60 segundos, que tipicamente é definida entre 3 a 5°C abaixo da T<sub>M</sub> dos primers utilizados, e por fim, (III) a extensão do ADN a partir dos locais indicados pelos primers, ocorrendo a 72°C por aproximadamente 2 minutos. A polimerização do ADN segue ao longo da região entre os locais. Após cada ciclo, o número do ADN modelo duplica e à medida que cada novo fragmento amplificado atua como molde, ciclos sucessivos de temperatura podem levar a um aumento exponencial no número de cópias da região do ADN alvo (*i.e.*, denominados amplicões). Uma única cópia do ADN alvo é amplificada até 106 cópias em apenas 30 a 40 ciclos em 2 a 3 horas. Os produtos amplificados por PCR são carregados num gel de agarose e separados, e como são corados com brometo de etídio ou com outras soluções mais seguras, podem ser visualizados por transiluminação ultravioleta e fotografados (Erlich, 1989; Chen *et al.*, 2017).

A Taq polimerase fornece à técnica PCR uma ferramenta versátil, reduzindo os custos e a perda de tempo nos ensaios e também os potenciais erros, ao mesmo tempo que melhora a especificidade, sensibilidade e rendimento do produto de PCR, levando o ensaio à automatização (Saiki *et al.*, 1988). A técnica convencional de PCR é uma ferramenta relativamente mais fácil e menos dispendiosa para amplificar um fragmento de ADN, sendo útil na deteção e monitorização de microrganismos transmitidos através dos alimentos (Chen *et al.*, 2017). As desvantagens incluem, ainda assim, um consumo elevado de tempo com menor sensibilidade e precisão de deteção, comparadas com a técnicas de PCR em tempo real, descrita abaixo e utilizada no desenvolvimento da metodologia para deteção e diferenciação de estirpes de *Salmonella*. A PCR convencional também não permite a distinção entre células viáveis de células não viáveis, dando origem a resultados falsos-positivos (Chen *et al.*, 2017).

#### 2.4.2 PCR em Tempo Real (RT-PCR)

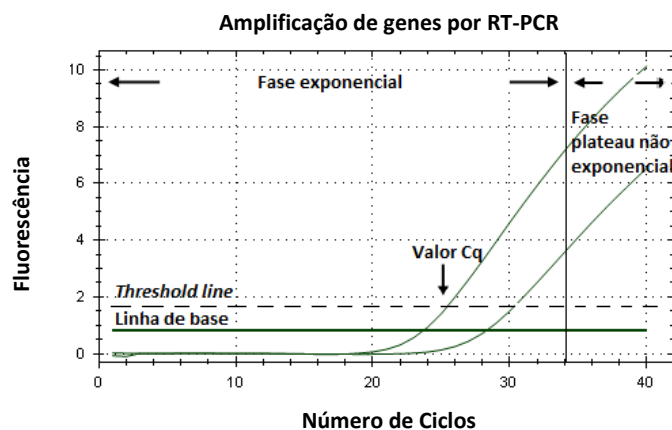
A tecnologia de PCR em tempo real (RT-PCR), surge como uma modificação ao PCR convencional que se tornou útil na deteção e quantificação de microrganismos devido à sua elevada sensibilidade e precisão (Chen *et al.*, 2017). Em comum com a técnica mais convencional, RT-PCR envolve ciclos de amplificação contínuos, durante os quais as amostras são aquecidas, há desnaturação do ADN, ocorre *annealing* com primers específicos, levando a um aumento exponencial dos amplicões. Contudo, em oposição ao PCR convencional, a etapa de deteção está combinada com a amplificação e assim, o ácido nucleico alvo amplificado é visualizado em tempo real, por conversão num sinal fluorescente. Este sinal é gerado em cada ciclo de PCR quando uma sonda de oligonucleótidos, ligada a um fluoróforo, ou um corante de ADN (em cadeia dupla) se liga ao ADN alvo amplificado. Com o aumento da quantidade de ADN amplificado em cada etapa, a intensidade de fluorescência também aumenta. O módulo ótico do sistema de RT-PCR do LMA

(CFX-96™ da Bio-Rad®, construído com o poder e a flexibilidade do termociclador C1000™) mede o sinal de fluorescência a cada ciclo, por sondas repórteres fluorescentes (SYBR Green ou TaqMan, sendo possível detetar até 5 alvos) (Chen *et al.*, 2017). A arquitetura em favo de mel da Mass-reduced sample block® da Bio-Rad® Patent Pending, promove de forma uniforme o arrefecimento de todos os poços da microplaca, mesmo durante a hibridização reduzindo assim o tempo de resposta do equipamento. O software de análise interpreta depois os resultados associados a intensidade de fluorescência com o número de ciclos. Os relatórios emitidos pelo software permitem também fazer a rastreabilidade dos resultados (Tabela 5).

**Tabela 5.** Alguns tipos de ficheiros no software CFX-96™, Bio-Rad®.

<i>Tipo de ficheiro</i>	<i>Extensão</i>	<i>Visualização e edição</i>
Protocol (protocolo)	.prcl	Selecionar «Run Setup» e editar em «Protocol Editor»
Plate (placa)	.pltd	Selecionar «Run Setup» e editar em «Plate Editor»
Data (dados)	.pcrd	Visualizar e analisar na janela «Data Analysis»

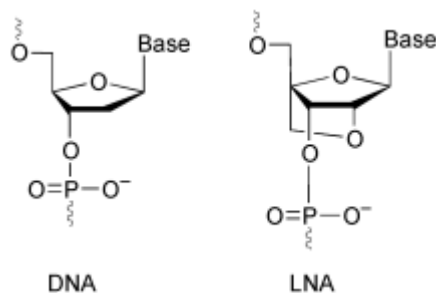
O sinal fluorescente é traçado em função do *cycle threshold* (Ct, *i.e.*, número de ciclos), de modo a produzir uma curva de amplificação, a partir do qual o Ct é determinado. O valor de Ct corresponde ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência do ADN gerado ultrapasse o sinal de fluorescência basal, correspondente ao “ruído” do equipamento. Desta forma, o ADN amplificado é proporcionalmente correlacionado com o nível inicial do ADN alvo que serve de base para a quantificação relativa do ADN modelo (Figura 8). Além de todos os componentes necessários para a técnica convencional, os ensaios de RT-PCR implicam química de deteção, incluindo por exemplo corantes de ADN como o SYBR Green; tecnologias de exonucleases, como é o caso de sondas de hibridização TaqMan, de acordo com Lübeck, (2003), citado por Löfström, Krause, Josefsen, Hansen, & Hoorfar (2009), e por transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET) para deteção de diferentes microrganismos (Chen *et al.*, 2017). O aumento do sinal fluorescente após cada ciclo sucessivo permite a quantificação direta do ADN alvo, que está correlacionado com a concentração do ADN modelo das bactérias presentes na amostra, sem necessidade de etapas pós-PCR, tornando a automatização e tecnologia de *high throughput* possíveis (Klein, 2002; Keer & Birch, 2003; Mackay, 2004; Valasek & Repa, 2005; Postollec, Falentin, Pavan, Combrisson, & Sohier, 2011).



**Figura 8.** Gráfico de amplificação por RT-PCR: fluorescência versus número de ciclos, do software CFX-96™, Bio-Rad®.



Os corantes de ADN em cadeia dupla e o ensaio 5' nuclease fluorescente são os dois sistemas de detecção mais utilizados. O primeiro está bem adaptado às análises de rotina de baixo custo, enquanto o segundo pode permitir a detecção de vários genes em ensaios multiplex, numa única reação (Postollec *et al.*, 2011). Uma desvantagem dos corantes de ADN em cadeia dupla (*e.g.*, SYBR Green) é que se podem ligar a todos os ADN de dupla cadeia, incluindo os produtos amplificados por PCR e dímeros e, portanto, potencialmente pode impedir ou interferir com a monitorização precisa da sequência alvo a ser amplificada. Em alternativa, as sondas específicas para a sequência do ADN (*i.e.*, os oligonucleótidos marcados com moléculas fluorescentes, que atuam como moléculas repórter) permitem a detecção apenas após a hibridização da sonda com a sua sequência complementar, tornando o RT-PCR mais específico. Sondas que contenham ácidos nucleicos bloqueados (*i.e.*, *Locked Nucleic Acid*, LNA) são compostas por oligonucleótidos derivados de ADN modificado com uma ligação extra entre o oxigénio ligado ao segundo carbono e o carbono 4 (Braasch & Corey, 2001) (Figura 9). Este análogo de ADN confere maior estabilidade e maior afinidade de ligação às sequências complementares, permitindo a otimização de procedimentos que exijam um poder discriminatório mais elevado. De acordo com Proudnik *et al.*, (2003), citado por Josefsen, Krause, Hansen, & Hoorfar (2007), as sondas com bases de LNA têm uma maior temperatura de melting do que as sondas TaqMan visto que aumentam o poder de hibridização no ADN e têm sido reportadas como sendo mais sensíveis face a outras sondas.



**Figura 9.** Comparação estrutural entre ADN e LNA (Adaptado de Jensen, Singh, Kumar, Wengel, & Jacobsen, 2001).

Outra característica desta metodologia é que para a análise quantitativa (Chen *et al.*, 2017) ou qualitativa é necessário a utilização de um controlo interno de amplificação (*i.e.*, *Internal Amplification Control*, IAC) nos ensaios, baseado no raciocínio de que «se nenhum gene alvo ou IAC seja amplificado, o resultado é inválido e a amostra deve ser repetida» (Chen *et al.*, 2017). Assim, a norma da ISO para métodos baseados em PCR para a detecção de agentes patogénicos transmitidos por alimentos (ISO 22174:2005) afirma que «a presença de uma inibição em PCR, deve ser demonstrada utilizando controlos apropriados, (...) em cada reação de PCR» (Chen *et al.*, 2017).

A amplificação por RT-PCR geralmente é feita para um volume final de 20 a 25 µl (Chen *et al.*, 2017) ou 50 µl que inclui a amostra de ADN já extraída, o IAC, uma master mix que contenha MgCl<sub>2</sub>, dNTPs e ADN polimerase, os primer de PCR, as sondas específicas e ainda água destilada ultrapura livre de nucleases de modo a perfazer o total do volume (Chen *et al.*, 2017). Os parâmetros dos ensaios são geralmente estabelecidos da seguinte forma: (I) incubação a 95 °C durante 10 minutos para permitir a desnaturação de ADN e a ativação enzimática, (II) ocorrência

de 45 a 50 ciclos consistindo de um passo de desnaturação de ADN a 95°C durante 10 segundos, (III) um passo de *annealing* (a diferentes temperaturas baseadas na  $T_m$  dos primers) durante 20 a 30 segundos e um passo de extensão a 72°C durante 10 segundos (Chen *et al.*, 2017).

A técnica de RT-PCR confere várias vantagens em relação ao PCR convencional. O risco de contaminação cruzada é menor porque a presença do alvo na amostra é demonstrada por um aumento de fluorescência do sinal. Por outro lado, não é necessário nenhum processamento dos produtos amplificados de ADN pós-PCR (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996), o sinal fluorescente é proporcionalmente linear ao nível do ADN alvo na amostra e o ensaio é totalmente automatizado (Gibson, Heid, & Williams, 1996). Esta metodologia é mais rápida do que os métodos convencionais baseados em cultura dos microrganismos e é altamente sensível, específica, reprodutível e permite a deteção simultânea de diferentes genes alvo e/ou diferentes microrganismos (Postollec *et al.*, 2011) Assim, é possível economizar-se tempo, custos e esforços consideráveis na medida em que o número de reações a serem realizadas para detetar agentes patogénicos em amostras de alimentos podem ser diminuídas (Elnifro, Ashshi, Cooper, & Klapper, 2000), uma vez que uma reação monoplex pode ser limitada por ter elevado custo e/ou volume limitado da amostra, assim, foram desenvolvidos os ensaios duplex (Rodriguez-Lazaro, Hernández, & Pla, 2004) e multiplex (Elizaquível & Aznar, 2008) de PCR, permitindo a amplificação e deteção simultânea de mais de uma sequência alvo numa única reação (Chen *et al.*, 2017).

## 2.5 Deteção e diferenciação de estirpes de *Salmonella*

A deteção de *Salmonella* spp. seguindo os métodos convencionais é demorada e, além disso, de acordo com Fricker (1987), citado por Eyigor, Carli, & Unal (2002) podem ser obtidos resultados falsos negativos quando o número inicial de *Salmonella* é baixo na amostra. Assim, é necessário um método de deteção de *Salmonella* que seja rápido e sensível com um plano de amostragem adequado para este agente patogénico na indústria alimentar. Para este efeito, a técnica PCR foi aplicada em vários tipos de amostras após incubação de pré-enriquecimento (Stone, Oberst, Hays, McVey, & Chengappa, 1994; Aabo, Andersen, & Olsen, 1995; Chiu & Ou, 1996; Cohen, Martin, Simpson, Wallis, & Neibergs, 1996; Luk, Kongmuang, Tsang, & Lindberg, 1997; Bennett, Greenwood, Tennant, Banks, & Betts, 1998; Lin & Tsen, 1999; Soumet *et al.*, 1999). A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) para a deteção específica de *Salmonella* em alimentos é cada vez mais utilizada como uma ferramenta rápida e confiável para o controlo de amostras contaminadas ao longo da cadeia de produção de alimentos. Atualmente existem métodos baseados em RT-PCR disponíveis para deteção de *Salmonella* em diferentes tipos de alimentos (Chen *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999; Hoorfar, Ahrens, & Rådström, 2000; Knutsson, Löfström, Grage, Hoorfar, & Rådström, 2002; Kurowski, Traub-Dargatz, Morley, & Gentry-Weeks, 2002; Malorny *et al.*, 2004; Perelle *et al.*, 2004; Guy, Kapoor, Holicka, Shepherd, & Horgen, 2006) mas alguns, não são aplicáveis no diagnóstico uma vez que não contêm um controlo interno de amplificação (IAC).

Existem vários alvos característicos utilizados para a deteção de *Salmonella* em microbiologia alimentar, tais como *oriC* (*i.e.*, gene que codifica para a origem de replicação) (Woods *et al.*, 2008), *ompC* (*i.e.*, gene da proteína da membrana externa principal) (S. Chen, Wang, Beaulieu, Stein, & Ge, 2011; González-Escalona, Brown, & Zhang, 2012); *stn* (*i.e.*, gene da enterotoxina) (Moore & Feist, 2007), *hila* (*i.e.*, gene que regula o sistema de secreção do tipo III)

(Donhauser *et al.*, (2011), citado por Gokduman, Dilek Avsaroglu, Cakiris, Ustek, & Gurakan, (2016)), *iroB* (*i.e.*, gene responsivo ao ferro) (Murphy, McLaughlin, Ohai, & Grant, 2007); *aceK* (*i.e.*, gene quinase fosfatase isocitrato desidrogenase) (O'Regan *et al.*, 2008) e o *locus* ttrRSBC (*i.e.*, onde estão localizados os genes estruturais da tetracionato redutase – genes *ttr*) (Hyeon, Park, Choi, Holt, & Seo, 2010; Josefsen *et al.*, 2007; Malorny *et al.*, 2004). Embora alguns estudos acima mencionados tenham obtido resultados promissores utilizando diferentes primers e sondas, ainda não existe um protocolo normalizado internacionalmente para a detecção de *Salmonella* baseada em RT-PCR, seja para testar a presença/ausência de *Salmonella* ou para a quantificação relativa (Gokduman *et al.*, 2016). Embora o gene *invA*, essencial na invasão por *Salmonella* das células epiteliais de mamíferos seja o alvo mais utilizado para detecção deste microrganismo por RT-PCR (O'Regan *et al.*, 2008), já foi demonstrado anteriormente por Ginocchio, Rahn, & Clarke, 1997 que existe instabilidade e que ocorrem deleções naturais na ilha de patogenicidade 1, onde está localizado, e foi demonstrado em alguns estudos (Galan & Curtiss, 1991; Rahn *et al.*, 1992) que o gene *invA* está em falta em algumas estirpes. Esta ilha de patogenicidade abrange, ainda, o gene *spa* e o loci *hil* (Malorny *et al.*, 2004). Esta instabilidade pode explicar a menor sensibilidade obtida ao utilizar o gene *invA* quando *Salmonella* se encontra em concentrações mais baixas (Gokduman *et al.*, 2016).

Malorny *et al.*, (2004), e mais tarde González-Escalona *et al.*, (2012) e Gokduman *et al.*, (2016) sugeriram um alvo alternativo e mais geneticamente estável em todas as estirpes de *S. enterica* e *S. bongori*, como é o caso do gene *ttr* (Malorny *et al.*, 2004), visto que um dos alvos específicos para *Salmonella* frequentemente utilizado pode levar a resultados falsos negativos para algumas estirpes (*e.g.*, *Salmonella* Saint Paul) (Malorny *et al.*, 2004). A inclusividade e exclusividade deste ensaio, aplicando 110 estirpes de *Salmonella* e 87 estirpes que não fossem *Salmonella*, foi de 100% em ambos os casos. Além disso, este ensaio foi validado em ensaios colaborativos produzindo resultados satisfatórios (Malorny *et al.*, 2007). Omiccioli, Amagliani, Brandi, & Magnani, (2009) selecionaram igualmente o gene *ttr* para detecção de *Salmonella*, contudo recorreram a sondas com bases LNA para ensaios de PCR multiplex, de modo a aumentar a especificidade dos ensaios uma vez que pretendiam detetar três patogênicos diferentes: *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 e *Listeria monocytogenes*. Gokduman *et al.*, (2016) também utilizaram o *locus* ttrRSBC em conjunto com outra região alvo, o gene *invA*. Apesar de não utilizarem sondas com bases de LNA, os ensaios conduzidos por Malorny *et al.*, 2004 demonstraram a elevada seletividade na medida em que realizaram o pré-enriquecimento descrito na norma ISO 6579, e de seguida extraíram e purificaram o ADN, demonstrando elevada precisão face aos métodos de cultura convencionais.

Existe uma gama de bactérias com a capacidade de utilizarem o tetracionato como aceitador final de eletrões (Hensel, Nikolaus, & Egelseer, 1999). A respiração do tetracionato é característica de alguns géneros pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, incluindo *Salmonella*, *Citrobacter* e *Proteus* (Barrett & Clark, 1987), mas não foi extensivamente estudado noutras famílias de bactérias, e caso existam semelhanças genéticas, pode levar a resultados falsos positivos nos ensaios de PCR. De acordo com Richard *et al.*, (1978) e Malorny *et al.*, (2004), a respiração do tetracionato foi considerada uma das características fenotípicas para a classificação de *Enterobacteriaceae* e de outras bactérias de Gram negativo. A região selecionada por Malorny *et al.*, (2004) para a detecção de espécies pertencentes ao género *Salmonella* é o

*locus* ttrRSBC que nunca tinha sido descrito anteriormente para a detecção específica de *S. enterica* ou *S. bongori*. Estes autores desenvolveram e validaram uma *open formula* não patenteada por RT-PCR para testar a presença de *Salmonella* em amostras alimentares. O *locus* ttrRSBC é necessário para a respiração do tetrionato em *Salmonella* e consiste em cinco genes organizados num operão (Rahn *et al.*, 1992; Malorny *et al.*, 2004). Este *locus* foi anteriormente atribuído à ilha de patogenicidade 2 de *Salmonella*, e foi demonstrado por hibridização que o operão ocorre em todas as subespécies das 2 espécies de *Salmonella* (Hensel *et al.*, 1999). Os genes *ttrA*, *ttrB* e *ttrC* codificam as proteínas estruturais da enzima tetrionato redutase (Hensel, Hinsley, Nikolaus, Sawers, & Berks, 1999), uma enzima respiratória que reduz o tetrionato a tiosulfato (Hensel *et al.*, 1999). A capacidade de respiração do tetrionato é provável que seja significativa no ciclo de vida de *Salmonella* spp., principalmente durante a infeção (Hensel *et al.*, 1999).

As infeções causadas por agentes patogénicos entéricos e a diarreia resultante são uma das causas de morbidade em todo o mundo, especialmente nos países subdesenvolvidos (Viswanathan, Hodges, & Hecht, 2009). As espécies de *Salmonella* durante o processo de infeção intestinal, superam diversas barreiras implementadas pelo microbiota comensal, assim como os mecanismos de defesa do hospedeiro. Um destes mecanismos do hospedeiro é a limitação dos nutrientes essenciais, como o ferro (Fe), ao agente patogénico (Schaible & Kaufmann, 2004; Collins, 2008; Nairz *et al.*, 2008) que utiliza os seus fatores de virulência para invadir e sobreviver na superfície epitelial e intracelular intestinal. As atividades do hospedeiro durante a inflamação são partes constituintes do sistema imunitário inato e envolvem a produção de moléculas bacterianas – os siderofóros – que atuam na captação do Fe, denominadas lipocalinas (M. Raffatellu *et al.*, 2009), e a limitação do Fe é mediada por citocinas inflamatórias (Nairz *et al.*, 2008). Como a *Salmonella* necessita de Fe, aliás, 7% do seu genoma é regulado por Fe (Bjarnason, Southward, & Surette, 2003), e seu o crescimento é promovido quando há elevada concentração de Fe (Layton *et al.*, 2010), acaba por desenvolver estratégias para superar a esta limitação como a produção de um quelante de Fe, as salmoquelinas (Raffatellu *et al.*, 2009) e ativa mecanismos de virulência. A aquisição de Fe durante a infeção tem sido demonstrada como essencial para desenvolver total virulência (Janakiraman & Schlauch, 2000). O fator de virulência do sistema de secreção do tipo III (T3SS), que é mediador da invasão no epitélio intestinal, é estimulado em condições elevadas de Fe (Janakiraman & Schlauch, 2000; Ellermeier & Schlauch, 2008; Teixidó, Carrasco, Alonso, Barbé, & Campoy, 2011).

Em indivíduos saudáveis, pensa-se que o lúmen intestinal seja bastante anaeróbio, com vestígios de oxigênio sendo facilmente consumidos pelo microbiota (Thiennimitr, Winter, & Bäumlér, 2012). A maioria do microbiota são bactérias estritamente anaeróbias pertencentes aos filos Bacteroidetes e Clostridiales, que dependem da fermentação de aminoácidos e polissacarídeos complexos. Durante a infeção por *Salmonella*, a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal está associada a mudanças na estrutura da comunidade microbiana (Sekirov *et al.*, 2010), resultando num enriquecimento do agente patogénico no lúmen intestinal e uma depleção em Bacteroidetes e Clostridiales. Um dos produtos finais gerados pela fermentação do microbiota é o sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S), um composto citotóxico que é convertido em tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) pelas colónias do epitélio intestinal (Thiennimitr *et al.*, 2012), contudo, o tiosulfato não pode ser utilizado como aceitador final de eletrões pelos genes do *locus* ttrRSBC

(Hinsley & Berks, 2002). Durante a inflamação, os neutrófilos, que migram para o lúmen intestinal libertam espécies reativas de oxigénio (ROS) na tentativa de matar as bactérias, e que ao reagir com o tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), ocorre oxidação e forma-se um novo aceitador respiratório de eletrões, o tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) (Winter *et al.*, 2010). Em contraste com o restante microbiota que utiliza a fermentação, a *Salmonella* pode utilizar o tetrionato como aceitador final de eletrões de forma a suportar o seu crescimento através da respiração anaeróbia, sendo mais eficiente do que a fermentação (Hensel *et al.*, 1999). Além disso, a *Salmonella* pode beneficiar da inflamação ao obter acesso a novos nutrientes porque a respiração anaeróbia do tetrionato facilita o crescimento de fontes de carbono pouco fermentáveis. Assim, o seu crescimento permite que haja competição com outros microrganismos, resultando num aumento acentuado na abundância relativa de *Salmonella* no intestino (Winter *et al.*, 2010). Por sua vez, o aumento do seu crescimento no lúmen intestinal promove a transmissão de *Salmonella* pela via fecal-oral (Lawley *et al.*, 2008) (Figura 10).

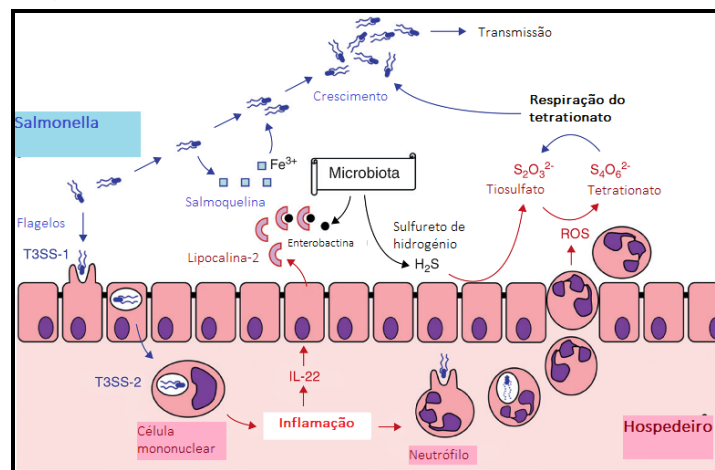


Figura 10. Respiração do tetrionato por *Salmonella* (Adaptado de Thiennimitr *et al.*, 2012).

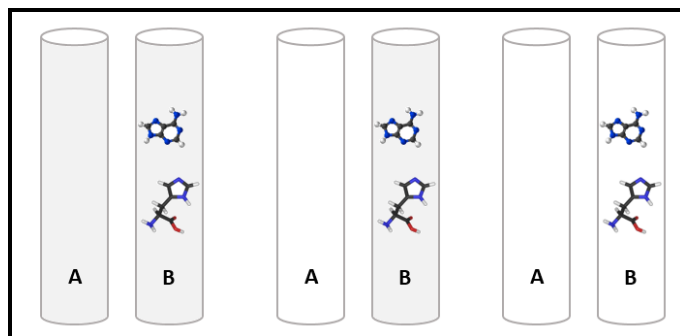
A troca transmembranar de iões de sódio ( $Na^+$ ) por protões ( $H^+$ ) existe praticamente em todos os organismos e em todos os domínios da vida (Lentes *et al.*, 2014) e é essencial para a sobrevivência das células, uma vez que controla as concentrações intracelulares destes dois iões, regula os valores do pH intracelular e o volume celular (Padan, Maisler, Taglicht, Karpel, & Schuldiner, 1989; Brett, Donowitz, & Rao, 2005; Lentes *et al.*, 2014). De acordo com Padan & Krulwich (2000), citado por Padan (2014) uma concentração baixa ou elevada destes iões pode ser um fator de stress para as células. Entre os diferentes sistemas de transporte de iões existem os uniporte (*i.e.*, se apenas um ião for transportado numa direção), antiporte (*i.e.*, dois ou mais iões são transportados em direções opostas) ou simporte (*i.e.*, dois ou mais iões são transportadas na mesma direção), e de acordo com o sistema de classificação dos transportadores, a maior parte dos transportadores dos iões  $Na^+/H^+$  pertencem à superfamília dos antiportes monovalentes catião/protão (CPA) (Brett *et al.*, 2005) que são proteínas integrais da membrana celular (Lentes *et al.*, 2014). A atividade deste antiporte tem uma distribuição ampla e desempenha papéis fisiológicos essenciais em procariontes (Pinner *et al.*, 1992).

O protótipo atual para a família de antiportes CPA é o antiporte NhaA  $Na^+/H^+$  de *Escherichia coli* (EcNhaA) (Padan, 2014). EcNhaA pertence ao subgrupo eletrogénico CPA2 da superfamília CPA e cataliza a troca de dois iões  $H^+$  por um ião  $Na^+$  (Pinner *et al.*, 1992; Padan,

2014) Estes transportadores de íões  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  parecem ter um perfil de atividade altamente regulado pelo pH. Inicialmente, esta hipótese foi explicada em EcNhaA pela regulação alostérica da atividade coordenada por um «sensor de pH» que ativava EcNhaA apenas acima de um certo valor de pH (Padan, Kozachkov, Herz, & Rimon, 2009). O papel fisiológico da EcNhaA é permitir o crescimento de *E. coli* em meios de alta salinidade ou na presença de lítio, de acordo com Padan & Krulwich (2000), citado por Padan (2014). Os homólogos próximos de EcNhaA foram encontrados noutras bactérias pertencentes à família das Enterobacteriaceae, incluindo *Vibrio cholerae* (Vimont & Berche, 2000) *Salmonella* Enteritidis (Pinner *et al.*, 1992), *Salmonella* Typhimurium (Lentes *et al.*, 2014) e *Helicobacter pylori* (Inoue *et al.*, 1999), partilhando sequências conservadas do gene **nhaA** que codifica para este antiporte em *E. coli*, e é regulado pelo gene **nhaR** (Pinner *et al.*, 1992).

Lentes *et al.*, (2014) recentemente caracterizaram a proteína NhaA de *Salmonella* Typhimurium LT2 (StNhaA), encontrando um perfil de atividade de transporte muito semelhante (aproximadamente 92% de identidade partilhada) ao de EcNhaA em relação à transição de pH baixo para alto, embora o transportador tenha uma melhor atividade com valores de pH alcalinos (Călinescu, Danner, Böhm, Hunte, & Fendler, 2014). O gene **nhaA** em *Salmonella* Enteritidis foi originalmente identificado num fragmento de ADN obtido por complementaridade (Pinner *et al.*, 1992). Este fragmento codifica proteínas homólogas ao antiporte NhaA e ao gene regulador **nhaR** e a sua expressão aumentou a atividade do antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e também demonstrou atividade para o  $\text{Li}^+$  (Lentes *et al.*, 2014). Em *S. enteritidis*, a proteína NhaA tem 388 aminoácidos, 9 deles são histidinas, e 387 em *E. coli*, diferindo em 40, com 15 regiões conservadas (Pinner *et al.*, 1992). As histidinas têm sido invocadas como aminoácidos essenciais em reações nas quais os íões  $\text{H}^+$  são translocados através das membranas. Maurischat, Szabo, Baumann, & Malorny, 2015 através da sequenciação total do genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS) detetaram que a estirpe vacinal e as selvagens diferiam entre 1 a 2 polimorfismos específicos de um nucleótido (*i.e.*, *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) no gene **nhaA**, concluindo que este antiporte permite a distinção entre as estirpes de *Salmonella*.

Um kit de diagnóstico de *Salmonella*, que se baseia na auxotrofia para a adenina e histidina ( $\text{ade}^-/\text{his}^-$ ) visto que a estirpe vacinal necessita de ser suplementada com ambos os aminoácidos para crescer, já se encontra comercialmente disponível, contudo torna-se dispendioso para os laboratórios porque continua a existir a necessidade da utilização de meios de cultura até obter purificação de culturas. Basicamente, o kit contém dois meios de crescimento, o meio A que não contém adenina nem histidina e o meio B, que contém ambos os aminoácidos. Após o cultivo de uma colónia pura em ambos os meios, os resultados podem ser interpretados tal como demonstra a Figura 11.



**Figura 11.** Quando há crescimento/turvação em ambos os meios, como representa a primeira imagem à esquerda, estamos perante uma estirpe selvagem. Quando apenas há crescimento no meio B, a estirpe é do tipo vacinal. Excecionalmente, poderá existir uma estirpe selvagem auxotrófica muito rara como representa a última imagem.

A vacina confere proteção precoce, persistente e é de fácil aplicação. Além dos evidentes benefícios para aves e consumidores, também permite uma identificação precisa, através de amostras de fezes frescas e de botas para esfregaço, após o primeiro dia de vacinação, possibilitando uma monitorização da eficiência da vacinação no bando em questão. Um dos benefícios da estirpe vacinal é que apresenta excelente crescimento em todos os meios tradicionalmente utilizados para o cultivo de *Salmonella*, inclusive naqueles recomendados pela UE, onde a legislação especifica a necessidade de um método bacteriológico adequado para diferenciar as estirpes selvagens desta estirpe contida na vacina.

O sucesso na deteção de *Salmonella* spp. é a chave para a prevenção e identificação de problemas relacionados com a saúde humana (Lazcka, Del, & Mu, 2007). Embora os métodos microbiológicos convencionais sejam aceites como normas padrão para a deteção de *Salmonella* são dispendiosos e demorados. Assim, é importante desenvolver métodos mais sensíveis e mais rápidos para a deteção de *Salmonella* (Fey et al., 2004; Patel, Bhagwat, Sanglay, & Solomon, 2006; Lazcka et al., 2007; Hagren, Lode, Syrjälä, Korpimäki, & Tuomola, 2008; McCabe et al., 2011; Zhou & Pollard, 2012; Singh et al., 2013). Devido à rapidez e elevada confiança dos ensaios de RT-PCR, a deteção de *Salmonella* utilizando uma sonda SYBR Green (Chen et al., 2011) ou através de sondas TaqMan (Malorny et al., 2004; Josefsen et al., 2007; O'Regan et al., 2008; Woods et al., 2008; Löfström et al., 2009; González-Escalona et al., 2009; Hyeon et al., 2010) tem sido desenvolvida. Já existindo, atualmente, sistemas comercialmente disponíveis baseados na deteção de *Salmonella* por PCR como são exemplo TaqMan® *Salmonella* Kit da Applied Biosystems, iQ-Check™ *Salmonella* Kit da Bio-Rad® e ainda o sistema BAX® (DuPont Qualicon, Wilmington, Delaware) (Bennett et al., 1998; D'aoust et al., 2007).

De modo a aumentar a fiabilidade dos resultados, sempre que seja necessário, o laboratório pode complementar as análises pedidas com pormenores adicionais, como é o caso da utilização do gene *ttr* para confirmação de *Salmonella* spp. apenas em amostras alimentares e ambientais.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Objetivos

O diagnóstico, a vigilância e o controlo de *Salmonella* na criação de aves domésticas para consumo humano requer ferramentas de diferenciação rápida entra a estirpe vacinal e as estirpes

selvagens de *Salmonella*. Então, a primeira parte deste estágio teve como objetivos o desenvolvimento de uma nova metodologia e a sua implementação na rotina laboratorial do INIAV, I.P. que permita (I) a deteção de *Salmonella* spp., confirmando resultados suspeitos em meio XLD através da norma ISO 6579, em amostras alimentares, ambientais e da fase de produção primária e a (II) diferenciação entre a estirpe vacinal e estirpes selvagens de *Salmonella*, por PCR em Tempo Real (RT-PCR), em matéria fecal de origem animal e noutras amostras provenientes da fase de produção primária. Esta metodologia permitirá a redução de perdas económicas por parte dos produtores, uma vez que a libertação dos bandos para abate poderá ser mais rápida, contribuindo para a melhoria da saúde pública e da economia nacional.

### 3.2 Estirpes bacterianas, condições de cultivo e de conservação

Um total de 79 estirpes, conservadas a -80°C em Microbank™, foram recuperadas em 5 ml de meio líquido de pré-enriquecimento não seletivo (*i.e.*, Água Peptonada Tamponada, APT) a partir das esferas de Microbank™, das quais, estirpes alvo (*i.e.*, estirpes que se espera que sejam detetadas como *Salmonella* spp. por RT-PCR, sejam estirpes do tipo selvagem ou vacinal). Foram ainda recuperadas estirpes não-alvo (*i.e.*, estirpes que não se espera que sejam detetadas por RT-PCR), em APT, à exceção da espécie *Clostridium perfringens*, uma bactéria de Gram positivo e produtora de esporos segundo Steven *et al.*, (2006), citado por Li, Paredes-Sabja, Sarker, & McClane (2016), que foi ressuspensa em caldo tioglicolato para permitir a sua recuperação e crescimento em anaerobiose, uma vez que o ácido tioglicólico é um agente redutor que consome oxigénio no meio, facilitando o crescimento de anaeróbios obrigatórios, de acordo com Summannen *et al.*, (1993), citado por Cadnum *et al.*, (2014). Todas estas estirpes foram repicadas para Nutriente Agar (NA) após crescimento num período de incubação de 24h a 37°C±1, em APT. Este total corresponde a 31 estirpes consideradas «negativos esperados», dos quais 2 estirpes são «falsos positivos» conhecidos (*i.e.*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii*), 44 estirpes selvagens de *Salmonella*, 3 estirpes de *Salmonella* Enteritidis do tipo vacinal (Tabela 6). Entre fevereiro e abril de 2017 foram cultivadas, e adicionadas ao total anterior, 27 estirpes (*i.e.*, 5 estirpes selvagens de *Salmonella* e 22 *Salmonella* estirpe vacinal) em meio Tryptone Soya Agar (TSA) a partir do NA provenientes de amostras de produção primária (*e.g.*, fezes e botas para esfregaço), após realização dos testes biológicos e serológicos tal como descrito na norma ISO 6579 (Anexo IX). Estas estirpes foram enviadas em meio XLD para serotipificação pelo Esquema de Classificação de Kauffmann-White pelo Laboratório de Microbiologia e Micologia (INIAV, I.P. – Pólo de Oeiras, Lisboa) para que algumas das estirpes utilizadas para o desenvolvimento da nova metodologia fossem originárias de amostras reais, mas já serotipificadas antes dos ensaios iniciais, assegurando a veracidade dos futuros resultados. Todas as estirpes crescidas em tubos de APT e em meio NA foram conservadas à temperatura de 5°C.

**Tabela 6.** Total de estirpes utilizadas para desenvolvimento da nova metodologia.

Estirpes	Número de estirpes
<i>Salmonella</i> Enteritidis estirpe vacinal	25
<i>Salmonella</i> Enteritidis selvagem	2
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC	1
Outras estirpes de <i>Salmonella</i>	46
Outras estirpes que não <i>Salmonella</i>	31



Foram também utilizadas 4 amostras HPA (*Health, Protection Agency*) que consistem em líofilos de *Skimmilk* contendo misturas conhecidas de estirpes bacterianas: a amostra SO450 continha *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* e *Escherichia coli* e foi escolhida por conter falsos positivos; na amostra SO457 existia *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e foi contaminada com *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal; a amostra SO481 continha *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Anatum, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, sendo utilizada pela existência de uma estirpe selvagem de *Salmonella* e de um falso positivo típico quando se testa a presença de *Salmonella* (*i.e.*, *Citrobacter freundii*), e por fim, a amostra SO482 era composta por *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Essen, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, que como já continha uma estirpe de *Salmonella* selvagem, foi adicionada uma estirpe vacinal de modo a testar se era possível, ou não, isolar ambas as estirpes.

As amostras reais provenientes dos planos comunitários PIGA, CAA e PIF que, após isolamento em meio XLD, contivessem estirpes que se apresentassem suspeitas em meio MSR/V, caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) e caldo Muller-Kauffmann (MKTTn) devem ser testadas para a presença de *Salmonella*, e no caso do plano PNCS, as amostras suspeitas devem ser confirmadas para *Salmonella* e também distinguidas em relação ao serotipo vacinal ou selvagem.

### 3.3 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. pela norma ISO 6579-1:2017

A detecção de espécies pertencentes ao género *Salmonella* em amostras provenientes de produção primária (*e.g.* como fezes e botas para esfregaço) deve ser realizada de acordo com a norma ISO 6579-1:2017 (Anexo IX). Neste método de detecção utiliza-se como meio de enriquecimento seletivo o meio semissólido MSR/V, após um pré-enriquecimento das amostras em APT, tal como descrito no Anexo IX, contudo este meio é utilizado em substituição do caldo RVS, podendo ser acompanhado pelo caldo MKTTn. Para dar início ao desenvolvimento da nova metodologia, no caso das amostras de produção primária os passos seguintes de identificação e confirmação indicados neste anexo, excluindo o passo de detecção de *Salmonella* spp. através do Kit iQ-Check® *Salmonella* II por RT-PCR, são efetuados normalmente. Como a implementação da nova metodologia na pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras alimentares e ambientais também é um dos objetivos, a utilização do Kit para RT-PCR ainda é necessária para futuras comparações dos resultados obtidos até à validação da nova metodologia. Com a atualização da norma para detecção de *Salmonella* em amostras alimentares, ambientais e de produção primária, o meio MSR/V (De Smedt, Bolderdijk, Rappold, & Lautenschlaeger, 1986) resultando da modificação do caldo RVS (Goossens, Wauters, de Boeck, Janssens, & Butzler, 1984; De Smedt *et al.*, 1986) tem sido demonstrado que permite um isolamento mais rápido e sensível de estirpes de *Salmonella* móveis (*i.e.*, permite a detecção de motilidade através de halos de crescimento que rodeiam o ponto de inoculação) (Worcman-Barninka, Destro, Fernandes, & Landgraf, 2001). E devido à baixa incidência de estirpes não móveis de *Salmonella* (Holbrook *et al.*, 1989), os métodos baseados na motilidade deste microrganismo são mais frequentemente utilizados na rotina laboratorial. Assim, os tempos para detecção de *Salmonella* diminuem, bem como o tempo de armazenamento e de custos para a indústria alimentar (Oggel, Nundy, Zebchuk, & Shaw, 1995). A seletividade do meio é baseada na capacidade de estirpes de *Salmonella* migrarem no ágar. O baixo pH minimiza a

migração da maioria dos microrganismos móveis que pertencem à família *Enterobacteriaceae*, à exceção de *Salmonella*, *Enterobacter cloacae* e de *Citrobacter freundii*. Contudo, o crescimento destes duas últimas espécies é inibido devido à adição de novobiocina, que também permite uma melhor recuperação de *Salmonella* a partir de amostras ambientais (Jensen, 2003) e pela incubação das placas de MSRV a 41.5°C. Este meio contém outros agentes inibidores, por exemplo de *Proteus* spp. e de *Pseudomonas aeruginosa*, tais como oxalato de verde malaquite (Blivet, Salvat, Humbert, & Colin, 1998; Joosten, Bidlas, & Garofalo, 2006) e uma elevada concentração de MgCl<sub>2</sub> (J. De Smedt, Bolderdijk, & Milas, 1994; Worcman-Barninka *et al.*, 2001) concluíram que uma incubação por mais 24 horas, aumenta a hipótese de recuperação de *Salmonella*, sem aumentar o número de resultados falsos-positivos, na medida em que nem todas as estirpes de *Salmonella* migram ao fim de 24 horas de incubação, mas sim ao fim de 48 horas, enquanto outras espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* não demonstraram migração após as 24 horas adicionais. Esta obtenção rápida de resultados suspeitos em apenas 48 horas confere vantagem a este método e a deteção de estirpes não produtoras de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) e lactose positivas também, em comparação com outros meios de cultura (Worcman-Barninka *et al.*, 2001).

A confirmação e identificação passam ainda pela utilização de dois meios de cultura distintos, na medida em que diferentes serotipos podem ter variações na sensibilidade aos diversos agentes seletivos dos meios (Singer, Mayer, Hanson, & Isaacson, 2009), e tal como descrito no Anexo IX, são utilizados os meios XLD e Chromo*Salmonella* ou Rapid*Salmonella*. O meio XLD permite verificar a fermentação da xilose, a descarboxilação da lisina e a produção de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) para uma diferenciação primária de *Shigella* e *Salmonella* de outras bactérias não patogénicas. O segundo meio seletivo e diferencial a utilizar é o meio Chromo*Salmonella* que se baseia na utilização de um substrato cromogénico que permite uma identificação presumível, rápida e fiável de *Salmonella* spp., sem testar a produção de H<sub>2</sub>S acoplado à não fermentação da lactose. O meio NA é um meio nutritivo utilizado com um propósito geral para cultivo, permitindo o crescimento de uma grande gama de organismos não fastidiosos, pelo seu elevado conteúdo em nutrientes permitindo purificar colónias de microrganismos. A partir das colónias isoladas neste meio, realizam-se os testes bioquímicos e serológicos: produção do citocromo c oxidase, aglutinação em Antiserum Poly A-I e Vi, que se baseia na determinação da composição antigénica, em que os antigénios se classificam em somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (Grimont & Weill, 2007), e em soro fisiológico, teste Triple Sugar Iron (TSI) (Josephson, Gerba, & Pepper, 1993) e caldo Triptofano e para galerias de identificação BBL™ Crystal™. Em substituição destas galerias procede-se à utilização da lisina e da ureia (Josephson *et al.*, 1993).

### 3.4 Extração de ADN para PCR em tempo real (RT-PCR)

Procedeu-se à extração do ADN das 105 estirpes, pipetando 100µL do tubo APT e acrescentando 100µL do reagente de lise de células bacterianas com lisozima e ADNse I. Para a espécie *Clostridium perfringens* foi utilizado um reagente de lise com microesferas para destruir a sua parede celular. Após 15 minutos a 98°C em agitação em termobloco para completar a extração, e depois de arrefecidas, as amostras foram diluídas em 1:10 e posteriormente congeladas. Como as estirpes ressuspensas em APT foram repicadas para placas de NA, procedeu-

se também à extração de uma colônia adicionando, a cada poço da microplaca *deepwell*, 250µL do reagente de lise e a microplaca foi seguidamente colocada em agitação no termobloco por 15 minutos a 98°C. Este foi o procedimento implementado e seguido para as futuras amostras (*i.e.*, todas as amostras reais necessitarão de extração a partir do NA em 250µL do reagente de lise para confirmar a presença de *Salmonella*, nas diferentes amostras) e para detetar a estirpe vacinal de *Salmonella* Enteritidis (*i.e.*, na mesma corrida de PCR em que se confirma a presença de *Salmonella* também é possível distinguir se a estirpe é vacinal ou não, no caso de amostras provenientes de produção primária).

