



Ana Rita Vaz Amoroso *Campylobacter* – Impacte na saúde humana e
segurança alimentar



Ana Rita Vaz Amoroso ***Campylobacter* – Impacte na saúde humana e segurança alimentar**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, professor auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Dr^a Teresa Lopes, técnica superior de diagnóstico e terapêutica Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto.

Dedico este trabalho à minha avó Júlia por ter estado sempre comigo.

o júri

presidente

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Eduarda Maria Freitas Gomes da Silva Neves
professora auxiliar do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
professor auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às instituições que permitiram a realização do presente mestrado, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e ao Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), no Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA).

Agradeço a todos os colaboradores do DAN por toda a simpatia, preocupação e disponibilidade que sempre demonstraram para comigo e acima de tudo, por me terem proporcionado um ótimo ambiente de trabalho, no qual me senti inteiramente integrada.

À minha orientadora, Dra. Teresa Teixeira Lopes, pela dedicação, disponibilidade, paciência, motivação, preocupação constante e acima de tudo, por todos os conhecimentos transmitidos. Agradeço o ótimo ambiente de trabalho que me proporcionou e toda a confiança que me foi depositada, sem dúvida que foi uma ótima orientadora e para mim irá sempre ser um exemplo e uma referência a seguir. Muito obrigada!

À Dra. Margarida Saraiva, por ter aceitado a minha vinda para o DAN, e que tão bem me recebeu, por toda a disponibilidade, por todo o conhecimento transmitido, por todas as oportunidades que me proporcionou e acima de tudo, pelo apoio incondicional na elaboração da presente Dissertação de Mestrado.

Ao meu orientador do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Professor Doutor Artur Alves, por me ter possibilitado a realização desta Dissertação, pela dedicação e apoio e por todo o conhecimento transmitido. Aos meus amigos da Covilhã, Diogo, Rita, Miriam, Paulo, Eduarda e a todos os outros, por todos os momentos de verdadeira amizade, pela partilha, pelo carinho e acima de tudo pelo apoio incondicional. Obrigada por estarem sempre presentes.

À Cris, à Sara e à Lúcia, por todo o incentivo, motivação, gargalhadas e por me mostrarem o verdadeiro significado de amizade. Obrigada por me terem acompanhado nesta jornada.

À minha Sofia, a melhor companheira de aventuras, uma das melhores escolhas da minha vida, a ti, um super obrigada, por toda a motivação, por todas as palavras meigas, por todos os conselhos sinceros, por seres o meu porto seguro e por acreditares em mim. Agradeço imensamente o facto de teres estado presente dia após dia, apesar da distância que nos separa. És sem dúvida uma amiga para a vida.

À minha família, tia e prima, agradeço do fundo do coração, todo o apoio, carinho, e compreensão que demonstraram para comigo. Muito obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos meus avós, por serem o maior apoio do mundo, por todos os conselhos, por todo o carinho e por todo o amor. Obrigada.

Aos pilares da minha vida, pai e mãe. Obrigada por acreditarem em mim, por serem o meu porto de abrigo, por rirem comigo, por me apoiarem incondicionalmente e por tudo o que representam para mim. Nunca conseguirei expressar por palavras todo o amor que sinto por vós. Espero que estejam orgulhosos por mais esta etapa!

Aos meus irmãos, Daniel e Maria, obrigada pelo vosso amor, pelo companheirismo, pela amizade incondicional, pelas aventuras e por todos os momentos de ternura. Agradeço do fundo do coração por estarem presentes na minha vida.

À minha querida avó Júlia, que onde quer que esteja, estará sempre presente na minha vida e nas minhas conquistas. A si dedico este trabalho.

A todos, muito obrigada!

palavras-chave

Campylobacter, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Screening-PCR*, PCR-Convencional, *Pools* de amostras, Carne de frango, Superfícies de embalagens.

resumo

Campylobacter é a causa mais frequente de gastroenterite bacteriana na Europa. Ao contrário de outras doenças zoonóticas, a incidência europeia de infeções por *Campylobacter* aumentou na última década. Das diversas espécies de *Campylobacter* são as termófilas as mais frequentemente associadas a infeção humana, nomeadamente *Campylobacter jejuni*, responsável por cerca de 80% a 90% dos casos de campilobacteriose, seguida por *Campylobacter coli*. A maneira mais frequente de um indivíduo se infectar com *Campylobacter* é através do consumo de alimentos contaminados principalmente aves, sendo a carne de frango apontada como a principal fonte de campilobacteriose. A deteção de *Campylobacter* em alimentos e animais é geralmente baseada em cultura. Métodos moleculares, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS), são usados para identificação das espécies.