### 3.5 Desenho de primers e sondas

Cada ensaio multiplex de RT-PCR consiste na deteção de três sequências alvo: (I) a do gene **ttr**, que deteta especificamente isolados de *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2004), incluindo a estirpe vacinal de *Salmonella* Enteritidis, (II) a do gene **nhaA**, para deteção da estirpe vacinal de *Salmonella* Enteritidis utilizada numa das vacinas mais empregues no controlo da prevalência de *Salmonella* em bandos de aves (Maurischat *et al.*, 2015) e (III) a de um controlo interno de amplificação (IAC) que deteta a sequência do plasmídeo pUC19.

Malorny *et al.*, (2004) utilizaram a sequência de **ttr6** para o primer *forward* (ttr6\_FW), localizado no gene **ttrC**, a sequência **ttr4** para primer *reverse* (ttr4\_RV) e a sequência **ttr5** para a sonda, ambos localizados no gene **ttrA** (Malorny *et al.*, 2004). De acordo com Livak *et al.*, (1995), citado por Malorny *et al.*, (2004), estes primers foram desenhados com base em alinhamentos múltiplos de sequências do locus ttrRSBC através do software Primer Express que permite uma identificação ótima dos primers e sondas dentro de regiões conservadas (versão 1.5; PE biosystems da Applied Biosystem™).

Para o gene **nhaA** foram escolhidas duas sondas (*i.e.*, **nhaA-WT** e **nhaA-V**) com ácidos nucleicos bloqueados (LNA) na posição de polimorfismos específicos de um nucleótido (SNPs). A sequência alvo específica para a estirpe mutante existente na vacina é referida por **nhaA-V** (Maurischat *et al.*, 2015). Esta sonda liga-se a locais semelhantes aos quais também se liga uma sonda não marcada por fluorescência e que é específica para estirpes selvagens de *Salmonella*, denominada por **nhaA-WT**, resultando em elevada especificidade e fiabilidade dos ensaios de RT-PCR (Maurischat *et al.*, 2015).

A utilização de um controlo interno de amplificação, que é coamplificado juntamente com os primers selecionados (Zadernowska & Chajeka, 2012) fornece uma ferramenta importante (Hoorfar *et al.*, 2003) para a indicação de falsos negativos, que possam ser causados por inibição da reação de PCR (*e.g.*, inibição da ADN polimerase) (Abu Al-Soud & Rådström, 1998), provocada pelas diferentes matrizes, ou até por algum erro no funcionamento do termociclador (Schoder *et al.*, 2003).

Os pares de primers e as respetivas sondas para os genes-alvo (**ttr** e **nhaA**) foram sintetizados pela empresa NZYTech de acordo com a listagem apresentada na Tabela 7. A dissolução dos primers e das sondas em água ultrapura para a preparação das soluções de trabalho foi realizada de acordo com o valor indicado na folha guia fornecida pelo laboratório de síntese.

**Tabela 7.** Sequências dos primers e das sondas do tipo *TaqMan* utilizadas nos ensaios de RT-PCR.

Patogénico/Alvo	Descrição	Sequência (5'-3') <sup>a</sup>	Referência
<i>Salmonella</i> spp.	<i>ttr6</i> _FW	CTC ACC AGG AGA TTA CAA CAT GG	(Malorny <i>et al.</i> , 2004)
	<i>ttr4</i> _RV	AGC TCA GAC CAA AAG TGA CCA TC	
	<i>ttr5</i> _sonda	HEX <sup>b</sup> -CAC CGA CGG CGA GAC CGA CTT T-BHQ1	
Estirpe vacinal de <i>Salmonella</i>	<i>nhaA</i> _FW	CGT ACC TGA TCC TGC	(Maurischat <i>et al.</i> , 2015)
	<i>nhaA</i> _RV	GCA AAA CAG GCT AAT CC	
	<i>nhaA</i> -V_sonda	Cy5 <sup>c</sup> -ACC TCC ATG C+T+A +CCG-BHQ2	
	<i>nhaA</i> -WT_sonda	TCC ATG CT+G CCG TTG G	
IAC (pUC19)	IAC_FW	GCA GCC ACT GGT AAC AGG AT	
	IAC_RV	GCA GAG CGC AGA TAC CAA AT	
	IAC_sonda	ROX <sup>d</sup> - AGA GCG AGG TAT GTA GGC GG-BHQ2	

a: + indica bases de LNA.

b: HEX: [6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein].

c: Cy5: cyanin 5.

d: ROX: carboxy-X-rhodamine.

A Tabela 7 demonstra as 4 sondas utilizada em cada ensaio multiplex: *i.e.*, sonda *ttr* que confirma a presença de espécies presuntivas de pertencerem ao género de *Salmonella*, a sonda *nhaA*-V que diferencia positivamente ou negativamente o serotipo da estirpe testada - vacinal ou não - e a sonda *nhaA*-WT que apenas compete pelos locais de ligação semelhantes aos da sonda *nhaA*-V. Segundo Maurischat *et al.*, 2015 a diferenciação entre estirpes selvagens e vacinais de *Salmonella* é possível visto que a sonda *nhaA*-V é específica e apresenta 100% de complementaridade ao gene *nhaA*, permitindo uma distinção através da ligação caso se utilize uma sonda para detetar estirpes selvagens (*nhaA*-WT). As estirpes vacinais e selvagens diferem entre 1 a 2 SNPs dentro da sequência alvo respetiva.

### 3.6 Ensaios de RT-PCR e definição do perfil térmico

Numa primeira fase deste trabalho, de modo a cumprir os objetivos de definir o ensaio de RT-PCR e de obter um perfil térmico adequado foram realizadas diversas corridas de PCR no termociclador CFX-96<sup>TM</sup> da Bio-Rad<sup>®</sup>, com 105 estirpes de origem conhecida (*e.g.*, provenientes de ensaios interlaboratoriais, estirpes selvagens isoladas de diferentes matrizes ou estirpes ATCC<sup>®</sup>) e que foram serotipificadas (no caso das estirpes suspeitas de pertencerem ao género *Salmonella*, segundo o esquema de classificação de Kauffmann-White) pelo Laboratório de Microbiologia e Micologia (INIAV, I.P. – Pólo de Oeiras, Lisboa) (Anexo X).

Inicialmente, o perfil térmico desenhado consistiu nos seguintes valores: (1) o passo de ativação da ADN polimerase e desnaturação da dupla cadeia do ADN a 95°C por 5 minutos, seguido de (2) desnaturação a 95°C por 15 segundos, (3) *annealing* a 60°C por 30 segundos, ocorrendo leitura da placa, e por fim (4) sucede-se a extensão a 72°C por 30 segundos, sendo que o ponto (2) é retomado e repetem-se estas etapas por mais 39 vezes (Tabela 8). Para escolher a temperatura e os tempos de ativação da ADN polimerase, da ocorrência de desnaturação do ADN e do *annealing* (*i.e.*, quando a diminuição da temperatura permite que os primers se liguem ao ADN alvo) foi tido em conta a tabela 2 do folheto de instruções de utilização da SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal Probes Supermix que descreve as recomendações para o desenho dos ensaios e para a

sua otimização. Para o ADN genómico é recomendada a ativação da ADN polimerase entre 2 a 3 minutos a 95°C e a desnaturação entre 5 a 15 segundos a 95°C, para o *annealing* é recomendado que sejam entre 10 a 30 segundos a 60°C uma vez que a Taq polimerase é bastante rápida e não necessita de muitos segundos para realizar o *annealing*. Esta supermix é duas vezes concentrada, pronta para ser usada, e é otimizada para ensaios de PCR em tempo real baseado em sondas, seja dependente de ROX ou não. SsoAdvanced™ contém uma polimerase mediada por anticorpos denominada por Sso7d-fusion, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, *enhancers* («acentuadores»), estabilizadores e uma mistura de corantes/fluoróforos passivos de referência (incluindo ROX e fluoresceína). Os primeiros ciclos são retirados, habitualmente, da leitura do software por causarem ruído na leitura dos resultados, contudo, nos primeiros ensaios do desenvolvimento desta metodologia não foram retirados, tal como demonstra a Tabela 8.

**Tabela 8.** Ensaios de RT-PCR para otimização do desenho do perfil térmico.

Perfil térmico Ensaios	(1) Ativação da ADN polimerase	(2) Desnaturação	(3) <i>Annealing</i>	Leitura na placa	(4) Extensão	(5) Voltar ao (2)
Ensaio 1	95°C, 5min	95°C, 15 s	60°C, 30 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 39x
Ensaio 2	95°C, 5 min	95°C, 15 s	47°C, 30 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 39x
Ensaio 3	95°C, 5 min	95°C, 15 s	55°C, 30 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 39x
Ensaio 4	95°C, 5 min	95°C, 15 s	60°C, 60 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 39x
Ensaio 5	95°C, 5 min	95°C, 15 s	57°C, 30 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 49x
Ensaio 6	95°C, 5 min	95°C, 15 s	55°C, 30 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 49x
Ensaio 7	95°C, 5 min	95°C, 15 s	55°C, 20 s	Leitura	72°C, 30 s	Repetir 49x

A leitura dos resultados é automática em formato digital, permitindo alterar/retirar a linha de base para uma melhor interpretação dos mesmos. O software CFX96™ fornece apresentação dos resultados em relatórios para impressão, e como esta metodologia apenas incide na avaliação qualitativa (*i.e.*, «amostra positiva» ou «amostra negativa»), é necessário selecionar a opção do modelo do relatório «*End-Point*» de modo a obter-se o resultado lido pelo software. Após cada ensaio de RT-PCR as curvas de amplificação do IAC e das amostras devem ser verificadas de forma a detetar eventuais erros ocorridos durante o ensaio, provocados pelo software CFX96™ ou pela matriz.

Os ensaios de RT-PCR são verificados e validados por comparação das curvas de amplificação dos controlos positivo (*i.e.*, *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076™ e *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal) e negativo (*i.e.*, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™). Sempre que se obtêm resultados presuntivos para *Salmonella* de acordo com a norma ISO 6579, realizam-se ensaios de RT-PCR para deteção de *Salmonella* spp. em amostras alimentares e ambientais e para confirmação (ou não) do serotipo vacinal, contudo estes resultados são confirmados pela serotipificação convencional segundo o Esquema de Classificação de Kauffmann-White pelo

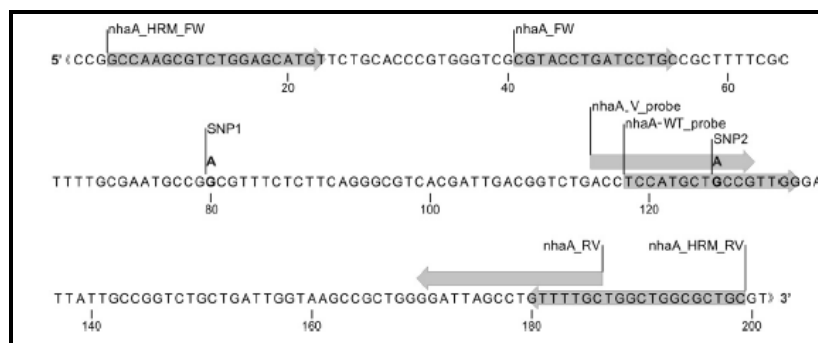
Laboratório de Microbiologia e Micologia (INIAV, I.P. – Pólo de Oeiras, Lisboa) para futura validação pelo Laboratório de Microbiologia dos Alimentos (LMA, INIAV – Pólo de Vairão).

### 3.7 Detecção de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real

A primeira abordagem passa pela deteção da presença de *Salmonella* spp., através do gene *ttr* responsável pela redução do tetracionato. O sinal do gene *ttr* que é específico para detetar a presença do ADN de *Salmonella* spp. é lido no canal HEX, e o sinal do IAC é lido no canal ROX, em simultâneo com os dois genes alvo.

### 3.8 Detecção de *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal por PCR em tempo real

A segunda abordagem utiliza a tecnologia TaqMan combinada com duas sequências específicas de LNA que diferenciam a estirpe vacinal das estirpes selvagens de *Salmonella* (*nhaA*-V e *nhaA*-WT, respetivamente) através de fluorescência, no caso de deteção da estirpe vacinal (Tabela 7). As duas sequências utilizadas para deteção do gene *nhaA* contêm apenas um dos dois SNPs distinguíveis (Figura 12). Cada ensaio consiste na deteção de *S. Enteritidis* estirpe vacinal e de estirpes selvagens de *Salmonella*, sendo baseada na distinção dos SNP em *nhaA* para a estirpe vacinal com a utilização do canal Cy5, na medida em que a sequência alvo para as estirpes selvagens não se encontra marcada com fluorescência, permitindo apenas a competição pelos locais de ligação.



**Figura 12.** Posição dos primers e das sondas utilizadas nos ensaios de RT-PCR para a identificação específica da estirpe vacinal na região genómica relevante (46 682 – 46 884 nt, *nhaA*), referente a *S. Enteritidis* P125109. Os SNPs entre as estirpes vacinais e a estirpe vacinal encontra-se indicados e negrito (Adaptado de Maurischat *et al.*, 2015).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Amostragem

De modo a proceder ao desenvolvimento, validação e implementação da nova metodologia, realizou-se inicialmente a extração em microplaca de 105 estirpes, cuja identificação é conhecida, com o objetivo de encontrar o perfil térmico adequado à amplificação dos 2 genes alvo (*i.e.*, *ttr* e *nhaA*) de modo a possibilitar a aplicação desta metodologia em amostras reais futuras.

Após a definição do perfil térmico, utilizando amostras de origem alimentar, ambiental, de produção primária e amostras de ensaios interlaboratoriais, foi possível assegurar os resultados pretendidos. As amostras SO457, SO481 e SO482 foram continuadas pois o resultado em meio MSR foi suspeito, contudo o crescimento da amostra SO450 foi negativo.

A partir de abril de 2017, e de modo a implementar e futuramente validar a nova metodologia utilizando amostras reais, e após obter um perfil térmico bem definido, todas as estirpes presuntivas de pertencer ao género *Salmonella* são repicadas para meio NA, sejam de amostras alimentares e ambientais, repicando apenas uma colónia (*i.e.*, a mesma colónia que irá para serotipificação), ou de amostras de produção primária (*i.e.*, repicagem de uma colónia para NA a partir do XLD que vai para serotipificação e do XLD resultante do enriquecimento seletivo são repicadas entre 1 a 10 colónias, dependendo da possibilidade de encontrar ou não aspetos diferentes entre elas).

#### 4.2 Ensaio de RT-PCR

Decorridos os primeiros ensaios com as estirpes recuperadas de Microbank™, crescidas em APT e em caldo tioglicolato, foi possível concluir que há deteção presuntiva de *Salmonella*, contudo, devido à elevada concentração de ADN presente, as curvas de amplificação das estirpes saíam muito mais cedo que as curvas dos controlos positivo e/ou negativo, então procedeu-se à diluição do extrato das mesmas estirpes (*i.e.*, à exceção de *Clostridium perfringens*). A temperatura de *annealing* de 55°C foi mantida, visto ser a mais adequada para ambos os genes, *ttr* e *nhaA*, sendo acrescentados mais 5 ciclos de repetição. Assim, verificou-se que a sonda para o gene *ttr* funciona melhor com, aproximadamente, 40 ciclos. Após diluição dos extratos das estirpes crescidas em NA, foi repetido o ensaio de RT-PCR com os valores do ensaio 7 referido na Tabela 8 levando novamente a concluir que para ensaios que contenham estirpes isoladas e crescidas neste meio de cultura e que sejam diluídas em água ultrapura, 40 ciclos são suficientes para ambos os genes. Este foi, então, o perfil térmico definido para esta metodologia.

A sonda para o gene *ttr* liga-se praticamente a todas as estirpes que se esperam que sejam detetadas por RT-PCR como pertencentes ao género *Salmonella* e a sonda para o gene *nhaA* apresenta sempre um resultado positivo para estirpes vacinais (*i.e.*, estirpes cujo serotipo já foi identificado pelo esquema de Classificação de Kauffmann-White), sendo então específica para amostras de *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resultados esperados e obtidos após ensaio multiplex das 105 estirpes iniciais provenientes do NA.

Resultado	Sonda <i>ttr</i>			Sonda <i>nhaA-V</i>		
	esperado	obtido	após ISO 6579	esperado	obtido	após ISO 6579
Positivos	74	72	74	25	25	25
Negativos	29	17	31	80	76	80
Falsos Positivos	2	14	0	0	4	0
Falsos Negativos	0	2	0	0	0	0
Total	105	105	105	105	105	105

Com o Anexo XX e a Tabela 9 verifica-se a existência de 2 estirpes de *Salmonella* (*i.e.*, *Salmonella* Infantis e *Salmonella* Brandenburg) que foram consideradas «falsos negativos» para o gene *ttr* sugerindo a possibilidade de que quando existam estirpes positivas nas Galerias de Identificação (*e.g.*, BBL™ Crystal™) e que sejam negativas no ensaio de RT-PCR, estas possam ser *S. Infantis* ou *S. Brandenburg*. Existem ainda 14 estirpes que não eram esperadas serem detetadas como *Salmonella* (*i.e.*, positivas para o gene *ttr*), na medida em que nem todas utilizam o tetracionato como aceitador final de eletrões, nem crescem em meios ricos neste composto,

como é o caso de *Listeria* (Mellin *et al.*, 2013). O mesmo se verifica para as 2 estirpes obtidas como positivas para a presença do gene **nhaA**, e de facto este antiporte é comum a muitas espécies como foi referido acima, sendo que algumas destas pertencem ao género *Vibrio* (Vimont & Berche, 2000). Na verdade, a sonda **nhaA-V** (*i.e.*, específica para deteção da estirpe vacinal) contém bases de LNA conferindo uma enorme especificidade, portanto não deveria ser detetada nenhuma espécie pertencente a este género. Estes «falsos positivos», tanto para o gene **ttr** como para o **nhaA** podem ser facilmente excluídos seguindo os passos da norma ISO 6579, na medida em que os meios de cultura e os reagentes utilizados não permitem o isolamento destas espécies. A Tabela 10 que contém o seguimento da norma para os «falsos positivos» obtidos nos ensaios de RT-PCR para ambos os genes é acompanhada por duas estirpes (*i.e.*, *Citrobacter freundii* e *Proteus mirabilis*) que habitualmente são considerados «falsos positivos» na rotina laboratorial para a pesquisa de *Salmonella*, e pelos controlos positivos utilizados em RT-PCR. Apesar de *C. freundii* não ser móvel, e por isso não ser detetável no meio semissólido MSRv, nos caldos MKTTn ou RVS pode crescer, já *P. mirabilis* é móvel, logo é passível de ser detetável em meio MSRv. Contudo, como não formam colónias características em meio XLD e/ou CS não há continuação pela norma ISO.



**Tabela 10.** Exemplificação da utilização da norma ISO 6579 para descartar falsos positivos obtidos pelos ensaios de RT-PCR.

Estirpes (Falsos Positivos)	RT-PCR obtido <sup>d</sup>		APT <sup>e</sup>	MSRV <sup>g</sup>	Confirmação e identificação <sup>d</sup>											RT-PCR esperado após ISO <sup>d</sup>		
	<i>ttr</i>	<i>nhaA-V</i>			XLD <sup>h</sup>	CS <sup>h</sup>	Oxi	S.P	S.F	TSI	Indol	L	U	G.I.	<i>ttr</i>	<i>nhaA-V</i>		
<i>Bacillus cereus</i> <sup>a</sup>	+	-	1	N													-	-
<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>	-	-	1	N	NC	NC											-	-
<i>Citrobacter youngae</i> <sup>a</sup>	+	-	1	N	NC	NC											-	-
<i>Clostridium perfringens</i> <sup>a</sup>	+	-	0 <sup>f</sup>	N													-	-
<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	+	-	1	S/N	NC	NC											-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <sup>a</sup>	+	-	1	S/N	NC	NC											-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i> <sup>c</sup>	+	-	1	S/N	NC	NC											-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>b</sup>	+	-	1	N													-	-
<i>Listeria innocua</i> <sup>b</sup>	+	-	1	N													-	-
<i>Listeria ivanovii</i> <sup>b</sup>	+	-	1	N													-	-
<i>Proteus mirabilis</i> <sup>c</sup>	-	-	1	S/N	NC												-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>b</sup>	+	-	1	S/N	NC												-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>b</sup>	+	-	1	N	NC												-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> <sup>c</sup>	+	+	1	N													-	-
<i>Vibrio cholerae</i> <sup>c</sup>	+	-	1	N													-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <sup>c</sup>	+	+	1	N													-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC® 13076	+	-	1	S	C	C	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis estirpe vacinal	+	+	1	S	C	C	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+

a: Estirpes provenientes de ensaios interlaboratoriais.

b: Estirpes provenientes de *American Type Culture Collection*® (ATCC®).

c: Estirpes selvagens.

d: Resultado positivo (+), resultado negativo (-).

e: Pré-enriquecimento adequado (1), pré-enriquecimento não adequado (0).

f: Bactéria de Gram positivo, anaeróbia e produtora de esporos, recuperada em caldo tioglicolato.

g: Crescimento (S), sem crescimento (N), possibilidade de crescimento (S/N).

h: Crescimento característico (C), crescimento não característico (NC).

De modo a ser possível aplicar esta metodologia, foi realizado um ensaio de RT-PCR (Anexo XI) para definir o perfil térmico adequado a ser utilizado em ensaios futuros de RT-PCR com os seguintes valores: (1) 95°C por 5 minutos, seguido de (2) 55°C por 20 segundos, ocorrendo (3) extensão a 72°C por 30 segundos, (4) retomando-se o ponto (2) e repetindo-se estas etapas por mais 4 vezes (estes passos iniciais permitem inibir ruídos que possam ocorrer nos primeiros ciclos), (5) 95°C por 15 segundos, (6) 55°C por 20 segundos, ocorrendo leitura na placa, (7) há extensão a 72°C por 30 segundos, e por fim (8) em que se retoma o ponto (5) e repete-se mais 34 vezes. Aqui, foram incluídos os 3 controlos positivos e negativo selecionados: (I) para a sonda que deteta o gene *ttr* foi extraído o ADN da estirpe *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076<sup>TM</sup> (*i.e.*, controlo positivo para *Salmonella* spp.), (II) para a sonda que deteta o gene *nhaA* utilizou-se uma estirpe vacinal de *Salmonella* Enteritidis isolada de campo, serotificada pelo INIAV, I.P. (*i.e.*,

controlo positivo para estirpe vacinal) e (III) para ambos os genes foi escolhida a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ (*i.e.*, controlo negativo para *Salmonella* spp., sejam estirpes selvagens ou a vacinal), visto que *S.aureus* não amplificou nenhum dos genes em nenhum ensaio inicial de desenvolvimento deste método.

### 4.3 Aplicação da nova metodologia na rotina laboratorial

Tendo em conta a utilização da norma ISO 6579 e da nova metodologia desenvolvida descrita no Anexo XII, foram obtidos os resultados que estão descritos nos pontos seguintes.

#### 4.3.1 Ensaio de RT-PCR em amostras conhecidas

A segunda parte deste trabalho consistiu na utilização de quatro amostras HPA (*i.e.*, misturas conhecidas liofilizadas de diferentes estirpes) denominadas por SO450, SO457, SO481 e SO482, nas quais foi aplicada a norma ISO 6579-1:2017, para testar a capacidade de deteção de espécies pertencentes ao género *Salmonella*, sejam estirpes selvagens ou vacinal (Tabela 11). Os ensaios iniciais de RT-PCR, nesta segunda parte, decorreram diretamente das placas do meio XLD, com o objetivo de estudar o aspeto macroscópico das colónias, visto existir a possibilidade destas colónias apresentarem aspetos diferentes que possam facilitar a distinção entre estirpes selvagens e a estirpe vacinal, a serem confirmadas nos ensaios de RT-PCR.

**Tabela 11.** Procedimento realizado segundo a norma ISO 6579-1:2017 para implementação da metodologia por RT-PCR.

Amostra HPA		SO450	SO457	SO481	SO482
Pré enriquecimento não seletivo (APT) <sup>a</sup>		1	1	1	1
	MSRV <sup>c</sup>	N	S (24h)	S (24h)	S (24h)
Enriquecimento seletivo <sup>b</sup>			C	C	C
	RVS		C	C	C
	MKTTn		C	C	C
Confirmação e identificação <sup>d</sup>	XLD (MSRV)		P	P	P
	CS (MSRV)		P	P	P
	Oxidase		N	N	N
	Soro Poly A		P	P	P
	Soro Fisiológico		N	N	N
	TSI		P	P	P
	Indol		N	N	N
	Lisina		P	P	P
	Ureia		N	N	N
	RT-PCR esperado após ISO 6579	<i>ttr</i>		P	P
	<i>nhaA-V</i>		P	N	P

a: Crescimento (1).

b: Crescimento/turbidez (C)

c: Amostra suspeita após 24 horas de incubação (S(24h)), ou negativa (N).

d: Resultado negativo (N), resultado positivo (P).

Tal como descrito nos Anexos XIII e XIV, a nova metodologia permitiu detetar a estirpe selvagem e a estirpe vacinal de *Salmonella* Enteritidis através das diferentes colónias que foram isoladas nos diferentes meios de enriquecimento seletivo (*i.e.*, Anexo XIII corresponde ao ensaio de RT-PCR das amostras enriquecidas nos caldos RVS e MKTTn e o Anexo XIV corresponde às amostras enriquecidas em meio MSRV).

Todas as colónias isoladas dos meios XLD e CS, ambas provenientes dos caldos RVS e MKTTn e do meio MSRV da amostra SO457, permitiram confirmar que as colónias pertenciam ao género *Salmonella*, mais especificamente que eram *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal, na medida em que o resultado para os genes *ttr* e *nhaA-V* foi positivo. A partir dos meios XLD e CS da amostra SO481 também foi possível detetar a presença de *Salmonella* (*i.e.*, amostra positiva para o gene *ttr*), contudo as colónias foram negativas para *nhaA-V*, sendo possível concluir que as estirpes isoladas dos 2 meios pertenciam ao género *Salmonella* e a 1 serotipo selvagem. A amostra SO482 revelou-se a mais cativante ao longo deste trabalho na medida em que foi contaminada com 1 estirpe selvagem e a estirpe vacinal de *Salmonella*. Nos ensaios de RT-PCR, as colónias provenientes do caldo RVS, sejam crescidas em meio XLD ou em meio CS, foram negativas para *nhaA-V*, ou seja, não foram detetadas como estirpe vacinal. Contudo, verificou-se o contrário nas colónias provenientes do caldo MKTTn, visto terem sido positivas para o gene *nhaA-V*. Estes resultados sugerem a possibilidade de uma competição entre os 2 serotipos pelos 2 meios de cultura, contudo através da formulação de ambos os caldos (Anexo XV) não foi possível concluir o que poderia favorecer o crescimento de uma das estirpes em detrimento da outra. Nesta amostra ainda foi possível observar 2 tipos diferentes de colónias, distinguíveis macroscopicamente pelo seu aspeto côncavo e convexo, que no ensaio de RT-PCR corresponderam a estirpe vacinal positiva e selvagem, respetivamente. Estes resultados sugerem a possibilidade da existência de amostras reais com duas estirpes diferentes de *Salmonella* (*e.g.* o mesmo bando da espécie *Gallus gallus* ser positivo para diferentes estirpes em diferentes alíquotas da mesma amostra), contudo, apenas se tornam preocupantes caso sejam as estirpes regulamentadas pela CE para o PNCS. Na tentativa de replicar o que é feito na pesquisa dos diferentes serogrupos em *Escherichia coli* STEC foram feitas 4 *pools* da amostra SO482 com o intuito de detetar as duas estirpes presentes nessa amostra. Cada *pool* contém 10 colónias replicadas simultaneamente de XLD e CS (Figura 13) para NA.

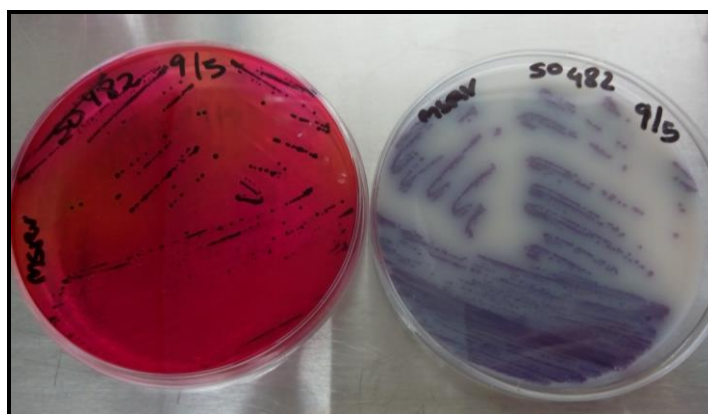
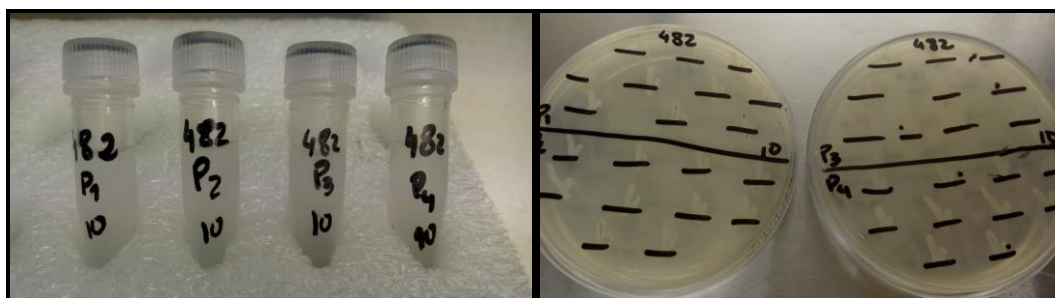


Figura 13. Colónias características de *Salmonella* em meio XLD (à esquerda) e CS (à direita), a partir de MSRV.

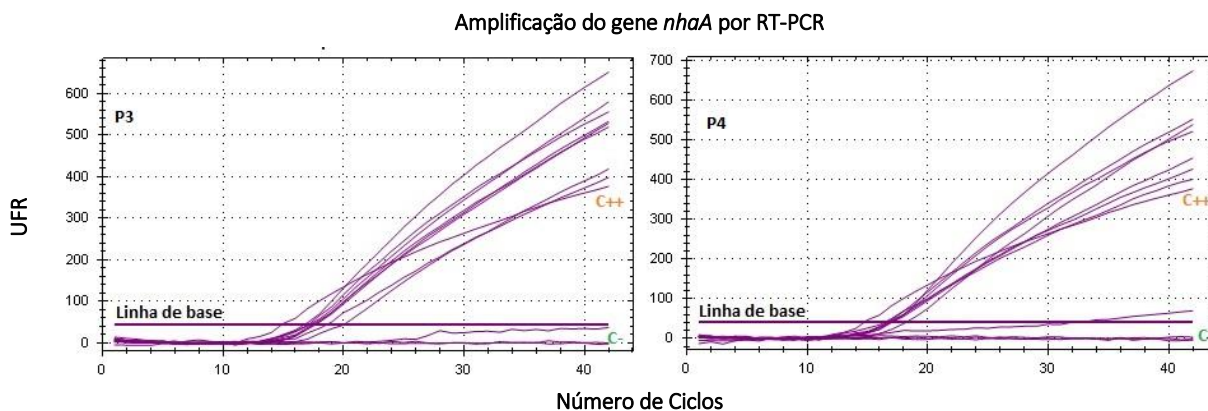
A pool 1 (*i.e.*, correspondente meio de enriquecimento RVS) continha colónias de aspeto côncavo e convexo (*i.e.*, suspeitas de serem estirpes vacinal e selvagem, respetivamente) e colónias mais escuras e mais claras provenientes do meio CS. A pool 2 continha o mesmo tipo de colónias, mas correspondentes ao meio de enriquecimento MKTTn. Relativamente ao meio

MSRV, por ser o meio de enriquecimento preferencialmente utilizado em amostras ambientais e da fase de produção primária, foram feitas duas *pools*, a 3 e a 4 (Figura 14).



**Figura 14.** Repicagem de colónias presumivelmente diferentes dos meios XLD e CS, provenientes de RVS (*pool* 1), MKTTn (*pool* 2) e MSRV (*pools* 3 e 4), para tubos com água ultrapura (à esquerda) e meio NA (à direita).

Apenas a *pool* 1 revelou conter mistura das duas estirpes (*i.e.*, estirpe vacinal e estirpe selvagem de *Salmonella*), e nas restantes apenas se detetou a estirpe vacinal, sugerindo que ambos os serotipos competem por locais de ligação semelhantes e que apenas o caldo RVS permite que a estirpe selvagem também seja detetada. Também foi realizado um ensaio para confirmar a presença de *Salmonella* e para detetar o serotipo presente nas 20 colónias repicadas em NA das *pools* 3 e 4 (Figura 15). Verificou-se que das 5 colónias de aspeto côncavo todas foram positivas para *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal, e das 5 colónias suspeitas de ser convexas apenas duas se verificaram estirpe selvagem (Anexo XVI).



**Figura 15.** Amplificação do gene *nhaA* para diferenciação entre estirpes vacinais e selvagens de *Salmonella*, por RT-PCR, na amostra SO482 (*Pool* 3 e 4, assinaladas na Figura com P3 e P4), incluindo o controlo positivo (*Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal) para o gene *nhaA* específico para estirpes vacinais, assinalado a **laranja**. O controlo negativo para os dois genes alvo (*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™) encontra-se assinalado a **verde**.

Como a distinção pelo aspeto se tornou numa possibilidade durante a execução da nova metodologia, devem ser repicadas 10 colónias do meio XLD para NA, e, caso se encontrem possíveis diferenças macroscópicas das colónias (*i.e.*, colónias características neste meio com aspeto côncavo, ou seja, com o centro da colónia sendo mais profundo, e colónias de aspeto convexo, ou seja, cujo centro é mais proeminente à superfície). Para além destas 10 colónias, deve ser repicada a colónia que é enviada para serotipificação, segundo o Esquema de

Classificação de Kauffmann-White, para que os resultados obtidos na metodologia «*in-house*» sejam comprovados de acordo com a rotina seguida no LMA do INIAV, I.P..

#### 4.3.2 Ensaios de RT-PCR em amostras reais

Com a definição do perfil térmico adequado para que se obtenham ensaios com resultados esperados, deve continuar a ser testada a especificidade das sondas para deteção dos genes *ttr* e *nhaA*, seguindo os primeiros passos da norma ISO 6579, adaptada no Anexo IX, e seguindo a descrição do novo procedimento no Anexo XIII. As amostras alimentares e ambientais são testadas através da cultura crescida em meio NA (*i.e.*, colónia purificada após repicagem do meio XLD) ou até no tubo TSI, visto ser 1 colónia já purificada. Quanto às amostras de produção primária o procedimento efetuado é através da diferenciação (ou não) macroscópica de colónias crescidas em meio XLD para a realização dos ensaios de RT-PCR (*e.g.*, repicagem de pelo menos 10 colónias presumivelmente diferentes para meio NA, e após isolamento da colónia escolhida para serotipificação do meio XLD, no dia seguinte replica-se para outra placa de meio NA, do qual se fazem os testes biológicos e serológicos). No caso de não serem encontradas diferenças macroscópicas significativas entre as colónias do meio XLD deve apenas repicar-se 2 colónias aparentemente semelhantes do meio XLD, ambas para NA, nas quais, uma delas corresponde à colónia purificada e enviada para serotipificação. Assim, torna-se possível comparar os resultados obtidos de acordo com a nova metodologia de deteção e de diferenciação, com a norma ISO 6579 e com os resultados da serotipificação.

Em todas as corridas de RT-PCR deve ser confirmada a amplificação do IAC para se detetarem possíveis problemas na amplificação do ADN das amostras, ou seja, quando o IAC não é amplificado corretamente no canal ROX (Figura 16) e nos outros canais não se obtêm resultados positivos (HEX, para o gene *ttr* e Cy5, para o gene *nhaA*), a corrida deve ser repetida. Quando não se verifica amplificação do IAC numa amostra negativa (sendo positiva, os recursos podem ter sido usados para a amplificação do ADN alvo não estando disponíveis para a amplificação do IAC) deve proceder-se à diluição das amostras em causa, com água ultrapura e geralmente na proporção 1:10, por se apresentarem inibidas devido a uma grande concentração de ADN nas amostras.

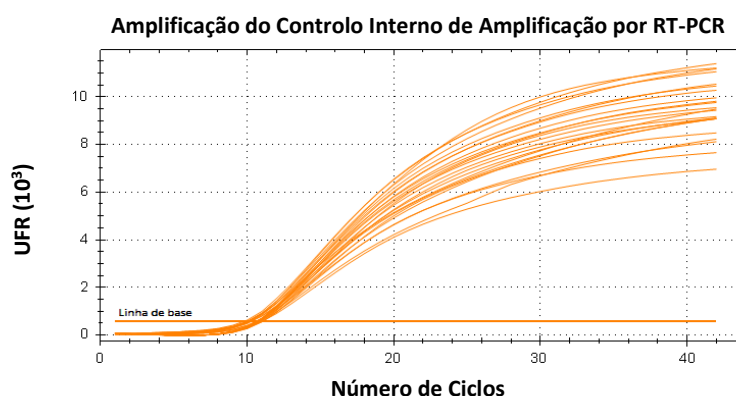
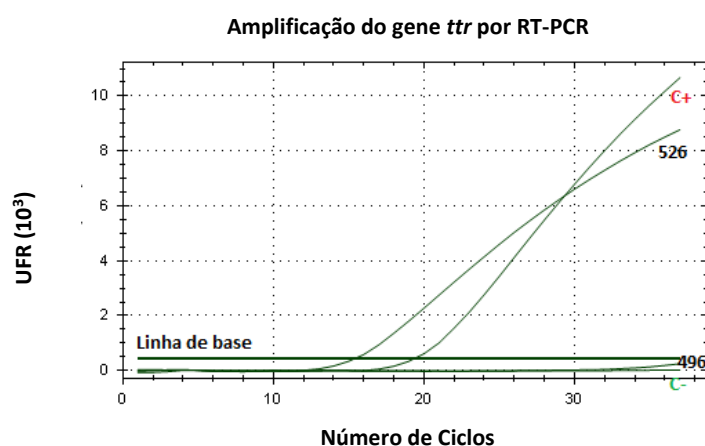


Figura 16. Amplificação do Controlo Interno de Amplificação (IAC) em amostras reais pertencentes ao Plano Nacional de Controlo de *Salmonella*.

As corridas seguintes de RT-PCR (Anexo XVII, Anexo XVIII, Anexo XIX, Anexo XX, Anexo XXI, Anexo XXII e XXIII) permitiram a implementação desta nova metodologia na rotina laboratorial e demonstraram a fiabilidade da mesma em amostras reais provenientes de matrizes alimentares, ambientais e de produção primária.

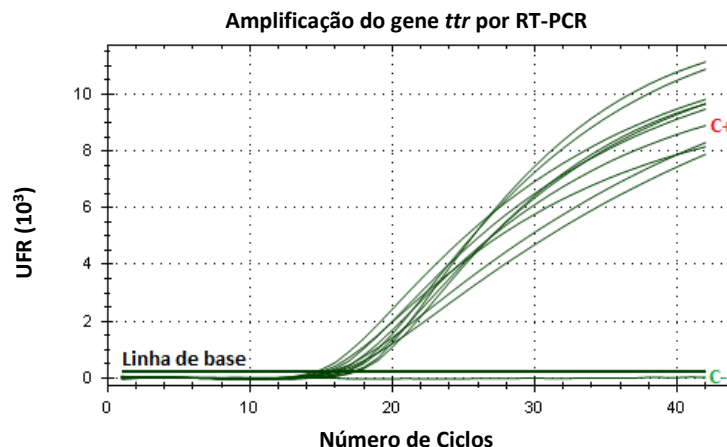
#### 4.3.2.1 Detecção de *Salmonella* spp. em amostras reais por RT-PCR

O ensaio de RT-PCR descrito no anexo XVII diz respeito às amostras 496 e 526 provenientes do PIGA, nas quais, exceccionalmente, se retirou cultura do tubo TSI, porque apesar de ambas se apresentarem suspeitas na cultura em placa, através da confirmação bioquímica e serológica foi possível concluir que a amostra 496 seria negativa e a amostra 526 positiva. A corrida de RT-PCR comprovou o esperado tal como a Figura 17 indica.



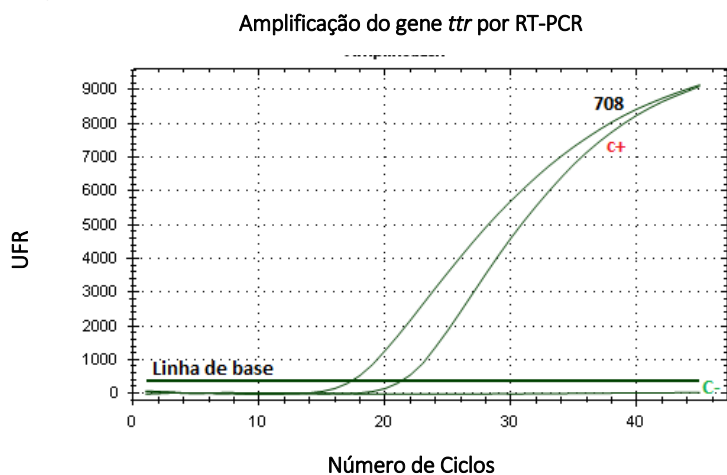
**Figura 17.** Amplificação do gene *ttr* na amostra alimentar 526 do plano PIGA, incluindo o controlo positivo para o gene *ttr* (*Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076™, assinalado a vermelho) por RT-PCR. O controlo negativo para o gene *ttr* (*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™) encontra-se assinalado a verde.

As colónias isoladas em NA provenientes de amostras do PIF (656 e 657) e de amostras do PNCS (681, 694, 695 e 696) (Anexo XIX) amplificaram o gene *ttr*, após seguimento da norma ISO 6579 e de serem suspeitas como estirpes pertencentes ao género *Salmonella*, então, na medida em que todas as amostras foram detetadas por RT-PCR, a cada uma corresponde uma curva de amplificação, representadas na Figura 18.



**Figura 18.** Amplificação do gene *ttr* em amostras do PIF (656 e 657) e do PNCS (681,694,695 e 696), incluindo o controle positivo para o gene *ttr* (*Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076™, assinalado a vermelho) por RT-PCR. O controle negativo para o gene *ttr* (*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™) encontra-se assinalado a verde.

A amostra alimentar 708 (Anexo XX) proveniente do PIGA, também foi considerada suspeita para *Salmonella* spp. de acordo com a norma, e positiva através da curva de amplificação do gene *ttr* e da existência do controlo positivo, sendo confirmada após serotipificação como *Salmonella* (Figura 19).



**Figura 19.** Amplificação do gene *ttr* na amostra alimentar 708, incluindo o controle positivo para o gene *ttr* (*Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076™, assinalado a vermelho) por RT-PCR. O controle negativo para o gene *ttr* (*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™) encontra-se assinalado a verde.

Assim, foi possível verificar que o gene *ttr* deteta estirpes de *Salmonella* provenientes de diferentes matrizes sejam ou não derivadas de diferentes Planos Comunitários de controlo alimentar, tais como PIF, PIGA e PNCS. A deteção é feita após repicagem das colónias do meio XLD para NA e, após crescimento em NA, realizam-se as corridas de RT-PCR.

#### 4.3.2.2 Diferenciação de estirpes de *Salmonella* por RT-PCR

As colónias provenientes da amostra 839, proveniente de produção primária, macroscopicamente apresentam-se com o aspeto convexo, denunciando a possibilidade de ser

uma estirpe selvagem. No ensaio de RT-PCR (Anexo XXIII) verificou-se que o gene *nhaA* não foi amplificado, ou seja, esta estirpe foi confirmada pelo ensaio como uma estirpe selvagem pertencente ao género *Salmonella* e pela serotipificação como *Salmonella* Typhimurium monofásica 4,[5],12:i:- (Figura 20). Sendo uma amostra proveniente de um bando de frangos não vacinado (Anexo XXV) não era esperado um resultado positivo para o gene *nhaA*, na medida em que a sonda do canal Cy5 deteta especificamente a estirpe vacinal. Esta corrida também clarificou a ideia de que as 2 sondas (*nhaA-V* e *nhaA-WT*) necessitam de serem adicionadas à mix para competirem pelos locais de ligação e assim fiabilizarem os resultados. As colónias da amostra 859 (Anexo XXII) provenientes de um bando de reprodução vacinado com a vacina que contém a estirpe alvo, amplificaram o gene *nhaA*, detetando-se fluorescência no canal Cy5 para a sonda *nhaA-V*, logo, após serotipificação, confirmou-se o serotipo esperado (*i.e.*, *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal).

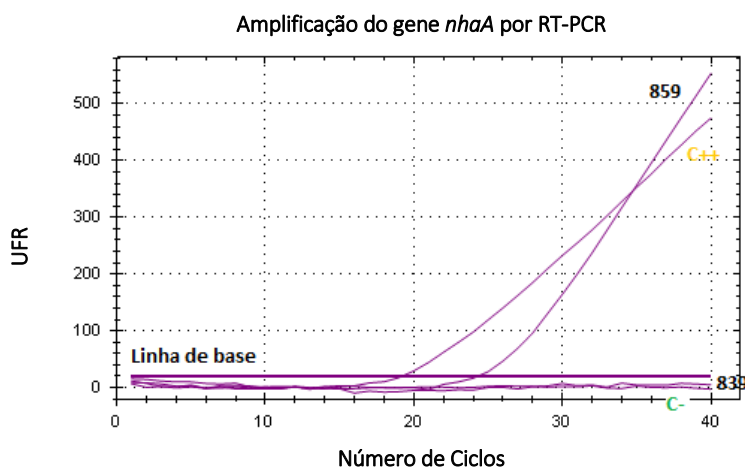


Figura 20. Amplificação do gene *nhaA* para diferenciação entre estirpes vacinais e selvagens de *Salmonella*, por RT-PCR, nas amostras do PNCS 839 e 859, incluindo o controlo positivo (*Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal) para o gene *nhaA* específico para estirpes vacinais, assinalado a laranja. O controlo negativo para os dois genes alvo (*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™) encontra-se assinalado a verde.

#### 4.3.3 Especificidade, sensibilidade e precisão

Com base nos resultados obtidos dos ensaios de RT-PCR referidos acima de estirpes ATCC®, provenientes de ensaios interlaboratoriais da Agência de Saúde Animal e de Plantas de Laboratórios Veterinários (APHA), da Agência de Proteção da Saúde (HPA) ou dos Laboratórios Europeus de Referência (EU-RL), e de amostras reais dos planos PIGA, CAA, PIF e PNCS, foram concluídos os valores da Especificidade, Sensibilidade e Precisão para ambos os genes, de acordo com as seguintes equações, para futura validação da nova metodologia:

**Especificidade sem isolamento de acordo com a norma ISO 6579 (E):**

$$E = \frac{N^{\circ} \text{ de Resultados negativos}}{N^{\circ} \text{ Total de amostras negativas esperadas}} \times 100$$

$$E (ttt) = \frac{19}{29} \times 100 = 65.5\%$$



$$E(nhaA) = \frac{82}{86} \times 100 = 95.3\%$$

Os valores de especificidade do gene *ttr* correspondem aos resultados obtidos e esperados com as estirpes utilizadas para desenvolvimento desta metodologia, na medida em que a especificidade na deteção de estirpes do género *Salmonella* é menor quando as estirpes não são isoladas de acordo com a norma ISO 6579. **Quando é utilizada esta norma, a especificidade do gene *ttr* atinge os 100%**. Para que a especificidade aumente sem necessidade do seguimento da norma podem ser utilizadas sondas com bases de LNA para o gene *ttr*. A especificidade do gene *nhaA* não é de 100%, na medida em que a norma ISO 6579 não foi seguida para as estirpes utilizadas no desenvolvimento da metodologia, apesar de todas as estirpes esperadas para serem detetadas como estirpe vacinal, tivessem sido detetadas. Assim, a sonda *nhaA-V* é específica para as estirpes alvo.

#### Sensibilidade (S):

$$S = \frac{N^{\circ} \text{ de Resultados positivos}}{N^{\circ} \text{ Total de amostras positivas esperadas}} \times 100$$

$$S(ttr) = \frac{97}{99} \times 100 = 97.9\%$$

$$S(nhaA) = \frac{40}{40} \times 100 = 100.0\%$$

Ambos os genes são bastante sensíveis nestes ensaios de RT-PCR uma vez que são capazes de detetar resultados positivos que sejam efetivos e, eventualmente, já confirmados por serotipificação.

#### Precisão (P):

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ de Resultados correctos (positivos e negativos)}}{N^{\circ} \text{ total de amostras}} \times 100$$

$$P(ttr) = \frac{130}{130} \times 100 = 100.0\%$$

$$P(nhaA) = \frac{126}{126} \times 100 = 100.0\%$$

Seguindo a norma ISO 6579, ambos os genes são precisos pela capacidade de detetar os resultados positivos e negativos no total das amostras testadas. A diferença no número total de amostras deve-se ao facto de terem sido testadas amostras apenas para a presença de *Salmonella*, provenientes dos planos PIGA, PIF e CAA.

## PARTE II – OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS: ROTINA LABORATORIAL

### 5. Análises microbiológicas em amostras alimentares e ambientais

A presença dos diferentes agentes zoonóticos que possam ser transmitidos através de animais e dos seus produtos para a cadeia de produção alimentar implica a necessidade de criar

estratégias de controlo e mitigação que sejam eficientes na indústria alimentar. Os métodos de detecção, enumeração e caracterização dos microrganismos patogénicos para o homem são necessários para melhorar o conhecimento sobre as tendências, prevalências, vias de transmissão e persistência dos mesmos na cadeia alimentar, bem como para melhorar as estratégias de controlo de forma a garantir alimentos mais seguros ao consumidor.

Desde o início do estágio e em simultâneo com o desenvolvimento da metodologia, foram acompanhadas as atividades de rotina laboratorial do INIAV, I.P. para pesquisa e deteção de diferentes microrganismos em amostra alimentares (de origem animal ou não animal) e ambientais, que se encontram descritas nos seguintes pontos.

## 5.1 Amostras

### 5.1.1 Géneros alimentícios de origem animal e não animal

De acordo com o Decreto-Lei N.º 193/2004 que se encontra descrito pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2017), um «género alimentício ou alimento para consumo humano é qualquer substância ou produto, transformado, parcialmente transformado ou não transformado, destinado a ser ingerido pelo ser humano ou com razoáveis probabilidades de o ser, abrangendo bebidas, pastilhas elásticas e todas as substâncias, incluindo a água, intencionalmente incorporadas nos géneros alimentícios durante o seu fabrico, preparação ou tratamento e excluindo os alimentos para animais, os animais vivos, a menos que sejam preparados para colocação no mercado para consumo humano e as plantas antes da colheita». Sendo que a coordenação da verificação do cumprimento dos requisitos de higiene dos alimentos de origem animal e vegetal de acordo com o Regulamento (CE) N.º 852/2004 sobre higiene dos géneros alimentícios, que constitui a base legal do Regulamento (CE) N.º 2073/2005, agora revogado pelo Regulamento (CE) N.º 1441/2007, que devem ser respeitados pelos operadores das empresas do setor alimentar é competência da DGAV, designadamente da Direção de Serviços de Segurança Alimentar (DGAV, 2017). O sítio da DGAV disponibiliza ainda informações sobre a lista de estabelecimentos que produzem os géneros alimentícios, os requisitos de higiene aplicáveis aos diferentes géneros, os controlos oficiais realizados aos alimentos e aos estabelecimentos que os produzem e os manuais e guias de Boas Práticas de Fabrico (DGAV, 2017).

Os géneros alimentícios de origem animal, incluem produtos processados ou não, provenientes ou derivados de animais, tais como carne, laticínios e ovos, abrangendo o mel e o sangue. Incluem também alguns animais vivos destinados ao consumo humano, como moluscos bivalves, equinodermes, tunicados e gastrópodes marinhos vivos (DGAV, 2017). Os géneros de origem não animal, incluem produtos como frutas, vegetais, cereais, tubérculos, bebidas (exceto as derivadas ou preparadas com produtos de origem animal como leite, ovoprodutos ou bebidas lácteas) e alimentos de origem mineral (como sal, especiarias e condimentos). No que diz respeito à legislação aplicável e ao controlo oficial, são também considerados nesta categoria os alimentos compostos que incluem na sua composição produtos de origem animal processados e produtos de origem não animal (DGAV, 2017). OS critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios encontram-se descritos no Anexo I.

### 5.1.2 Amostras de produção primária

As amostras provenientes de produção primária consistem em excrementos ou botas para esfregaço originárias de bandos de galinhas de reprodução, bandos de frangos, bandos de perus ou galinhas poedeiras. Tendo em conta que, de acordo com o Decreto-Lei N.º 193/2004, a produção primária é definida como «a produção, a criação ou o cultivo de produtos primários, incluindo a colheita e a ordenha e criação de animais antes do abate, abrange também a caça, a pesca e a colheita de produtos silvestres». Estas amostras são enviadas para análise para os laboratórios autorizados no prazo máximo de 24 horas após a colheita. Se não forem enviadas neste prazo deverão ser mantidas refrigeradas. O transporte pode ser efetuado à temperatura ambiente desde que sejam evitados o calor excessivo (*i.e.*, superior a 25°C) e exposição à luz solar. No laboratório, as amostras devem ser conservadas refrigeradas até à sua análise, a qual terá que ser efetuada no prazo de 48 horas após a sua receção e de 96 horas após a colheita (DGAV, 2017).

### 5.2 Colheita e preparação de amostras

As Normas ISO 6887:2017 (1, 2, 3, 4, 6) definem as condições gerais a que deve obedecer a colheita de amostras dos géneros alimentícios e alimentos para animais para análise microbiológica. Assim sendo, independentemente do tipo de amostra a recolher (*i.e.*, género alimentício, água e até zaragatoas) devem ser mantidos os cuidados de assepsia, utilizando material sempre lavado e esterilizado pela autoclave, procedendo à abertura das embalagens que contêm as amostras apenas nas CSB/CFL, de modo a manter as características microbiológicas da amostra a analisar. As informações referentes às amostras tais como o seu número interno identificativo, a sua identificação, o local e a hora de recolha devem estar bem definidas e a colheita só deve ser iniciada após receção da folha de requisição para confirmação da informação referente às análises pedidas. Embora as amostras devam ser transportadas em ambiente refrigerado, entre 0 e 4°C, com acumuladores térmicos, deve ter-se em conta os cuidados específicos de recolha, transporte e armazenamento descritos nas respetivas normas de referência utilizadas no INIAV, I.P.

Para a preparação das amostras deve-se ter em conta os documentos de referência ISO 6887-1:2017, conduzindo à uniformidade da distribuição dos microrganismos. Assim, as amostras devem ser pré-enriquecidas (numa suspensão de 1:10) de acordo com a respetiva norma perfazendo um volume total de 250 ml (25 g ou ml da amostra em 225 ml da solução de pré-enriquecimento) ou 10 ml (1 g ou ml da amostra em 90 ml da solução de pré-enriquecimento). De seguida, deve proceder-se à homogeneização da solução num equipamento com agitação mecânica (tipo “*Stomacher*”) por 60 segundos e fechar os sacos.

No caso de se pretender realizar diluições, é importante que os diluentes estejam à temperatura ambiente para evitar danos na estrutura da membrana dos microrganismos devido a alterações bruscas na temperatura. A suspensão mãe corresponde à diluição 10<sup>-1</sup>. O tempo entre a preparação da suspensão inicial e o início das seguintes diluições decimais não deve exceder os 30 minutos (ISO 6887-1:2017).

### 5.3 Métodos de deteção e contagem de microrganismos patogénicos

A utilização de métodos convencionais (*i.e.*, através de normas criadas pela Organização Internacional de Padronização, ISO) para pesquisa e/ou contagem de *Campylobacter* spp.,

*Escherichia coli* STEC, *Listeria monocytogenes*, microrganismos a 30°C, *Enterobacteriaceae* e de *Salmonella* spp. e do Regulamento que permite a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas implica uma duração aproximada de uma semana de análise, resultando num enorme gasto de consumíveis o que demonstra a necessidade de recorrer a métodos mais rápidos ou ao desenvolvimento de kits «*in-house*» para a pesquisa dos diferentes microrganismos alvo. Atualmente, existem no mercado vários métodos para pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e de enterotoxinas estafilocócicas que foram adotados pelo INIAV, I.P. (e.g., Kit iQ-Check® *Salmonella* II (Bio-Rad®), Kit iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II (Bio-Rad®) e Kit Vidas® SET2 (bioMérieux®), respetivamente), no entanto, devido ao seu elevado custo estes kits não se encontram ao alcance de todos os laboratórios, aumentando a necessidade de desenvolver novas metodologias igualmente funcionais, mas mais acessíveis. Estes kits iQ-Check® são testes qualitativos que permitem a deteção de sequências de ADN específicas de patogénicos que são amplificadas por PCR e detetadas em simultâneo por sondas fluorescentes.

A equação utilizada para a contagem do número total de colónias ou colónias típicas (N) para a contagem de microrganismos mesófilos, enterobactérias ou de *Listeria monocytogenes* é dada pela soma das colónias contadas ( $\Sigma C$ ), de pelo menos duas diluições sucessivas (i.e., com a última diluição a conter pelo menos 10 colónias) a dividir pelo volume (em mililitros) de inóculo em cada placa (V) multiplicado pelo número de placas selecionadas da primeira diluição (n1), pelo número de placas selecionadas para a segunda diluição (n2) e pelo valor da diluição (d) (ISO 7218:2007/Amd 1:2013).

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n1 + 0.1 + n2)d}$$

**Equação 1.** Fórmula geral de cálculo do número total de colónias (ISO 7218:2007/Amd 1:2013).

No caso da contagem de *L. monocytogenes*, o número de colónias identificadas e confirmadas (a) é calculado com ajuda da equação seguinte:

$$a = \frac{b}{A} \times c$$

**Equação 2.** Contagem do número de colónias de *L. monocytogenes* (ISO 7218:2007/Amd 1:2013).

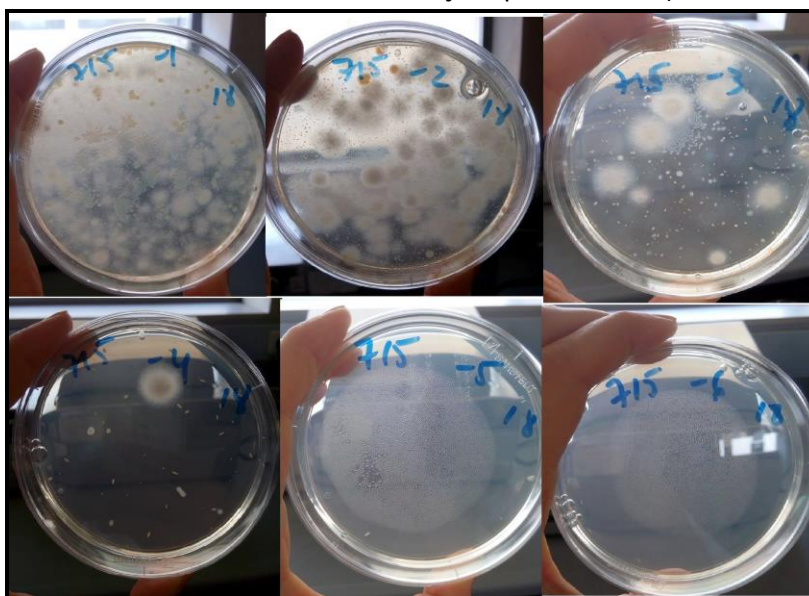
Sendo A o número de colónias características para confirmação, b o número de colónias características confirmadas, e c o número total de colónias características contadas na placa. Para concluir o número de colónias, utiliza-se a equação 1.

### 5.3.1 Contagem de microrganismos a 30°C

A enumeração de bactérias através de métodos baseados em contagem em placa é uma técnica bastante utilizada na microbiologia dos alimentos e da água nos diferentes laboratórios acreditados (Hallas & Monis, 2015). Na indústria de laticínios os testes microbiológicos são importantes na medida em que o leite é um alimento altamente perecível e pode ser um veículo de microrganismos patogénicos ou das suas toxinas, causando vários surtos de intoxicação alimentar (Vasavada, 1993). A metodologia atual foi desenvolvida há várias décadas, contudo é demorada pois baseia-se na incorporação convencional de diluições sucessivas para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, segundo O'Connor, (1984), citado por Nero *et al.*, (2002). Vários métodos alternativos foram desenvolvidos para facilitar este controlo microbiológico

(Senyk, Kozlowski, Noar, Shipe, & Bandler, 1987; Vasavada, 1993; Fung, 2000) e são denominados por métodos rápidos. Segundo Bigalke, (1984), citado por Nero *et al.*, (2002) estes métodos são mais simples, exigem pouco material e dão resultados em menos tempo, contudo não estão ao alcance de todos os laboratórios.

A norma ISO 4833-1:2013 (E) especifica um método para a enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos através da técnica de contagem de colônias crescidas em meio sólido após incubação aeróbica a 30°C por 72h (Anexo XXV). Executa-se uma sementeira de 1 ml das diluições consideradas convenientes (normalmente, de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) por incorporação no meio de cultura Plate Count Agar (PCA), com adição de leite desnatado em pó (*Skimmilk*), livre de qualquer substância inibitória, e que cria as condições ideais para o crescimento de microrganismos em leite e nos seus derivados (Figura 21). Este meio de cultura apresenta ainda um conjunto de nutrientes (por exemplo, fontes proteicas, vitaminas e hidratos de carbono) que favorecem a cultura e a contagem neste meio. Qualquer microrganismo (*e.g.*, bactéria, levedura ou bolor) e que forme colônias contáveis (*i.e.*, entre 15 a 300 colônias) quando crescidas sob as condições exigidas nesta norma é considerado para expressão de resultados. Este método é aplicável a produtos para consumo humano ou de outros animais e a amostras ambientais na área alimentar ou do processamento e manuseamento de rações para animais (ISO 4833-1:2013 (E)).



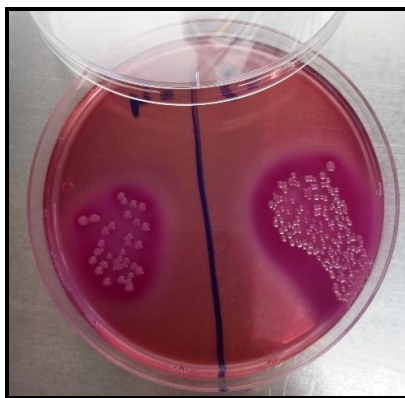
**Figura 21.** Placas do meio PCA resultantes das diluições sucessivas de um leite para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos.

### 5.3.2 Contagem de *Enterobacteriaceae* em placa

A família *Enterobacteriaceae* é ubíqua na natureza e muitas espécies mesófilas têm a capacidade de contaminar os alimentos, mesmo em percentagens baixas (Molin & Stenström, 1984; García-Armesto *et al.*, 1993; Ternström, Lindberg, & Molin, 1993), contudo, como alguns taxa são psicotróficos podendo multiplicar-se em alimentos conservados a temperaturas de refrigeração como carne, peixe e laticínios (Lindberg, Ljungh, Ahrné, Löfdahl, & Molin, 1998), torna-se uma preocupação clínica na medida em que atuam como patogénicos oportunistas em pacientes imunodeprimidos e nesta família de bactérias existem espécies que são produtoras de enterotoxinas e fatores de virulência. *Hafnia alvei*, *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp. são exemplos

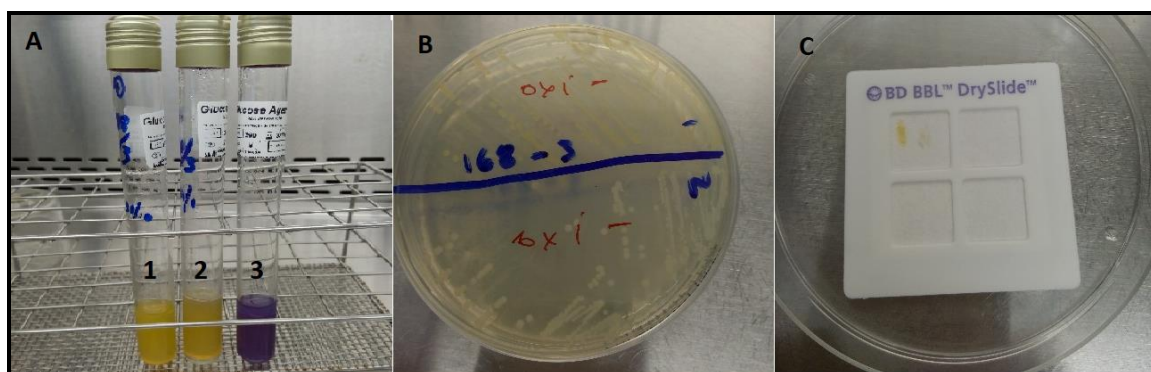
de espécies e géneros conhecidos por apresentarem contagens elevadas em diferentes alimentos, com mais de 100 unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) (Ternström *et al.*, 1993).

Na contagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*i.e.*, enterobactérias) é utilizado o meio de cultura Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG), uma modificação do meio MacConkey Agar pela substituição da lactose por glucose (Mossel *et al.*, 1962; Mossel *et al.*, 1979), não permitindo a diferenciação entre géneros que fermentam ou não a lactose (*i.e.*, lactose-positivos e lactose-negativos, respetivamente), como *Salmonella* e *Shigella*. Contudo, este meio apresenta uma enorme aplicação na análise de alimentos, medicamentos e cosméticos. O meio VRBG é, ainda, composto por sais biliares e violeta de cristal que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo (portanto, é um meio seletivo) e ainda por glucose e vermelho neutro que permite a deteção da fermentação deste açúcar pelos microrganismos (Figura 22).



**Figura 22.** Colónias características no meio VRBG agar, para controlo interno do meio de cultura.

De acordo com a norma ISO 21528-2:2004 (Anexo XXVI), a contagem em placa das enterobactérias deve ser feita pela utilização do meio VRBG, com sementeira por incorporação com 1 ml de inóculo e com dupla camada, incubando a 30°C por 24h±2. Nestes ensaios são semeados inóculos correspondentes às diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Para confirmação das colónias suspeitas, deve ser feita a avaliação da fermentação da glucose através de Glucose Agar, e da produção do citocromo c oxidase. As colónias que sejam oxidase-negativas e glucose-positivas são confirmadas como *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004) (Figura 23).



**Figura 23.** Confirmação de colónias suspeitas pela fermentação da glucose na imagem A, em que o tubo 1 (à esquerda) e tubo 2 (do meio) correspondem a duas colónias suspeitas e o tubo 3 (à direita) corresponde a um tubo pré-inoculado (controlo). A imagem B corresponde ao crescimento em meio NA e a imagem C ao teste da produção de oxidase para confirmação bioquímica.

### 5.3.3 Pesquisa de *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* forma colónias características em meio seletivo sólido, quando incubada em microaerofilia a 41.5°C, mas não a 25°C. Possui características distinguíveis tais como a motilidade, produção de oxidase e propriedades de crescimento (Tabela 12), quando os testes são realizados de acordo com a primeira parte da norma ISO/TS 10272-1:2006. As espécies encontradas mais frequentemente em alimentos são *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, contudo outras espécies já foram descritas tais como *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis* (ISO/TS 10272-1:2006).

**Tabela 12.** Características de *Campylobacter* spp. (Adaptado de ISO/TS 10272-1:2006).

Teste	Resultado
Morfologia	Pequenos bacilos curvos
Motilidade	Característica
Crescimento microaerofílico a 25°C	Sem crescimento
Crescimento aerofílico a 41.5°C	Sem crescimento
Oxidase	Positivo

A pesquisa de *Campylobacter* spp. é conduzida, convencionalmente, de acordo com a norma ISO/TS 10272-1:2006 e de uma metodologia «in-house» por RT-PCR que está a ser implementada e validada no LMA do INIAV, I.P. (Anexo XXVII). O objetivo deste método é reduzir o tempo de aplicação desta norma ISO, de 10 para 4 dias, através da deteção de *Campylobacter* spp. ao fim de 44h±4 por RT-PCR, em que a partir das amostras suspeitas, se realize a especificação das mesmas de modo a identificar as seguintes espécies: *Campylobacter lari*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter upsaliensis*. Desta forma, quer na implementação da técnica quer na pesquisa desta bactéria em alimentos, utiliza-se água peptonada tamponada (APT) para preparar a suspensão inicial da qual será usado o volume necessário para preparar o pré-enriquecimento, utilizando o Caldo Bolton com adição de sangue de cavalo e suplemento Bolton que promovem o crescimento de *Campylobacter*. Os meios modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate agar (mCCD) e CampyFood ID Agar (CFA) contêm promotores de crescimento, antibióticos específicos para apenas permitir o desenvolvimento de *Campylobacter* spp., e agentes neutralizantes específicos que inibem os efeitos tóxicos do oxigénio. Para isolamento utiliza-se o meio Columbia Agar 5%, a partir do qual se verifica a produção do citocromo c oxidase e kits geradores de atmosfera de microaerofilia. Uma vez que as espécies pertencentes a este género são extremamente sensíveis à congelação, mas sobrevivem melhor a baixas temperaturas, é recomendado que as amostras a serem testadas sejam armazenadas a 3°C±2 e sujeitas a análise o mais rapidamente possível. As amostras positivas são posteriormente enviadas em zaragatoas para serotipificação no Pólo de Oeiras do INIAV, I.P..

### 5.3.4 Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas

A intoxicação alimentar provocada pelo género *Staphylococcus* é uma das doenças mais comuns associadas ao consumo de alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas preformadas por estirpes coagulase positiva, principalmente, *Staphylococcus aureus* (Pinchuk *et al.*, 2010). O critério 1.1.21 do Regulamento (CE) N.º 2073/2005 refere-se ao Método Europeu de Deteção do Laboratório Europeu de Referência para Estafilococos Coagulase Positivos (EU-RL CPS), incluindo *S. aureus*, como método analítico de referência para a monitorização e controlo de

enterotoxinas estafilocócicas em queijos e em caso de surtos de intoxicação estafilocócica alimentar envolvendo matrizes alimentares provenientes de leite ou de produtos lácteos. No que diz respeito à parte A deste regulamento, o procedimento para a deteção destas enterotoxinas em queijos consiste, essencialmente, em 4 passos distintos: a preparação das amostras, a extração através da acidificação e da neutralização, a diálise pela utilização de membranas que permitem a concentração das enterotoxinas em solução PEG e por fim a deteção imunoenzimática através do Kit Vidas® SET2 (Anexo XXVIII). O Kit de deteção Vidas® SET2 (bioMérieux®) é baseado num teste rápido, automatizado do tipo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) em que a reação antigénio/anticorpo é medida por enzimas. A parte B consiste na deteção imunoenzimática de enterotoxinas estafilocócicas dos tipos SEA a SEE em matrizes que não sejam produtos lácteos, tais como marisco, crustáceos, produtos cárneos, vegetais e refeições já preparadas (ou pré congeladas). O Kit de deteção Vidas® SET2 não pode ser utilizado para pesquisar a presença de enterotoxinas estafilocócicas em produtos que não sejam leite ou nos seus derivados porque não foi validado para esse fim pelo Laboratório Europeu de Referência. A deteção imunoenzimática de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares apresenta vários obstáculos. As reações inespecíficas destas toxinas com alguns dos kits comerciais disponíveis foram anteriormente relatadas com vários tipos de alimentos ou com alimentos contaminados por outros microrganismos que não pertençam a *Staphylococcus* spp.. Algumas interferências podem ser atribuídas a enzimas endógenas, como a fosfatase alcalina ou a lactoperoxidase. A fosfatase alcalina está normalmente presente em queijos provenientes de leite cru e pode ser destruída pelo tratamento térmico a 80°C durante, aproximadamente, dois minutos. Assim, pelo efeito de perda de atividade serológica das enterotoxinas presentes no extrato concentrado, este tratamento não deve ser realizado antes do passo de deteção devido à possibilidade de falsos-negativos. No entanto, no caso de resultados positivos obtidos pelo Kit de deteção Vidas® SET2 e se é suspeita a existência de interferências, deve ser aplicado o procedimento com o Kit Ridascreen® SET Total. A lactoperoxidase é resistente a um pH de valor igual a 3 e o seu peso molecular pode ser explicado pelo facto de não ser destruída ou inativada durante o passo de extração. Se existirem suspeitas de interferências com o Kit Ridascreen® SET Total, deve ser feito o procedimento de deteção com o Kit Vidas® SET2, de acordo com o Regulamento (CE) N.º 2073/2005.

### 5.3.5 Pesquisa de *Escherichia coli* STEC/VTEC

A especificação técnica da norma ISO/TS 13136:2012 descreve a identificação de bactérias da espécie *Escherichia coli* que sejam produtoras da toxina Shiga (STEC) pela deteção dos genes mais virulentos característicos das mesmas, *stx* e *eae* (Nielsen & Andersen, 2003; Perelle *et al.*, 2004) e dos genes associados aos serogrupos O157, O111, O26, O103, O104 e O145 (Perelle *et al.*, 2004; Perelle, Dilasser, Grout, & Fach, 2005). Quando um ou ambos os genes *stx* são detetados, o isolamento da estirpe é necessário sendo repicada para NA e enviada para posterior serotipificação, no Pólo do INIAV, I.P. em Oeiras.

O LMA do INIAV, I.P. utiliza como tecnologia de referência para deteção destes genes a técnica de RT-PCR desenvolvida «*in-house*», após o pré-enriquecimento não seletivo das amostras em APT (Anexo XXIX). Após a deteção dos genes *stx* e *eae*, a pesquisa de *E. coli* STEC é efetuada de acordo com a norma ISO/TS 13136:2012 associada ao procedimento EU-RL para a pesquisa de



*E. coli* O104:H4, utilizando o meio de cultura Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) (Figura 24) que contém um agente cromogénico, o ácido 5- bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucorónico (*X-Glucuronide*), capaz de detetar a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase (Hansen, 1984).

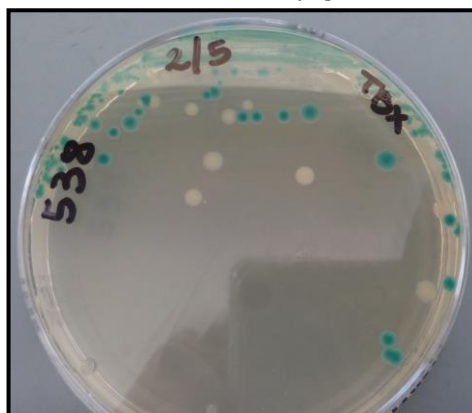


Figura 24. Colónias características de *Escherichia coli* em meio TBX.

Como grande parte das estirpes de *E. coli* são  $\beta$ -glucuronidase positivas, ao absorverem o complexo intacto presente no meio de cultura, a glucuronidase intracelular de *E. coli* divide a ligação entre o cromóforo e o glucuronido, libertando e acumulando o cromóforo colorido dentro das células, originando a coloração azul esverdeada das colónias, tal como descrito pela norma ISO/TS 13136:2012. Contudo, aproximadamente 3 a 4 % das estirpes de *E. coli* são  $\beta$ -glucuronidase negativas, nomeadamente estirpes do serogrupo de *E. coli* O157 (Ratnam, March, Ahmed, Bezanson, & Kasatiya, 1988). O meio TBX apresenta ainda sais biliares que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo.

### 5.3.6 Pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*

A contagem e a deteção de *Listeria monocytogenes* seguiram as técnicas descritas na primeira (ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004) e segunda partes (ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004) desta norma (Anexo XXX). O procedimento para a contagem de *L. monocytogenes* consiste na utilização do meio de cultura Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar (OCLA), em que é semeado 0.1 ml das diluições consideradas (*e.g.*, geralmente, até à diluição  $10^{-3}$ ) por espalhamento em superfície. O meio OCLA, dada a presença de um substrato cromogénico (*X-Glucoside*), permite a deteção da enzima  $\beta$ -glucosidase que o degrada, fazendo desta forma a identificação presuntiva do género *Listeria* que permite diferenciar espécies patogénicas como *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (Willis, Baalham, Greenwood, & Presland, 2006). Esta enzima é comum a todas as espécies do género *Listeria*, contudo outros organismos, como *Enterococcus*, também a possuem, sendo inibidos neste meio de cultura pelos diversos agentes seletivos combinados presentes, como cloreto de lítio e alguns antibióticos (*i.e.*, ácido nalidíxico, ceftazidima e polimixina B). Enquanto o papel da anfotericina passa pela inibição do crescimento de leveduras e bolores que podem estar presentes nas amostras. As colónias características de *L. monocytogenes* em meio OCLA apresentam-se com coloração azul-esverdeada rodeadas por um halo opaco (Figura 25), tornando-as distinguíveis das restantes espécies pertencentes a este género, e cuja formação está relacionada com a atividade de uma enzima específica (PC-PLC) (Leclercq, 2004; Reissbrodt, 2004; Hegde, Leon-Velarde, Stam, Jaykus, & Odumeru, 2007; Stessl, Luf, Wagner, & Schoder, 2009)

produzida por *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* que hidrolisa o fosfatidilinositol, no caso do meio ALOA de acordo com Ottaviani *et al.*, (1997), citado por Willis *et al.*, (2006) ou a lecitina de soja, uma opção mais barata (Willis *et al.*, 2006; da Silva Malheiros, Micheletto, da Silveira, & Brandelli, 2010) no caso do meio OCLA (Willis *et al.*, 2006).



**Figura 25.** Diferenciação entre *Listeria monocytogenes* (à esquerda na placa) e *Listeria innocua* (à direita na placa) em meio OCLA, pela presença de halos opacos em *L. monocytogenes*.

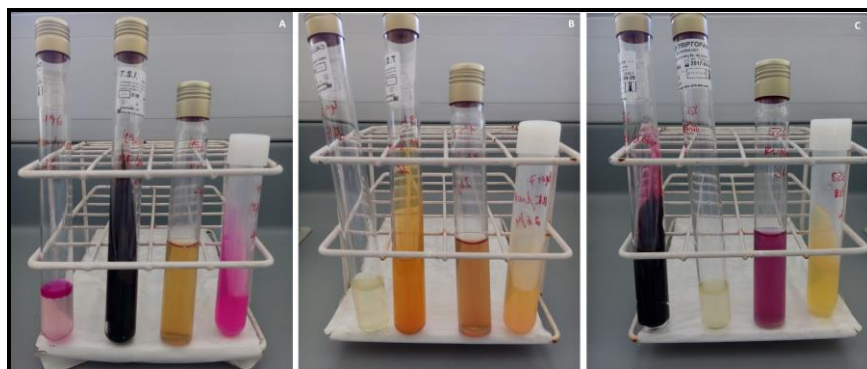
Para a pesquisa de *L. monocytogenes*, após detecção através do Kit iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II (Bio-Rad®), utilizam-se o caldo Half-Fraser, caldo Fraser, meio Columbia Agar 5%, teste da catalase e o Kit Api® *Listeria* (bioMérieux™). Os caldos Half-Fraser e Fraser apresentam uma constituição semelhante com a diferença de que o primeiro apresenta metade da concentração de antibióticos do segundo, de forma a permitir um melhor crescimento das bactérias eventualmente lesadas, pelo facto de se tratar de um pré-enriquecimento (Corry, Curtis, & Baird, 2003).

### 5.3.7 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras alimentares e de alimentos para animais pré enriquecidas em APT e de acordo com a norma ISO 6579-1:2017 (Anexo IX), após detecção através do Kit iQ-Check® *Salmonella* II (Bio-Rad®), procede-se ao enriquecimento seletivo em caldo RVS ou em meio MSRV e em caldo MKTTn. Estes passos de enriquecimento são necessários uma vez que estas amostras, geralmente contêm baixos números de espécies de *Salmonella* em stress (Fleet, 1999). O caldo RVS contém, para além de fontes de carbono e compostos azotados, cloreto de magnésio que aumenta a pressão osmótica do meio, verde de malaquite que inibe organismos que não sejam do género *Salmonella*, que associados a um pH baixo, proporcionam a seletividade do meio para *Salmonella* e agem como agentes seletivos para espécies do género *Salmonella* altamente resistentes. O caldo MKTTn apresenta fontes de carbono, azoto, vitaminas e sais minerais e é constituído também por tetracionato que inibe bactérias que não possuam tetracionatoredutase (*e.g.*, a maioria das bactérias de Gram negativo, com exceção de *Salmonella* e *Proteus*). A inibição de *Proteus* é efetuada pela adição de novobiocina e a das bactérias de Gram positivo é conseguida pela ação do verde brilhante e pela presença de sais biliares. A confirmação e identificação passa ainda pela utilização do meio XLD e de CS. O meio XLD permite verificar a rápida fermentação da xilose que é quase universal entre todas as bactérias entéricas, exceto

para os géneros *Shigella*, *Providencia* and *Edwardsiella*. Assim, neste meio, a xilose é incluída de modo a que as espécies de *Shigella* possam ser identificadas a partir de uma reação negativa. *Salmonella* spp. são diferenciadas de outras espécies não patogénicas fermentadoras de xilose pela incorporação de lisina neste meio, pois utilizando a xilose e descarboxilando a lisina, o pH torna-se alcalino, mimetizando a reação de *Shigella*. No entanto é possível diferenciar estas duas espécies pelo indicador de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S). A elevada produção de ácido pela fermentação da lactose e sacarose previne que os coliformes positivos, que descarboxilem a lisina, revertam o pH para valores alcalinos, e que os não patogénicos produtores de H<sub>2</sub>S não descarboxilem a lisina. Os níveis de ácido também previnem o escurecimento das colónias por estes microrganismos antes das horas recomendadas pela norma para incubação (*i.e.*, 24h±3). O desoxicolato de sódio é incorporado como inibidor de coliformes sem diminuir o crescimento de *Salmonella* e *Shigella*. A sensibilidade e seletividade do meio XLD é superior à dos meios de plaqueamento convencionais, como Eosin Methylene Blue, *Salmonella-Shigella* e Bismuth Sulphite que tendem a suprimir o crescimento de *Shigella*. Neste laboratório, o meio XLD é utilizado para o isolamento de *Salmonella* a partir de alimentos destinados ao consumo humano, de alimentos para outros animais e amostras provenientes de produção primária. O segundo meio seletivo e diferencial a utilizar é o meio Chromo*Salmonella* que se baseia na utilização de um substrato cromogénico ao qual são adicionados sais biliares, novobiocina e cefsulodina que inibem o crescimento de microrganismos de Gram positivo, *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respetivamente.

O meio NA é um meio nutritivo muito utilizado na purificação de diferentes organismos e contém peptona, extrato de levedura ou de carne e uma concentração de 0.5% de NaCl, mantendo uma concentração de sal no meio semelhante à do citoplasma dos microrganismos. Destas colónias purificadas, executam-se os testes bioquímicos e serológicos: produção do citocromo c oxidase, aglutinação em Antiserum Poly A-I e Vi e em soro fisiológico, teste Triple Sugar Iron (TSI) para a produção de gás a partir da fermentação da glicose e produção de H<sub>2</sub>S e caldo Triptofano, cujo objetivo é determinar a capacidade de um microrganismo produzir indol após adição de reagente de Kovacs por ação da enzima triptofenase, a partir da molécula de triptofano. No caso de *Salmonella* não há formação de um anel avermelhado à superfície, mas sim amarelo acastanhado, pois não há produção de indol. Convencionalmente, procede-se à utilização dos testes da lisina e da ureia em substituição das galerias de identificação, na qual o teste bioquímico da lisina visa determinar, por ação da enzima lisina descarboxilase, a capacidade de descarboxilar este aminoácido e a utilização da ureia permite verificar a habilidade de um microrganismo em utilizar a mesma, formando amónia pela ação da enzima urease. O tubo de lisina, geralmente, permanece roxo com alguma turbidez em *Salmonella* spp. indicando uma reação positiva, contudo a reação da ureia em *Salmonella* é negativa (Figura 26).



**Figura 26.** A imagem A corresponde à amostra 496 (Anexo XVIII) com os testes bioquímicos a demonstrar uma estirpe que não *Salmonella* pelo anel cor cereja no caldo triptofano (primeiro tubo à esquerda), a não descarboxilação da lisina (terceiro tubo) e a formação de amónia (cor cereja no tubo da ureia, o último); a imagem B representa os testes claramente negativos para *Salmonella* da amostra 527; e por fim, a imagem C corresponde à amostra 526 (Anexo XVIII), com os testes bioquímicos a confirmarem o género *Salmonella*.

As galerias de identificação BBL™ Crystal™ (Becton, Dickinson *and* Company) são um método de identificação em miniatura que utiliza substratos convencionais modificados e cromogénicos para auxiliar a identificação de bactérias aeróbicas de Gram negativo, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* sendo de fácil utilização e sem necessitar do uso de pipetas de Pasteur. A Figura 27 representa um resultado positivo para *Salmonella*.



**Figura 27.** Galeria de identificação de confirmação de uma amostra suspeita de *Salmonella*, proveniente de uma colónia isolada em NA.

## 5.4 Controlo de qualidade dos ensaios microbiológicos

### 5.4.1 Controlo de qualidade interno e externo

O controlo de qualidade interno e externo do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Unidade de Tecnologia e Segurança Alimentar do INIAV, I.P. é conduzido tendo como base a norma ISO 7218:2007/Amd 1:2013, de modo a que seja realizada uma avaliação contínua do trabalho executado e dos resultados obtidos. Assim sendo, é possível cumprir o principal objetivo do controlo interno através da garantia da consistência dos resultados obtidos na rotina laboratorial aliada à sua conformidade com os critérios definidos nas respetivas normas ISO utilizadas nos diferentes ensaios, demonstrando que há controlo sobre as variáveis laboratoriais (*i.e.*, entre técnicos, equipamentos ou materiais). O controlo de qualidade externo visa a execução de ensaios interlaboratoriais utilizando matrizes adequadas que sejam representativas da rotina e provenientes de diferentes laboratórios (*e.g.*, APHA, EU-RL e HPA). O programa que envolve os critérios de controlo de qualidade interno e externo deste laboratório encontra-se explícito no Anexo XXXI, assim como a frequência e o objetivo de cada medida executada para o controlo de

qualidade. O Anexo XXXII também descreve a utilização de controlos positivo e negativo mensais e após a abertura de um novo lote de um consumível. Estes controlos são específicos consoante o ensaio requerido para os diferentes microrganismos (Tabela 13). Estas estirpes encontram-se conservadas a -80°C em Microbank™, contudo, são repicadas para TSA e conservadas a 5°C para uso recorrente.

**Tabela 13.** Controlos positivo e negativo para as diferentes análises realizadas no LMA do INIAV, I.P..

Microrganismo	Meio	Controlo Positivo	Controlo Negativo
<i>Campylobacter</i> spp.	Bolton	<i>C. jejuni</i> ATCC® 33291	<i>E. coli</i> ATCC® 25922
<i>Escherichia coli</i> STEC	APT	<i>E. coli</i> O26	<i>S. Enteritidis</i> ATCC® 13076
<i>Escherichia coli</i> O157	APT	<i>E. coli</i> O157	<i>S. Enteritidis</i> ATCC® 13076
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fraser	<i>L. monocytogenes</i> ATCC® 7644	<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212
<i>Salmonella</i> spp.	APT	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> ATCC® 25922

#### 5.4.2 Controlo ambiental

De acordo com a norma ISO 7218:2007/Amd 1:2013, para além dos procedimentos de garantia de qualidade dos ensaios executados e, conseqüentemente, dos resultados obtidos, deve ser feito semanalmente um controlo ambiental (*i.e.*, um controlo da qualidade do ar do laboratório). Este controlo deve envolver todas as áreas de trabalho, assim como todos os equipamentos do laboratório, de modo a avaliar a contaminação microbiana nas condições normais de trabalho. Assim, é possível garantir que as condições do ambiente laboratorial sejam as ideais para a execução dos ensaios e permite confirmar que a higienização de todas as salas e equipamentos é bem executada. Posto isto, são expostas ao ambiente das salas, nas bancadas, placas de meio de cultura não seletivo (*e.g.*, Plate Count Agar, PCA) para efetuar o ensaio de contagem de microrganismos a 30°C e de fungos, em cada uma das áreas e equipamentos a avaliar: Salas D.6, D.7, D.8, D.9 e D.11 As Câmara(s) de Segurança Biológica ou Câmara(s) de Fluxo Laminar (CSB/CFL) existentes nas Salas D.6, D.8, D.9 e D.11 devem ser ligadas cerca de 15 minutos antes da exposição das placas. As placas de PCA devem ser fechadas após 15 minutos de exposição para as placas colocadas nas bancadas e após 30 minutos para as placas colocadas nas CSB/CFL. Para a pesquisa de bactérias mesófilas, as placas devem ser incubadas a 37°C±2 durante 48h ou a 30°C±2 durante 72h, e para a pesquisa de fungos, as placas devem ser colocadas à temperatura ambiente, até no máximo 7 dias, em contentor com tampa. Em simultâneo, incubam-se as placas testemunho (placas sem exposição), tanto para a pesquisa de bactérias como de fungos. Decorrido o tempo de incubação, procede-se à contagem das colónias, registam-se os resultados e aplicam-se as medidas corretivas caso seja necessário (*i.e.*, limpeza e desinfeção das CSB/CFL e/ou das bancadas). Caso o limite tolerado de ufc por placa seja ultrapassado, quer nos fungos quer nas bactérias, deverá proceder-se à identificação dos grupos mais representativos a fim de avaliar a importância dessa contaminação.