O presente projeto teve quatro objetivos. O primeiro consistiu em validar uma metodologia para detetar, em amostras de carne de frango e em esfregaços de superfícies de embalagens que acondicionavam carne de frango, a presença de *C. jejuni* e *C. coli* no meio de enriquecimento, por uma reação em cadeia da polimerase (*Screening-PCR*) baseada na amplificação do gene *mapA* de *C. jejuni* e do gene *ceuE* de *C. coli*. As amostras, após submetidas a um enriquecimento, foram isoladas em meios seletivos para deteção e posterior caracterização do microrganismo alvo, segundo a ISO 10272-1:2017. O segundo objetivo consistiu em validar a metodologia *Screening-PCR* em *pools* de amostras de carne de frango e em *pools* de esfregaços de superfícies de embalagens. Pretendeu-se ainda à monitorização da presença de *Campylobacter* em carne de frango no retalho e na superfície exterior das embalagens onde a carne de frango se encontrava acondicionada. A monitorização de embalagens é importante para avaliar o risco de contaminação pelo contacto com as mãos e superfícies entre as quais as de géneros alimentícios.

As amostras foram selecionadas por conveniência tendo sido recolhidas em supermercados e talhos na região norte de Portugal. Foram recolhidas amostras de carne de frango (n=60) e superfícies de embalagens contendo carne de frango (n=63).

A metodologia de *Screening-PCR* do meio de enriquecimento não detetou falsos negativos, tendo o resultado sido concordante com a deteção de *Campylobacter* de acordo com a ISO 10272-1:2017 em 96% das amostras ensaiadas. Em 4% das amostras foi detetada a presença de genes para *C. jejuni* e/ou *C. coli* por PCR no caldo de enriquecimento, mas não foi possível isolar essas estirpes. A metodologia de PCR evidenciou a dificuldade do isolamento de mais de uma espécie na mesma amostra.

A monitorização da presença de *Campylobacter* em 10 gramas de carne de frango e em embalagens de carne de frango colocadas no retalho permitiu detetar a presença respetivamente em 58% e 27% das amostras ensaiadas. Foi detetada a presença de *C. jejuni* em 88% e *C. coli* em 25% das amostras positivas para *Campylobacter* spp. Nas amostras positivas no *Screening-PCR* para ambas as espécies, não foi possível isolar as duas espécies em 81% das amostras.

Estes números mostram a importância de consciencializar a população dos cuidados necessários de higiene na manipulação de carne de frango, na separação dos géneros

alimentícios crus e das respetivas embalagens de alimentos que se encontram prontos para sere consumidos, bem como dos que não vão ter um processo térmico e das superfícies utilizadas no seu processamento. A presente dissertação apresenta uma metodologia que rapidamente diferencia os casos negativos dos prováveis positivos, sendo só nestes, necessário prosseguir o ensaio para confirmação da presença de *Campylobacter* spp. por isolamento de estirpes. A utilização de *pools* de amostras foi validada o que permitiu diminuir gastos e aumentar número de amostras a ser testadas por reação, em futuros estudos de monitorização. Ficámos cientes que a identificação de espécies de *Campylobacter* presentes nas amostras terá de ser realizada num maior número de colónias isoladas do que as 5 estabelecidas para a deteção do género *Campylobacter*. As estirpes isoladas neste estudo poderão ser utilizadas em estudos de avaliação de resistência de *Campylobacter* a antimicrobianos, pesquisar fatores de virulência, comparar com estirpes isoladas em humanos, animais e no ambiente, entre outros estudos que irão ajudar ao conhecimento da epidemiologia da campilobacteriose e facilitar a gestão do risco.

keywords

Campylobacter, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Screening-PCR, Conventional PCR, Sample pools, Chicken meat, Packaging surfaces.

abstract

Campylobacter is the most common cause of bacterial gastroenteritis in Europe. Unlike other zoonotic diseases, the number of infections by *Campylobacter* has increased in the last decade. Of the various species of *Campylobacter*, thermophilic *Campylobacter* are those which are most commonly associated with human infection, specifically *Campylobacter jejuni* which accounts for approximately 80%-90% of campylobacteriosis cases followed by *Campylobacter coli*. Infection by *Campylobacter* is most frequently spread through the consumption of contaminated foods, particularly poultry. Chicken meat has been considered the main source of contamination by *Campylobacter*.