## 6. Conclusões

Os métodos normalizados são ferramentas importantes na pesquisa e deteção de microrganismos patogénicos, pois com o avançar das metodologias é essencial que as instituições

laboratoriais consigam acompanhar os desenvolvimentos destes métodos. A utilização da tecnologia PCR como primeira abordagem na detecção dos microrganismos alvo, auxiliando os métodos normativos (*i.e.*, após o pré-enriquecimento não seletivo), revolucionou a microbiologia alimentar, pois permitiu no caso de *Listeria* e *Salmonella* (através do Kit iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II e do Kit iQ-Check® *Salmonella* II da Bio-Rad®, respetivamente) e de *Escherichia coli* STEC e de *Campylobacter* spp. (através de 2 Kit «*in-house*») uma diminuição no gasto de consumíveis, na medida em que apenas há continuação pela respetiva norma ISO nos casos em que as amostras são positivas na corrida de RT-PCR. Como estas metodologias apenas exigem a presença de ADN do microrganismo, podem, assim, complementar os métodos convencionais uma vez que existe a possibilidade dos microrganismos se encontrarem num estado viável não cultivável ou de já não estarem vivos após o pré-enriquecimento da amostra.

A existência dos surtos provocados pelo consumo de alimentos contaminados com os diferentes agentes zoonóticos fomenta o desenvolvimento de metodologias «*in-house*» capazes de detetar os microrganismos alvo. Os métodos qualitativos, e mais económicos, capazes de detetar a presença de *Salmonella*, quer em baixas ou elevadas concentrações, são essenciais para identificação dos pontos críticos de contaminação e para a avaliação dos riscos microbiológicos na cadeia de processamento dos alimentos (Malorny *et al.*, 2007; Postollec *et al.*, 2011). O desenvolvimento de um método que forneça a confirmação rápida (*i.e.*, aproximadamente 2 horas) da presença de *Salmonella* numa amostra alimentar ou ambiental e que, no caso de amostras de produção primária, também permita distinguir o serotipo (vacinal ou selvagem), trará vantagens para a indústria alimentar, uma vez que haverá uma melhor avaliação do risco para os alimentos destinados a humanos ou outros animais, que sejam de origem animal ou vegetal, e poderão desenvolver-se estratégias de tratamento (*e.g.*, em medicina veterinária através do desenvolvimento ou melhoramento de vacinas), reduzindo perdas económicas para os produtores de aves domésticas quando os bandos estão à espera de serem libertados para abate. Os diferentes serotipos de *Salmonella* são resilientes e apresentam um sistema genómico complexo o que faz com que o organismo seja capaz de reagir às diferentes condições ambientais, seja no próprio trato gastrointestinal dos animais ou durante o seu processamento, após abate. Diferentes fatores de stress a que a bactéria pode ser exposta incluem a temperatura, pH, diferenças osmóticas e baixa atividade da água, abaixo dos valores normais (Andino & Hanning, 2015).

De acordo com Malorny *et al.*, 2004, o gene *ttr* deteta qualquer estirpe pertencente às duas espécies de *Salmonella*, *S. enterica* e *S. bongori*, não limitando o espectro de detecção através de uma sonda que apenas permita a detecção de *Salmonella* Enteritidis. A sonda para o gene *ttr* liga-se praticamente a todas estirpes que se esperam que sejam detetadas por RT-PCR como pertencentes ao género *Salmonella* e a sonda para o gene *nhaA*, capaz de detetar o serotipo vacinal (*i.e.*, sonda *nhaA-V*), apresenta sempre um resultado positivo para estirpes vacinais (*i.e.*, estirpes cujo serotipo já foi identificado pelo esquema de Classificação de Kauffmann-White), sendo então específica para amostras de *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal. Segundo Maurischat *et al.*, 2015 a utilização da sequência da sonda *nhaA-WT* é essencial para a diferenciação entre estirpes selvagens e a estirpe vacinal de *Salmonella* Enteritidis na medida em que ambas as sequências competem por locais de ligação semelhantes. Neste procedimento, a sonda *nhaA-WT* é utilizada sem marcação, apenas estando presente na mix para que haja

competição, sendo que uma sonda LNA e marcada com fluorescência (neste caso, FAM) se torna mais dispendiosa para o laboratório do que uma sonda TaqMan. Uma vez que as curvas de amplificação obtidas através da sonda *nhaA*-WT não permitem uma boa visualização dos resultados obtidos, com o objetivo de implementar esta metodologia, a solução passa por adicionar a sequência da sonda que deteta estirpes selvagens, mas sem que haja a necessidade de a detetar através dos fluoróforos. Ambos os genes funcionam melhor com aproximadamente 40 ciclos, evitando a desnaturação da sonda e com uma temperatura de annealing de 55°C.

Com base nos resultados obtidos dos ensaios de RT-PCR de estirpes ATCC®, provenientes de ensaios interlaboratoriais (APHA ou HPA), dos Laboratórios Europeus de Referência e de amostras reais dos planos PIGA, CAA, PIF e PNCS, foram concluídos os valores da especificidade, sensibilidade e precisão para ambos os genes, para futura validação de metodologia. Os valores de especificidade do gene *ttr* correspondem aos resultados obtidos e esperados com as estirpes utilizadas para desenvolvimento desta metodologia, na medida em que a especificidade na deteção de estirpes do género *Salmonella* é menor (65.5%) quando não as estirpes não são isoladas de acordo com a norma ISO 6579. Quando é utilizada esta norma, a especificidade do gene *ttr* atinge os 100%. Então, é possível assegurar o isolamento de *Salmonella*, uma vez que a norma 6579 é utilizada de modo a garantir que as estirpes que obtemos e que são testadas por RT-PCR sejam pertencentes a este género. Para que a especificidade aumente sem necessidade do seguimento da norma podem ser utilizadas sondas com bases de LNA, em substituição de uma sonda TaqMan para o gene *ttr*, contudo isto traria maiores custos para o laboratório não sendo possível fazer esta opção. A especificidade do gene *nhaA* (95.3%) não é de 100%, na medida em que a norma ISO 6579 não foi seguida para as estirpes utilizadas no desenvolvimento da metodologia, apesar de que todas as estirpes esperadas para serem detetadas como estirpe vacinal, foram detetadas. Assim, a sonda *nhaA*-V é específica para as estirpes alvo. Ambos os genes são bastante sensíveis (97.9% para o *ttr* e 100% para o *nhaA*) nestes ensaios de RT-PCR uma vez que são capazes de detetarem resultados positivos que sejam efetivos e, eventualmente, já confirmados por serotipificação.

A utilização de amostras com estirpes conhecidas (HPA) permitiu verificar que a nova metodologia permite isolar *Salmonella* através da ISO 6579, detetar *Salmonella* spp. e diferenciar a estirpe vacinal das selvagens uma vez que o aspeto macroscópico obtido em meio XLD era diferente, sendo côncavo no caso da estirpe vacinal e convexo no caso de estirpes selvagens. Também foi possível verificar que o meio que favorecia o crescimento da estirpe vacinal e que permitia a sua deteção era o caldo MKTTn. No caso de existirem amostras suspeitas para *Salmonella*, após seguimento da norma ISO 6579, contudo, através da corrida de RT-PCR se obtiver resultados negativos, podemos estar perante «falsos negativos», requerendo a utilização de galerias de identificação para confirmar a presença/ausência de *Salmonella*. De modo a validar a nova metodologia, todas as estirpes presuntivas de pertencer ao género *Salmonella* são repicadas para meio NA, e sendo de origem alimentar apenas é repicada 1 colónia (*i.e.*, a mesma colónia a ser serotipificada), ou proveniente de matrizes ambientais (*i.e.*, repicagem da colónia para NA a partir do XLD que vai para serotipificação, e do XLD resultante do enriquecimento seletivo são repicadas entre 1 a 10 colónias, dependendo da possibilidade de encontrar ou não aspetos diferentes entre elas levando à possibilidade de encontrar espécies diferentes).

As sondas e os *primers* usados são específicos, o que faz com que haja uma eficiência elevada desta metodologia «*in-house*» na obtenção de resultados, uma vez que este método permite a deteção de *Salmonella* spp. em todos os produtos alimentares, alimentos para animais e amostras ambientais, e ainda a deteção de *Salmonella* Enteritidis estirpe vacinal (*i.e.*, diferenciando estirpe vacinal de estirpes selvagens) em amostras de produção primária, todas previamente enriquecidas 18h±2h a 37°C, em APT e, incluindo as restantes fases iniciais da norma. A diferença no número total de amostras deve-se ao facto de terem sido testadas amostras apenas para a presença de *Salmonella*.

Este trabalho contribui, assim, para a disseminação da utilização da tecnologia PCR para a deteção de agentes patogénicos transmitidos por alimentos. Poderão, ainda, ser desenvolvidos estudos no futuro para testar a sensibilidade de deteção de ambos os genes, diretamente do APT em comparação com as colónias puras, uma vez que pode sempre existir a possibilidade de *Salmonella* se encontrar presente nas amostras, contudo, num estado viável não cultivável.



## Referências

- Aabo, S., Andersen, J. K., & Olsen, J. E. (1995). Research note: Detection of Salmonella in minced meat by the polymerase chain reaction method. *Letters in Applied Microbiology*, 21(3), 180–182.
- Abu Al-Soud, W., & Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3748–53.
- Abubakar, I., Irvine, L., Aldus, C. F., Wyatt, G. M., Fordham, R., Schelenz, S., ... Hunter, P. R. (2007). A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 11(36), 1–216.
- Adak, G. K., Long, S. M., & O'Brien, S. J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*, 51, 832–841.
- Adamus-Bialek, W., & Wawszczak, M. (2015). Microbiological contamination of food. *Ecological Chemistry and Technology*, 22(4), 509–516.
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*, 2015(Table 3).
- Arnold, M. E., Papadopoulou, C., Davies, R. H., Carrique-Mas, J. J., Evans, S. J., & Hoinville, L. J. (2010). Estimation of Salmonella prevalence in UK egg-laying holdings. *Preventive Veterinary Medicine*, 94(3), 306–309.
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., & Roosens, N. H. (2013). Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for detection and discrimination of Listeria spp. and Listeria monocytogenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4021–4037. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4477-2>
- Barrett, E. L., & Clark, M. A. (1987). Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological Reviews*, 51(2), 192–205.
- Barros, M. A. F., Nero, L. A., Silva, L. C., D'Ovidio, L., Monteiro, F. A., Tamanini, R., ... Beloti, V. (2007). Listeria monocytogenes: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*, 76(4), 591–596.
- Bennett, Greenwood, Tennant, Banks, & Betts. (1998). Rapid and definitive detection of Salmonella in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 26(6), 437–441.
- Bhatt, B., Nagar, G., Nagar, S., & Tyagi, N. (2016). Food-borne Diseases and Techniques to Detect Food-borne Pathogens and Their Limitations, 4(1), 199–205.
- Bjarnason, J., Southward, C. M., & Surette, M. G. (2003). Genomic Profiling of Iron-Responsive Genes in Salmonella enterica Serovar Typhimurium by High-Throughput Screening of a Random Promoter Library. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4973.
- Bless, P. J., Schmutz, C., Suter, K., Jost, M., Hattendorf, J., Mäusezahl-Feuz, M., & Mäusezahl, D. (2014). A tradition and an epidemic: Determinants of the campylobacteriosis winter peak in Switzerland. *European Journal of Epidemiology*, 29(7), 527–537.
- Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F., & Colin, P. (1998). Development of a new culture medium for the rapid detection of Salmonella by indirect conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 399–403.
- Bonalli, M., Stephan, R., Käppeli, U., Cernela, N., Adank, L., & Hächler, H. (2011). Salmonella enterica serotype Virchow associated with human infections in Switzerland: 2004-2009. *BMC Infectious Diseases*, 11, 49.
- Braasch, D. A., & Corey, D. R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chemistry & Biology*, 8(1), 1–7.

- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465–7.
- Brett, C. L., Donowitz, M., & Rao, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288(2). Obtido de <http://ajpcell.physiology.org/content/288/2/C223>
- Cadnum, J. L., Hurless, K. N., Deshpande, A., Nerandzic, M. M., Kundrapu, S., & Donskey, C. J. (2014). Sensitive and selective culture medium for detection of environmental *Clostridium difficile* isolates without requirement for anaerobic culture conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3259–3263.
- Călinescu, O., Danner, E., Böhm, M., Hunte, C., & Fendler, K. (2014). Species differences in bacterial NhaA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *FEBS Letters*, 588(17), 3111–3116.
- Campagnari, E., Rossi, G., Franciosi, C., Ruffoni, L. S., Giovanardi, D., Ricci, A., ... Prandini, F. (2007). In vitro evaluation of live attenuated vaccines against *Salmonella enteritidis*: humoral immune response. *Italian Journal of Animal Science*, 6(3), 297–300.
- Chen, J. Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39–59.
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R. E., & Ge, B. (2011). Rapid Detection of Viable *Salmonellae* in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification □, 77(12), 4008–4016.
- Chen, S., Yee, A., Griffiths, M., Larkin, C., Yamashiro, C. T., Behari, R., ... De Grandis, S. A. (1997). The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 35(3), 239–250.
- Chen, Y., & Knabel, S. J. (2007). Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 73(19), 6299–304.
- Chiang, Y. C., Wang, H. H., Ramireddy, L., Chen, H. Y., Shih, C. M., Lin, C. K., & Tsen, H. Y. (2016). Designing a biochip following multiplex polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* serovars Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Hadar, and Virchow in poultry products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1–9.
- Chiu, C. H., & Ou, J. T. (1996). Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2619–2622.
- Chiu, T. H., Chen, T. R., Hwang, W. Z., & Tsen, H. Y. (2005). Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *International Journal of Food Microbiology*, 97(3), 259–265.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., & Comi, G. (2002). Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6273–6282.
- Cohen, N. D., Martin, L. J., Simpson, R. B., Wallis, D. E., & Neiberghs, H. L. (1996). Comparison of polymerase chain reaction and microbiological culture for detection of salmonellae in equine feces and environmental samples. *American Journal of Veterinary Research*, 57(6), 780–786.
- Collins, H. L. (2008). Withholding iron as a cellular defence mechanism – friend or foe? *European Journal of Immunology*, 38(7), 1803–1806.
- Connor, B. A., & Schwartz, E. (2005). Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(10), 623–628.

- Corry, E. L., Curtis, G. D. W., & Baird, R. M. (2003). Fraser broth and modified half fraser broth. *Progress in Industrial Microbiology*, 37, 472–474.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 435–464.
- Costerton, J. W., Lewandorski, Z., Debber, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms , the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137–2142.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880.
- Crump, J. A., Ram, P. K., Gupta, S. K., Miller, M. A., & Mintz, E. D. (2008). Part I. Analysis of data gaps pertaining to Salmonella enterica serotype Typhi infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiology and Infection*, 136(04), 436–48.
- D 'aoust, J. Y., Pagotto, F., Akhtar, M., Bussey, J., Cooper, C., Mcdonald, C., ... Tyler, K. (2007). Evaluation of the BAX Gel and Fluorometric Systems for the Detection of Foodborne Salmonella. *Journal of Food Protection*, 70(4), 835–840.
- da Silva Malheiros, p., Micheletto, Y. M. S., da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198–1203.
- De Smedt, J., Bolderdijk, R., & Milas, J. (1994). Salmonella detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 77(2), 365–73.
- De Smedt, J. M., Bolderdijk, R. F., Rappold, H., & Lautenschlaeger, D. (1986). Rapid Salmonella Detection in Foods by Motility Enrichment on a Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium. *Journal of Food Protection*, 49(7), 510–514.
- de Souza, E. L., & da Silva, C. A. (2002). Qualidade sanitária de equipamentos, superfícies, água e mãos de manipuladores de alguns estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de João Pessoa, Pb. *Hig. aliment*, 18(116/117), 98–102.
- Decreto-Lei N.º 193/2004. (2004). Decreto-Lei N.º 193/2004 do Conselho de 17 de dezembro, relativa às medidas de protecção contra zoonoses e certos agentes zoonóticos em animais e produtos de origem animal a fim de evitar focos de infecção e de intoxicação de origem alimentar, com a último. *Diário da República n.º 193/2004, Série I-A*.
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., ... Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6), 1882–1889.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). (2017). Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–3822.
- Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144(4), 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- EFSA. (2014). EFSA explains zoonotic diseases: Salmonella | European Food Safety Authority. Obtido 16 de Setembro de 2017, de <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/factsheetsalmonella>
- EFSA & ECDC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12).

- EFSA BIOHAZ Panel. (2013). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, *11*(4), 3138.
- EFSA e ECDC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, *14*(12).
- EFSA e ECDC 2015a. (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, *18*(15), 20449.
- EFSA e ECDC 2015b. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal*, *13*(12), 4329.
- Elizaquível, P., & Aznar, R. (2008). A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiology*, *25*(5), 705–713.
- Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2008). Fur Regulates Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System through HilD. *Journal of Bacteriology*, *190*(2), 476.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, *13*(4), 559–70.
- Emborg, H. D., Teunis, P., Simonsen, J., Krogfelt, K. A., Jørgensen, C. S., Takkinen, J., & Mølbak, K. (2015). Was the increase in culture-confirmed *Campylobacter* infections in Denmark during the 1990s a surveillance artefact? *Eurosurveillance*, *20*(41), 30041.
- Erich, H. A. (1989). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*, *9*(6), 437–447.
- Eyigor, A., Carli, K. T., & Unal, C. B. (2002). Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(1), 37–41.
- FDA. (sem data). People at Risk of Foodborne Illness - Food Safety: It's Especially Important for At-Risk Groups [WebContent]. Obtido 16 de Setembro de 2017, de <https://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/PeopleAtRisk/ucm352830.htm#FS5>
- Fey, A., Eichler, S., Christen, R., Guzma, C. A., Sophia, N., Centre, A., & Nice, F. (2004). Establishment of a Real-Time PCR-Based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA Targets in Water , Using *Salmonella* as a Model Organism, *70*(6), 3618–3623.
- Fitzgerald, C., Sherwood, R., Gheesling, L. L., Brenner, F. W., & Fields, P. I. (2003). Molecular Analysis of the *rfb* O Antigen Gene Cluster of *Salmonella enterica* Serogroup O:6,14 and Development of a Serogroup-Specific PCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(10), 6099–6105.
- Fleet, G. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, *50*(1–2), 101–117.
- Foley, S. L., Lynne, A. M., & Nayak, R. (2007). *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, *86*(No 14,Sup 2008), E149–E162.
- Fung, D. Y. C. (2000). Rapid methods and automation in microbiology: A review. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, *39*(2), 301–307.
- Galan, J. E., & Curtiss, R. (1991). Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D Genes of *Salmonella typhimurium* among Other *Salmonella* Serovars: *invA* Mutants of *Salmonella typhi* Are Deficient for Entry into Mammalian Cells. *Infection and Immunity*, *59*(9), 2901–2908.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M. A., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., ... Wegener, H. C. (2006). Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002 - Volume 12, Number 3—March 2006 - Emerging Infectious Disease journal - CDC.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(1), 1–15.

- García-Armesto, M.-R., Prieto, M., Alonso, C., GarcíLópez, M.-L., García-Fernández, M.-C., & Otero, A. (1993). Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes' milk. *Journal of Dairy Research*, 60(3), 371–383.
- Garner, D., & Kathariou, S. (2016). Fresh Produce–Associated Listeriosis Outbreaks, Sources of Concern, Teachable Moments, and Insights. *Journal of Food Protection*, 79(2), 337–344.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, 6(10), 995–1001.
- Ginocchio, C. C., Rahn, K., & Clarke, R. C. (1997). Naturally Occurring Deletions in the Centisome 63 Pathogenicity Island of Environmental Isolates of *Salmonella* spp., 65(4), 1267–1272.
- Gokduman, K., Dilek Avsaroglu, M., Cakiris, A., Ustek, D., & Gurakan, G. C. (2016). Recombinant plasmid-based quantitative Real-Time PCR analysis of *Salmonella enterica* serotypes and its application to milk samples. *Journal of Microbiological Methods*, 122(Supplement C), 50–58.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., ... Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., ... Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.
- González-Escalona, N., Brown, E. W., & Zhang, G. (2012). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *ttrRSBCA locus* and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. in fresh produce and eggs. *FRIN*, 48(1), 202–208.
- González-Escalona, N., Hammack, T. S., Russell, M., Jacobson, A. P., Jesús, A. J. D., Brown, E. W., & Lampel, K. A. (2009). Detection of Live *Salmonella* sp. Cells in Produce by a TaqMan-Based Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting *invA* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3714–3720.
- Goossens, H., Wauters, G., de Boeck, M., Janssens, M., & Butzler, J. P. (1984). Semisolid selective-motility enrichment medium for isolation of salmonellae from fecal specimens. *Journal of clinical microbiology*, 19(6), 940–1.
- Grimont, P. A. D., & Weill, F.-X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* (9th edition). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Obtido de [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. - PubMed - NCBI. Obtido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840847?dopt=Abstract>
- Guy, R. A., Kapoor, A., Holicka, J., Shepherd, D., & Horgen, P. A. (2006). A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1265–1272.
- Hagren, V., Lode, P. V., Syrjälä, A., Korpimäki, T., & Tuomola, M. (2008). International Journal of Food Microbiology An 8-hour system for *Salmonella* detection with immunomagnetic separation and homogeneous time-resolved fluorescence PCR, 125, 158–161.
- Hallas, G., & Monis, P. (2015). Evaluation of heterotrophic plate and chromogenic agar colony counting in water quality laboratories. *MethodsX*, 2, 415–422.
- Hegde, V., Leon-Velarde, C. G., Stam, C. M., Jaykus, L. A., & Odumeru, J. A. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar *Listeria* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 82–87.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986–94.

- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E., & Wagner, M. (2001). Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Research in Microbiology*, *152*(1), 37–46.
- Helms, M., Simonsen, J., Olsen, K. E. P., & Mølbak, K. (2005). Adverse Health Events Associated with Antimicrobial Drug Resistance in *Campylobacter* Species: A Registry-Based Cohort Study. *Journal of Infectious Diseases*, *191* (7), 1050–1055.
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., Lo, F. W., Jensen, A. B., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2011). Global monitoring of salmonella serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, *8*(8), 887–900.
- Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus, T., Sawers, G., & Berks, B. C. (1999). The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, *32*(2), 275–287.
- Hensel, M., Nikolaus, T., & Egelseer, C. (1999). Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*, *31*(2), 489–498.
- Hinsley, A. P., & Berks, B. C. (2002). Specificity of respiratory pathways involved in the reduction of sulfur compounds by *Salmonella enterica*. *Microbiology*, *148*(11), 3631–3638.
- Hoelzer, K., Moreno, A. S., Wiedmann, M., Werker, D., Signs, K., Davis, C., ... Smith, K. E. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research*, *42*(1), 34.
- Holbrook, R., Anderson, J. M., Baird-Parker, A. C., Dodds, L. M., Sawhney, D., Stuchbury, S. H., & Swaine, D. (1989). Rapid detection of salmonella in foods—a convenient two-day procedure. *Letters in Applied Microbiology*, *8*(4), 139–142.
- Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådström, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(9), 3429–3435.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., & Fach, P. (2003). Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *Journal of clinical microbiology*, *41*(12), 5835.
- Howard, Z. R., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2012). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Research International*, *45*(2), 755–764.
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). *Campylobacter*s as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(3), 237–257.
- Hunt, J. M., Abeyta, C., & Tran, T. (1998). *Campylobacter* In *Bacteriological Analytical Manual*. Em U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Ed.), *Bacteriological Analytical Manual* (8th Editio). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Obtido de <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm072616.htm>
- Hyeon, J. Y., Park, C., Choi, I. S., Holt, P. S., & Seo, K. H. (2010). Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(1), 177–181.
- Inoue, H., Sakurai, T., Ujike, S., Tsuchiya, T., Murakami, H., & Kanazawa, H. (1999). Expression of functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters of *Helicobacter pylori* in antiporter-deficient *E. coli* mutants. *FEBS Letters*, *443*(1), 11–16.
- ISO (International Organization for Standardization). (2004a). ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2004b). ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method. *Geneva, Switzerland*.

- ISO (International Organization for Standardization). (2004c). ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method – Amendment 1: Modification of the enumeration medium. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2004d). ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2005). ISO 22174:2005 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions. *Geneva, Switzerland*. Obtido de <https://www.iso.org/standard/36153.html>
- ISO (International Organization for Standardization). (2006). ISO/TS 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 1: Detection method. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012a). ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the deter. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012b). ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the deter. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2013a). ISO 4833-1:2013 (E). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2013b). ISO 7218:2007/Amd 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2013c). ISO 7218:2007/Amd 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. *Geneva, Switzerland*.
- ISO (International Organization for Standardization). (2014). ISO 11133:2014 - Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. *Geneva, Switzerland*. Obtido de <https://www.iso.org/standard/53610.html>
- ISO (International Organization for Standardization). (2017a). 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.
- ISO (International Organization for Standardization). (2017b). ISO 6887 (all parts). Microbiology of food and animal feed - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. *Geneva, Switzerland*.
- Janakiraman, A., & Slauch, J. M. (2000). The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 35(5), 1146–1155.
- Jensen, A. (2003). Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport–Vassiliadis. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), 249–255.
- Jensen, A. N., & Hoorfar, J. (2000). Immediate Differentiation of *Salmonella*-Resembling Colonies On Brilliant Green Agar. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 8(3), 219–225.

- Jensen, G. A., Singh, S. K., Kumar, R., Wengel, J., & Jacobsen, J. P. (2001). A comparison of the solution structures of an *LNA*:DNA duplex and the unmodified DNA:DNA duplex. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 0(7), 1224–1232.
- Jones, T. F., Ingram, L. A., Cieslak, P. R., Vugia, D. J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., ... Angulo, F. J. (2008). Salmonellosis Outcomes Differ Substantially by Serotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(1), 109–114.
- Joosten, H., Bidlas, E., & Garofalo, N. (2006). Salmonella detection in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 110(1), 104–107.
- Josefsen, M. H. (2009). *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen. Obtido de [https://curis.ku.dk/ws/files/17240028/Molecular\\_Detection\\_of\\_Foodborne\\_Pathogens.pdf](https://curis.ku.dk/ws/files/17240028/Molecular_Detection_of_Foodborne_Pathogens.pdf)
- Josefsen, M. H., Krause, M., Hansen, F., & Hoorfar, J. (2007). Optimization of a 12-Hour TaqMan PCR-Based Method for Detection of Salmonella Bacteria in Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 3040–3048.
- Josephson, K. L., Gerba, C. P., & Pepper, I. L. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3513–3515.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Micro*, 2(2), 123–140.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Micro*, 2(2), 123–140.
- Kaper, J. B., & O'Brien, A. D. (2014). Overview and historical perspective. *Microbiol Spectr*, 2(2), 1–15.
- Kathariou, S. (2002). Listeria monocytogenes virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of food protection*, 65(11), 1811–1829.
- Keer, J. T., & Birch, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 175–183.
- Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Kusunoki, J., Itoh, T., & Flood, S. J. (1999). Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting Salmonella in raw meat and shrimp. *Journal of Food Protection*, 62(4), 329–335.
- Kinde, H., Read, D. H., Chin, R. P., Bickford, A. A., Walker, R. L., Ardans, A., ... Gardner, I. A. (1996). Salmonella enteritidis, Phage Type 4 Infection in a Commercial Layer Flock in Southern California: Bacteriologic and Epidemiologic Findings. *Avian Diseases*, 40(3), 665–671.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8(6), 257–60.
- Kluytmans, J., & Belkum, A. Van. (1997). Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Microbiology Reviews*, 10(3), 505–520.
- Knutsson, R., Löfström, C., Grage, H., Hoorfar, J., & Rådström, P. (2002). Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for Salmonella enterica. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 52–60.
- Kurowski, P. B., Traub-Dargatz, J. L., Morley, P. S., & Gentry-Weeks, C. R. (2002). Detection of Salmonella spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*, 63(9), 1265–1268.
- Lascowski, K. M. S., Guth, B. E. C., Martins, F. H., Rocha, S. P. D., Irino, K., & Pelayo, J. S. (2013). Shiga toxin-producing Escherichia coli in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1230–1239.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations, 5(January), 1–19.



- Lawley, T. D., Bouley, D. M., Hoy, Y. E., Gerke, C., Relman, D. A., & Monack, D. M. (2008). Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infection and Immunity*, *76*(1), 403–416.
- Layton, A. N., Hudson, D. L., Thompson, A., Hinton, J. C. D., Stevens, J. M., Galyov, E. E., & Stevens, M. P. (2010). Salicylidene acylhydrazide-mediated inhibition of type III secretion system-1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is associated with iron restriction and can be reversed by free iron. *FEMS Microbiology Letters*, *302*(2), 114–122.
- Lazcka, O., Del, F. J., & Mu, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *22*, 1205–1217.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, *2*(1), 63–76.
- Leclercq, A. (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods*, *57*(2), 251–258.
- Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *189*(12), 4418–4424.
- Lentes, C. J., Mir, S. H., Boehm, M., Ganea, C., Fendler, K., & Hunte, C. (2014). Molecular Characterization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NhaA from *Salmonella* Typhimurium. *PLoS ONE*, *9*(7), e101575.
- Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M. R., & McClane, B. A. (2016). *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. *Microbiol Spectr*, *4*(3), 1–27.
- Lin, J. S., & Tsen, H. Y. (1999). Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. *Journal of Food Protection*, *62*(10), 1103–1110.
- Lindberg, A.-M., Ljungh, Å., Ahrné, S., Löfdahl, S., & Molin, G. (1998). Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology*, *39*(1), 11–17.
- Lindsay, J. A., Ruzin, A., Ross, H. F., Kurepina, N., & Novick, R. P. (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *29*(2), 527–543.
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(6), 645–659.
- Liu, H., Lu, L., Pan, Y., Sun, X., Hwang, C.-A., Zhao, Y., & Wu, V. C. H. (2015). Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, *52*, 78–84.
- Löfström, C., Krause, M., Josefsen, M. H., Hansen, F., & Hoorfar, J. (2009). Validation of a same-day real-time PCR method for screening of meat and carcass swabs for *Salmonella*. *BMC Microbiology*, *9*(85), 1–9.
- Lomonaco, S., Nucera, D., & Filipello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, *35*, 172–183.
- Luk, J. M., Kongmuang, U., Tsang, R. S., & Lindberg, A. A. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(3), 714–718.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*(3), 190–212.
- Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., ... Kirk, M. D. (2014). Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne pathogens and disease*, *11*(6), 447–455.

- Malorny, B., Mäde, D., Teufel, P., Berghof-Jäger, C., Huber, I., Anderson, A., & Helmuth, R. (2007). Multicenter validation study of two blockcycler- and one capillary-based real-time PCR methods for the detection of Salmonella in milk powder. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(2), 211–218.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of Salmonella in food. *Applied and environmental microbiology*, *70*(12), 7046–52.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Martin, A., Helmuth, R., & Bunge, C. (2004). Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7046–7052.
- Mani, V., Brennan, J., & Mandal, B. K. (1974). Invasive Illness with Salmonella Virchow Infection. *Br Med J*, *2*(5911), 143–144.
- Maurischat, S., Szabo, I., Baumann, B., & Malorny, B. (2015). Rapid real-time PCR methods to distinguish Salmonella Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro SALMONELLA VAC E. *Journal of Microbiological Methods*, *112*, 92–98.
- Maurischat, S., Szabo, I., Baumann, B., & Malorny, B. (2015). Rapid real-time PCR methods to distinguish Salmonella Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro SALMONELLA VAC E. *Journal of Microbiological Methods*, *112*, 92–98.
- Mccabe, E. M., Burgess, C. M., Regan, E. O., Mcguinness, S., Barry, T., Fanning, S., & Duffy, G. (2011). Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the hilA gene of Salmonella enterica subspecies enterica. *Food Microbiology*, *28*(3), 447–456.
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (1997). *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Compendium of Chemical Terminology* (2nd ed. (""). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., ... Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, *5*(5), 607–625.
- Mellin, J. R., Tiensuu, T., Bécavin, C., Gouin, E., Johansson, J., & Cossart, P. (2013). A riboswitch-regulated antisense RNA in *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(32), 13132–13137.
- Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology Spectrum*, *2*(3), 1–21.
- Miller, A. J. (1992). Combined Water Activity and Solute Effects on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, *55*(6), 414–418.
- Molin, G., & Stenström, I.-M. (1984). Effect of temperature on the microbial flora of herring fillets stored in air or carbon dioxide. *Journal of Applied Bacteriology*, *56*(2), 275–282.
- Moore, M. M., & Feist, M. D. (2007). Real-time PCR method for Salmonella spp. targeting the stn gene. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(2), 516–530.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., & Lodi, R. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. *International Journal of Microbiology*, 501362:1–501362:7.
- Mossel, D. A. A., Eelderink, I., Koopmans, M., & Van Rossem, F. (1979). Influence of Carbon Source, Bile Salts and Incubation Temperature on Recovery of Enterobacteriaceae from Foods Using MacConkey-type Agars. *Journal of Food Protection*, *42*(6), 470–475.
- Mossel, D. A. A., Mengerink, W. H., & Scholts, H. H. (1962). Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *Journal of bacteriology*, *84*, 381.
- Muniesa, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Appel, B., & Brussow, H. (2012). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: A new challenge for microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(12), 4065–4073.
- Nachamkin, I. (2002). Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*, *4*(4), 399–403.

- Nairz, M., Fritsche, G., Brunner, P., Talasz, H., Hantke, K., & Weiss, G. (2008). Interferon- $\gamma$  limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*. *European Journal of Immunology*, 38(7), 1923–1936.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201.
- Nero, L. A., Beloti, V., Barros, M. de A. F., Santana, E. H. W. de, Pereira, M. S., Gusmão, V. V., & Moraes, L. B. de. (2002). Assessment of the efficiency of SimPlate™ total plate count color indicator (TPC CI) to quantify mesophilic aerobic microorganisms in pasteurized milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(1), 44–48.
- Nielsen, E. M., & Andersen, M. T. (2003). Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* by Automated 5' Nuclease PCR Assay. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 2884–2893.
- Oggel, J. J., Nundy, D. E. V. C., Zebchuk, P. A. N. N., & Shaw, S. J. (1995). Reliability of the Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar and the Modified 1-2 Test™ System for Detection of *Salmonella* in Poultry Feeds. *Journal of Food Protection*, 58(1), 98–101.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., & Magnani, M. (2009). A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology*, 26(6), 615–622.
- O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., Duffy, G., ... Fanning, S. (2008). Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, 8, 156.
- Padan, E. (2014). Functional and structural dynamics of NhaA, a prototype for Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> antiporters, which are responsible for Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> homeostasis in cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(7), 1047–1062.
- Padan, E., Kozachkov, L., Herz, K., & Rimon, A. (2009). NhaA crystal structure: functional–structural insights. *Journal of Experimental Biology*, 212(11). Obtido de <http://jeb.biologists.org/content/212/11/1593>
- Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpel, R., & Schuldiner, S. (1989). Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system(s). *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20297–20302.
- Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2009). Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 5846–5852.
- Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., & Solomon, M. B. (2006). ARTICLE IN PRESS Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 23, 39–46.
- Pathmanathan, S. G., Cardona-Castro, N., Sánchez-Jiménez, M. M., Correa-Ochoa, M. M., Puthuchery, S. D., & Thong, K. L. (2003). Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the hila gene. *Journal of Medical Microbiology*, 52(9), 773–776.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P. (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes*, 18(3), 185–192.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P. (2005). Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1162–1168.
- Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J., & Fach, P. (2004). Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Molecular and Cellular Probes*, 18(6), 409–420.

- Phraephaisarn, C., Khumthong, R., Takahashi, H., Ohshima, C., Kodama, K., Techaruvichit, P., ... Keeratipibul, S. (2017). A novel biomarker for detection of *Listeria* species in food processing factory. *Food Control*, 73, 1032–1038.
- Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal Enterotoxins, 2177–2197.
- Pinner, E., Carmel, O., Bercovier, H., Sela, S., Padan, E., & Schuldiner, S. (1992). Cloning, sequencing and expression of the *thenA* and *nhA* genes from *Salmonella enteritidis* | SpringerLink, 157(4), 323–328.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848–861.
- Preußel, K., Milde-Busch, A., Schmich, P., Wetzstein, M., Stark, K., & Werber, D. (2015). Risk factors for sporadic non-pregnancy associated listeriosis in Germany-immunocompromised patients and frequently consumed ready-to-eat products. *PLoS ONE*, 10(11), 1–15.
- Puño-Sarmiento, J., Gazal, L. E., Medeiros, L. P., Nishio, E. K., Kobayashi, R. K. T., & Nakazato, G. (2014). Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(9), 8924–8939.
- Rabsch, W., Tschäpe, H., & Bäuml, A. J. (2001). Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection*, 3(3), 237–47.
- Raffatelli, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, S. P., Paixao, T. A., ... Bäuml, A. J. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host & Microbe*, 5(5), 476–486.
- Raffatelli, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, S.-P., Paixao, T. A., ... Bäuml, A. J. (2009). Lipocalin-2 resistance of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium confers an advantage during life in the inflamed intestine. *Cell Host & Microbe*, 5(5), 476.
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., ... Gyles, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6(4), 271–279.
- Ratnam, S., March, S. B., Ahmed, R., Bezanson, G. S., & Kasatiya, S. (1988). Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(10), 2006–2012.
- Regulamento (CE) N.º 852/2004. (2004). Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139.
- Regulamento (CE) N.º 853/2004. (2004). Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 226/22.
- Regulamento (CE) N.º 854/2004. (2004). Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139/206.
- Regulamento (CE) N.º 882/2004. (2004). Regulamento (CE) N.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 165.
- Regulamento (CE) N.º 1003/2005. Regulamento (CE) N.º 1003/2005 da Comissão de 30 de Junho de 2005 relativo à execução do Regulamento (CE) N.º 2160/2003 no que se refere ao objectivo comunitário de redução da prevalência de determinados serótipos de *Salmonella* em bandos de reprodução de *Gallus gallus* e que altera o Regulamento (CE) N.º 2160/2003, Pub. L. No. L 170/12. Obtido de <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32005R1003&from=en>
- Regulamento (CE) N.º 1177/2006. (2006). Regulamento (CE) N.º 1177/2006 da Comissão de 1 de agosto de 2006 que aplica o Regulamento (CE) n.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho

- relativamente à utilização de métodos específicos de controlo no âmbito dos programas nacionais de controlo de salmonelas nas aves de capoeira. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 212/3. Obtido de <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1177&from=PT>
- Regulamento (CE) N.º 1441/2007. (2007). Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.o 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 322/12(8).
- Regulamento (CE) N.º, 2073/2005. (sem data). Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005. (sem data). Regulamento (CE) N.º 2073/2005 do Parlamento Europeu e da Comissão relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338.
- Regulamento (CE) N.º 2160/2003. (2003a). Regulamento (CE) N.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de novembro de 2003 relativo ao controlo de salmonelas e outros agentes zoonóticos específicos de origem alimentar. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 325/1.
- Regulamento (CE) N.º 2160/2003. (2003b). Regulamento (CE) N.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de novembro de 2003 relativo ao controlo de salmonelas e outros agentes zoonóticos específicos de origem alimentar. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 325/1. Obtido de <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R2160&from=PT>
- Regulamento (UE) N.º 200/2012. (2012). Regulamento (UE) N.º 200/2012 da Comissão de 8 de março de 2012 relativo ao objetivo da União de redução de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* em bandos de frangos, tal como previsto no Regulamento (CE) n.o 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 71/31. Obtido de [http://www.vetbiblios.pt/LEGISLACAO\\_TECNICA/SAUDE\\_ANIMAL/Aves/Salmonela/Regulamento\\_200-2012\\_08-03.pdf](http://www.vetbiblios.pt/LEGISLACAO_TECNICA/SAUDE_ANIMAL/Aves/Salmonela/Regulamento_200-2012_08-03.pdf)
- Regulamento (UE) N.º 218/2014. (2014). Regulamento (UE) N.º 218/2014 da Comissão de 7 de março de 2014 que altera os anexos dos Regulamentos (CE) n.o 853/2004 e (CE) n.o 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e do Regulamento (CE) n.o 2074/2005 da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 69/95.
- Reissbrodt, R. (2004). New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.—an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 1–9.
- Rettger, L. F. (1909). Further Studies on fatal Septicemia in Young Chickens, or “White Diarrhea”. *The Journal of medical research*, 21(1), 115–23.
- Rodriguez-Lazaro, D., Hernández, M., & Pla, M. (2004). Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 257–267.
- Rosenquist, H., Bengtsson, A., & Hansen, T. B. (2007). A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007). *International Journal of Food Microbiology*, 118(2), 201–213.
- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2), 659–664.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–91.
- Sanchez, S., Hofacre, C. L., Lee, M. D., Maurer, J. J., & Doyle, M. P. (2002). Animal sources of salmonellosis in humans. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(4), 492–7.
- Sanderson, K. E., & Demerec, M. (1965). The Linkage Map Of *Salmonella Typhimurium*, 51, 897–913.

- Schaible, U. E., & Kaufmann, S. H. E. (2004). Iron and microbial infection. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(12), 946–953.
- Schoder, D., Schmalwieser, A., Schauburger, G., Kuhn, M., Hoorfar, J., & Wagner, M. (2003). Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clinical chemistry*, 49(6 Pt 1), 960–3.
- Sekirov, I., Gill, N., Jogova, M., Tam, N., Robertson, M., de Llanos, R., ... Finlay, B. B. (2010). Salmonella SPI-1-mediated neutrophil recruitment during enteric colitis is associated with reduction and alteration in intestinal microbiota. *Gut Microbes*, 1(1), 30–41.
- Senyk, G. F., Kozlowski, S. M., Noar, P. S., Shipe, W. F., & Bandler, D. K. (1987). Comparison of Dry Culture Medium and Conventional Plating Techniques for Enumeration of Bacteria in Pasteurized Fluid Milk. *Journal of Dairy Science*, 70(6), 1152–1158.
- Singer, R. S., Mayer, A. E., Hanson, T. E., & Isaacson, R. E. (2009). Do Microbial Interactions and Cultivation Media Decrease the Accuracy of Salmonella Surveillance Systems and Outbreak Investigations? *Journal of Food Protection*, 72(4), 707–713.
- Singh, G., Vajpayee, P., Bhatti, S., Ronnie, N., Shah, N., & McClure, P. (2013). Ecotoxicology and Environmental Safety Determination of viable Salmonella e from potable and source water through PMA assisted qPCR. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 121–127.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2003). A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes* MINIREVIEWS A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes*, 69(1), 1–9.
- Snow, L. C., Davies, R. H., Christiansen, K. H., Carrique-Mas, J. J., Wales, A. D., O'Connor, J. L., ... Evans, S. J. (2007). Survey of the prevalence of Salmonella species on commercial laying farms in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 161(14), 471–476.
- Soumet, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Identification by a multiplex PCR-based assay of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*, 29(1), 1–6.
- Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., & Schoder, D. (2009). Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(2), 651–659.
- Stone, G. G., Oberst, R. D., Hays, M. P., McVey, S., & Chengappa, M. M. (1994). Detection of Salmonella serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1742–1749.
- Takahashi, M., Koga, M., Yokoyama, K., & Yuki, N. (2005). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre and Fisher syndromes in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 335–339.
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbé, J., & Campoy, S. (2011). Fur Activates the Expression of Salmonella enterica Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the hIld Operator In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE*, 6(5).
- Ternström, A., Lindberg, A.-M., & Molin, G. (1993). Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(1), 25–34.
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., & Bäumlér, A. J. (2012). Salmonella, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 108–114.
- Thomas, M. K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., ... Marshall, B. (2013). Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(7), 639–648.

- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 521–524.
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29, 151–159.
- van de Giessen, A. W., Ament, A. J., & Notermans, S. H. (1994). Intervention strategies for *Salmonella* enteritidis in poultry flocks: a basic approach. *International journal of food microbiology*, 21(1–2), 145–54.
- Varshney, A. K., Mediavilla, J. R., Robiou, N., Guh, A., Wang, X., Gialanella, P., ... Fries, B. C. (2009). Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6839–6849.
- Vasavada, P. C. (1993). Rapid Methods and Automation in Dairy Microbiology. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3101–3113.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B., Seabra, M. J., ... Nunes, S. (2009). Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Direcção de Avaliação e Comunicação dos Riscos*.
- Vimont, S., & Berche, P. (2000). NhaA, an Na(+)/H(+) antiporter involved in environmental survival of *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2937–44.
- Viswanathan, V. K., Hodges, K., & Hecht, G. (2009). Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(2), 110.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., & Peters, G. (2001). Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11–16.
- W Hansen, E. Y. (1984). Detection of beta-glucuronidase in lactose-fermenting members of the family Enterobacteriaceae and its presence in bacterial urine cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(6), 1177–1179.
- Wales, A., Breslin, M., & Davies, R. (2006). Semiquantitative assessment of the distribution of *Salmonella* in the environment of caged layer flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 309–318.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 286–292. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.070839-0>
- WHO. (2015). WHO | Food safety. Obtido 16 de Setembro de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>
- WHO, W. H. O. (2012). *World Health Statistics. WHO World Health Organization* (Vol. 27).
- WHO/FAO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Interpretative summary.
- Willis, C., Baalham, T., Greenwood, M., & Presland, F. (2006). Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 711–717.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., ... Bäumler, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 467(7314), 426–429.
- Woods, D. D. F., Reen, F. J., Gilroy, D., Buckley, J., Frye, J. G., & Boyd, E. F. (2008). Rapid Multiplex PCR and Real-Time TaqMan PCR Assays for Detection of *Salmonella enterica* and the Highly Virulent Serovars *Choleraesuis* and *Paratyphi C* □ †, 46(12), 4018–4022.
- Worcman-Barninka, D., Destro, M. T., Fernandes, S. A., & Landgraf, M. (2001). *Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport–Vassiladis medium (MSRV) for the detection of Salmonella in foods. International Journal of Food Microbiology* (Vol. 64).
- Zadernowska, A., & Chajęcka, W. (2012). Detection of *Salmonella* spp . Presence in Food. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*, 21.

- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297–312.
- Zhou, L., & Pollard, A. J. (2012). A novel method of selective removal of human DNA improves PCR sensitivity for detection of Salmonella Typhi in blood samples, 1–7.



## ANEXOS

Anexo I – Critérios microbiológicos de segurança aplicáveis aos géneros alimentícios (adaptado do Anexo I do Regulamento (CE) N.º 1441/2007).

<b>Categoria de alimentos</b>	<b>Microrganismos/toxinas a pesquisar</b>	<b>Limites <sup>a</sup></b>	<b>Método de análise de referência <sup>b</sup></b>
Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específico <sup>c</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 11290-1
Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 ufc/g <sup>d</sup> 100 ufc/g <sup>d</sup>	EN/ISO 11290-2 <sup>e</sup> EN/ISO 11290-1
Alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos <sup>c,f</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2 <sup>e</sup>
Carne picada e preparados de carne destinados a serem consumidos crus	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Carne picada e preparados de carne obtidos a partir de carne de aves de capoeira destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	Ausência em 10g ou em 25g	EN/ISO 6579
Carne picada e preparados de carne, exceto os obtidos a partir de carne de aves de capoeira, destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	Ausência em 10g	EN/ISO 6579
Carne separada mecanicamente <sup>g</sup>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 10g	EN/ISO 6579
Produtos à base de carne destinados a serem consumidos crus, excluindo aqueles em que o processo de fabrico ou a composição do próprio produto eliminarão o risco relativamente a <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Produtos à base de carne obtidos a partir de carne de aves de capoeira destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	Ausência em 10g ou em 25g	EN/ISO 6579
<b>Categoria de alimentos (cont.)</b>	<b>Microrganismos/toxinas</b>	<b>Limites <sup>a</sup></b>	<b>Método de análise de</b>

	<b>e metabolitos a</b>		<b>referência<sup>b</sup></b>
Queijo, manteiga e natas fabricados com leite cru ou leite que tenha sido submetido a tratamento térmico mais fraco que a pasteurização <sup>h</sup>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Leite em pó e soro de leite em pó	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Gelatina e colagénio	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Sorvetes <sup>i</sup> , excluindo produtos em que o processo de fabrico ou a composição do próprio produto eliminarão o risco relativamente a <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Ovoprodutos, excluindo aqueles em que o processo de fabrico ou a composição do próprio produto eliminarão o risco relativamente a <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Alimentos prontos para consumo que contenham ovos crus, excluindo aqueles em que o processo de fabrico ou a composição do próprio produto eliminarão o risco relativamente a <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g ou ml	EN/ISO 6579
Crustáceos e moluscos cozidos	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Moluscos bivalves vivos e equinodermes, tunicados e gastrópodes vivos	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Sementes germinadas (prontas para consumo) <sup>j</sup>	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Frutas e produtos hortícolas pré-cortados (prontos para consumo)	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Sumos de frutas e de produtos hortícolas não pasteurizados (prontos para consumo)	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
Queijo, leite em pó e soro de leite em pó, como referidos nos critérios relativos aos estafilococos coagulase positivos do capítulo 2.2 do presente anexo	Enterotoxinas estafilocócicas	Não detetadas em 25g	Método europeu de deteção do LCR para os estafilococos coagulase positivos <sup>k</sup>
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de 6 meses	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579

Fórmulas de transição desidratadas	<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	EN/ISO 6579
------------------------------------	-------------------	-----------------	-------------

#### Legenda

a: Nos números 1.1-1.25 m = M.

b Utilizada a edição mais recente da norma.

c: Em circunstâncias normais, não se exige a realização de testes regulares dos seguintes alimentos prontos para consumo: — alimentos prontos para consumo que tenham recebido um tratamento térmico ou outro tratamento eficaz para eliminar a *Listeria monocytogenes*, quando não for possível uma recontaminação após este tratamento (por exemplo, produtos tratados termicamente na sua embalagem final), — produtos hortícolas e frutas frescos, não cortados e não transformados, excluindo sementes germinadas, — pão, bolachas e produtos similares, — águas engarrafadas ou embaladas, refrigerantes, cerveja, cidra, vinho, bebidas espirituosas e produtos similares, — açúcar, mel e produtos de confeitaria, incluindo produtos de cacau e de chocolate, — moluscos bivalves vivos

d: Este critério é aplicável se o fabricante puder demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao termo do período de vida útil. O operador pode fixar limites intermédios durante o processo, que deverão ser suficientemente baixos para garantir que, no termo do período de vida útil, não seja ultrapassado o limite de 100 ufc/g

e: Sementeira de 1 ml de inóculo numa placa de Petri de 140 mm de diâmetro ou em três placas de Petri de 90 mm de diâmetro.

f: Os produtos com um pH  $\leq$  4.4 ou com aw  $\leq$  0.92, os produtos com um pH  $\leq$  5.0 e com aw  $\leq$  0.94 e os produtos com um período de vida útil inferior a 5 dias são automaticamente considerados como pertencentes a esta categoria. Podem também pertencer a esta categoria outros tipos de produtos, sujeitos a justificação científica

g: Este critério é aplicável a carne separada mecanicamente produzida com as técnicas referidas no capítulo III, n.o 3, da secção V do anexo III do Regulamento (CE) n.o 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho

h: Excluindo os produtos relativamente aos quais o fabricante puder demonstrar, a contento das autoridades competentes, que devido ao período de cura e ao aw do produto, se for o caso, não há risco de contaminação por *Salmonella*.

i: Apenas sorvetes que contenham ingredientes lácteos

j: Realização de testes preliminares ao lote de sementes antes do início do processo de germinação ou a amostragem deve fazer-se na fase em que seja mais provável encontrar *Salmonella*.

k: Referência: laboratório comunitário de referência para estafilococos coagulase positivos. Método europeu de detecção de enterotoxinas estafilocócicas no leite e nos produtos lácteos.

Anexo II - Casos confirmados, em 2015, de infeções provocadas por *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* STEC/VTEC, *Listeria* spp., e *Salmonella* spp. Consultado a (ECDC, 2017), disponível em <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>.

País	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> STEC/VTEC	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Alemanha	69 829	1 616	580	13 667
Austria	6 258	107	38	1 544
Bélgica	6 096 <sup>c</sup>	100	83	3 170 <sup>c</sup>
Bulgária	227	0	5	1 076
Croácia	1 393	0	2	1 593
Chipre	29	0	0	65
Dinamarca	4 327	173	44	925
Eslováquia	6 949	1	18	4 841
Eslovénia	1 328	23	13	401
Espanha	13 227 <sup>b</sup>	86	206 <sup>b</sup>	9 045 <sup>b</sup>
Estónia	318	8	11	112
Finlândia	4 588	74	46	1 650
França	6 074 <sup>g</sup>	262 <sup>c,d</sup>	412	10 305 <sup>e</sup>
Grécia	- <sup>h</sup>	1	31	466
Holanda	3 778 <sup>i</sup>	858	71	974 <sup>f</sup>
Hungria	8 342	15	37	4 894
Irlanda	2 453	598	19	270
Itália	1 014 <sup>c</sup>	59 <sup>d</sup>	153	3 821
Letónia	74	4	8	380
Lituânia	1 186	3	5	1 082
Luxemburgo	254	4	0	106
Malta	248	4	4	126
Polónia	653	0	70	8 245
Portugal	271	0	28	325
Roménia	311	0	12	1 330
Suécia	9 180	551	88	2 312
Reino Unido	59 846	1 328	186	9 492
Répubblica Checa	20 960	26	36	12 408
<b>Total UE</b>	<b>229 213</b>	<b>5 901</b>	<b>2 206</b>	<b>94 625</b>
Islândia	119	1	0	44
Noruega	2 318	221	18	928
Suíça	7 055 <sup>a</sup>	308 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	1 375 <sup>a</sup>

a: A Suíça fornece os dados diretamente à EFSA. E os dados humanos da Suíça também incluem os dados do Liechtenstein.

b: Sistema sentinela de vigilância, em que as taxas de notificação são calculadas com base numa cobertura populacional de 45%.

c: Sistema sentinela de vigilância, em que não existe nenhuma informação sobre a cobertura estimada, assim, a taxa de notificação não pode ser estimada.

d: Apenas os casos com Síndrome Hemolítica Urémica são notificados.

e: Sistema sentinela de vigilância, em que as taxas de notificação são calculadas com base numa cobertura populacional de 48%.

f: Sistema sentinela de vigilância, em que as taxas de notificação são calculadas com base numa cobertura populacional de 64%.

g: Sistema sentinela de vigilância, em que as taxas de notificação são calculadas com base numa cobertura populacional de 20%.

h: Sem sistema de vigilância.

i: em que as taxas de notificação são calculadas com base numa cobertura populacional de 52%.

Anexo III – Categoria dos produtos testados em Portugal, no ano de 2015, para a presença de *Campylobacter* spp. (EFSA & ECDC, 2016).

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Amostragem</b>	<b>Peso (g)<sup>a</sup></b>	<b>T<sup>b</sup></b>	<b>P<sup>c</sup></b>
Carne de bovino	Carçaça	Única	25	15	0
	Fresca	Única	25	42	0
Carne de frango	Carçaça	Única	25	17	5
	Fresca	Única	25	41	13
Carne de peru	Carçaça	Única	25	2	0
	Fresca	Única	25	18	1
Carne de porco	Carçaça	Única	25	16	0
	Fresca	Única	25	49	4

<sup>a</sup>Peso (g): Peso em gramas.

<sup>b</sup>T: Amostras testadas.

<sup>c</sup>P: Amostras positivas.

Anexo IV - Categoria dos produtos testados em Portugal, no ano de 2015, para a presença de enterotoxinas estafilocócicas (EFSA & ECDC, 2016).

<i>Categoria</i>	<i>Amostragem</i>	<i>Peso (g)<sup>a</sup></i>	<i>T<sup>b</sup></i>	<i>P<sup>c</sup></i>
Produtos derivados do leite(exceto queijo), leite em pó e soro de leite em pó	Lote	25	5	0
Queijo fresco		25		
Cabra	Única	25	12	0
Ovelha	Única	25	14	0
Vaca	Única	25	10	0
Mistura	Única	25	3	0
Queijos de pasta mole e semi-mole				
Cabra	Única	25	4	0
Ovelha	Única	25	50	1
Vaca	Única	25	10	0
Mistura	Única	25	14	0
Queijo pasta dura				
Cabra	Única	25	6	0
Ovelha	Única	25	4	0
Vaca	Única	25	4	0
Mistura	Única	25	1	0

<sup>a</sup>Peso (g): Peso em gramas.

<sup>b</sup>T: Amostras testadas.

<sup>c</sup>P: Amostras positivas.

Anexo V - Categoria dos produtos testados em Portugal, no ano de 2015, para a presença de estirpes de *Escherichia coli* produtoras da toxina Shiga (EFSA & ECDC, 2016).

<i>Categoria</i>	<i>Método de análise</i>	<i>Amostragem</i>	<i>Peso (g)<sup>a</sup></i>	<i>T<sup>b</sup></i>	<i>P<sup>c</sup></i>	<i>O157<sup>d</sup></i>
Carne de bovino fresca	ISO 13136	Única	25g	32	4	1
Fruta pré cortada (pronta para consumo)	ISO 13136	Única	25g	10	0	0
Sumos e sumos de fruta não pasteurizados	ISO 13136	Única	25g	3	0	0
Carne de porco fresca	ISO 13136	Única	25g	3	0	0
Sementes germinadas (prontas para consumo)	ISO 13136	Única	25g	2	0	0
Vegetais pré-cortados (prontos para consumo)	ISO 13136	Única	25g	8	0	0

Legenda:

<sup>a</sup>Peso (g): Peso em gramas.

<sup>b</sup>T: Amostras testadas.

<sup>c</sup>P: Amostras positivas.

<sup>d</sup>(O157): Amostras positivas para o serogrupo O157.

Anexo VI - Categoria dos produtos testados em Portugal, no ano de 2015, para a presença de *Listeria monocytogenes* (EFSA & ECDC, 2016).

<b>Categoria</b>	<b>Amostragem</b>	<b>D<sup>a</sup></b>	<b>C<sup>b</sup></b>
Pastelaria			
	Bolos com creme	Lote	0 5
	Bolos com ovos	Lote	0 30
	Sobremesas sem ovo	Lote	0 30
	Sobremesas com ovo	Lote	0 20
Doces à base de chocolate		Lote	0 25
Ovos (prontos para consumo)		Única	5 5
Peixe fumado		Lote	5 5
Crustáceos e camarão			
	Cozinhados	Lote	0 20
	Congelados	Única	8 8
Frutas e vegetais pré cortados (prontos para consumo)		Lote	0 30
Frutas e vegetais pré cortados (prontos para consumo)		Única	8 8
Queijos de pasta dura de leite pasteurizado			
	Vaca	Única	15 15
	Cabra	Única	3 3
	Ovelha	Única	1 1
Queijos de pasta dura de leite cru ou baixo tratamento			
	Vaca	Única	16 16
	Cabra	Única	3 3
	Ovelha	Única	4 4
Queijos de pasta mole e semi-mole de leite pasteurizado			
	Vaca	Única	25 25
	Vaca (fresco)	Única	24 24
	Cabra	Lote	0 45
	Cabra	Única	13 13
	Cabra	Lote	0 15
	Ovelha (fresco)	Lote	0 5
	Ovelha (fresco)	Única	16 16
Queijos de pasta mole e semi-mole de leite cru ou baixo tratamento			
	Vaca	Lote	0 15
	Cabra	Única	4 4
	Cabra	Lote	0 15
	Ovelha	Lote	0 40
	Ovelha	Única	53 53
	Ovelha	Lote	0 125
Queijos de origem diversa (ou inespecificada)			
	Pasteurizado de de pasta dura	Única	1 1
	Pasteurizado de pasta mole e semi-mole	Única	4 4
	Crú ou de baixo tratamento de pasta mole e semi-mole	Única	12 12
	Crú ou de baixo tratamento pasta mole e semi-mole	Lote	0 20
Produtos prontos para consumo			
	Sandes	Lote	0 55
	Sandes sem carne	Lote	0 10
	Sandes com carne	Lote	0 85
	Molhos	Lote	0 105



<b>Categoria (cont.)</b>	<b>Amostragem</b>	<b>D<sup>a</sup></b>	<b>C<sup>b</sup></b>
Produtos cárneos (cozinhados ou prontos para consumo)	Única	146	146
	Lote	165	0
Ervas e especiarias secas	Lote	0	5
Carne de porco (pronta para consumo)	Única	0	51
	Lote	0	5
	Lote	0	120
	Lote	0	20
Carne de peru cozinhada (pronta para consumo)	Única	9	9
Saladas	Lote	0	130
	Lote	0	20

Legenda:

<sup>a</sup>D: deteção.

<sup>b</sup>C: contagem testada em ufc/g ou ufc/ml.

Anexo VII - Categoria dos produtos testados em Portugal, no ano de 2015, para a presença de *Salmonella* spp. (EFSA & ECDC, 2016).

<b>Categoria de alimentos para humanos</b>	<b>Amostragem</b>	<b>Peso(g)<sup>a</sup></b>	<b>T<sup>b</sup></b>	<b>P<sup>c</sup></b>
Moluscos, bivalves	Lote	25	5	0
Moluscos, bivalves (depurados, inespecíficos)	Lote	25	5	0
Moluscos, bivalves (depurados, inespecíficos)	Única	25	100	0
Carne bovino (carcaça)	Única	25	16	0
Carne bovino (fresca)	Lote	25	43	0
Carne de frango (fresca) - antes do abate	Lote	25	100	0
Carne de frango (fresca) - antes do abate	Única	25	41	0
Carne de frango (carcaça) - antes do abate	Única	25	17	1
Fruta pré-cortada (pronta para consumo)	Lote	25	30	0
Fruta pré-cortada (pronta para consumo)	Única	25	1	0
Carne de porco (carcaça) - antes do abate <sup>d</sup>	Lote	400cm <sup>2</sup>	3332	91
Carne de porco (carcaça)	Única	25	18	2
Carne de porco (fresca)	Única	25	50	4
Carne de frango (pronta para consumo)	Única	25	10	0
Carne de porco: salsicha fermentada	Lote	25	120	0
Carne de porco (pronta para consumo, inespecífica)	Lote	25	20	0
Carne de porco (pronta para consumo, inespecífica)	Única	25	148	6
Carne de peru (pronta para consumo, cozinhada)	Única	25	10	0
Ovos de mesa	Lote	25	5	0
Ovos de mesa	Única	25	45	0
Semente germinadas	Única	25	20	0
Carne de peru (fresca)	Lote	25	95	3
Carne de peru fresca	Única	25	18	0
Carne de peru (carcaça)	Única	26	2	0
Vegetais (pré-cortados, frescos)	Única	25	8	0
Especiarias e ervas aromáticas	Lote	25	50	0

Legenda:

<sup>a</sup>Peso (g): Peso em gramas.

<sup>b</sup>T: Amostras testadas.

<sup>c</sup>P: Amostras positivas.

<sup>d</sup>Seguindo os princípios HACCP, o (Regulamento (CE) N.º 854/2004, 2004; Regulamento (UE) N.º 218/2014, 2014).

<b>Categoria de alimentos para animais</b>	<b>Amostragem</b>	<b>T<sup>b</sup></b>	<b>P(%)<sup>e</sup></b>
Outros cereais (derivados de sementes secas)	Única	2	0
Derivados de cereais fermentados e destilados ( <i>e.g.</i> aveia)	Única	2	0
Derivados de arroz	Única	3	0
Derivados de trigo	Única	11	0
Derivados de sangue em pó	Única	1	0
Derivados de penas em pó	Única	3	0

Derivados de carne em pó	Única	6	0
Derivados de peixe em pó	Única	6	16.67
Derivados de colza	Única	1	0
Derivados de feijão de soja	Única	2	0
Derivados de sementes de girassol	Única	1	0
Milho <sup>f</sup>	Única	10	0
Feijão de soja <sup>f</sup>	Única	1	0

Legenda:

<sup>b</sup>T: Amostras testadas.

<sup>e</sup>P(%): Amostras positivas, em percentagem.

<sup>f</sup>P: Amostras provenientes dos Postos de Inspeção Fronteiriço (PIF).

<b>Categoria</b>	<b>T<sup>b</sup></b>	<b>P(%)<sup>e</sup></b>	<b>SE%<sup>g</sup></b>	<b>ST(%)<sup>h</sup></b>	<b>Outras(%)<sup>i</sup></b>
Bandos de galinhas reprodutoras <sup>j</sup>	535	0.56	0.19	0	0.37
Galinhas reprodutoras (após abate)	11 359	2.64	0.11	0.05	2.47
Perus (antes do abate)	905	0.33	0	0.22	0.11
Bandos de galinhas poedeiras	426	399	0	0.23	4.46

Legenda:

<sup>b</sup>T: Amostras testadas.

<sup>e</sup>P(%): Amostras positivas, em percentagem.

<sup>g</sup>SE(%): Amostras positivas para *Salmonella* Enteritidis, em percentagem.

<sup>h</sup>ST(%): Amostras positivas para *Salmonella* Typhimurium, em percentagem.

<sup>i</sup>Outras(%): Amostras positivas para outras estirpes do género *Salmonella*, em percentagem.

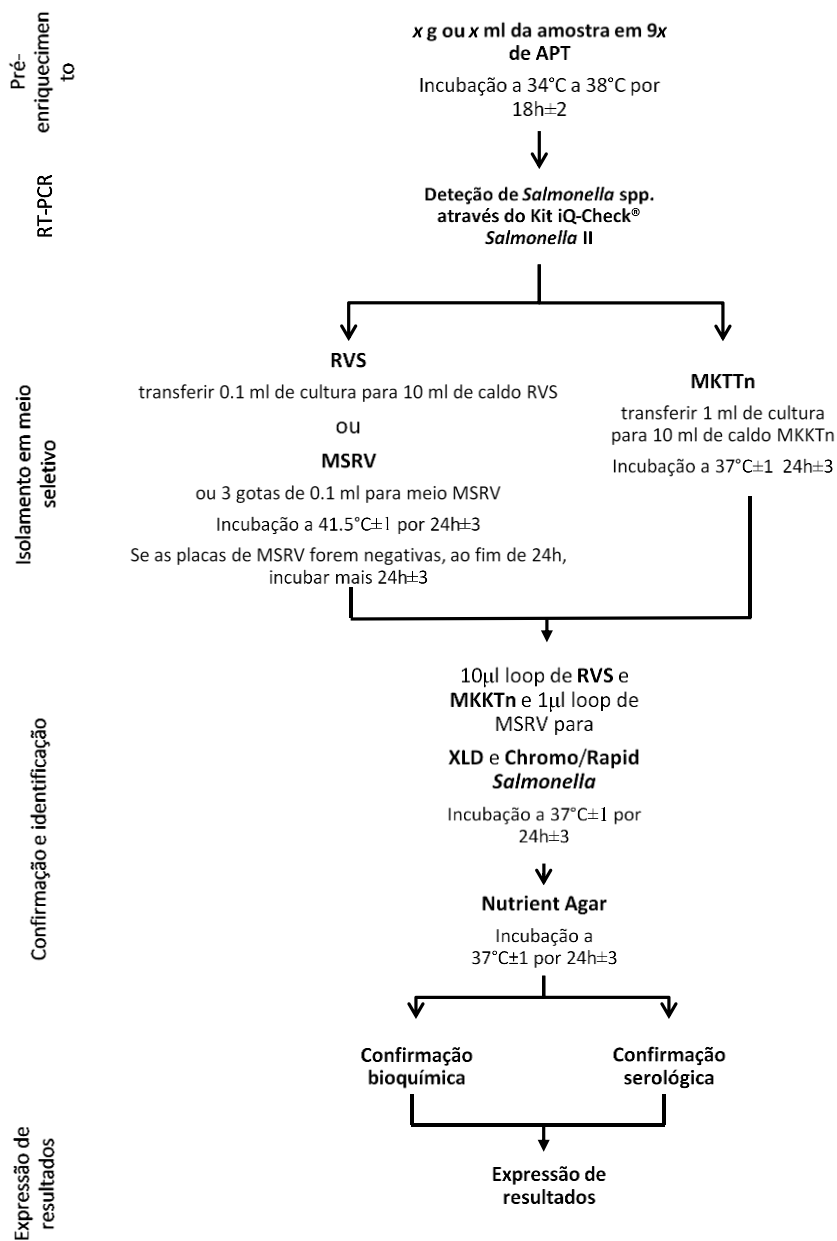
<sup>j</sup>(Regulamento (CE) N.º 2160/2003, 2003a).

## Anexo VIII – Objetivos e amostragem dos diferentes programas do PNCS.

Programa	Objetivo do Programa	Amostragem	Bandos positivos
Bandos de Frangos	Redução da prevalência de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> <sup>a</sup> , em bandos de frangos para abate, para 1% ou menos, de acordo com o artigo 1º do Regulamento (UE) N.º 200/2012 da Comissão de 8 de março.	Pelo menos 1 bando de frangos, por ano, em 10% das explorações com mais de 5000 aves, em concordância com o descrito Regulamento (UE) N.º 200/2012.	Deteção de <i>S. Typhimurium</i> <sup>a</sup> e/ou <i>S. Enteritidis</i> , (exceto estirpes de vacina), no controlo oficial ou no autocontrolo efetuado pelo produtor.
Bandos de Galinhas Poedeiras	Redução da prevalência de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> <sup>a</sup> , para 2% ou menos, em bandos adultos de galinhas poedeiras, de acordo com o Regulamento (UE) N.º 517/2011 da Comissão de 25 de maio.	No mínimo num bando com pelo menos 1000 aves, por ano e por exploração em qualquer caso de suspeita de infeção por <i>Salmonella</i> na investigação de surtos de origem alimentar, de acordo com o artigo 8º da Diretiva 2003/99/CE, ou de eventuais casos em que a autoridade competente considere apropriado utilizando o protocolo descrito no Regulamento (CE) N.º 2160/2003.	Deteção da presença dos serotipos relevantes (com exceção das estirpes vacinais) numa ou várias amostras do bando, nas fezes ou no pó, e se forem detetados no bando agentes antimicrobianos ou efeito inibidor do crescimento bacteriano.
Bandos de Galinhas Reprodutoras	Manutenção da prevalência de <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Virchow</i> , <i>S. Hadar</i> e <i>S. Typhimurium</i> <sup>a</sup> , em 1% ou menos, em bandos adultos de reprodução de acordo com o Regulamento (UE) N.º 200/2010 da Comissão de 10 de março.	Em todos os bandos de reprodução com mais de 250 aves, em duas ocasiões distintas e em qualquer altura desde que suficientemente distantes uma da outra, durante o ciclo de produção, de acordo com a derrogação prevista no ponto 2.1.2.3 do Anexo ao Regulamento (UE) nº 200/2010.	Deteção da presença de um dos serotipos visados numa ou mais do que uma amostra de excrementos ou pó (ou se houver confirmação oficial secundária, nas amostras relevantes tanto de excrementos como de órgãos das aves), no controlo oficial ou no autocontrolo efetuado pelo produtor.
Bandos de Perus	Redução para 1% ou menos, da percentagem anual máxima de bandos de perus de engorda que permanecem positivos a <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> <sup>a</sup> , de acordo com o artigo 1º do Regulamento (UE) N.º 1190/2012 da Comissão de 12 de dezembro.	Pelo menos 1 bando de perus de engorda, por ano, em 10% das explorações com mais de 500 aves, em concordância com o descrito Regulamento (UE) N.º 1190/2012.	Deteção de <i>S. Typhimurium</i> <sup>a</sup> e/ou <i>S. Enteritidis</i> , (exceto estirpes de vacina), no controlo oficial ou no autocontrolo efetuado pelo produtor.

a: incluindo as estirpes monofásicas com a fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:-.

Anexo IX – Procedimento para a detecção de *Salmonella* spp. (Adaptado da norma ISO 6579-1:2017).



Anexo X – Estirpes selecionadas para o desenvolvimento da nova metodologia por RT-PCR.

Matriz	Estirpe	Resultado esperado		RT-PCR («in-house»)	
		ttr	nhaA-V	ttr	nha_V
Zaragatoa	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Citrobacter</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Citrobacter youngae</i>	-	-	+	-
Fezes	<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	+	-
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	-	+	-
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
	<i>Escherichia coli O157</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	-	-	+	-
Suíno	<i>Escherichia fergusonii</i>	-	-	-	-
Ração	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Kocuria rhizophila</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Listeria innocua</i>	-	-	+	-
Liófilo	<i>Listeria ivanovii</i>	-	-	+	-
Liófilo	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	+	-
Queijo	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-
	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-
Liófilo	<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Salmonella 4,5,12:i:-</i>	+	-	+	-
Fezes	<i>Salmonella Anatum</i>	+	-	+	-
Farinha Cat. M3	<i>Salmonella Anatum</i>	+	-	+	-
	<i>Salmonella Arizonae</i>	+	-	+	-
Botas p/esfregação	<i>Salmonella Berta</i>	+	-	+	-
	<i>Salmonella Blockly</i>	+	-	+	-
Perú	<i>Salmonella Bradenburg</i>	+	-	-	-
Botas	<i>Salmonella Braenderup</i>	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella Bredeney</i>	+	-	+	-
Fezes (Frangos)	<i>Salmonella Cerro</i>	+	-	+	-
Botas p/esfregação	<i>Salmonella Derby</i>	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella Dublin</i>	+	-	+	-
Liófilo	<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	-
	<i>Salmonella enterica 9,46:-:-</i>	+	-	+	-
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	+	-	+	-
Frango	<i>Salmonella Enteritidis</i>	+	-	+	-
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	+	-	+	-
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	+	-	+	-
Mexilhão	<i>Salmonella Goethinger</i>	+	-	+	-
Liófilo (sim. Carcaça)	<i>Salmonella Hadar</i>	+	-	+	-

Matriz	Estirpe	Resultado esperado		RT-PCR («in-house»)	
		ttr	nhaA-V	ttr	nha_V
Fezes (Frango)	<i>Salmonella</i> Havana	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Heidelberg	+	-	+	-
Fezes	<i>Salmonella</i> Infantis	+	-	-	-
	<i>Salmonella</i> Kedougou	+	-	+	-
Botas para esfregação	<i>Salmonella</i> Kentucky	+	-	+	-
Liófilo	<i>Salmonella</i> lactose positiva	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Lexington	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Lexington	+	-	+	+
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Muenchen	+	-	+	-
Liófilo (sim. Fezes)	<i>Salmonella</i> Montevideo	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Newport	+	-	+	-
Fezes	<i>Salmonella</i> Offa	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Ohio	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Ohio	+	-	+	-
Liófilo	<i>Salmonella</i> Pensacola	+	-	+	-
Suíno	<i>Salmonella</i> Rissen	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	+	-	+	+
Liófilo (sim. Fezes)	<i>Salmonella</i> Seftenberg	+	-	+	-
	<i>Salmonella</i> Seftenberg	+	-	+	-
Fezes (GP)	<i>Salmonella</i> Tennessee	+	-	+	-
Liófilo	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	-	+	-
Botas	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	-	+	-
Mexilhão	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	-	+	-
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	-	+	-
Fezes	<i>Salmonella</i> Virchow	+	-	+	-
Botas para esfregação	<i>Salmonella</i> Enteritidis estirpe vacinal	+	+	+	+
	<i>Salmonella</i> Enteritidis estirpe vacinal	+	+	+	+
Botas para esfregação	<i>Salmonella</i> Enteritidis estirpe vacinal	+	+	+	+
Liófilo	<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Liófilo	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-
Camarão	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	+	+
	<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	+	-
Camarão	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	+	+
Botas para esfregação	248/2	+	+	+	+
Botas para esfregação	249/2	+	+	+	+
Botas para esfregação	252/1	+	+	+	+
Botas para esfregação	252/2	+	+	+	+
Fezes	194/1	+	-	+	+
Botas para esfregação	196/2	+	+	+	+
Botas para esfregação	197/2	+	+	+	+

Matriz	Estirpe	Resultado esperado		RT-PCR («in-house»)	
		<i>ttr</i>	<i>nhaA-V</i>	<i>ttr</i>	<i>nha_V</i>
Botas para esfregaço	199/1	+	+	+	+
Botas para esfregaço	199/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	221/1	+	+	+	+
Botas para esfregaço	222/1	+	+	+	+
Botas para esfregaço	223/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	271/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	272/1	+	+	+	+
Botas para esfregaço	271/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	273/1	+	+	+	+
Botas para esfregaço	273/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	292/1	+	+	+	+
Botas para esfregaço	296/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	297/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	296/1	+	+	+	+
Fezes	311/1	+	-	+	+
Fezes	311/2	+	-	+	+
Fezes	311/3	+	-	+	+
Fezes	360/3	+	-	+	+
Botas para esfregaço	340/2	+	+	+	+
Botas para esfregaço	341/2	+	+	+	+



## Anexo XI - Ensaio de RT-PCR para definição do perfil térmico.



BB\_2017-04-27 12-25-28\_CC011789.pcrd

22-05-2017 12:14

Report Information

User: BioRad/BB

Data File Name: BB\_2017-04-27 12-25-28\_CC011789.pcrd

Data File Path: D:\Geral\2017\BB\Finais

Well \*\*Group Name: All Wells

Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run Date: 27-04-2017 12:25

Run User: BB

Run Type: User-defined

Plate File: BB nha\_ttr.pltd

ID:

Notes: Deepwell plate: Deltalab Lote 14021

Extracção DNA:

CSB - 11.15

Micropipetas

P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3

Micropipetas

P1000 - 11.13

P200 - 11.8

P20 - 11.12

Preparação Strip/ Placa:

Micropipetas

P200 - 11.9

P20 - 11.7

P10 - 11.17

Sample Volume: 50

Temperature Control Mode: Calculated

Lid Temperature: 105

Base Serial Number: CC011789

Optical Head Serial Number: 785BR3838

Protocol

- 1: 95,0°C for 5:00
- 2: 55,0°C for 0:20
- 3: 72,0°C for 0:30
- 4: GOTO 2, 4 more times
- 5: 95,0°C for 0:15
- 6: 55,0°C for 0:20 Plate Read
- 7: 72,0°C for 0:30
- 8: GOTO 5, 36 more times

### Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr K. rhizophila	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Shigella sonnei	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr E. coli O157	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Virchow	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Typhimurium	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Enteritidis	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr V. alginolyticu	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr E. sakazakii	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Mbandaka	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. enterica	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. enterica
B	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. aureus (5)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr L. ivanovii	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr C. perfringens	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Montevideo	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Kedougou	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Kentucky	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr V. cholerae	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Offa	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Mbandaka	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. enterica 9	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. enterica 9

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr C. freundii	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr L. innocua	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Typhimurium	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Pensacola	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Berta	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Seftenberg	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Citrobacter ama	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Virchow	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE selvagem
D	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr E. faecalis	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr E. coli	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. 4	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr 5	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr 12:i:-	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Citrobacter you	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Enteritidis	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr E. sakazaki	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Proteus mirabil	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Pos IAC Slm_WT Slm_ttr SE Vacinal
E	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. aureus (14)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr P. aeruginosa	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Dublin	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Seftenberg	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Anatum	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Escherichia fer	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr K. pneumonia e	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Mbandaka	Pos IAC Slm_V SE VAC 341/2
F	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Streptococcus p	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Citrobacter ?	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Hadar	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr L. monocytogene	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Goethinger	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Infantis	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Cerro	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE ATCC	Neg IAC Slm_WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. aureus	
G	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr L. monocytogene	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr P. aeruginosa	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Typhimurium	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr A. hydrophila	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Typhimurium	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Bradenburg	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr V. <i>Salmonella</i> ?	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vac1		
H	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Rodococcus Equi	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr Slm_ttr Bacillus cereus	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr E. coli O157:H7	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Rissen	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Blocky	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr V. parahaemolyt	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr S. Anatum	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vacinal	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Llandoff	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ttr SE Vac 2		

## Quantification

Step #: 6

Analysis Mode: Fluorophore

Cq Determination: Single Threshold

Baseline Method:

ROX: Auto Calculated

FAM: Auto Calculated

Cy5: User Defined

HEX: Auto Calculated

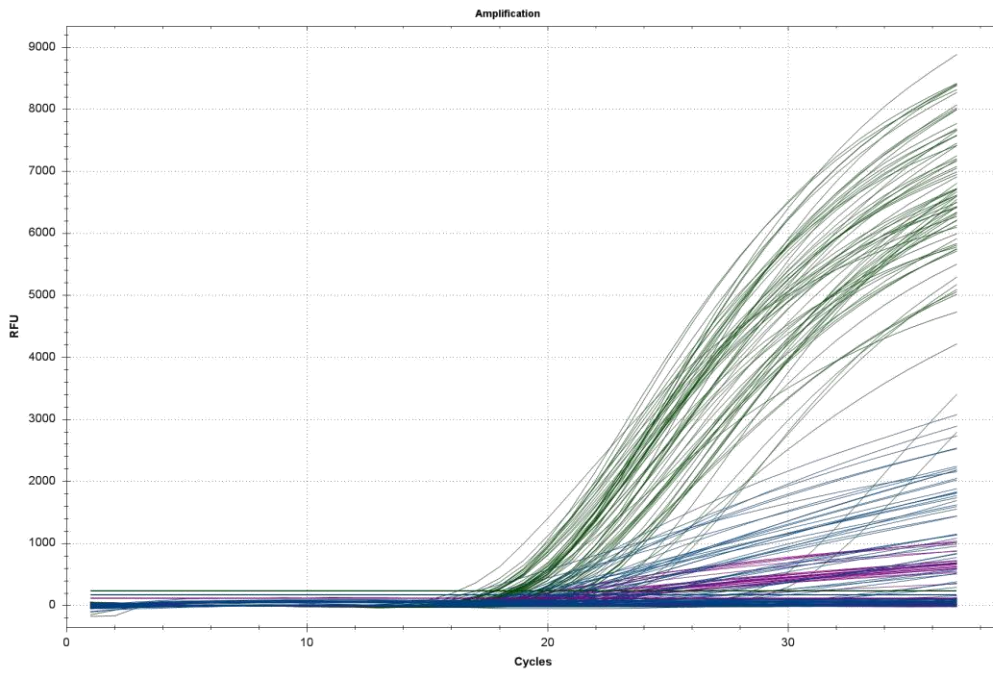
Threshold Setting:

ROX: 490,15, Auto Calculated

FAM: 172,98, User Defined

Cy5: 120,68, User Defined

HEX: 235,82, User Defined



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 5,82**

**Highest RFU Value: 8322**

**Negative Control Average: 9,18**

**Cut Off Value: 841**

## HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	K. rhizophila	9,86	
A02	HEX	Unkn	Shigella sonnei	12,5	
A03	HEX	Unkn	E. coli O157	11,7	
A04	HEX	Unkn	S. Virchow	5340	(+) Positive
A05	HEX	Unkn	S. Typhimurium	4604	(+) Positive
A06	HEX	Unkn	S. Enteritidis	4600	(+) Positive
A07	HEX	Unkn	V. alginolyticu	6097	(+) Positive
A08	HEX	Unkn	E. sakazakii	6138	(+) Positive
A09	HEX	Unkn	SE Vacinal	5657	(+) Positive
A10	HEX	Unkn	SE Vacinal	5748	(+) Positive
A11	HEX	Unkn	S. Mbandaka	5749	(+) Positive

## HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A12	HEX	Unkn	S. enterica	5333	(+) Positive
B01	HEX	Unkn	S. aureus (5)	6,30	
B02	HEX	Unkn	L. ivanovii	5513	(+) Positive
B03	HEX	Unkn	C. perfringens	1978	(+) Positive
B04	HEX	Unkn	S. Montevideo	6587	(+) Positive
B05	HEX	Unkn	S. Kedougou	5938	(+) Positive
B06	HEX	Unkn	S. Kentucky	5323	(+) Positive
B07	HEX	Unkn	V. cholerae	5759	(+) Positive
B08	HEX	Unkn	S. Offa	6672	(+) Positive
B09	HEX	Unkn	SE Vacinal	6204	(+) Positive
B10	HEX	Unkn	SE Vacinal	6261	(+) Positive
B11	HEX	Unkn	S. Mbandaka	7931	(+) Positive
B12	HEX	Unkn	S. enterica 9,4	7852	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	C. freundii	26,9	
C02	HEX	Unkn	L. inocua	6613	(+) Positive
C03	HEX	Unkn	S. Typhimurium	7169	(+) Positive
C04	HEX	Unkn	S. Pensacola	7265	(+) Positive
C05	HEX	Unkn	S. Berta	7343	(+) Positive
C06	HEX	Unkn	S. Seftenberg	6688	(+) Positive
C07	HEX	Unkn	Citrobacter ama	10,9	
C08	HEX	Unkn	S. Virchow	7542	(+) Positive
C09	HEX	Unkn	SE Vacinal	7451	(+) Positive
C10	HEX	Unkn	SE Vacinal	8000	(+) Positive
C11	HEX	Unkn	SE Vacinal	7918	(+) Positive
C12	HEX	Unkn	SE selvagem	7926	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	E. faecalis	9,89	
D02	HEX	Unkn	E. coli	5859	(+) Positive
D03	HEX	Unkn	S. 4,5,12:i:-	6285	(+) Positive
D04	HEX	Unkn	Citrobacter you	2561	(+) Positive
D05	HEX	Unkn	S. Enteritidis	6809	(+) Positive
D06	HEX	Unkn	E. sakazaki	8,46	

## HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
D07	HEX	Unkn	Proteus mirabil	12,4	
D08	HEX	Unkn	SE Vacinal	7071	(+) Positive
D09	HEX	Unkn	SE Vacinal	5874	(+) Positive
D10	HEX	Unkn	SE Vacinal	8322	(+) Positive
D11	HEX	Unkn	SE Vacinal	7805	(+) Positive
D12	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	7939	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	S. aureus (14)	21,7	
E02	HEX	Unkn	P. aeruginosa	6150	(+) Positive
E03	HEX	Unkn	S. Dublin	7107	(+) Positive
E04	HEX	Unkn	S. Seftenberg	6111	(+) Positive
E05	HEX	Unkn	S. Anatum	7156	(+) Positive
E06	HEX	Unkn	Escherichia fer	10,3	
E07	HEX	Unkn	K. pneumoniae	17,8	
E08	HEX	Unkn	SE Vacinal	6772	(+) Positive
E09	HEX	Unkn	SE Vacinal	7245	(+) Positive
E10	HEX	Unkn	SE Vacinal	7509	(+) Positive
E11	HEX	Unkn	S. Mbandaka	7065	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	Streptococcus p	56,1	
F02	HEX	Unkn	Citrobacter ?	5,82	
F03	HEX	Unkn	S. Hadar	6651	(+) Positive
F04	HEX	Unkn	L. monocytogene	31,0	
F05	HEX	Unkn	S. Goethinger	6755	(+) Positive
F06	HEX	Unkn	S. Infantis	27,0	
F07	HEX	Unkn	S. Cerro	5835	(+) Positive
F08	HEX	Unkn	SE Vacinal	5899	(+) Positive
F09	HEX	Unkn	SE Vacinal	6979	(+) Positive
F10	HEX	Unkn	SE Vacinal	7539	(+) Positive
F11	HEX	Unkn	SE ATCC	6865	(+) Positive
F12	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	9,18	
G01	HEX	Unkn	L. monocytogene	6120	(+) Positive
G02	HEX	Unkn	P. aeruginosa	5065	(+)

					Positive
--	--	--	--	--	----------

## HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
G03	HEX	Unkn	S. Typhimurium	6198	(+) Positive
G04	HEX	Unkn	A. hydrophila	9,29	
G05	HEX	Unkn	S. Typhimurium	4714	(+) Positive
G06	HEX	Unkn	S. Bradenburg	6447	(+) Positive
G07	HEX	Unkn	<i>Salmonella</i> ?	6359	(+) Positive
G08	HEX	Unkn	SE Vacinal	5826	(+) Positive
G09	HEX	Unkn	SE Vacinal	3794	(+) Positive
G10	HEX	Unkn	SE Vacinal	5964	(+) Positive
G11	HEX	Unkn	SE Vac1	6092	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	Rodococcus Equi	9,82	
H02	HEX	Unkn	Bacillus cereus	5971	(+) Positive
H03	HEX	Unkn	E. coli O157:H7	5475	(+) Positive
H04	HEX	Unkn	S. Rissen	5883	(+) Positive
H05	HEX	Unkn	S. Blocky	4451	(+) Positive
H06	HEX	Unkn	V. parahaemolyt	5520	(+) Positive
H07	HEX	Unkn	S. Anatum	4651	(+) Positive
H08	HEX	Unkn	SE Vacinal	5454	(+) Positive
H09	HEX	Unkn	SE Vacinal	5717	(+) Positive
H10	HEX	Unkn	SE Llandoff	6321	(+) Positive
H11	HEX	Unkn	SE Vac 2	4625	(+) Positive