The most used and trusted method of detection of *Campylobacter* in food and animals is by culture. Molecular methods Polymerase Chain Reaction (PCR) and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) are used in the identification of species.

There were four aims to this project; firstly, the validation of a screening method used to detect the presence of *C. jejuni* and *C. coli* in both poultry samples and swabs of the outer packaging of poultry in an enrichment medium by screening for polymerase chain reaction (PCR) based on the amplification of the *mapA* gene in *C. jejuni* and the *ceuE* gene in *C. coli*. After being enriched samples were isolated in selective mediums for the detection and later characterization of the targeted microorganism according to ISO 10272-1:2017. The second aim of this project was the implementation and validation of the screening-PCR method by pooling chicken and packaging swab samples. It was also intended to monitor the presence of *Campylobacter* in commercially sold chicken, and on the outer packaging of poultry. Testing packaging is crucial in assessing the risk of contamination through contact with our hands and contact with other surfaces, namely food surfaces.

Samples were selected based on convenience and were taken from both supermarkets and butchers in the northern region of Portugal. Poultry (n=60) and poultry packaging (n=63) samples were used.

The conventional combined PCR and enrichment-based screening method did not detect any false negatives and the results were in line with ISO 10272-1:2017 in the detection of the *Campylobacter* species in 96% of the test samples. The presence of *Campylobacter* genes was detected in 4% of the samples by using the Screening-PCR, however it was not possible to isolate these strains.

The PCR method proved inefficient in isolating more than one species in the same sample.

The monitoring of the presence of *Campylobacter* in 10 grams of commercially sold chicken and packaging enabled detection of a respective 58% presence and 27% presence in the test samples. *C. jejuni* was detected in 88%

and *C. coli* was detected in 25% of the samples which testes positive for *Campylobacter* spp. In the positive samples in Screening-PCR for both species, it was not possible to isolate the two species in 81% of the samples. These figures emphasize the need to raise the public's awareness as to proper hygiene practices when handling poultry and surfaces used when processing chicken as well as the need to correctly separate raw foodstuffs and respective packaging from ready-to-eat foods and foods that do not require thermal processing. The present thesis presents a methodology that quickly differentiates the negative from the probable positive cases, being only in these, it is necessary to continue the test to confirm the presence of *Campylobacter* spp. Isolation of strains. The use of sample pools has been validated, which allows reducing costs and increasing sampling in future monitoring studies. We were aware that the identification of *Campylobacter* species present in the samples will have to be carried out in a greater number of isolated colonies. The strains isolated in this study can be used in studies to evaluate *Campylobacter* resistance it antimicrobials, evaluate virulence factors, compare with strains isolated in humans, animals and the environment, among other studies that will help to understand the epidemiology of campilobacteriosis and facilitate risk management.

Índice	
agradecimentos.....	i
palavras-chave	ii
resumo.....	iii
keywords	v
abstract.....	v
Índice de figuras	x
Índice de Tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas	xvii
1. CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS	1
2. INTRODUÇÃO.....	5
2.1 <i>Campylobacter</i> spp.....	6
2.2 Epidemiologia.....	7
2.3. Mecanismos de Patogenicidade	11
2.4. Prevenção e Controlo	13
2.5. Métodos de Detecção	15
3. METODOLOGIA	18
3.1. Estirpes Bacterianas	19
3.2. Seleção das Amostras.....	19
3.3. Preparação das Amostras	20
3.4. Condições de Cultura e Isolamento.....	20
3.5. Testes de confirmação das estirpes para o género <i>Campylobacter</i>	23
3.6. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	25
3.6.1. Extração e Purificação do ADN.....	26