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -2,79

**Highest RFU Value:** 2832

**Negative Control Average:** 5,51

**Cut Off Value:** 288

FAM End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	FAM	Unkn	K. rhizophila	2,83	
A02	FAM	Unkn	Shigella sonnei	5,92	
A03	FAM	Unkn	E. coli O157	2,03	

## FAM End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A04	FAM	Unkn	S. Virchow	1601	(+) Positive
A05	FAM	Unkn	S. Typhimurium	1020	(+) Positive
A06	FAM	Unkn	S. Enteritidis	468	(+) Positive
A07	FAM	Unkn	V. alginolyticu	92,7	
A08	FAM	Unkn	E. sakazakii	56,5	
A09	FAM	Unkn	SE Vacinal	1,65	
A10	FAM	Unkn	SE Vacinal	0,450	
A11	FAM	Unkn	S. Mbandaka	660	(+) Positive
A12	FAM	Unkn	S. enterica	1281	(+) Positive
B01	FAM	Unkn	S. aureus (5)	115	
B02	FAM	Unkn	L. ivanovii	1579	(+) Positive
B03	FAM	Unkn	C. perfringens	274	
B04	FAM	Unkn	S. Montevideo	1010	(+) Positive
B05	FAM	Unkn	S. Kedougou	694	(+) Positive
B06	FAM	Unkn	S. Kentucky	438	(+) Positive
B07	FAM	Unkn	V. cholerae	14,5	
B08	FAM	Unkn	S. Offa	884	(+) Positive
B09	FAM	Unkn	SE Vacinal	-1,50	
B10	FAM	Unkn	SE Vacinal	3,38	
B11	FAM	Unkn	S. Mbandaka	1644	(+) Positive
B12	FAM	Unkn	S. enterica 9,4	2650	(+) Positive
C01	FAM	Unkn	C. freundii	103	
C02	FAM	Unkn	L. inocua	2332	(+) Positive
C03	FAM	Unkn	S. Typhimurium	2524	(+) Positive
C04	FAM	Unkn	S. Pensacola	1640	(+) Positive
C05	FAM	Unkn	S. Berta	1640	(+) Positive
C06	FAM	Unkn	S. Seftenberg	863	(+) Positive
C07	FAM	Unkn	Citrobacter ama	57,7	
C08	FAM	Unkn	S. Virchow	2832	(+) Positive
C09	FAM	Unkn	SE Vacinal	0,537	
C10	FAM	Unkn	SE Vacinal	3,38	
C11	FAM	Unkn	SE Vacinal	10,3	
C12	FAM	Unkn	SE selvagem	1963	(+) Positive
D01	FAM	Unkn	E. faecalis	4,92	
D02	FAM	Unkn	E. coli	2032	(+)



					Positive
--	--	--	--	--	----------

FAM End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
D03	FAM	Unkn	S. 4,5,12:i:-	2056	(+) Positive
D04	FAM	Unkn	Citrobacter you	123	
D05	FAM	Unkn	S. Enteritidis	2343	(+) Positive
D06	FAM	Unkn	E. sakazaki	63,3	
D07	FAM	Unkn	Proteus mirabil	90,1	
D08	FAM	Unkn	SE Vacinal	116	
D09	FAM	Unkn	SE Vacinal	1,73	
D10	FAM	Unkn	SE Vacinal	3,36	
D11	FAM	Unkn	SE Vacinal	7,82	
D12	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	1389	(+) Positive
E01	FAM	Unkn	S. aureus (14)	92,8	
E02	FAM	Unkn	P. aeruginosa	1704	(+) Positive
E03	FAM	Unkn	S. Dublin	1476	(+) Positive
E04	FAM	Unkn	S. Seftenberg	1957	(+) Positive
E05	FAM	Unkn	S. Anatum	1390	(+) Positive
E06	FAM	Unkn	Escherichia fer	36,2	
E07	FAM	Unkn	K. pneumoniae	76,7	
E08	FAM	Unkn	SE Vacinal	71,3	
E09	FAM	Unkn	SE Vacinal	1,09	
E10	FAM	Unkn	SE Vacinal	0,318	
E11	FAM	Unkn	S. Mbandaka	219	
F01	FAM	Unkn	Streptococcus p	105	
F02	FAM	Unkn	Citrobacter ?	116	
F03	FAM	Unkn	S. Hadar	264	
F04	FAM	Unkn	L. monocytogene	55,9	
F05	FAM	Unkn	S. Goethinger	943	(+) Positive
F06	FAM	Unkn	S. Infantis	7,58	
F07	FAM	Unkn	S. Cerro	411	(+) Positive
F08	FAM	Unkn	SE Vacinal	-1,77	
F09	FAM	Unkn	SE Vacinal	3,95	
F10	FAM	Unkn	SE Vacinal	-0,188	
F11	FAM	Unkn	SE ATCC	698	(+) Positive
F12	FAM	Neg Ctrl	S. aureus	5,51	
G01	FAM	Unkn	L. monocytogene	2019	(+) Positive
G02	FAM	Unkn	P. aeruginosa	1437	(+) Positive
G03	FAM	Unkn	S. Typhimurium	1843	(+) Positive

G04	FAM	Unkn	A. hydrophila	5,66	
-----	-----	------	---------------	------	--

## FAM End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
G05	FAM	Unkn	S. Typhimurium	1020	(+) Positive
G06	FAM	Unkn	S. Bradenburg	61,7	
G07	FAM	Unkn	Salmonella ?	2,85	
G08	FAM	Unkn	SE Vacinal	0,236	
G09	FAM	Unkn	SE Vacinal	-0,423	
G10	FAM	Unkn	SE Vacinal	-2,20	
G11	FAM	Unkn	SE Vac1	30,3	
H01	FAM	Unkn	Rodococcus Equi	70,1	
H02	FAM	Unkn	Bacillus cereus	1302	(+) Positive
H03	FAM	Unkn	E. coli O157:H7	86,0	
H04	FAM	Unkn	S. Rissen	1821	(+) Positive
H05	FAM	Unkn	S. Blocky	611	(+) Positive
H06	FAM	Unkn	V. parahaemolyt	50,5	
H07	FAM	Unkn	S. Anatum	492	(+) Positive
H08	FAM	Unkn	SE Vacinal	1,06	
H09	FAM	Unkn	SE Vacinal	73,5	
H10	FAM	Unkn	SE Llandoff	1466	(+) Positive
H11	FAM	Unkn	SE Vac 2	-2,79	

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -16,8

**Highest RFU Value:** 960

**Negative Control Average:** -6,51

**Cut Off Value:** 90,1

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	K. rhizophila	-7,87	
A02	Cy5	Unkn	Shigella sonnei	-16,8	
A03	Cy5	Unkn	E. coli O157	-5,83	
A04	Cy5	Unkn	S. Virchow	31,0	
A05	Cy5	Unkn	S. Typhimurium	18,6	
A06	Cy5	Unkn	S. Enteritidis	11,1	
A07	Cy5	Unkn	V. alginolyticu	93,4	(+) Positive
A08	Cy5	Unkn	E. sakazakii	-16,0	
A09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	662	(+) Positive

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	608	(+) Positive
A11	Cy5	Unkn	S. Mbandaka	30,4	
A12	Cy5	Unkn	S. enterica	39,1	
B01	Cy5	Unkn	S. aureus (5)	-2,25	
B02	Cy5	Unkn	L. ivanovii	26,9	
B03	Cy5	Unkn	C. perfringens	12,3	
B04	Cy5	Unkn	S. Montevideo	18,9	
B05	Cy5	Unkn	S. Kedougou	12,6	
B06	Cy5	Unkn	S. Kentucky	25,0	
B07	Cy5	Unkn	V. cholerae	46,3	
B08	Cy5	Unkn	S. Offa	19,6	
B09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	664	(+) Positive
B10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	635	(+) Positive
B11	Cy5	Unkn	S. Mbandaka	16,5	
B12	Cy5	Unkn	S. enterica 9,4	30,4	
C01	Cy5	Unkn	C. freundii	-6,36	
C02	Cy5	Unkn	L. inocua	13,4	
C03	Cy5	Unkn	S. Typhimurium	30,6	
C04	Cy5	Unkn	S. Pensacola	27,4	
C05	Cy5	Unkn	S. Berta	27,6	
C06	Cy5	Unkn	S. Seftenberg	14,1	
C07	Cy5	Unkn	Citrobacter ama	-8,39	
C08	Cy5	Unkn	S. Virchow	27,6	
C09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	956	(+) Positive
C10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	955	(+) Positive
C11	Cy5	Unkn	SE Vacinal	929	(+) Positive
C12	Cy5	Unkn	SE selvagem	32,5	
D01	Cy5	Unkn	E. faecalis	0,740	
D02	Cy5	Unkn	E. coli	61,7	
D03	Cy5	Unkn	S. 4,5,12:i:-	30,4	
D04	Cy5	Unkn	Citrobacter you	3,52	
D05	Cy5	Unkn	S. Enteritidis	34,1	
D06	Cy5	Unkn	E. sakazaki	-2,83	
D07	Cy5	Unkn	Proteus mirabil	0,493	
D08	Cy5	Unkn	SE Vacinal	829	(+) Positive
D09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	570	(+) Positive
D10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	960	(+) Positive
D11	Cy5	Unkn	SE Vacinal	814	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	S. aureus (14)	-7,17	

E02	Cy5	Unkn	P. aeruginosa	35,4	
-----	-----	------	---------------	------	--

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
E03	Cy5	Unkn	S. Dublin	18,2	
E04	Cy5	Unkn	S. Seftenberg	27,4	
E05	Cy5	Unkn	S. Anatum	17,7	
E06	Cy5	Unkn	Escherichia fer	-5,08	
E07	Cy5	Unkn	K. pneumoniae	-2,36	
E08	Cy5	Unkn	SE Vacinal	620	(+) Positive
E09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	659	(+) Positive
E10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	620	(+) Positive
E11	Cy5	Unkn	S. Mbandaka	2,28	
E12	Cy5	Pos Ctrl	SE VAC 341/2	637	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	Streptococcus p	-6,71	
F02	Cy5	Unkn	Citrobacter ?	-9,56	
F03	Cy5	Unkn	S. Hadar	1,52	
F04	Cy5	Unkn	L. monocytogene	-0,690	
F05	Cy5	Unkn	S. Goethinger	16,1	
F06	Cy5	Unkn	S. Infantis	-1,15	
F07	Cy5	Unkn	S. Cerro	11,3	
F08	Cy5	Unkn	SE Vacinal	545	(+) Positive
F09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	604	(+) Positive
F10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	611	(+) Positive
F11	Cy5	Unkn	SE ATCC	18,6	
F12	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-6,51	
G01	Cy5	Unkn	L. monocytogene	13,0	
G02	Cy5	Unkn	P. aeruginosa	8,30	
G03	Cy5	Unkn	S. Typhimurium	20,1	
G04	Cy5	Unkn	A. hydrophila	-9,17	
G05	Cy5	Unkn	S. Typhimurium	16,3	
G06	Cy5	Unkn	S. Bradenburg	54,9	
G07	Cy5	Unkn	Salmonella ?	564	(+) Positive
G08	Cy5	Unkn	SE Vacinal	503	(+) Positive
G09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	316	(+) Positive
G10	Cy5	Unkn	SE Vacinal	537	(+) Positive
G11	Cy5	Unkn	SE Vac1	563	(+) Positive
H01	Cy5	Unkn	Rodococcus Equi	-7,29	
H02	Cy5	Unkn	Bacillus cereus	24,6	

H03	Cy5	Unkn	E. coli O157:H7	1,85	
-----	-----	------	--------------------	------	--



## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
H04	Cy5	Unkn	S. Rissen	29,4	
H05	Cy5	Unkn	S. Blocky	26,2	
H06	Cy5	Unkn	V. parahaemolyt	109	(+) Positive
H07	Cy5	Unkn	S. Anatum	22,2	
H08	Cy5	Unkn	SE Vacinal	539	(+) Positive
H09	Cy5	Unkn	SE Vacinal	586	(+) Positive
H10	Cy5	Unkn	SE Llandoff	14,3	
H11	Cy5	Unkn	SE Vac 2	487	(+) Positive

## Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 3947**

**Highest RFU Value: 7577**

**Negative Control Average: 7064**

**Cut Off Value: 7116**

## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	K. rhizophila	4968	
A02	ROX	Unkn	Shigella sonnei	5733	
A03	ROX	Unkn	E. coli O157	5169	
A04	ROX	Unkn	S. Virchow	5901	
A05	ROX	Unkn	S. Typhimurium	5575	
A06	ROX	Unkn	S. Enteritidis	6226	
A07	ROX	Unkn	V. alginolyticu	5935	
A08	ROX	Unkn	E. sakazakii	6741	
A09	ROX	Unkn	SE Vacinal	5880	
A10	ROX	Unkn	SE Vacinal	6416	
A11	ROX	Unkn	S. Mbandaka	6310	
A12	ROX	Unkn	S. enterica	6283	
B01	ROX	Unkn	S. aureus (5)	5973	
B02	ROX	Unkn	L. ivanovii	5879	
B03	ROX	Unkn	C. perfringens	7442	(+) Positive
B04	ROX	Unkn	S. Montevideo	6818	
B05	ROX	Unkn	S. Kedougou	6907	
B06	ROX	Unkn	S. Kentucky	4870	
B07	ROX	Unkn	V. cholerae	6998	
B08	ROX	Unkn	S. Offa	7092	
B09	ROX	Unkn	SE Vacinal	7453	(+) Positive
B10	ROX	Unkn	SE Vacinal	6491	
B11	ROX	Unkn	S. Mbandaka	6989	

## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
B12	ROX	Unkn	S. enterica 9,4	6751	
C01	ROX	Unkn	C. freundii	5421	
C02	ROX	Unkn	L. innocua	5936	
C03	ROX	Unkn	S. Typhimurium	5752	
C04	ROX	Unkn	S. Pensacola	5622	
C05	ROX	Unkn	S. Berta	5874	
C06	ROX	Unkn	S. Seftenberg	5350	
C07	ROX	Unkn	Citrobacter ama	6575	
C08	ROX	Unkn	S. Virchow	6821	
C09	ROX	Unkn	SE Vacinal	6101	
C10	ROX	Unkn	SE Vacinal	6803	
C11	ROX	Unkn	SE Vacinal	6094	
C12	ROX	Unkn	SE selvagem	6542	
D01	ROX	Unkn	E. faecalis	4556	
D02	ROX	Unkn	E. coli	5518	
D03	ROX	Unkn	S. 4,5,12:i:-	5723	
D04	ROX	Unkn	Citrobacter you	5452	
D05	ROX	Unkn	S. Enteritidis	5800	
D06	ROX	Unkn	E. sakazaki	6671	
D07	ROX	Unkn	Proteus mirabil	6127	
D08	ROX	Unkn	SE Vacinal	6297	
D09	ROX	Unkn	SE Vacinal	6788	
D10	ROX	Unkn	SE Vacinal	7577	(+) Positive
D11	ROX	Unkn	SE Vacinal	6525	
E01	ROX	Unkn	S. aureus (14)	5833	
E02	ROX	Unkn	P. aeruginosa	5443	
E03	ROX	Unkn	S. Dublin	6464	
E04	ROX	Unkn	S. Seftenberg	6048	
E05	ROX	Unkn	S. Anatum	6634	
E06	ROX	Unkn	Escherichia fer	6660	
E07	ROX	Unkn	K. pneumoniae	6688	
E08	ROX	Unkn	SE Vacinal	6414	
E09	ROX	Unkn	SE Vacinal	6491	
E10	ROX	Unkn	SE Vacinal	6745	
E11	ROX	Unkn	S. Mbandaka	6661	
E12	ROX	Pos Ctrl	SE VAC 341/2	7268	(+) Positive
F01	ROX	Unkn	Streptococcus p	6012	
F02	ROX	Unkn	Citrobacter ?	5886	
F03	ROX	Unkn	S. Hadar	6029	
F04	ROX	Unkn	L. monocytogene	5872	
F05	ROX	Unkn	S. Goethinger	6092	
F06	ROX	Unkn	S. Infantis	6708	

F07	ROX	Unkn	S. Cerro	6526	
-----	-----	------	----------	------	--

## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
F08	ROX	Unkn	SE Vacinal	6509	
F09	ROX	Unkn	SE Vacinal	6392	
F10	ROX	Unkn	SE Vacinal	6793	
F11	ROX	Unkn	SE ATCC	6577	
F12	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	7064	
G01	ROX	Unkn	L. monocytogene	5511	
G02	ROX	Unkn	P. aeruginosa	5031	
G03	ROX	Unkn	S. Typhimurium	5806	
G04	ROX	Unkn	A. hydrophila	6176	
G05	ROX	Unkn	S. Typhimurium	5910	
G06	ROX	Unkn	S. Bradenburg	6096	
G07	ROX	Unkn	Salmonella ?	5956	
G08	ROX	Unkn	SE Vacinal	6237	
G09	ROX	Unkn	SE Vacinal	3947	
G10	ROX	Unkn	SE Vacinal	6493	
G11	ROX	Unkn	SE Vac1	6458	
H01	ROX	Unkn	Rodococcus Equi	4717	
H02	ROX	Unkn	Bacillus cereus	5497	
H03	ROX	Unkn	E. coli O157:H7	5249	
H04	ROX	Unkn	S. Rissen	5863	
H05	ROX	Unkn	S. Blocky	4037	
H06	ROX	Unkn	V. parahaemolyt	4745	
H07	ROX	Unkn	S. Anatum	5009	
H08	ROX	Unkn	SE Vacinal	5828	
H09	ROX	Unkn	SE Vacinal	6147	
H10	ROX	Unkn	SE Llandoff	5876	
H11	ROX	Unkn	SE Vac 2	5062	

## QC Parameters

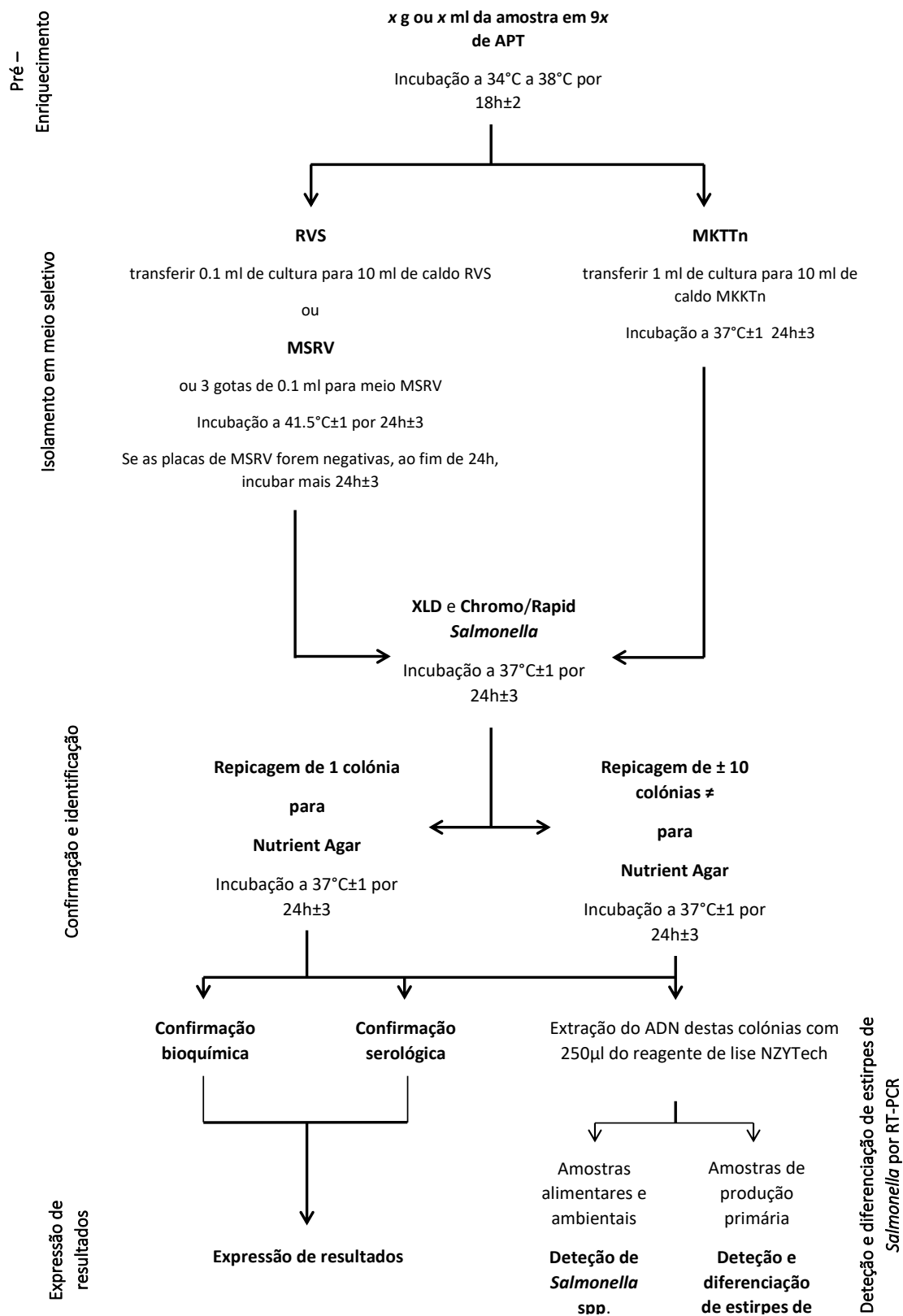
### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	

Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Positive control with a Cq greater than	30	True		False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B11, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C12, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E11, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F11, G1, G2, G3, G4, G5, G6, H1, H2, H3,	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R^2 less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XII – Nova metodologia para deteção e diferenciação entre estirpes selvagens e a estirpe vacinal de *Salmonella*



Anexo XIII – Ensaio de RT-PCR de amostras HPA enriquecidas em RVS e MKTTn.



BB\_2017-05-10 14-32-  
29\_CC011789\_SO457\_SO481\_SO482\_RVS\_MKT T.pcrd  
22-05-2017 12:11

Report Information

**User:** BioRad/HRG  
**Data File Name:** BB\_2017-05-10 14-32-  
29\_CC011789\_SO457\_SO481\_SO482\_RVS\_MKTT.pcrd  
**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB\Finais  
**Well Group Name:** All Wells  
**Report Differs from Last Save:** No

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 10-05-2017 14:33  
**Run User:** HRG  
**Run Type:** User-defined  
**Plate File:** BB nha\_ *ttr*.pltd  
**ID:**  
**Notes:** Deepwell plate: Deltalab Lote 14021

Extracção DNA:

CSB - 11.15  
Micropipetas  
P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3  
Micropipetas  
P1000 - 11.13  
P200 - 11.8  
P20 - 11.12

Preparação Strip/ Placa:

Micropipetas  
P200 - 11.9  
P20 - 11.7  
P10 - 11.17  
**Sample Volume:** 50  
**Temperature Control Mode:** Calculated  
**Lid Temperature:** 105  
**Base Serial Number:** CC011789  
**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

- 9:** 95,0°C for 5:00
- 10:** 55,0°C for 0:20
- 11:** 72,0°C for 0:30
- 12:** GOTO 2, 4 more times
- 13:** 95,0°C for 0:15
- 14:** 55,0°C for 0:20 Plate Read
- 15:** 72,0°C for 0:30
- 16:** GOTO 5, 41 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 XLD RVS	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 XLD RVS	Neg IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> S. aureus									
B	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 XLD MKTT	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 XLD MKTT										
C	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 CS RVS	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 CS RVS C										
D	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 CS MKTT	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 CS RVS E										
E	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 481 XLD RVS1	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 CS MKTT E										
F	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 481 XLD RVS2	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 CS MKTT C										
G	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 481 CS RVS C	Pos IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC										
H	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 481 CS RVS E	Pos IAC <i>nhaA</i> _V SE Vacinal										

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

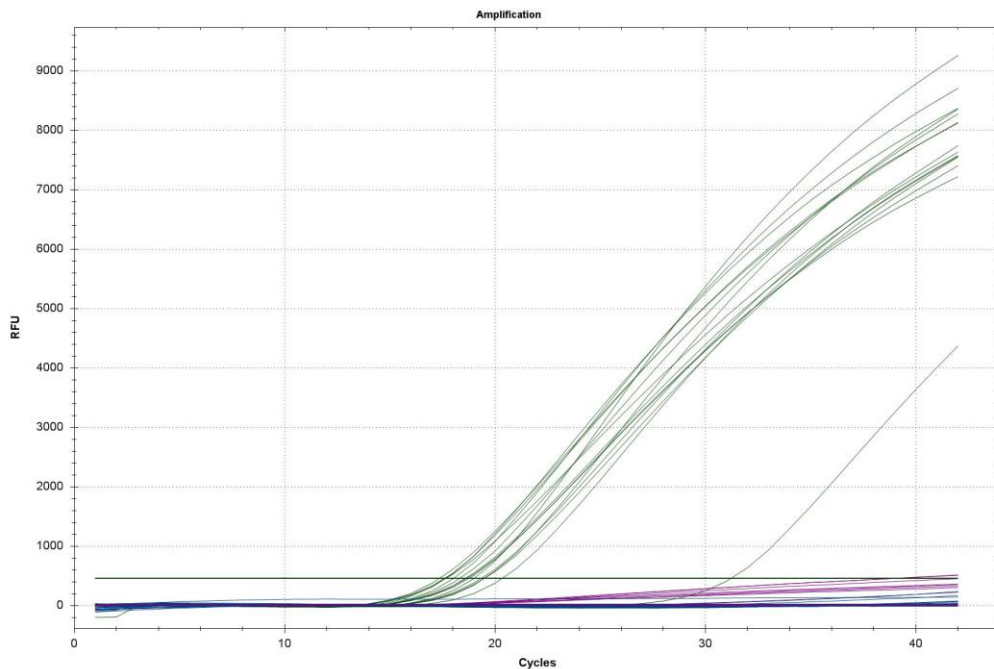
**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

FAM: Auto Calculated



Cy5: Auto Calculated  
HEX: Auto Calculated  
**Threshold Setting:**  
ROX: 615,35, Auto Calculated  
FAM: 22,58, User Defined  
Cy5: 19,23, User Defined  
HEX: 463,61, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 21,6

**Highest RFU Value:** 8773

**Negative Control Average:** 21,6

**Cut Off Value:** 897

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point Data	Sample Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	457 XLD RVS	7156	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	482 XLD RVS	6855	(+) Positive
A03	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	21,6	
B01	HEX	Unkn	457 XLD MKTT	7891	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	482 XLD MKTT	7281	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	457 CS RVS	7833	(+) Positive
C02	HEX	Unkn	482 CS RVS C	7142	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	457 CS MKTT	8773	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	482 CS RVS E	8276	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	481 XLD RVS1	7724	(+) Positive
E02	HEX	Unkn	482 CS MKTT E	6982	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	481 XLD RVS2	7213	(+) Positive
F02	HEX	Unkn	482 CS MKTT C	7100	(+) Positive
G01	HEX	Unkn	481 CS RVS C	7974	(+) Positive
G02	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	3632	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	481 CS RVS E	7732	(+) Positive

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 0,666

**Highest RFU Value:** 198

**Negative Control Average:** 13,9

**Cut Off Value:** 32,3

FAM End Point Data

Well FAM	Fluor End	Content Point	Data	Sample	End RFU	Call
A01	FAM	Unkn	457 XLD RVS		3,31	
A02	FAM	Unkn	482 XLD RVS		50,9	(+) Positive
A03	FAM	Neg Ctrl	S. aureus		13,9	
B01	FAM	Unkn	457 XLD MKTT		0,666	
B02	FAM	Unkn	482 XLD MKTT		3,14	
C01	FAM	Unkn	457 CS RVS		3,46	
C02	FAM	Unkn	482 CS RVS C		38,2	(+) Positive
D01	FAM	Unkn	457 CS MKTT		7,15	
D02	FAM	Unkn	482 CS RVS E		142	(+) Positive
E01	FAM	Unkn	481 XLD RVS1		51,9	(+) Positive
E02	FAM	Unkn	482 CS MKTT E		3,25	
F01	FAM	Unkn	481 XLD RVS2		30,4	
F02	FAM	Unkn	482 CS MKTT C		4,34	
G01	FAM	Unkn	481 CS RVS C		198	(+) Positive
G02	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC		146	(+) Positive
H01	FAM	Unkn	481 CS RVS E		58,3	(+) Positive

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -2,56

**Highest RFU Value:** 485

**Negative Control Average:** -0,811

**Cut Off Value:** 47,8

Cy5 End Point Data

Well Cy5	Fluor End	Content Point	Data	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	457 XLD RVS	485	(+) Positive	
A02	Cy5	Unkn	482 XLD RVS	-1,26		
A03	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-0,811		
B01	Cy5	Unkn	457 XLD MKTT	428	(+) Positive	
B02	Cy5	Unkn	482 XLD MKTT	334	(+) Positive	
C01	Cy5	Unkn	457 CS RVS	346	(+) Positive	
C02	Cy5	Unkn	482 CS RVS C	0,534		
D01	Cy5	Unkn	457 CS MKTT	482	(+) Positive	
D02	Cy5	Unkn	482 CS RVS E	1,36		
E01	Cy5	Unkn	481 XLD RVS1	-0,00388		
E02	Cy5	Unkn	482 CS MKTT E	286	(+) Positive	
F01	Cy5	Unkn	481 XLD RVS2	0,923		
F02	Cy5	Unkn	482 CS MKTT C	311	(+) Positive	
G01	Cy5	Unkn	481 CS RVS C	-0,471		
G02	Cy5	Pos Ctrl	SE ATCC	-2,56		
H01	Cy5	Unkn	481 CS RVS E	2,19		
H02	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	196	(+) Positive	

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 7996

**Highest RFU Value:** 10242

**Negative Control Average:** 10069

**Cut Off Value:** 10086

ROX End Point Data

Well ROX	Fluor End	Content Point	Data	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	457 XLD RVS	8299	
A02	ROX	Unkn	482 XLD RVS	8037	
A03	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	10069	
B01	ROX	Unkn	457 XLD MKTT	9495	
B02	ROX	Unkn	482 XLD MKTT	9117	
C01	ROX	Unkn	457 CS RVS	9526	
C02	ROX	Unkn	482 CS RVS C	8764	
D01	ROX	Unkn	457 CS MKTT	10242	(+) Positive
D02	ROX	Unkn	482 CS RVS E	9560	
E01	ROX	Unkn	481 XLD RVS1	9086	
E02	ROX	Unkn	482 CS MKTT E	8617	
F01	ROX	Unkn	481 XLD RVS2	8832	
F02	ROX	Unkn	482 CS MKTT C	9239	
G01	ROX	Unkn	481 CS RVS C	9302	
G02	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	8300	
H01	ROX	Unkn	481 CS RVS E	9120	
H02	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	7996	

## QC Parameters

### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	

Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True	Cy5:G2. HEX:G2.	False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:A2, C2, D2, E1, F1, G1, H1. FAM:A1, B1, B2, C1, D1, E2, F2.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XIV – Ensaio de RT-PCR de amostras HPA enriqueidas em MSRV.



BB\_2017-05-11 12-46-  
42\_CC011789\_SO457\_SO481\_SO482\_MS RV\_Poo  
ls482.pcrd

22-05-2017 12:10

Report Information

**User:** BioRad/BB

**Data File Name:** BB\_2017-05-11 12-46-  
42\_CC011789\_SO457\_SO481\_SO482\_MS RV\_Pools482.pc  
rd

**Data File Path:** D:\Gera l\2017\BB\Fina is

**Well Group Name:** All Wells

**Report Differs from Last Save:** No

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 11-05-2017 12:47

**Run User:** BB

**Run Type:** User-defined

**Plate File:** BB nha\_ ttr.pltd

**ID:**

**Notes:** Deepwell plate: Deltalab Lote 14021

Extracção DNA:

CSB - 11.15

Micropipetas

P1000 - 11.10

P200 - 7.14

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3

Micropipetas

P1000 - 11.13

P200 - 11.8

P20 - 11.12

Prepação Strip/ Placa:

Micropipetas

P200 - 11.9

P20 - 11.7

P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50

**Temperature Control Mode:** Calculated

**Lid Temperature:** 105

**Base Serial Number:** CC011789

**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

**17:** 95,0°C for 5:00

**18:** 55,0°C for 0:20

**19:** 72,0°C for 0:30

**20:** GOTO 2, 4 more times

**21:** 95,0°C for 0:15

**22:** 55,0°C for 0:20 Plate Read

**23:** 72,0°C for 0:30

**24:** GOTO 5, 41 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 CS MSRV C	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 CS MSRV C										
B	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 XLD MSRV	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P1										
C	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 457 CS MSRV E	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P2										
D	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 481 XLD MSRV	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3										
E	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 481 CS MSRV	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4										
F	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 XLD MSRV A	Pos IAC <i>nhaA</i> _WT  Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC										
G	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 XLD MSRV B	Pos IAC  <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> SE Vac										
H	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 CS MSRV E	Neg IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> S. aureus										

## Quantification

Step #: 6

Analysis Mode: Fluorophore

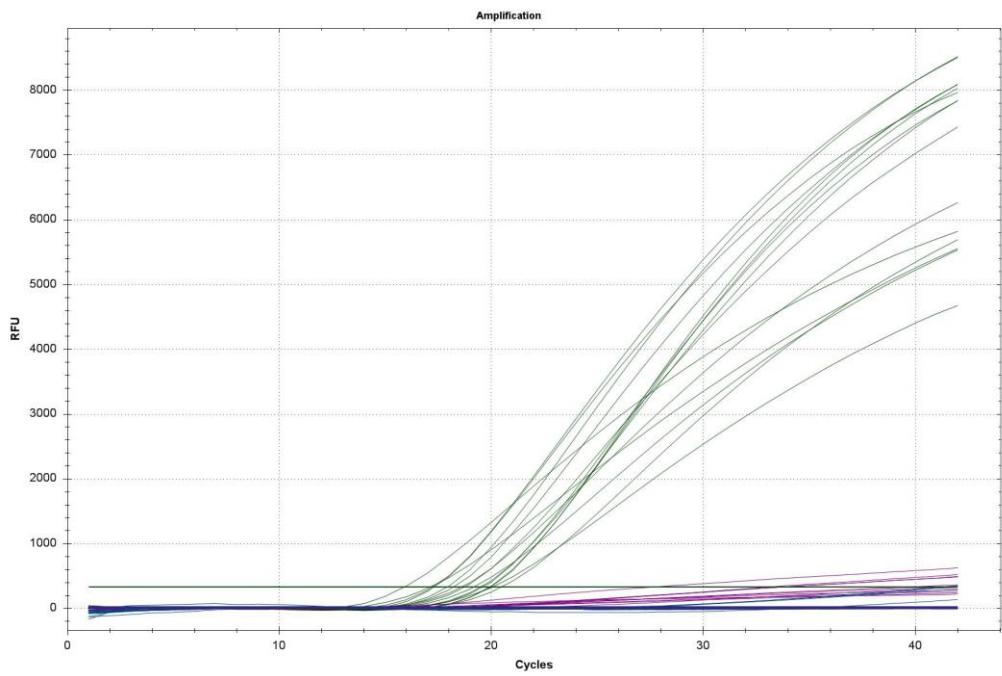
Cq Determination: Single Threshold

Baseline Method:

ROX: Auto Calculated



FAM: Auto Calculated  
Cy5: Auto Calculated  
HEX: Auto Calculated  
**Threshold Setting:**  
ROX: 735,11, Auto Calculated  
FAM: 25,94, User Defined  
Cy5: 11,50, Auto Calculated  
HEX: 334,21, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 10,2

**Highest RFU Value:** 8129

**Negative Control Average:** 10,2

**Cut Off Value:** 822

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point	Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	457 CS MSRV C	5214	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	482 CS MSRV C	5337	(+) Positive
B01	HEX	Unkn	457 XLD MSRV	7014	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	482 P1	7688	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	457 CS MSRV E	8126	(+) Positive
C02	HEX	Unkn	482 P2	7616	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	481 XLD MSRV	5248	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	482 P3	7403	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	481 CS MSRV	8129	(+) Positive
E02	HEX	Unkn	482 P4	7442	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	482 XLD MSRV A	7690	(+) Positive
F02	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	7651	(+) Positive
G01	HEX	Unkn	482 XLD MSRV B	5922	(+) Positive
G02	HEX	Pos Ctrl	SE Vac	5572	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	482 CS MSRV E	4394	(+) Positive
H02	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	10,2	

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -6,73

**Highest RFU Value:** 298

**Negative Control Average:** 6,17

**Cut Off Value:** 35,3

FAM End Point Data

Well FAM	Fluor End	Content Point Data	Sample Data	End RFU	Call
A01	FAM	Unkn	457 CS MSRV C	0,544	
A02	FAM	Unkn	482 CS MSRV C	6,09	
B01	FAM	Unkn	457 XLD MSRV	1,17	
B02	FAM	Unkn	482 P1	259	(+) Positive
C01	FAM	Unkn	457 CS MSRV E	9,67	
C02	FAM	Unkn	482 P2	15,7	
D01	FAM	Unkn	481 XLD MSRV	13,0	
D02	FAM	Unkn	482 P3	4,46	
E01	FAM	Unkn	481 CS MSRV	286	(+) Positive
E02	FAM	Unkn	482 P4	8,60	
F01	FAM	Unkn	482 XLD MSRV A	298	(+) Positive
F02	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	98,4	(+) Positive
G01	FAM	Unkn	482 XLD MSRV B	-6,73	
H01	FAM	Unkn	482 CS MSRV E	2,45	
H02	FAM	Neg Ctrl	S. aureus	6,17	

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -1,43

**Highest RFU Value:** 586

**Negative Control Average:** -1,43

**Cut Off Value:** 57,3

Cy5 End Point Data

Well Cy5	Fluor End	Content Point Data	Sample Data	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	457 CS MSRV C	224	(+) Positive
A02	Cy5	Unkn	482 CS MSRV C	338	(+) Positive
B01	Cy5	Unkn	457 XLD MSRV	318	(+) Positive
B02	Cy5	Unkn	482 P1	298	(+) Positive
C01	Cy5	Unkn	457 CS MSRV E	586	(+) Positive
C02	Cy5	Unkn	482 P2	480	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	481 XLD MSRV	1,53	
D02	Cy5	Unkn	482 P3	450	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	481 CS MSRV	0,683	
E02	Cy5	Unkn	482 P4	453	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	482 XLD MSRV A	2,86	
G01	Cy5	Unkn	482 XLD MSRV B	271	(+) Positive
G02	Cy5	Pos Ctrl	SE Vac	209	(+) Positive
H01	Cy5	Unkn	482 CS MSRV E	247	(+) Positive
H02	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-1,43	

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 7416

**Highest RFU Value:** 12848

**Negative Control Average:** 11087

**Cut Off Value:** 11263

ROX End Point Data

Well ROX	Fluor End	Content Point	Data	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	457 CS MSRV C	8494	
A02	ROX	Unkn	482 CS MSRV C	9277	
B01	ROX	Unkn	457 XLD MSRV	11690	(+) Positive
B02	ROX	Unkn	482 P1	12596	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	457 CS MSRV E	12848	(+) Positive
C02	ROX	Unkn	482 P2	12284	(+) Positive
D01	ROX	Unkn	481 XLD MSRV	8178	
D02	ROX	Unkn	482 P3	12426	(+) Positive
E01	ROX	Unkn	481 CS MSRV	12646	(+) Positive
E02	ROX	Unkn	482 P4	11840	(+) Positive
F01	ROX	Unkn	482 XLD MSRV A	12367	(+) Positive
F02	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	11998	(+) Positive
G01	ROX	Unkn	482 XLD MSRV B	10582	
G02	ROX	Pos Ctrl	SE Vac	8729	
H01	ROX	Unkn	482 CS MSRV E	7416	
H02	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	11087	

## QC Parameters

### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	

## Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Positive control with a Cq greater than	30	True	FAM:F2.	False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:D1, E1, F1. FAM:A1, A2, B1, C1, C2, D1, D2, E2, G1, H1.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XV – Formulação típica dos caldos RVS e MKTTn .

<i>Fórmula típica do caldo RVS (g/L)</i>	
Peptona de soja	4.5
Cloreto de sódio	7.2
Fosfato digidrogenado de potássio	1.26
Fosfato dipotássico de hidrogénio	0.18
Cloreto de magnésio (anidro)	13.58
Verde malaquite	0.036
pH 5.2 ± 0.2, a 25°C	

<i>Fórmula típica do caldo MKTTn (g/L)</i>	
Extrato de carne	4.3
Digestão enzimática da caseína	8.6
Cloreto de sódio	2.6
Carbonato de cálcio	38.7
Tiosulfato de sódio anidro	30.5
Sais biliares	4.78
Verde brilhante	9.6mg
Iodo	4.0
Iodo de potássio	5.0
Novobiocina	0.04
pH final 8.2 ± 0.2	

Anexo XVI – Ensaio de RT-PCR das pools 3 e 4 da amostras HPA S0482, isoladas em NA.



BB\_2017-05-11 16-29-  
10\_CC011789\_482\_P3\_P4.pcrd  
22-05-2017 12:14

Report Information

**User:** BioRad/BB  
**Data File Name:** BB\_2017-05-11 16-29-  
10\_CC011789\_482\_P3\_P4.pcrd  
**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB\Finais  
**Well Group Name:** All Wells  
**Report Differs from Last Save:** No

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 11-05-2017 16:29  
**Run User:** BB  
**Run Type:** User-defined  
**Plate File:** BB nha\_ *ttr*.pltd  
**ID:**  
**Notes:** Deepwell plate: Deltalab Lote 14021

Extracção DNA:  
CSB - 11.15  
Micropipetas  
P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:  
CUV - F05-3  
Micropipetas  
P1000 - 11.13  
P200 - 11.8  
P20 - 11.12

Prepação Strip/ Placa:  
Micropipetas  
P200 - 11.9  
P20 - 11.7  
P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50  
**Temperature Control Mode:** Calculated  
**Lid Temperature:** 105  
**Base Serial Number:** CC011789  
**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

- 25:** 95,0°C for 5:00
- 26:** 55,0°C for 0:20
- 27:** 72,0°C for 0:30
- 28:** GOTO 2, 4 more times
- 29:** 95,0°C for 0:15
- 30:** 55,0°C for 0:20 Plate Read
- 31:** 72,0°C for 0:30
- 32:** GOTO 5, 41 more times



## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (1)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (9)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (7)									
B	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (2)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (10)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (8)									
C	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (3)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (1)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (9)									
D	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (4)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (2)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (10)									
E	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (5)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (3)	Pos IAC <i>nhaA</i> _WT  Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC									
F	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (6)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT Cy5 Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (4)	Pos IAC <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> SE Vacinal									
G	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (7)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (5)	Neg IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> S. aureus									
H	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P3 (8)	Unk IAC <i>nhaA</i> _WT <i>nhaA</i> _V Slm_ <i>ttr</i> 482 P4 (6)										

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

FAM: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

HEX: Auto Calculated

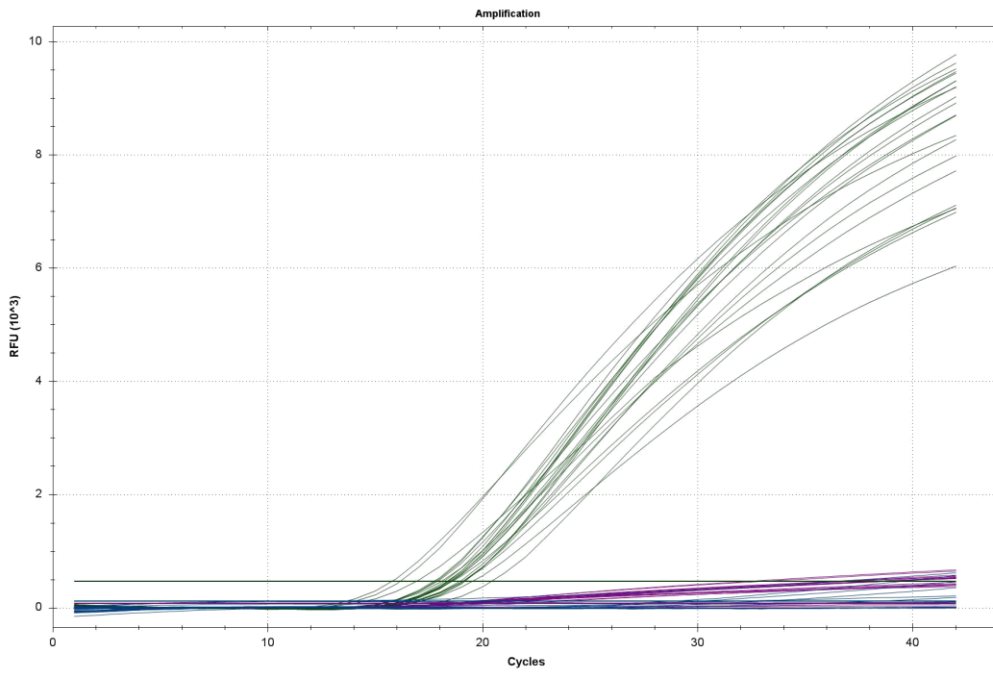
**Threshold Setting:**

ROX: 587,08, Auto Calculated

FAM: 123,43, User Defined

Cy5: 78,65, User Defined

HEX: 469,97, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 12,5**

**Highest RFU Value: 9289**

**Negative Control Average: 12,5**

**Cut Off Value: 940**

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point	Data	Sample	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	482 P3 (1)	6740	(+) Positive	
A02	HEX	Unkn	482 P3 (9)	5727	(+) Positive	
A03	HEX	Unkn	482 P4 (7)	6624	(+) Positive	
B01	HEX	Unkn	482 P3 (2)	8467	(+) Positive	
B02	HEX	Unkn	482 P3 (10)	7584	(+) Positive	
B03	HEX	Unkn	482 P4 (8)	9114	(+) Positive	
C01	HEX	Unkn	482 P3 (3)	9289	(+) Positive	
C02	HEX	Unkn	482 P4 (1)	8251	(+) Positive	
C03	HEX	Unkn	482 P4 (9)	7320	(+) Positive	
D01	HEX	Unkn	482 P3 (4)	9018	(+) Positive	
D02	HEX	Unkn	482 P4 (2)	8837	(+) Positive	
D03	HEX	Unkn	482 P4 (10)	8852	(+) Positive	
E01	HEX	Unkn	482 P3 (5)	8781	(+) Positive	
E02	HEX	Unkn	482 P4 (3)	8280	(+) Positive	
E03	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	8828	(+) Positive	
F01	HEX	Unkn	482 P3 (6)	9177	(+) Positive	
F02	HEX	Unkn	482 P4 (4)	8568	(+) Positive	
F03	HEX	Pos Ctrl	SE Vacinal	8019	(+) Positive	
G01	HEX	Unkn	482 P3 (7)	9030	(+) Positive	
G02	HEX	Unkn	482 P4 (5)	7844	(+) Positive	
G03	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	12,5		
H01	HEX	Unkn	482 P3 (8)	6730	(+) Positive	
H02	HEX	Unkn	482 P4 (6)	6684	(+) Positive	

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -1,60

**Highest RFU Value:** 564

**Negative Control Average:** 4,35

**Cut Off Value:** 60,3

## FAM End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	FAM	Unkn	482 P3 (1)	194	(+) Positive
A02	FAM	Unkn	482 P3 (9)	2,38	
A03	FAM	Unkn	482 P4 (7)	4,91	
B01	FAM	Unkn	482 P3 (2)	2,41	
B02	FAM	Unkn	482 P3 (10)	4,60	
B03	FAM	Unkn	482 P4 (8)	492	(+) Positive
C01	FAM	Unkn	482 P3 (3)	10,1	
C02	FAM	Unkn	482 P4 (1)	7,00	
C03	FAM	Unkn	482 P4 (9)	97,4	(+) Positive
D01	FAM	Unkn	482 P3 (4)	98,2	(+) Positive
D02	FAM	Unkn	482 P4 (2)	5,24	
D03	FAM	Unkn	482 P4 (10)	3,21	
E01	FAM	Unkn	482 P3 (5)	395	(+) Positive
E02	FAM	Unkn	482 P4 (3)	1,99	
E03	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	564	(+) Positive
F01	FAM	Unkn	482 P3 (6)	9,30	
F02	FAM	Unkn	482 P4 (4)	7,60	
G01	FAM	Unkn	482 P3 (7)	-1,60	
G02	FAM	Unkn	482 P4 (5)	297	(+) Positive
G03	FAM	Neg Ctrl	S. aureus	4,35	
H01	FAM	Unkn	482 P3 (8)	-0,279	
H02	FAM	Unkn	482 P4 (6)	149	(+) Positive

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -2,97

**Highest RFU Value:** 635

**Negative Control Average:** -0,989

**Cut Off Value:** 62,6

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	482 P3 (1)	35,1	
A02	Cy5	Unkn	482 P3 (9)	373	(+) Positive
A03	Cy5	Unkn	482 P4 (7)	402	(+) Positive
B01	Cy5	Unkn	482 P3 (2)	526	(+) Positive
B02	Cy5	Unkn	482 P3 (10)	489	(+) Positive
B03	Cy5	Unkn	482 P4 (8)	-2,97	
C01	Cy5	Unkn	482 P3 (3)	614	(+) Positive
C02	Cy5	Unkn	482 P4 (1)	495	(+) Positive
C03	Cy5	Unkn	482 P4 (9)	383	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	482 P3 (4)	500	(+) Positive
D02	Cy5	Unkn	482 P4 (2)	635	(+) Positive
D03	Cy5	Unkn	482 P4 (10)	502	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	482 P3 (5)	1,50	
E02	Cy5	Unkn	482 P4 (3)	425	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	482 P3 (6)	541	(+) Positive
F02	Cy5	Unkn	482 P4 (4)	519	(+) Positive
F03	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	361	(+) Positive
G01	Cy5	Unkn	482 P3 (7)	493	(+) Positive
G02	Cy5	Unkn	482 P4 (5)	3,04	
G03	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-0,989	
H01	Cy5	Unkn	482 P3 (8)	390	(+) Positive
H02	Cy5	Unkn	482 P4 (6)	64,4	(+) Positive

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 6862

**Highest RFU Value:** 11215

**Negative Control Average:** 11097

**Cut Off Value:** 11109

## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	482 P3 (1)	8027	
A02	ROX	Unkn	482 P3 (9)	6862	
A03	ROX	Unkn	482 P4 (7)	7962	
B01	ROX	Unkn	482 P3 (2)	10363	
B02	ROX	Unkn	482 P3 (10)	8380	
B03	ROX	Unkn	482 P4 (8)	11215	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	482 P3 (3)	10319	
C02	ROX	Unkn	482 P4 (1)	9310	
C03	ROX	Unkn	482 P4 (9)	8896	
D01	ROX	Unkn	482 P3 (4)	9833	
D02	ROX	Unkn	482 P4 (2)	10909	
D03	ROX	Unkn	482 P4 (10)	9431	
E01	ROX	Unkn	482 P3 (5)	9670	
E02	ROX	Unkn	482 P4 (3)	8962	
E03	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	8899	
F01	ROX	Unkn	482 P3 (6)	10143	
F02	ROX	Unkn	482 P4 (4)	9627	
F03	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	9260	
G01	ROX	Unkn	482 P3 (7)	10992	
G02	ROX	Unkn	482 P4 (5)	9057	
G03	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	11097	
H01	ROX	Unkn	482 P3 (8)	8940	
H02	ROX	Unkn	482 P4 (6)	7557	

## QC Parameters

## Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True		False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:A1, B3, E1, G2, H2. FAM:A2, A3, B1, B2, C1, C2, C3, D1, D2, D3, E2, F1, F2, G1, H1.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XVII – Ensaio de RT-PCR para confirmação da presença de *Salmonella* em amostras alimentares.



BB\_2017-04-27 15-58-  
01\_CC011789\_496\_526\_**ttr**.pcrd  
22-05-2017 12:16

Report Information

**User:** BioRad/BB  
**Data File Name:** BB\_2017-04-27 15-58-  
01\_CC011789\_496\_526\_**ttr**.pcrd  
**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB\Alimentos  
**Well Group Name:** All Wells  
**Report Differs from Last Save:** No

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 27-04-2017 15:58  
**Run User:** BB  
**Run Type:** User-defined  
**Plate File:** BB\_**ttr**\_amostras.pltd  
**ID:**  
**Notes:** Deepwell plate: Deltalab Lote 14021  
Extracção DNA:  
CSB - 11.15  
Micropipetas  
P1000 - 11.10  
Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:  
CUV - F05-3  
Micropipetas  
P200 - 11.8  
P20 - 11.12

Prepação Strip/ Placa:  
Micropipetas  
P200 - 11.9  
P20 - 11.7  
P10 - 11.17  
**Sample Volume:** 50  
**Temperature Control Mode:** Calculated  
**Lid Temperature:** 105  
**Base Serial Number:** CC011789  
**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

- 33:** 95,0°C for 5:00
- 34:** 55,0°C for 0:20
- 35:** 72,0°C for 0:30
- 36:** GOTO 2, 4 more times
- 37:** 95,0°C for 0:15
- 38:** 55,0°C for 0:20 Plate Read
- 39:** 72,0°C for 0:30
- 40:** GOTO 5, 36 more times



# Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC Slm_ <i>ttr</i> 496											
B	Unk IAC Slm_ <i>ttr</i> 526											
C	Pos IAC Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC											
D	Neg IAC Slm_ <i>ttr</i> S. aureus											
E												
F												
G												
H												

# Quantification

**Step #: 6**

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

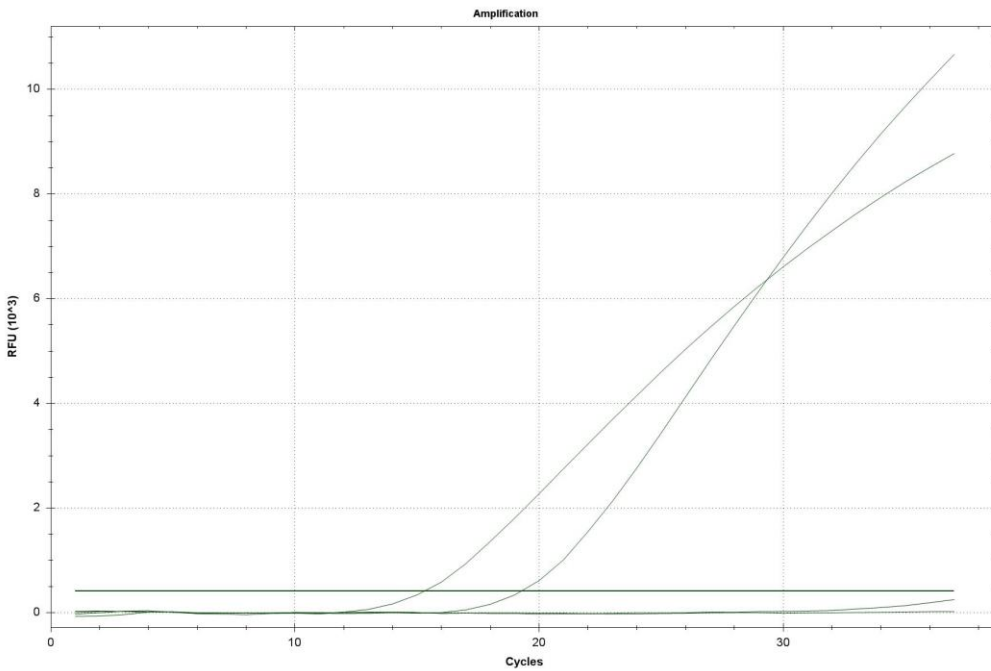
ROX: Auto Calculated

HEX: Auto Calculated

**Threshold Setting:**

ROX: 567,98, Auto Calculated

HEX: 417,30, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 11,7

**Highest RFU Value:** 9656

**Negative Control Average:** 11,7

**Cut Off Value:** 976

HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	496	148	
B01	HEX	Unkn	526	8218	(+) Positive
C01	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	9656	(+) Positive
D01	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	11,7	

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 7072

**Highest RFU Value:** 14795

**Negative Control Average:** 14795

**Cut Off Value:** 14795

ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	496	7072	
B01	ROX	Unkn	526	9710	
C01	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	13024	
D01	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	14795	

## QC Parameters

Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	

## Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Positive control with a Cq greater than	30	True		False	
Unknown without a Cq	N/A	True	HEX:A1.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

## Anexo XVIII – Ensaio de RT-PCR das amostras provenientes do plano PNCS.



BB\_2017-05-16 12-29-  
41\_CC011789\_PNCS\_609\_610\_612.pcrd  
22-05-2017 12:15

### Report Information

**User:** BioRad/BB  
**Data File Name:** BB\_2017-05-16 12-29-  
41\_CC011789\_PNCS\_609\_610\_612.pcrd  
**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB\PNCS  
**Well Group Name:** All Wells  
**Report Differs from Last Save:** No

### Notes

### Run Setup

### Run Information

**Run Date:** 16-05-2017 12:30  
**Run User:** BB  
**Run Type:** User-defined  
**Plate File:** BB nha\_ttr\_colónias.pltd  
**ID:**  
**Notes:** Deepwell plate: P0600000700074  
Extracção DNA:  
CSB - 11.15  
Micropipetas  
P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:  
CUV - F05-3  
Micropipetas  
P1000 - 11.13  
P200 - 11.8  
P20 - 11.12

Preparação Strip/ Placa:  
Micropipetas  
P200 - 11.9  
P20 - 11.7  
P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50  
**Temperature Control Mode:** Calculated  
**Lid Temperature:** 105  
**Base Serial Number:** CC011789  
**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

### Protocol

**41:** 95,0°C for 5:00  
**42:** 55,0°C for 0:20  
**43:** 72,0°C for 0:30  
**44:** GOTO 2, 4 more times  
**45:** 95,0°C for 0:15  
**46:** 55,0°C for 0:20 Plate Read  
**47:** 72,0°C for 0:30  
**48:** GOTO 5, 41 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (9)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (7)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (5)	Neg IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> S. aureus							
B	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (10)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (8)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (6)								
C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (3)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (9)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (7)								
D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (4)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (10)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (8)								
E	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (5)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (3)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (9)								
F	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (6)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (4)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (10)								
G	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (7)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (5)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (3)	Pos IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC								
H	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 609/2 (8)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 610/2 (6)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 612/2 (4)	Pos IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> SE Vacinal								

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

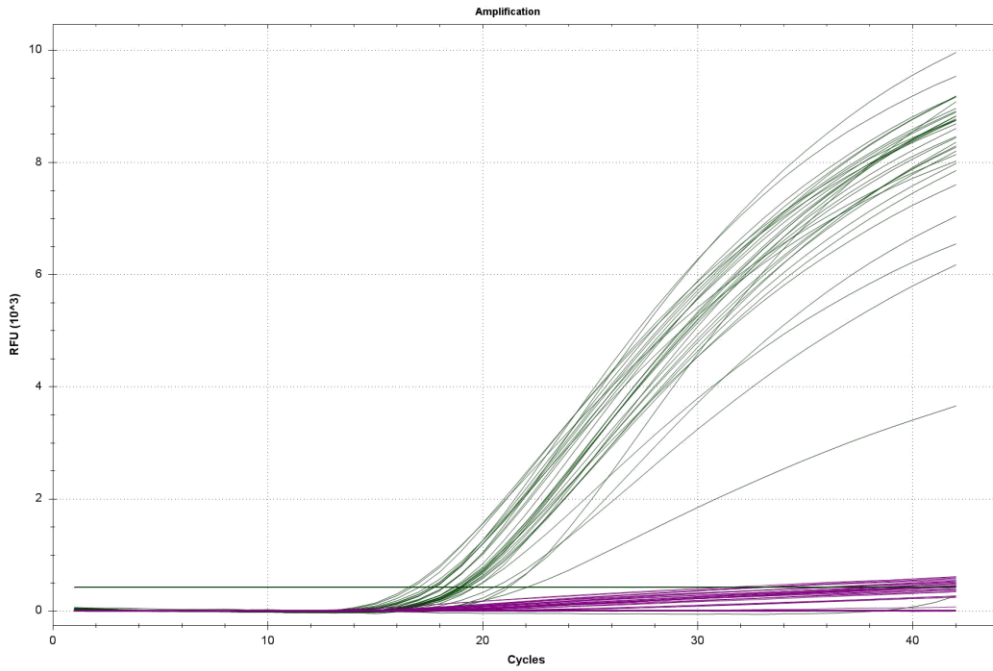
HEX: Auto Calculated

**Threshold Setting:**

ROX: 494,25, Auto Calculated

Cy5: 15,85, User Defined

HEX: 422,39, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 105

**Highest RFU Value:** 9544

**Negative Control Average:** 105

**Cut Off Value:** 1049

## HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	609/2 (1)	3406	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	609/2 (9)	7575	(+) Positive
A03	HEX	Unkn	610/2 (7)	8211	(+) Positive
A04	HEX	Unkn	612/2 (5)	8541	(+) Positive
A05	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	105	
B01	HEX	Unkn	609/2 (2)	5790	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	609/2 (10)	7868	(+) Positive
B03	HEX	Unkn	610/2 (8)	7227	(+) Positive
B04	HEX	Unkn	612/2 (6)	9544	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	609/2 (3)	7903	(+) Positive

## HEX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
C02	HEX	Unkn	610/2 (1)	8348	(+) Positive
C03	HEX	Unkn	610/2 (9)	7810	(+) Positive
C04	HEX	Unkn	612/2 (7)	8768	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	609/2 (4)	7443	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	610/2 (2)	8508	(+) Positive
D03	HEX	Unkn	610/2 (10)	8052	(+) Positive
D04	HEX	Unkn	612/2 (8)	8429	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	609/2 (5)	7882	(+) Positive
E02	HEX	Unkn	610/2 (3)	8800	(+) Positive
E03	HEX	Unkn	612/2 (1)	8401	(+) Positive
E04	HEX	Unkn	612/2 (9)	8358	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	609/2 (6)	8412	(+) Positive
F02	HEX	Unkn	610/2 (4)	8584	(+) Positive
F03	HEX	Unkn	612/2 (2)	7781	(+) Positive
F04	HEX	Unkn	612/2 (10)	8756	(+) Positive
G01	HEX	Unkn	609/2 (7)	8095	(+) Positive
G02	HEX	Unkn	610/2 (5)	7708	(+) Positive
G03	HEX	Unkn	612/2 (3)	8375	(+) Positive
G04	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	8538	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	609/2 (8)	6640	(+) Positive
H02	HEX	Unkn	610/2 (6)	6212	(+) Positive
H03	HEX	Unkn	612/2 (4)	8391	(+) Positive
H04	HEX	Pos Ctrl	SE Vacinal	9177	(+) Positive

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -1,79

**Highest RFU Value:** 576

**Negative Control Average:** 0,00926

**Cut Off Value:** 57,6

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	609/2 (1)	62,7	(+) Positive
A02	Cy5	Unkn	609/2 (9)	427	(+) Positive
A03	Cy5	Unkn	610/2 (7)	556	(+) Positive
A04	Cy5	Unkn	612/2 (5)	427	(+) Positive
A05	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	0,00926	
B01	Cy5	Unkn	609/2 (2)	223	(+) Positive
B02	Cy5	Unkn	609/2 (10)	389	(+) Positive
B03	Cy5	Unkn	610/2 (8)	371	(+) Positive
B04	Cy5	Unkn	612/2 (6)	419	(+) Positive
C01	Cy5	Unkn	609/2 (3)	357	(+) Positive
C02	Cy5	Unkn	610/2 (1)	573	(+) Positive
C03	Cy5	Unkn	610/2 (9)	529	(+) Positive
C04	Cy5	Unkn	612/2 (7)	323	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	609/2 (4)	337	(+) Positive
D02	Cy5	Unkn	610/2 (2)	461	(+) Positive
D03	Cy5	Unkn	610/2 (10)	496	(+) Positive
D04	Cy5	Unkn	612/2 (8)	490	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	609/2 (5)	409	(+) Positive
E02	Cy5	Unkn	610/2 (3)	453	(+) Positive
E03	Cy5	Unkn	612/2 (1)	479	(+) Positive
E04	Cy5	Unkn	612/2 (9)	315	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	609/2 (6)	405	(+) Positive
F02	Cy5	Unkn	610/2 (4)	543	(+) Positive
F03	Cy5	Unkn	612/2 (2)	407	(+) Positive
F04	Cy5	Unkn	612/2 (10)	239	(+) Positive
G01	Cy5	Unkn	609/2 (7)	447	(+) Positive
G02	Cy5	Unkn	610/2 (5)	420	(+) Positive
G03	Cy5	Unkn	612/2 (3)	506	(+) Positive



### Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
G04	Cy5	Pos Ctrl	SE ATCC	-1,79	
H01	Cy5	Unkn	609/2 (8)	243	(+) Positive
H02	Cy5	Unkn	610/2 (6)	356	(+) Positive
H03	Cy5	Unkn	612/2 (4)	222	(+) Positive
H04	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	576	(+) Positive

### Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 5061**

**Highest RFU Value: 11726**

**Negative Control Average: 10953**

**Cut Off Value: 11030**

### ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	609/2 (1)	5061	
A02	ROX	Unkn	609/2 (9)	9951	
A03	ROX	Unkn	610/2 (7)	10490	
A04	ROX	Unkn	612/2 (5)	10374	
A05	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	10953	
B01	ROX	Unkn	609/2 (2)	7798	
B02	ROX	Unkn	609/2 (10)	10348	
B03	ROX	Unkn	610/2 (8)	9054	
B04	ROX	Unkn	612/2 (6)	11659	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	609/2 (3)	10547	
C02	ROX	Unkn	610/2 (1)	9765	
C03	ROX	Unkn	610/2 (9)	9378	
C04	ROX	Unkn	612/2 (7)	10650	
D01	ROX	Unkn	609/2 (4)	10200	
D02	ROX	Unkn	610/2 (2)	10722	
D03	ROX	Unkn	610/2 (10)	10335	

## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
D04	ROX	Unkn	612/2 (8)	10246	
E01	ROX	Unkn	609/2 (5)	10417	
E02	ROX	Unkn	610/2 (3)	10666	
E03	ROX	Unkn	612/2 (1)	11454	(+) Positive
E04	ROX	Unkn	612/2 (9)	10330	
F01	ROX	Unkn	609/2 (6)	10739	
F02	ROX	Unkn	610/2 (4)	10879	
F03	ROX	Unkn	612/2 (2)	10127	
F04	ROX	Unkn	612/2 (10)	10786	
G01	ROX	Unkn	609/2 (7)	10496	
G02	ROX	Unkn	610/2 (5)	9334	
G03	ROX	Unkn	612/2 (3)	10905	
G04	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	11668	(+) Positive
H01	ROX	Unkn	609/2 (8)	9555	
H02	ROX	Unkn	610/2 (6)	8148	
H03	ROX	Unkn	612/2 (4)	10987	
H04	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	11726	(+) Positive

## QC Parameters

### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True	Cy5:G4.	False	

## Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Unknown without a Cq	N/A	True		False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

## Anexo XIX – Ensaio de RT-PCR de amostras provenientes dos planos PIF e PNCS.



BB\_2017-05-24 11-18-  
50\_CC011789\_PNCS\_PIF.pcrd

24-05-2017 12:58

### Report Information

**User:** BioRad/BB

**Data File Name:** BB\_2017-05-24 11-18-  
50\_CC011789\_PNCS\_PIF.pcrd

**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB

**Well Group Name:** All Wells

**Report Differs from Last Save:** No

### Run Setup

### Run Information

**Run Date:** 24-05-2017 11:19

**Run User:** BB

**Run Type:** User-defined

**Plate File:** BB nha\_ttr.pltd

**ID:**

**Notes:** Deepwell plate: P060000700087

### Extracção DNA:

CSB - 11.15

Micropipetas

P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

### Preparação Mix:

CUV - F05-3

Micropipetas

P1000 - 11.13

P200 - 11.8

P20 - 11.12

### Prepação Strip/ Placa:

Micropipetas

P200 - 11.9

P20 - 11.7

P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50

**Temperature Control Mode:** Calculated

**Lid Temperature:** 105

**Base Serial Number:** CC011789

**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

### Protocol

**49:** 95,0°C for 5:00

**50:** 55,0°C for 0:20

**51:** 72,0°C for 0:30

**52:** GOTO 2, 4 more times

**53:** 95,0°C for 0:15

**54:** 55,0°C for 0:20 Plate Read

**55:** 72,0°C for 0:30

**56:** GOTO 5, 41 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 692/1 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 694/2 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (7)	Neg IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> S. aureus								
B	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 692/1 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 694/1 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (8)									
C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 681/1 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (9)									
D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 681/1 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (10)									
E	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 681/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (3)	Unk IAC Slm_ <i>ttr</i> 656/3									
F	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 696/3 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (4)	Unk IAC Slm_ <i>ttr</i> 657/5									
G	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 696/3 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (5)	Pos IAC Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC									
H	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 694/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 695/2 (6)	Pos IAC <i>nhaA_V</i> SE Vacinal									

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

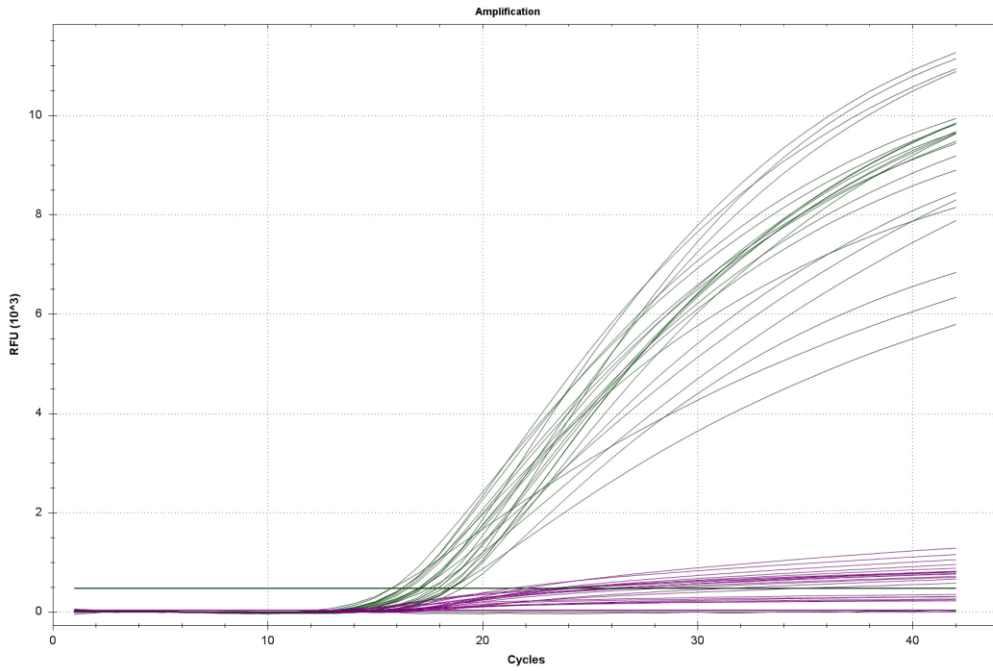
HEX: Auto Calculated

**Threshold Setting:**

ROX: 75,48, Auto Calculated

Cy5: 35,98, Auto Calculated

HEX: 481,19, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 24,1**

**Highest RFU Value: 10896**

**Negative Control Average: 24,1**

**Cut Off Value: 1111**

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point	Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	692/1 (1)	7868	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	694/2 (2)	6550	(+) Positive
A03	HEX	Unkn	695/2 (7)	5506	(+) Positive
A04	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	24,1	
B01	HEX	Unkn	692/1 (2)	10563	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	694/1 (1)	9282	(+) Positive
B03	HEX	Unkn	695/2 (8)	9191	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	681/1 (1)	10770	(+) Positive
C02	HEX	Unkn	695/2 (1)	10475	(+) Positive
C03	HEX	Unkn	695/2 (9)	8072	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	681/1 (2)	10896	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	695/2 (2)	9443	(+) Positive
D03	HEX	Unkn	695/2 (10)	8832	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	681/2 (1)	9117	(+) Positive
E02	HEX	Unkn	695/2 (3)	9249	(+) Positive
E03	HEX	Unkn	656/3	7868	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	696/3 (1)	9476	(+) Positive
F02	HEX	Unkn	695/2 (4)	6052	(+) Positive
F03	HEX	Unkn	657/5	7437	(+) Positive
G01	HEX	Unkn	696/3 (2)	9623	(+) Positive
G02	HEX	Unkn	695/2 (5)	9106	(+) Positive
G03	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	8574	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	694/2 (1)	9323	(+) Positive
H02	HEX	Unkn	695/2 (6)	9456	(+) Positive

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 1,25

**Highest RFU Value:** 1235

**Negative Control Average:** 1,25

**Cut Off Value:** 125

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	692/1 (1)	225	(+) Positive
A02	Cy5	Unkn	694/2 (2)	676	(+) Positive
A03	Cy5	Unkn	695/2 (7)	307	(+) Positive
A04	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	1,25	
B01	Cy5	Unkn	692/1 (2)	307	(+) Positive
B02	Cy5	Unkn	694/1 (1)	777	(+) Positive
B03	Cy5	Unkn	695/2 (8)	636	(+) Positive
C01	Cy5	Unkn	681/1 (1)	1235	(+) Positive
C02	Cy5	Unkn	695/2 (1)	918	(+) Positive
C03	Cy5	Unkn	695/2 (9)	557	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	681/1 (2)	1112	(+) Positive
D02	Cy5	Unkn	695/2 (2)	695	(+) Positive
D03	Cy5	Unkn	695/2 (10)	751	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	681/2 (1)	776	(+) Positive
E02	Cy5	Unkn	695/2 (3)	743	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	696/3 (1)	242	(+) Positive
F02	Cy5	Unkn	695/2 (4)	350	(+) Positive
G01	Cy5	Unkn	696/3 (2)	261	(+) Positive
G02	Cy5	Unkn	695/2 (5)	795	(+) Positive
H01	Cy5	Unkn	694/2 (1)	1011	(+) Positive
H02	Cy5	Unkn	695/2 (6)	853	(+) Positive
H03	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	790	(+) Positive

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 3,24**

**Highest RFU Value: 8694**

**Negative Control Average: 4952**

**Cut Off Value: 5326**



## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	692/1 (1)	18,1	
A02	ROX	Unkn	694/2 (2)	105	
A03	ROX	Unkn	695/2 (7)	90,7	
A04	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	4952	
B01	ROX	Unkn	692/1 (2)	3,24	
B02	ROX	Unkn	694/1 (1)	83,1	
B03	ROX	Unkn	695/2 (8)	62,5	
C01	ROX	Unkn	681/1 (1)	99,9	
C02	ROX	Unkn	695/2 (1)	47,6	
C03	ROX	Unkn	695/2 (9)	80,9	
D01	ROX	Unkn	681/1 (2)	89,3	
D02	ROX	Unkn	695/2 (2)	4,60	
D03	ROX	Unkn	695/2 (10)	28,2	
E01	ROX	Unkn	681/2 (1)	5,93	
E02	ROX	Unkn	695/2 (3)	60,8	
E03	ROX	Unkn	656/3	8694	(+) Positive
F01	ROX	Unkn	696/3 (1)	148	
F02	ROX	Unkn	695/2 (4)	5,16	
F03	ROX	Unkn	657/5	8558	(+) Positive
G01	ROX	Unkn	696/3 (2)	48,8	
G02	ROX	Unkn	695/2 (5)	7,64	
G03	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	139	
H01	ROX	Unkn	694/2 (1)	56,1	
H02	ROX	Unkn	695/2 (6)	3,88	
H03	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	348	

## QC Parameters

Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True		False	
Unknown without a Cq	N/A	True		False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XX – Ensaio RT-PCR de amostras provenientes dos planos PIGA e PNCS.



BB\_2017-05-29 12-20-  
30\_CC011789\_PNCS\_PIGA.pcrd  
31-05-2017 09:34

Report Information

**User:** BioRad/BB  
**Data File Name:** BB\_2017-05-29 12-20-  
30\_CC011789\_PNCS\_PIGA.pcrd  
**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB  
**Well Group Name:** All Wells  
**Report Differs from Last Save:** Yes

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 29-05-2017 12:20  
**Run User:** BB  
**Run Type:** User-defined  
**Plate File:** BB nha\_*ttr*.pltd  
**ID:**  
**Notes:** Deepwell plate: P060000700062

Extracção DNA:

CSB - 11.15  
Micropipetas  
P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3  
Micropipetas  
P1000 - 11.13  
P200 - 11.8  
P20 - 11.12

Prepação Strip/ Placa:

Micropipetas  
P200 - 11.9  
P20 - 11.7  
P10 - 11.18  
P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50

**Temperature Control Mode:** Calculated

**Lid Temperature:** 105

**Base Serial Number:** CC011789

**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

**57:** 95,0°C for 5:00  
**58:** 55,0°C for 0:20  
**59:** 72,0°C for 0:30  
**60:** GOTO 2, 4 more times  
**61:** 95,0°C for 0:15  
**62:** 55,0°C for 0:20 Plate Read  
**63:** 72,0°C for 0:30  
**64:** GOTO 5, 39 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (9)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (7)									
B	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (10)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (8)									
C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (3)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (9)									
D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (4)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (10)									
E	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (5)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (3)	Unk IAC Slm_ <i>ttr</i> 708									
F	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (6)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (4)	Pos IAC Slm_ <i>ttr</i> SE ATCC									
G	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (7)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (5)	Pos IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> SE Vacinal									
H	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 738/1 (8)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> 739/1 (6)	Neg IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> S. aureus									

## Quantification

Step #: 6

Analysis Mode: Fluorophore

Cq Determination: Single Threshold

Baseline Method:

ROX: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

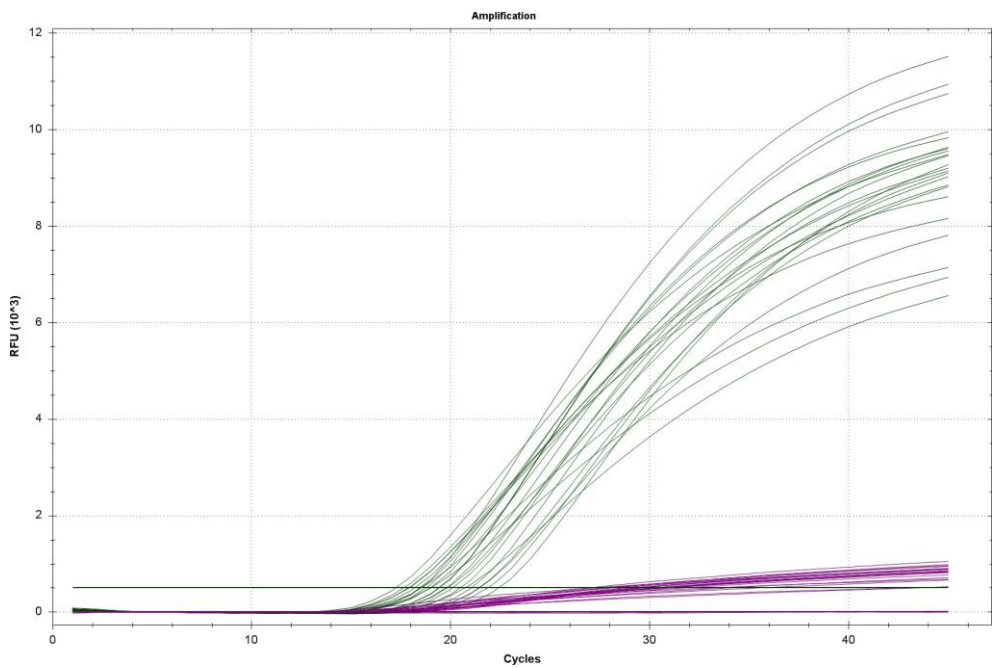
HEX: Auto Calculated

Threshold Setting:

ROX: 424,28, Auto Calculated

Cy5: 13,66, Auto Calculated

HEX: 508,81, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 18,1**

**Highest RFU Value: 11245**

**Negative Control Average: 18,1**

**Cut Off Value: 1141**

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	738/1 (1)	7569	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	738/1 (9)	8526	(+) Positive
A03	HEX	Unkn	739/1 (7)	8423	(+) Positive
B01	HEX	Unkn	738/1 (2)	9180	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	738/1 (10)	8928	(+) Positive
B03	HEX	Unkn	739/1 (8)	10649	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	738/1 (3)	9298	(+) Positive
C02	HEX	Unkn	739/1 (1)	6323	(+) Positive
C03	HEX	Unkn	739/1 (9)	8725	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	738/1 (4)	6940	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	739/1 (2)	9240	(+) Positive
D03	HEX	Unkn	739/1 (10)	10469	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	738/1 (5)	6704	(+) Positive
E02	HEX	Unkn	739/1 (3)	7972	(+) Positive
E03	HEX	Unkn	708	8879	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	738/1 (6)	8581	(+) Positive
F02	HEX	Unkn	739/1 (4)	11245	(+) Positive
F03	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	8796	(+) Positive
G01	HEX	Unkn	738/1 (7)	8943	(+) Positive
G02	HEX	Unkn	739/1 (5)	9622	(+) Positive
G03	HEX	Pos Ctrl	SE Vacinal	9712	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	738/1 (8)	9362	(+) Positive
H02	HEX	Unkn	739/1 (6)	9368	(+) Positive
H03	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	18,1	

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 1,14

**Highest RFU Value:** 1009

**Negative Control Average:** 1,14

**Cut Off Value:** 102

## Cy5 End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	738/1 (1)	740	(+) Positive
A02	Cy5	Unkn	738/1 (9)	867	(+) Positive
A03	Cy5	Unkn	739/1 (7)	870	(+) Positive
B01	Cy5	Unkn	738/1 (2)	910	(+) Positive
B02	Cy5	Unkn	738/1 (10)	864	(+) Positive
B03	Cy5	Unkn	739/1 (8)	1009	(+) Positive
C01	Cy5	Unkn	738/1 (3)	811	(+) Positive
C02	Cy5	Unkn	739/1 (1)	506	(+) Positive
C03	Cy5	Unkn	739/1 (9)	636	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	738/1 (4)	659	(+) Positive
D02	Cy5	Unkn	739/1 (2)	798	(+) Positive
D03	Cy5	Unkn	739/1 (10)	944	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	738/1 (5)	500	(+) Positive
E02	Cy5	Unkn	739/1 (3)	856	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	738/1 (6)	782	(+) Positive
F02	Cy5	Unkn	739/1 (4)	806	(+) Positive
G01	Cy5	Unkn	738/1 (7)	799	(+) Positive
G02	Cy5	Unkn	739/1 (5)	928	(+) Positive
G03	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	681	(+) Positive
H01	Cy5	Unkn	738/1 (8)	827	(+) Positive
H02	Cy5	Unkn	739/1 (6)	853	(+) Positive
H03	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	1,14	

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 4599

**Highest RFU Value:** 8216

**Negative Control Average:** 6805

**Cut Off Value:** 6947

## ROX End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	738/1 (1)	6016	
A02	ROX	Unkn	738/1 (9)	6725	
A03	ROX	Unkn	739/1 (7)	6426	
B01	ROX	Unkn	738/1 (2)	7243	(+) Positive
B02	ROX	Unkn	738/1 (10)	7302	(+) Positive
B03	ROX	Unkn	739/1 (8)	8216	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	738/1 (3)	7365	(+) Positive
C02	ROX	Unkn	739/1 (1)	4599	
C03	ROX	Unkn	739/1 (9)	6692	
D01	ROX	Unkn	738/1 (4)	5090	
D02	ROX	Unkn	739/1 (2)	7362	(+) Positive
D03	ROX	Unkn	739/1 (10)	8065	(+) Positive
E01	ROX	Unkn	738/1 (5)	5454	
E02	ROX	Unkn	739/1 (3)	6232	
E03	ROX	Unkn	708	7271	(+) Positive
F01	ROX	Unkn	738/1 (6)	6727	
F02	ROX	Unkn	739/1 (4)	8137	(+) Positive
F03	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	6860	
G01	ROX	Unkn	738/1 (7)	7098	(+) Positive
G02	ROX	Unkn	739/1 (5)	7159	(+) Positive
G03	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	7606	(+) Positive
H01	ROX	Unkn	738/1 (8)	7434	(+) Positive
H02	ROX	Unkn	739/1 (6)	7189	(+) Positive
H03	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	6805	

## QC Parameters



Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True		False	
Unknown without a Cq	N/A	True		False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XXI – Ensaio RT-PCR de diferentes estirpes selvagens de *Salmonella* e de amostras provenientes do plano PNCS.