3.7. Configuração da PCR (Polymerase Chain Reaction)	28
3.8. Eletroforese em gel de agarose	30
3.9. Interpretação dos resultados.....	30
3.10. Otimização das condições da PCR	31
3.10.1. PCR em amostras Simples	31
3.11. Limites de Detecção.....	32
3.11.1. Limites de Detecção da Reação de PCR convencional a partir de ADN extraído de colónias.....	32
3.11.2. Otimização das condições do <i>Screening-PCR</i> a partir do ADN obtido do meio de enriquecimento Bolton Broth	32
3.12. <i>Screening-PCR</i> de pools de amostras	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Protocolo de verificação de <i>Pools</i> de amostras, no <i>Screening-PCR</i>	39
4.2. Resultados do <i>Screening-PCR</i> e resultados obtidos pela ISO 10272-1:2017 em amostras de carne de frango e em esfregaços de superfícies de embalagens.	45
4.3- Presença das espécies de <i>Campylobacter</i> em amostras de carne de frango e em superfícies de embalagens de carne de frango	47
4.3.1- Presença de <i>Campylobacter</i> em amostras de carne de frango	47
4.3.2- Presença de <i>Campylobacter</i> em amostras de superfícies de embalagens de carne de frango	48
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	51
5.1 Conclusão	52
5.2. Perspetivas Futuras.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS	67
Anexo A – Diagrama de procedimentos da metodologia usada.....	68
Anexo B- Composição de meios de cultura e reagentes	69

Anexo C- Tabela dos resultados do <i>Screening-PCR</i> e da Identificação da Espécie..	71
Anexo D- Visualização dos produtos de PCR resultantes do <i>Screening-PCR</i> a partir do ADN extraído do meio de enriquecimento.....	75
Anexo E- Visualização dos produtos de PCR resultantes na identificação da espécie das colónias isoladas.....	95

Índice de figuras

Figura 1 -Reservatórios, vias de contaminação e veículos de exposição de <i>Campylobacter</i> (Wagenaar et al., 2013).....	9
Figura 2 -Crescimento de <i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559 no meio seletivo mCCDA ...	22
Figura 3 -Crescimento de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291 no meio de Gelose de sangue.....	23
Figura 4 -Morfologia de <i>Campylobacter</i> (Coloração de Gram).....	24
Figura 5 -Pesquisa de Citocromo C oxidase	25
Figura 6 -Limite de deteção para ocorrer a amplificação através de PCR	32
Figura 7 -Amplificação por PCR de genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> , de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/13808; 19/13809; 19/16670 e 19/16671.....	34
Figura 8 - <i>Screening-PCR</i> – Estudo de limites de deteção através da amplificação dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i>	35
Figura 9 -Procedimento de elaboração de uma <i>pool</i>	37
Figura 10 - <i>Screening-PCR</i> da <i>pool</i> contaminada de amostras de esfregaços de superfícies de embalagens que acondicionam carne de frango	40
Figura 11 -Amplificação, dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> em <i>pools</i> de géneros alimentícios e em <i>pools</i> de esfregaços de superfícies de embalagens	43
Figura 12 -Amplificação do gene <i>mapA</i> nas amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 20/13263; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13276 e 20/13277.	44
Figura 13 -Amplificação do gene <i>ceuE</i> nas amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 20/13263; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13276 e 20/13277.	45
Figura 14 -Diagrama de procedimentos para a deteção de <i>Campylobacter</i> spp. (Adaptado da ISO 10272-1:2017.	68

Figura 15 -Amplificação por PCR de genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> , de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/13808; 19/13809; 19/16670 e 19/16671.....	75
Figura 16 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> , de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/27906 e 20/27907.....	76
Figura 17 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/27906 e 20/27907.....	76
Figura 18 -Amplificação por PCR dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/28910 e 19/28911.....	77
Figura 19 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> , de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/34547 e 19/34548.....	77
Figura 20 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> , de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/34547 e 19/34548.....	78
Figura 21 -Amplificação por PCR dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1979; 20/1980; 20/1981 e 20/1982.....	79
Figura 22 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> , de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1869; 20/1983; 20/1984; 20/1985; 20/1986; 20/1987 e 20/1988.	80
Figura 23 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1869; 20/1983; 20/1984; 20/1985; 20/1986; 20/1987 e 20/1988.	80
Figura 24 -Amplificação por PCR dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das	