BB\_2017-06-02 13-01-11\_CC011789.pcrd

02-06-2017 15:44

Report Information

**User:** BioRad/BB

**Data File Name:** BB\_2017-06-02 13-01-11\_CC011789.pcrd

**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB\Finais

**Well Group Name:** All Wells

**Report Differs from Last Save:** Yes

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 02-06-2017 13:01

**Run User:** BB

**Run Type:** User-defined

**Plate File:** BB nha\_ *ttr*.pltd

**ID:**

**Notes:** Deepwell plate: P150000023351

Extracção DNA:

CSB - 11.15

Micropipetas

P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3

Micropipetas

P1000 - 11.13

P200 - 11.8

P20 - 11.12

Prepação Strip/ Placa:

Micropipetas

P200 - 11.9

P20 - 11.7

P10 - 11.18

P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50

**Temperature Control Mode:** Calculated

**Lid Temperature:** 105

**Base Serial Number:** CC011789

**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

**65:** 95,0°C for 5:00

**66:** 55,0°C for 0:20

**67:** 72,0°C for 0:30

**68:** GOTO 2, 4 more times

**69:** 95,0°C for 0:15

**70:** 55,0°C for 0:20 Plate Read

**71:** 72,0°C for 0:30

**72:** GOTO 5, 39 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Arizonae	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Braend	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 692/1									
B	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Tennessee	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S.Derby	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 696/3 Lisboa									
C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Ohic	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Havana	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 696/3									
D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Heidelberg	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Bredeneey	Pos IAC  Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> SE ATCC									
E	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Lexington 3C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Muenchen	Pos IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i>  SE Vacinal									
F	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Lexington 3D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. lactose +	Neg IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. aureus									
G	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Schwar	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Newport										
H	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. Ohio	Unk IAC <i>nhaA_V</i> Slm_ <i>ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 692/1 Lisboa										

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

FAM: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

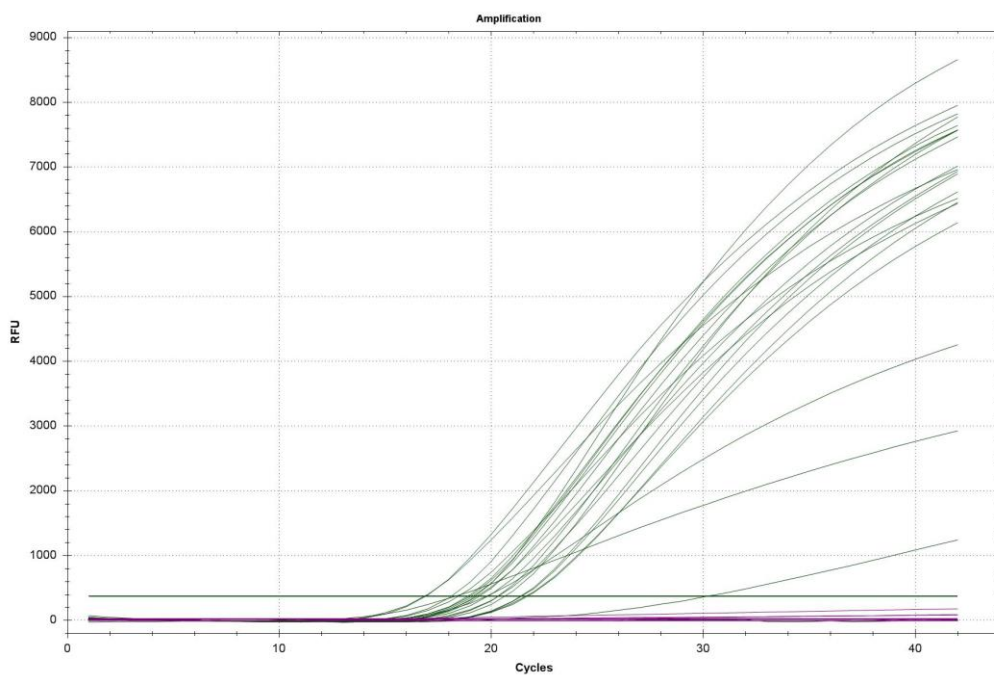
HEX: Auto Calculated

**Threshold Setting:**

ROX: 509,26, Auto Calculated

FAM: 39,14, User Defined

Cy5: 20,08, User Defined  
HEX: 370,71, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -5,62

**Highest RFU Value:** 8278

**Negative Control Average:** -5,62

**Cut Off Value:** 823

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point Data	Sample Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	S. Arizonae	4027	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	S. Braend	6229	(+) Positive
A03	HEX	Unkn	692/1	6119	(+) Positive
B01	HEX	Unkn	S. Tennessee	7307	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	S.Derby	7238	(+) Positive
B03	HEX	Unkn	696/3 Lisboa	7504	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	S. Ohic	6646	(+) Positive
C02	HEX	Unkn	S. Havana	7350	(+) Positive
C03	HEX	Unkn	696/3	6229	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	S. Heidelberg	7108	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	S. Bredeney	6041	(+) Positive
D03	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	1086	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	S. Lexington 3C	6663	(+) Positive
E02	HEX	Unkn	S. Muenchen	7179	(+) Positive
E03	HEX	Pos Ctrl	SE Vacinal	2761	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	S. Lexington 3D	7631	(+) Positive
F02	HEX	Unkn	S. lactose +	8278	(+) Positive
F03	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	-5,62	
G01	HEX	Unkn	S. Schwar	6538	(+) Positive
G02	HEX	Unkn	S. Newport	6496	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	S. Ohio	5762	(+) Positive
H02	HEX	Unkn	692/1 Lisboa	7227	(+) Positive

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -8,63

**Highest RFU Value:** 1039

**Negative Control Average:** -8,63

**Cut Off Value:** 96,2

## FAM End Point Data

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A01	FAM	Unkn	S. Arizonae	67,6	
A02	FAM	Unkn	S. Braend	168	(+) Positive
A03	FAM	Unkn	692/1	640	(+) Positive
B01	FAM	Unkn	S. Tennessee	548	(+) Positive
B02	FAM	Unkn	S.Derby	493	(+) Positive
B03	FAM	Unkn	696/3 Lisboa	503	(+) Positive
C01	FAM	Unkn	S. Ohic	265	(+) Positive
C02	FAM	Unkn	S. Havana	326	(+) Positive
C03	FAM	Unkn	696/3	396	(+) Positive
D01	FAM	Unkn	S. Heidelberg	438	(+) Positive
D02	FAM	Unkn	S. Bredeny	12,3	
D03	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	4,89	
E01	FAM	Unkn	S. Lexington 3C	266	(+) Positive
E02	FAM	Unkn	S. Muenchen	880	(+) Positive
F01	FAM	Unkn	S. Lexington 3D	473	(+) Positive
F02	FAM	Unkn	S. lactose +	326	(+) Positive
F03	FAM	Neg Ctrl	S. aureus	-8,63	
G01	FAM	Unkn	S. Schwar	22,3	
G02	FAM	Unkn	S. Newport	833	(+) Positive
H01	FAM	Unkn	S. Ohio	225	(+) Positive
H02	FAM	Unkn	692/1 Lisboa	1039	(+) Positive

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -2,07

**Highest RFU Value:** 169

**Negative Control Average:** -1,50

**Cut Off Value:** 15,5

Cy5 End Point Data

Well Cy5	Fluor End	Content Point Data	Sample	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	S. Arizonae	-2,07	
A02	Cy5	Unkn	S. Braend	1,21	
A03	Cy5	Unkn	692/1	0,575	
B01	Cy5	Unkn	S. Tennessee	1,65	
B02	Cy5	Unkn	S.Derby	2,71	
B03	Cy5	Unkn	696/3 Lisboa	3,57	
C01	Cy5	Unkn	S. Ohic	2,80	
C02	Cy5	Unkn	S. Havana	5,39	
C03	Cy5	Unkn	696/3	2,82	
D01	Cy5	Unkn	S. Heidelberg	2,71	
D02	Cy5	Unkn	S. Bredeney	8,38	
E01	Cy5	Unkn	S. Lexington 3C	78,9	(+) Positive
E02	Cy5	Unkn	S. Muenchen	1,04	
E03	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	169	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	S. Lexington 3D	1,77	
F02	Cy5	Unkn	S. lactose +	1,47	
F03	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-1,50	
G01	Cy5	Unkn	S. Schwar	82,5	(+) Positive
G02	Cy5	Unkn	S. Newport	1,37	
H01	Cy5	Unkn	S. Ohio	0,848	
H02	Cy5	Unkn	692/1 Lisboa	-0,265	

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 3445**

**Highest RFU Value: 13541**

**Negative Control Average: 9608**

**Cut Off Value: 10002**

ROX End Point Data



Well ROX	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	S. Arizonae	6259	
A02	ROX	Unkn	S. Braend	10079	(+) Positive
A03	ROX	Unkn	692/1	9764	
B01	ROX	Unkn	S. Tennessee	11547	(+) Positive
B02	ROX	Unkn	S. Derby	11712	(+) Positive
B03	ROX	Unkn	696/3 Lisboa	11691	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	S. Ohic	10695	(+) Positive
C02	ROX	Unkn	S. Havana	12259	(+) Positive
C03	ROX	Unkn	696/3	9559	
D01	ROX	Unkn	S. Heidelberg	11300	(+) Positive
D02	ROX	Unkn	S. Bredeneby	10921	(+) Positive
D03	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	4181	
E01	ROX	Unkn	S. Lexington 3C	9837	
E02	ROX	Unkn	S. Muenchen	11947	(+) Positive
E03	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	3445	
F01	ROX	Unkn	S. Lexington 3D	11313	(+) Positive
F02	ROX	Unkn	S. lactose +	13541	(+) Positive
F03	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	9608	
G01	ROX	Unkn	S. Schwar	11117	(+) Positive
G02	ROX	Unkn	S. Newport	11698	(+) Positive
H01	ROX	Unkn	S. Ohio	10286	(+) Positive
H02	ROX	Unkn	692/1 Lisboa	11850	(+) Positive

## QC Parameters

### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	

Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True	HEX:D3.	False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C3, D1, D2, E2, F1, F2, G2, H1, H2.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R^2 less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XXII – Ensaio de RT-PCR de amostras provenientes do plano PNCS.



BB\_2017-06-12 10-51-  
33\_CC011789\_839\_859\_PNCS.pcrd

20-06-2017 10:54

Report Information

**User:** BioRad/MA

**Data File Name:** BB\_2017-06-12 10-51-  
33\_CC011789\_839\_859\_PNCS.pcrd

**Data File Path:** D:\Geral\2017\BB\Finais

**Well Group Name:** All Wells

**Report Differs from Last Save:** Yes

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 12-06-2017 10:52

**Run User:** MA

**Run Type:** User-defined

**Plate File:** BB nha\_*ttr*.pltd

**ID:**

**Notes:** Deepwell plate: P150000023353 (839);  
P150000023356 (859/2)

Extracção DNA:

CSB - 11.15

Micropipetas

P1000 - 11.10

P200 - 7.14

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3

Micropipetas

P1000 - 11.13

P200 - 11.8

P20 - 11.12

Preparação Strip/ Placa:

Micropipetas

P200 - 11.9

P20 - 11.7

P10 - 11.18

P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50

**Temperature Control Mode:** Calculated

**Lid Temperature:** 105

**Base Serial Number:** CC011789

**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

**73:** 95,0°C for 5:00

**74:** 55,0°C for 0:20

**75:** 72,0°C for 0:30

**76:** GOTO 2, 4 more times

**77:** 95,0°C for 0:15

**78:** 55,0°C for 0:20 Plate Read

**79:** 72,0°C for 0:30

**80:** GOTO 5, 39 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> Lisbo)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 859/2 (9)	839 (1)								
B	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (2)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (10=	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 839 (Lisboa)									
C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (3)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 839 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 859/2 (1)									
D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (4)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 839 (Lisboa)	Pos IAC  <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> SE ATCC									
E	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (5)	Pos IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> SE ATCC	Pos IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i>  SE Vacinal									
F	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (6)		Neg IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. aureus									
G	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (7)											
H	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> 859/2 (8)											

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

FAM: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

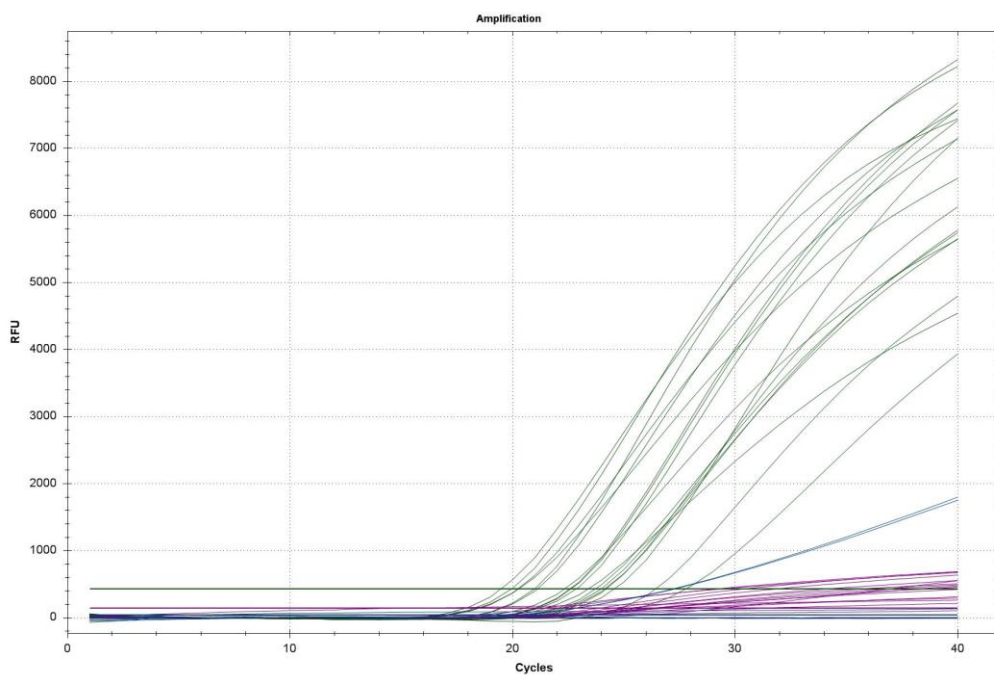
HEX: Auto Calculated

**Threshold Setting:**

ROX: 395,56, Auto Calculated

FAM: 40,86, User Defined

Cy5: 147,71, User Defined  
HEX: 432,83, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 5,94**

**Highest RFU Value: 7864**

**Negative Control Average: 5,94**

**Cut Off Value: 792**

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	859/2 (1,Lisbo)	5627	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	859/2 (9)	7141	(+) Positive
A03	HEX	Unkn	839 (1)	7126	(+) Positive
B01	HEX	Unkn	859/2 (2)	7037	(+) Positive
B02	HEX	Unkn	859/2 (10=	6872	(+) Positive
B03	HEX	Unkn	839 (Lisboa)	7818	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	859/2 (3)	5275	(+) Positive
C02	HEX	Unkn	839 (1)	7864	(+) Positive
C03	HEX	Unkn	859/2 (1)	6486	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	859/2 (4)	7133	(+) Positive
D02	HEX	Unkn	839 (Lisboa)	5257	(+) Positive
D03	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	3387	(+) Positive
E01	HEX	Unkn	859/2 (5)	6738	(+) Positive
E02	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	4300	(+) Positive
E03	HEX	Pos Ctrl	SE Vacinal	6167	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	859/2 (6)	5186	(+) Positive
F03	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	5,94	
G01	HEX	Unkn	859/2 (7)	5294	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	859/2 (8)	4191	(+) Positive

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -8,17

**Highest RFU Value:** 1559

**Negative Control Average:** 0,187

**Cut Off Value:** 156

FAM End Point Data

Well FAM	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A03	FAM	Unkn	839 (1)	1522	(+) Positive
B03	FAM	Unkn	839 (Lisboa)	1559	(+) Positive
C03	FAM	Unkn	859/2 (1)	-8,17	
D03	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	127	
E02	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	-4,94	
F03	FAM	Neg Ctrl	S. aureus	0,187	

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -0,462

**Highest RFU Value:** 651

**Negative Control Average:** -0,462

**Cut Off Value:** 64,7

Cy5 End Point Data

Well Cy5	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	859/2 (1,Lisbo)	455	(+) Positive
A02	Cy5	Unkn	859/2 (9)	651	(+) Positive
A03	Cy5	Unkn	839 (1)	98,2	(+) Positive
B01	Cy5	Unkn	859/2 (2)	593	(+) Positive
B02	Cy5	Unkn	859/2 (10=	517	(+) Positive
B03	Cy5	Unkn	839 (Lisboa)	5,34	
C01	Cy5	Unkn	859/2 (3)	422	(+) Positive
C02	Cy5	Unkn	839 (1)	278	(+) Positive
C03	Cy5	Unkn	859/2 (1)	475	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	859/2 (4)	641	(+) Positive
D02	Cy5	Unkn	839 (Lisboa)	201	(+) Positive
E01	Cy5	Unkn	859/2 (5)	636	(+) Positive
E02	Cy5	Pos Ctrl	SE ATCC	256	(+) Positive
E03	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	427	(+) Positive
F01	Cy5	Unkn	859/2 (6)	392	(+) Positive
F03	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-0,462	
G01	Cy5	Unkn	859/2 (7)	475	(+) Positive
H01	Cy5	Unkn	859/2 (8)	289	(+) Positive

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average: 5**

**Mode: Percentage of Range - 10**

**Lowest RFU Value: 3917**

**Highest RFU Value: 9537**

**Negative Control Average: 6776**

**Cut Off Value: 7052**

ROX End Point Data



Well ROX	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	859/2 (1,Lisbo)	4818	
A02	ROX	Unkn	859/2 (9)	5372	
A03	ROX	Unkn	839 (1)	8539	(+) Positive
B01	ROX	Unkn	859/2 (2)	5602	
B02	ROX	Unkn	859/2 (10=)	5384	
B03	ROX	Unkn	839 (Lisboa)	9500	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	859/2 (3)	4640	
C02	ROX	Unkn	839 (1)	5464	
C03	ROX	Unkn	859/2 (1)	9537	(+) Positive
D01	ROX	Unkn	859/2 (4)	5690	
D02	ROX	Unkn	839 (Lisboa)	3917	
D03	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	6367	
E01	ROX	Unkn	859/2 (5)	5148	
E02	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	5555	
E03	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	7248	(+) Positive
F01	ROX	Unkn	859/2 (6)	4319	
F03	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	6776	
G01	ROX	Unkn	859/2 (7)	4788	
H01	ROX	Unkn	859/2 (8)	3929	

## QC Parameters

### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True	FAM:E2.	False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:A3, B3. FAM:C3.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	

Data

<b>Description</b>	<b>Value</b>	<b>Use</b>	<b>Results</b>	<b>Exclude Wells</b>	<b>All excluded wells</b>
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R^2 less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XXIII – Ensaio de RT-PCR de amostras provenientes do plano PNCS.



BB\_2017-06-23 11-01-  
21\_CC011789\_1017\_PNCS.pcrd  
23-06-2017 12:48

Report Information

**User:** BioRad/BB  
**Data File Name:** BB\_2017-06-23 11-01-  
21\_CC011789\_1017\_PNCS.pcrd  
**Data File Path:** D:\Geral\2017  
**Well Group Name:** All Wells  
**Report Differs from Last Save:** Yes

Run Setup

Run Information

**Run Date:** 23-06-2017 11:01  
**Run User:** BB  
**Run Type:** User-defined  
**Plate File:** BB nha\_*ttr*.pltd  
**ID:**  
**Notes:** Deepwell plate: P150000023344

Extracção DNA:

CSB - 11.15  
Micropipetas  
P1000 - 11.10

Thermoblock: 11.14

Preparação Mix:

CUV - F05-3  
Micropipetas  
P1000 - 11.13  
P200 - 11.8  
P20 - 11.12

Preparação Strip/ Placa:

Micropipetas  
P200 - 11.9  
P20 - 11.7  
P10 - 11.17

**Sample Volume:** 50

**Temperature Control Mode:** Calculated

**Lid Temperature:** 105

**Base Serial Number:** CC011789

**Optical Head Serial Number:** 785BR3838

Protocol

- 81:** 95,0°C for 5:00
- 82:** 55,0°C for 0:20
- 83:** 72,0°C for 0:30
- 84:** GOTO 2, 4 more times
- 85:** 95,0°C for 0:15
- 86:** 55,0°C for 0:20 Plate Read
- 87:** 72,0°C for 0:30
- 88:** GOTO 5, 39 more times

## Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/1 (1)	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/3 Lisboa										
B	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/1 (6)	Pos IAC  <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> SE ATCC										
C	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/1 Lisboa	Pos IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i>  SE Vacinal										
D	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/2 (1)	Neg IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> S. aureus										
E	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/2 (5)											
F	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/2 Lisboa											
G	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/3 (3)											
H	Unk IAC <i>nhaA_V</i> <i>Slm_ttr</i> <i>nhaA_WT</i> 1017/3 (8)											

## Quantification

**Step #:** 6

**Analysis Mode:** Fluorophore

**Cq Determination:** Single Threshold

**Baseline Method:**

ROX: Auto Calculated

FAM: Auto Calculated

Cy5: Auto Calculated

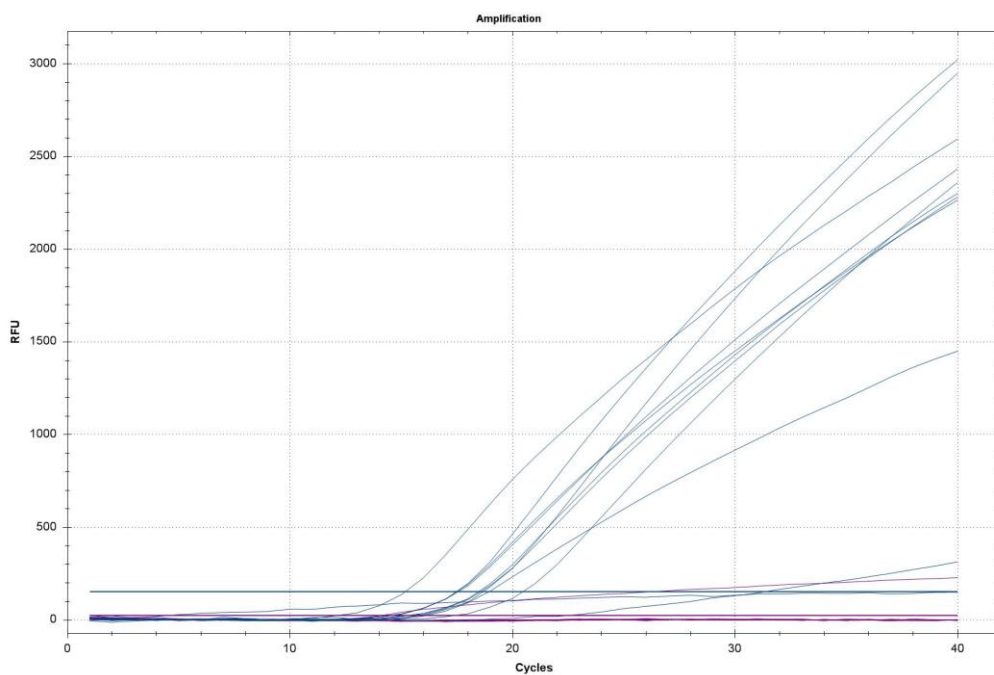
HEX: Auto Calculated

**Threshold Setting:**

ROX: 2,64, Auto Calculated

FAM: 153,69, User Defined

Cy5: 25,63, User Defined  
HEX: 512,16, Auto Calculated



## End Point

Fluorophore/Target: HEX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 49,4

**Highest RFU Value:** 9206

**Negative Control Average:** 49,4

**Cut Off Value:** 965

HEX End Point Data

Well HEX	Fluor End	Content Point Data	Sample Data	End RFU	Call
A01	HEX	Unkn	1017/1 (1)	6221	(+) Positive
A02	HEX	Unkn	1017/3 Lisboa	8188	(+) Positive
B01	HEX	Unkn	1017/1 (6)	8271	(+) Positive
B02	HEX	Pos Ctrl	SE ATCC	6625	(+) Positive
C01	HEX	Unkn	1017/1 Lisboa	9206	(+) Positive
C02	HEX	Pos Ctrl	SE Vacinal	3020	(+) Positive
D01	HEX	Unkn	1017/2 (1)	8602	(+) Positive
D02	HEX	Neg Ctrl	S. aureus	49,4	
E01	HEX	Unkn	1017/2 (5)	9161	(+) Positive
F01	HEX	Unkn	1017/2 Lisboa	8638	(+) Positive
G01	HEX	Unkn	1017/3 (3)	7932	(+) Positive
H01	HEX	Unkn	1017/3 (8)	8108	(+) Positive

Fluorophore/Target: FAM

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 146

**Highest RFU Value:** 2815

**Negative Control Average:** 146

**Cut Off Value:** 413

FAM End Point Data

Well FAM	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	FAM	Unkn	1017/1 (1)	1358	(+) Positive
A02	FAM	Unkn	1017/3 Lisboa	2441	(+) Positive
B01	FAM	Unkn	1017/1 (6)	2145	(+) Positive
B02	FAM	Pos Ctrl	SE ATCC	273	
C01	FAM	Unkn	1017/1 Lisboa	2815	(+) Positive
D01	FAM	Unkn	1017/2 (1)	2117	(+) Positive
D02	FAM	Neg Ctrl	S. aureus	146	
E01	FAM	Unkn	1017/2 (5)	2725	(+) Positive
F01	FAM	Unkn	1017/2 Lisboa	2121	(+) Positive
G01	FAM	Unkn	1017/3 (3)	2258	(+) Positive
H01	FAM	Unkn	1017/3 (8)	2164	(+) Positive

Fluorophore/Target: Cy5

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** -1,51

**Highest RFU Value:** 220

**Negative Control Average:** -0,698

**Cut Off Value:** 21,3

Cy5 End Point Data

Well Cy5	Fluor End	Content Point Data	Sample Data	End RFU	Call
A01	Cy5	Unkn	1017/1 (1)	1,93	
A02	Cy5	Unkn	1017/3 Lisboa	-1,51	
B01	Cy5	Unkn	1017/1 (6)	0,811	
C01	Cy5	Unkn	1017/1 Lisboa	0,0566	
C02	Cy5	Pos Ctrl	SE Vacinal	220	(+) Positive
D01	Cy5	Unkn	1017/2 (1)	1,66	
D02	Cy5	Neg Ctrl	S. aureus	-0,698	
E01	Cy5	Unkn	1017/2 (5)	2,01	
F01	Cy5	Unkn	1017/2 Lisboa	1,56	
G01	Cy5	Unkn	1017/3 (3)	0,0811	
H01	Cy5	Unkn	1017/3 (8)	1,67	

Fluorophore/Target: ROX

**End Cycles to Average:** 5

**Mode:** Percentage of Range - 10

**Lowest RFU Value:** 2,16

**Highest RFU Value:** 266

**Negative Control Average:** 108

**Cut Off Value:** 124

ROX End Point Data



Well ROX	Fluor End	Content Point	Sample Data	End RFU	Call
A01	ROX	Unkn	1017/1 (1)	2,16	
A02	ROX	Unkn	1017/3 Lisboa	6,38	
B01	ROX	Unkn	1017/1 (6)	136	(+) Positive
B02	ROX	Pos Ctrl	SE ATCC	195	(+) Positive
C01	ROX	Unkn	1017/1 Lisboa	35,6	
C02	ROX	Pos Ctrl	SE Vacinal	266	(+) Positive
D01	ROX	Unkn	1017/2 (1)	9,10	
D02	ROX	Neg Ctrl	S. aureus	108	
E01	ROX	Unkn	1017/2 (5)	43,7	
F01	ROX	Unkn	1017/2 Lisboa	9,30	
G01	ROX	Unkn	1017/3 (3)	100	
H01	ROX	Unkn	1017/3 (8)	51,9	

## QC Parameters

### Data

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True	FAM:B2.	False	
Unknown without a Cq	N/A	True	Cy5:A1, A2, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1.	False	
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			

## Data

<b>Description</b>	<b>Value</b>	<b>Use</b>	<b>Results</b>	<b>Exclude Wells</b>	<b>All excluded wells</b>
Std Curve R <sup>2</sup> less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

Anexo XXIV – Dados relativos aos ensaios de RT-PCR e respetiva serotipificação em amostras de produção primária reais.

Amostra	Matriz	Espécie	Vacina	ISO 6579		RT-PCR ("in house")	
				Resultado	Serotipificação*	ttr	nhaA-V
437/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
434/1	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
435/1	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
435/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
474/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
491/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
609/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
610/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
612/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
692/1	Botas para esfregaço	Bandos de galinhas poedeiras	Vacina 2	Positivo	S. Newport	Positivo	Negativo
694/1	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
694/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
695/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
696/3	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Mbandaka	Positivo	Negativo
681/1	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
681/2	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
839	Botas para esfregaço	Bandos de frangos	Não foi vacinado	Positivo	S. Typhimurium monofásica 4,[5],12:i:-	Positivo	Negativo
859	Botas para esfregaço	Bandos de reprodução	Vacina 1	Positivo	S. Enteritidis vacinal	Positivo	Positivo
1017/1	Botas para esfregaço	Bandos de galinhas poedeiras	Vacina 3	Positivo	S. Montevideo	Positivo	Negativo
1017/2	Botas para esfregaço	Bandos de galinhas poedeiras	Vacina 3	Positivo	S. Montevideo	Positivo	Negativo
1017/3	Botas para esfregaço	Bandos de galinhas poedeiras	Vacina 3	Positivo	S. Montevideo	Positivo	Negativo

Anexo XXV - Procedimento para contagem de microrganismos a 30°C em meio PCA  
(Adaptado da norma ISO 4833-1:2013 (E)).

Suspensão inicial, diluições decimais e incorporação

Enumeração

Expressão dos resultados

**Pipetar 1000µL da amostra para efetuar diluições decimais**

(e.g.,  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ )



**Incorporar em meio PCA Skim Milk**

Incubação aeróbica a 30°C por 72h



**Contagem das colónias (entre 15 a 300) formadas por qualquer microrganismo** (e.g., bactéria, levedura ou bolor)



**Expressão dos resultados**

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0.1 + n2)d}$$

Sendo que,

**N:** contagem do número total de colónias típicas para a contagem de microrganismos mesófilos.

**ΣC:** soma das colónias contadas, de pelo menos duas diluições sucessivas (*i.e.*, com a última diluição a conter pelo menos dez colónias).

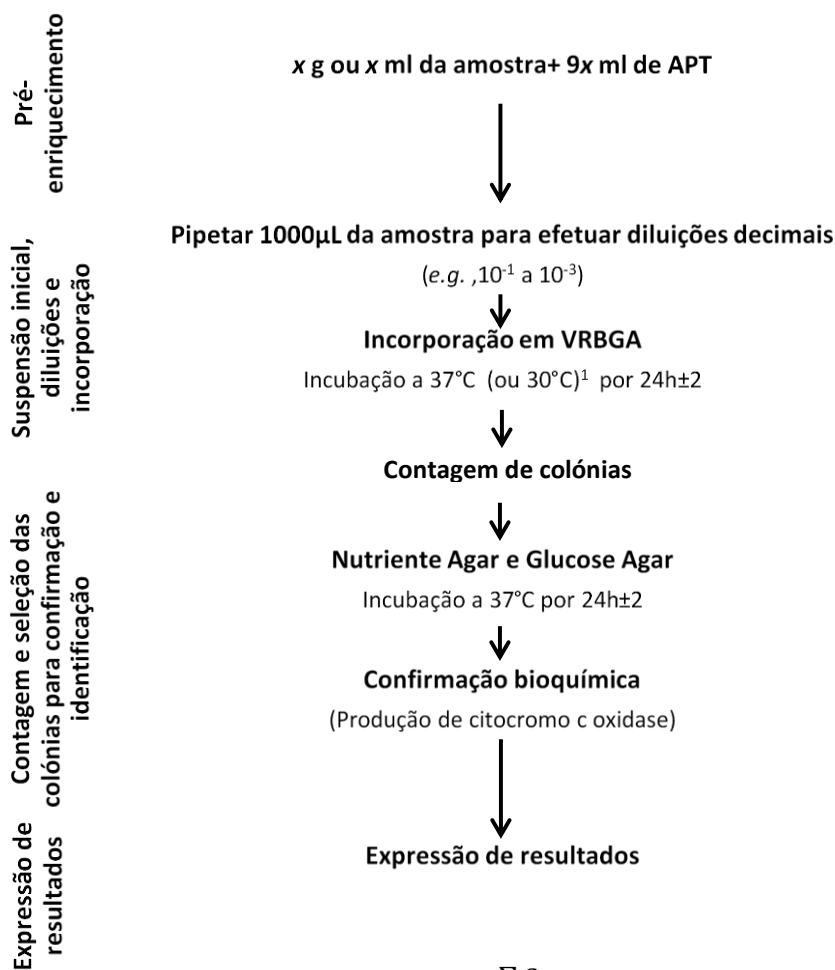
**V:** volume (em mililitros) de inóculo cada placa.

**n1:** número de placas selecionadas da primeira diluição.

**n2:** número de placas selecionadas para a segunda diluição.

**d:** valor da primeira diluição.

Anexo XXVI - Procedimento para contagem em placa de *Enterobacteriaceae* (Adaptado da norma ISO 21528-2:2004).



$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0.1 + n2)d}$$

Sendo que,

**N:** contagem do número total de colónias.

**ΣC:** soma das colónias contadas, de pelo menos duas diluições sucessivas (*i.e.*, com a última diluição a conter pelo menos dez colónias).

**V:** volume (em mililitros) de inóculo cada placa (V).

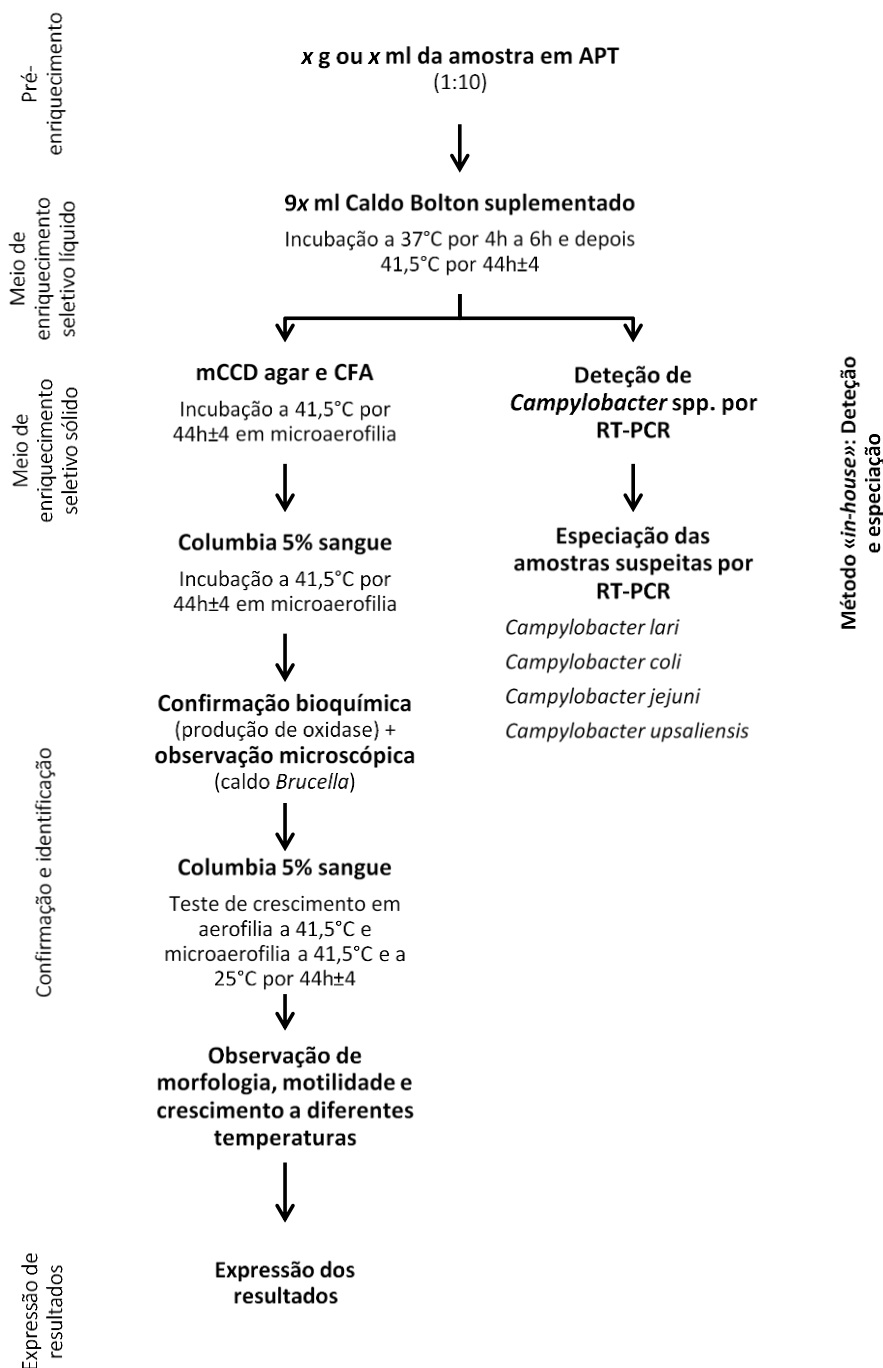
**n1:** número de placas selecionadas da primeira diluição.

**n2:** número de placas selecionadas para a segunda diluição.

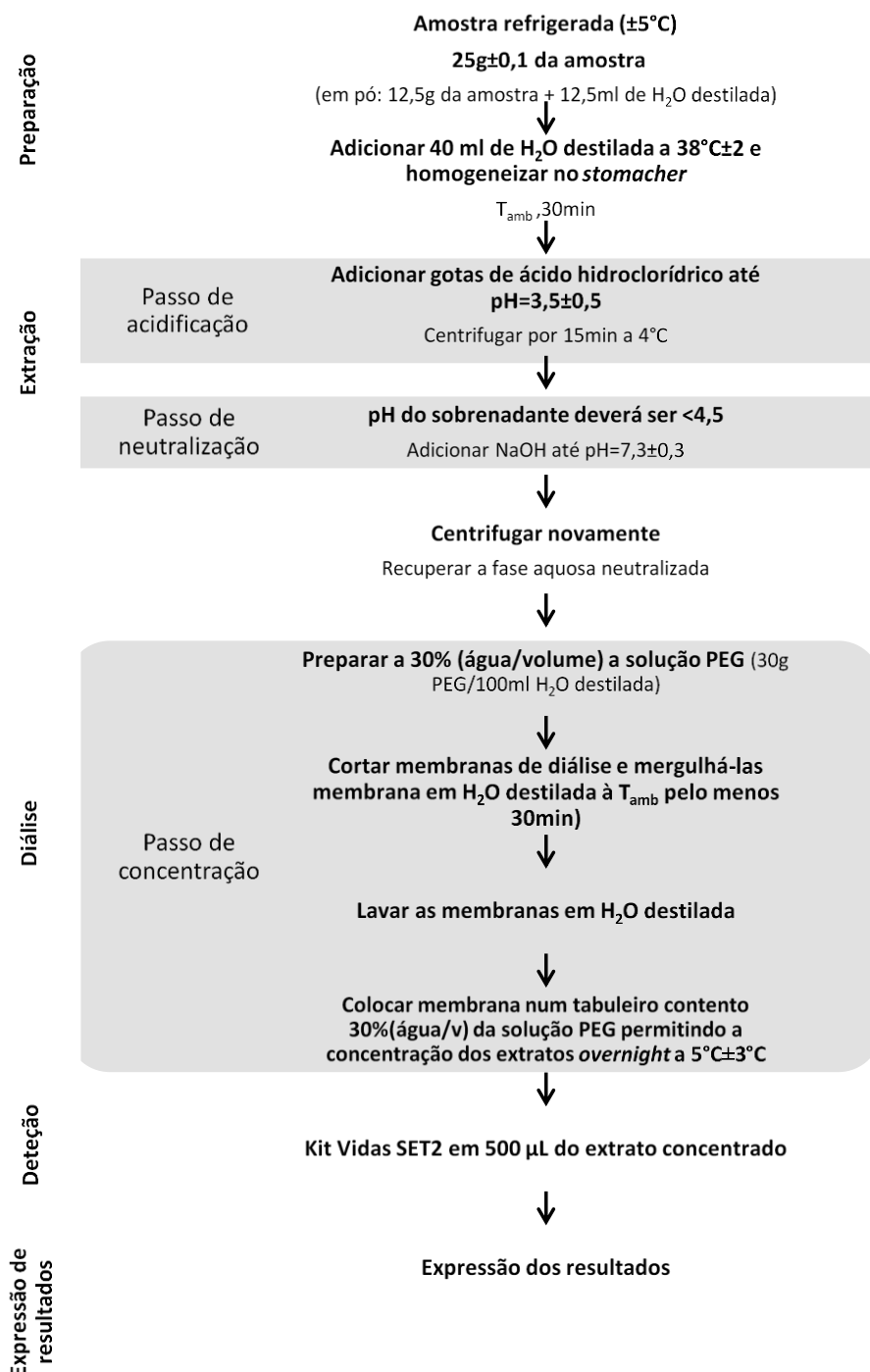
**d:** valor da primeira diluição.

<sup>1</sup> A temperatura de 37°C é geralmente utilizada quando a enumeração de *Enterobacteriaceae* serve como indicador de higiene. Em alternativa, a temperatura de 30°C pode ser escolhida quando a enumeração de *Enterobacteriaceae* é conduzida para propósitos técnicos e que incluam enterobactérias psicotróficas.

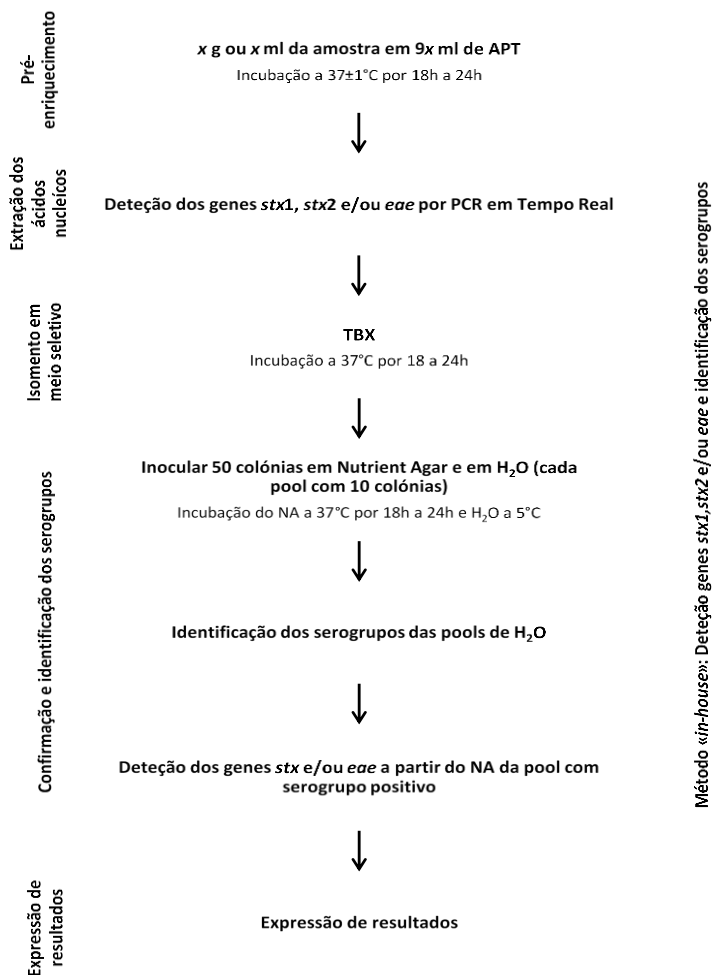
Anexo XXVII- Procedimento experimental para a deteção e especiação de *Campylobacter* spp. em alimentos (Adaptado da norma ISO/TS 10272-1:2006).



Anexo XXVIII- Procedimento para a deteção de enterotoxinas estafilocócicas do tipo SEA a SEE em queijos provenientes de leites crus, de acordo com o critério 1.1.21 do Regulamento EC N.º 2073/2005 de 25 de novembro de 2005.

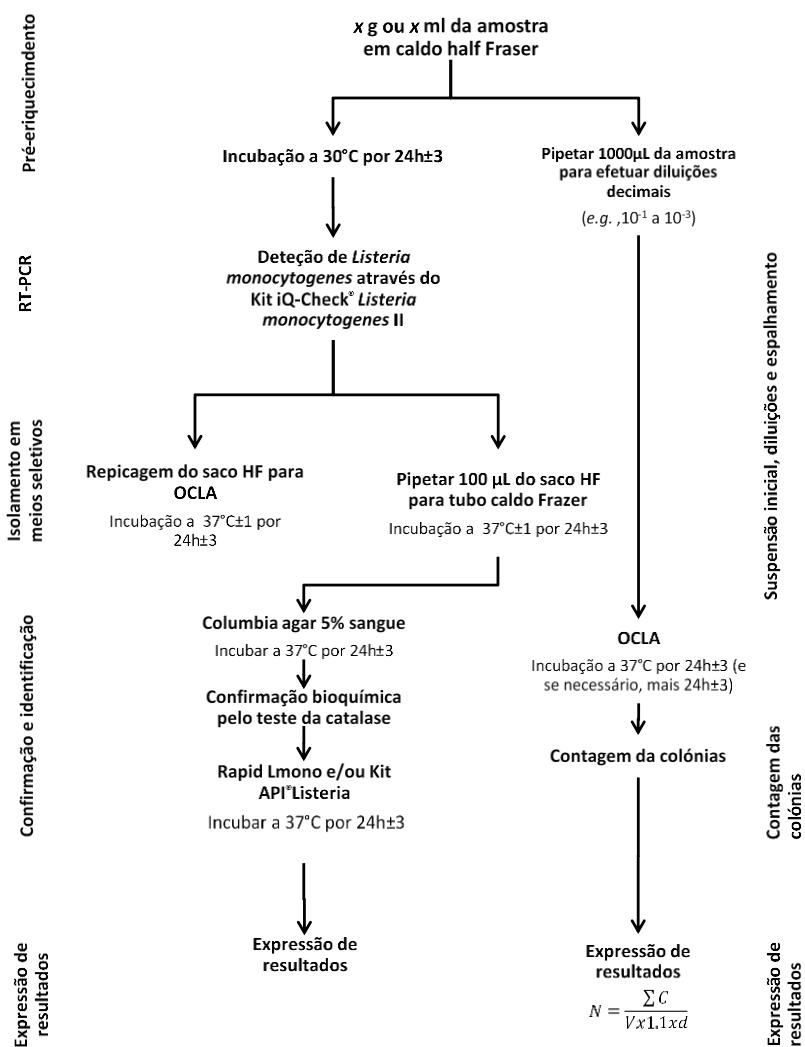


Anexo XXIX - Procedimento para a deteção dos genes mais virulentos de *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC/VTEC) e para a determinação dos serogrupos O157, O111, O26, O103 e O145 (Adaptado da norma ISO/TS 13136:2012).





Anexo XXX - Procedimento para deteção e contagem de *Listeria monocytogenes* (Adaptado da norma ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 e ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004).



Anexo XXXI – Processos internos e externos de controlo de qualidade realizados no laboratório de Microbiologia Alimentar do INIAV, I.P..

	Controlo	Frequência	Objetivo		
Internos	Qualidade Física	pH esperado			
		Quantidade pretendida ou esperada			
		Coloração esperada	A cada lote	Adequabilidade do meio	
		Opacidade esperada/presença de artefactos			
	Contaminação microbiana	Consistência/humidade/estabilidade			
		Incubação em placas ou tubos (5%)	A cada lote		
	Meios de Cultura	Crescimento microbiano	Produtividade	A cada lote	
			Seletividade		
			Especificidade		
			Branco	A cada lote	Esterilidade do processo
			Controlos Positivos / Negativos		Capacidade de confirmação e/ou de deteção do método
			Duplicados	Mensalmente	Cálculo de incerteza e critério de precisão
			Branco	A cada série de amostras	Esterilidade do processo
	Análises		Controlos Positivos / Negativos	Mensalmente	Capacidade de confirmação e/ou de deteção do método
Externos		Ensaio interlaboratoriais		Avaliar técnicos e metodologias	