<i>pools</i> das amostras 20/4649 a 20/4653; <i>pool</i> das amostras 20/4644 a 20/4648); 20/4655 e 20/4656.....	81
Figura 25 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/6071; 20/6072; 20/6073; 20/6074; 20/6075 e 20/6076	82
Figura 26 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/6071; 20/6072; 20/6073; 20/6074; 20/6075 e 20/6076	82
Figura 27 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/4649; 20/4650; 20/4651; 20/4652; 20/4653; 20/6256; 20/6257; 20/6258; 20/6259; 20/6260; 20/6261; 20/6262;20/6263; 20/6264; 20/6266; 20/6267; 20/6268; 20/6269; 20/6270; 20/6271; 20/6272; 20/6273; 20/6274.....	83
Figura 28 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/4649; 20/4650; 20/4651; 20/4652; 20/4653; 20/6256; 20/6257; 20/6258; 20/6259; 20/6260; 20/626.....	84
Figura 29 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/7319; 20/7320; 20/7321; 20/7322; 20/7910; 20/7911; 20/7912; 20/7913; 20/7914; 20/7915; 20/7916; 20/7917; 20/7918; 20/7319; 20/7920; 20/7921; 20/7922; 20/7923; 20/7924.	85
Figura 30 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/7319; 20/7320; 20/7321; 20/7322; 20/7910; 20/7911; 20/7912; 20/7913; 20/7914; 20/7915; 20/7916; 20/7917; 20/7918; 20/7319; 20/7920; 20/7921; 20/7922; 20/7923; 20/7924.	86
Figura 31 -Deteção de limites de deteção para amostras alimentares e amplificação dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração - por coluna de	

sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/12224; 20/12225; 20/12226; 20/12227; 20/12228; 20/12229; 20/12230; 20/6273(repetição) 87

Figura 32-- Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 2063; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13277. 88

Figura 33- Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 20/13263; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13277 89

Figura 34-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das *pools* 20/16201; 20/16202; 20/16203 e 20/16204 89

Figura 35-Amplificação por PCR dos genes *mapA* e *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento da *pool* das amostras 20/16211 a 20/16215; *pool* das amostras 20/16217 a 20/16221; amostra 20/16223; amostra 20/16224. 90

Figura 36-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/16217; 20/16218; 20/16219; 20/16220; 20/16221; *pool* das amostras 20/16683 a 20/16687; 20/16688; 20/16689; 20/16690; 20/16691; 20/16692; 20/16693; 20/16694 91

Figura 37-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento da *pool* das amostras 20/16683 a 20/16687; amostra 20/16688; 20/16689; 20/16690; 20/16691; 20/16692; 20/16693; 20/16694; *pool* 20/18086 92

Figura 38 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> e ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/16683; 20/16684; 20/16685; 20/16686 e 20/16687.....	92
Figura 39 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/16683; 20/16684; 20/16685; 20/16686 e 20/16687.....	93
Figura 40 -Repetição da amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/6075; 20/6269; 20/12226.....	93
Figura 41 -Repetição da amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1982; 20/6075; 20/6271; 20/6273; 20/16690	94
Figura 42 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 19/13808; 19/13809; 19/27906; 19/27907; 19/28911; 20/1869; 20/1981; 20/1983; 20/1984; 20/4650.....	95
Figura 43 -Amplificação por PCR do gene <i>ceuE</i> de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/1982; 20/1983; 20/1984; 20/6075; 20/6266; 20/6267.....	96
Figura 44 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/4651; 20/4652.	96
Figura 45 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/6075; 20/6261; 20/6266; 20/6267; 20/6268; 20/6269.....	96
Figura 46 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/6271; 20/6272; 20/6273; 20/6274; 20/7914; 20/7917; 20/7920; 20/7921; 20/7922; 20/7924	96
Figura 47 -Amplificação por PCR do gene <i>mapA</i> de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/7916; 20/7918; 20/13257; 20/13261; 20/13262; 20/13263.....	96

Figura 48-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/12226; 20/12227; 20/12228; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13277 96

Figura 49-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/16217; 20/16218; 20/16220; 20/16221; 20/16224..... 96

Figura 50-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/16687; 20/16688; 20/16689; 20/16690; 20/16691; 20/16692; 20/16694..... 96

Figura 51-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/6268; 20/6271; 20/6273; 20/7922; 20/13265; 20/13266..... 96

Figura 52-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/13268; 20/13269; 20/16687; 20/16690; 20/16694..... 96

Índice de Tabelas

Tabela 1- Testes de confirmação para o género <i>Campylobacter</i> (ISO10272:2017).	25
Tabela 2- Primers utilizados para a deteção das duas espécies do género <i>Campylobacter</i> , <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> (DTU, 2013).....	26
Tabela 3- Volumes utilizados para mistura para deteção dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> por PCR convencional, a partir do ADN do meio de enriquecimento (adaptado do protocolo da DTU(DTU, 2013).....	29
Tabela 4- Volumes utilizados na preparação da mistura para a deteção dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> , a partir do ADN de colónias isoladas	29
Tabela 5- Perfil térmico e tempo a programar no termociclador para amplificação os genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> (DTU, 2013)	30
Tabela 6- Resultados da amplificação dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> em <i>pools</i> de esfregaços de superfícies de embalagens e nas amostras individualizadas que constituem as <i>pools</i> .	41
Tabela 7- Resultados da amplificação dos genes <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> em <i>pools</i> de géneros alimentícios e nas amostras individualizadas que constituem as <i>pools</i>	42
Tabela 8- Resultados obtidos no <i>Screening-PCR</i> e resultados obtidos pela confirmação com base na ISO 10272-1:2017 em amostras de carne de frango e em esfregaços de superfícies, quanto à pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp	46
Tabela 9- Resultados da presença das espécies de <i>Campylobacter</i> em amostras de carne de frango e em superfícies de embalagens de carne de frango, através do <i>Screening-PCR</i> e identificação das espécies de <i>Campylobacter</i> das colónias isoladas através do PCR convencional.....	49
Tabela 10- Tabela dos resultados do <i>Screening-PCR</i> e do Isolamento das estirpes.....	71

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
aw	Atividade de água
CadF	<i>Campylobacter</i> adhesin to Fibronectin (Proteína de adesão de <i>Campylobacter</i> à fibronectina)
CapA	<i>Campylobacter</i> autotransporter protein A (Proteína de adesão de <i>Campylobacter</i>)
CDT	<i>Cytolethal Distending Toxin</i> (Toxina bacteriana de distensão citoletal)
CdtA	<i>Cytolethal distending toxin A</i> (Sub-unidade A da toxina de distensão citoletal)
CdtB	<i>Cytolethal distending toxin B</i> (Sub-unidade B da toxina de distensão citoletal)
CdtC	<i>Cytolethal distending toxin C</i> (Sub-unidade C da toxina de distensão citoletal)
CT	<i>Cholera Toxin</i> (Toxina da Cólera)
DTU	<i>Technical University of Denmark</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EURL-AR	EU Reference Laboratory – Antimicrobial Resistance.
SGB	Síndrome Guillian Barré
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LPS	Lipopolissacáridos
LT	<i>Heat-labile enterotoxin</i> (Toxina termo-lábil)
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight mass spectrometry</i>
mCCDA	Modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pb	Pares de bases
PHE	<i>Public Health England</i>
PMA	<i>Propidium monoazide</i> (Monoazida de propídeo)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
UE	União Europeia
UFC	Unidade formadora de colónia
VBNC	<i>Viable but nonculturable</i> (Viável mas não cultivável)
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> (Sequenciação total do genoma)

1. CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS

A maioria das infeções bacterianas adquiridas através do consumo de alimentos têm como principal fonte de transmissão alimentos de origem animal (Heredia & García, 2018). A dieta do consumidor tem vindo a sofrer alterações ao longo dos tempos, verificando-se um aumento no consumo de proteína e, conseqüentemente, um aumento no consumo de carne (Dhama *et al.*, 2013). A carne de frango tem sido das mais consumidas mundialmente, devido ao elevado teor proteico (Geissler & Powers, 2017). Este fator leva a que ocorra um aumento na produção animal e no processamento de carne, que, por sua vez, conduz a um aumento do risco de microrganismos patogénicos serem transmitidos por alimentos (Heredia & García, 2018).

De acordo com os dados da *European Food Safety Authority* (EFSA) e do *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) a campilobacteriose é a zoonose mais notificada na Europa, sendo desde 2005 a causa mais comum de gastroenterite em humanos, apresentando-se estável quanto ao número de casos no período de 2014 a 2018 (EFSA-ECDC, 2019, Oleastro *et al.*, 2014).

As espécies bacterianas pertencentes ao género *Campylobacter* encontram-se amplamente distribuídas em animais de sangue quente (WHO, 2020), apresentando uma relação comensal com o hospedeiro (Facciola *et al.*, 2017). O género *Campylobacter* é comensal do trato gastrointestinal de muitos animais selvagens e animais domésticos incluindo animais de companhia como cães e gatos. Está frequentemente associado a espécies aviárias utilizadas para consumo humano. As aves, em particular as aves domésticas, são o hospedeiro de eleição, estando grande parte da produção mundial de aves colonizada por *Campylobacter* (Facciola *et al.*, 2017). Estudos de fontes de transmissão de campilobacteriose humana estimam que 20%-40% dos casos se atribuem ao manuseamento e consumo de carne de frango (EFSA, 2011).

De entre as diferentes espécies de *Campylobacter*, as termófilas são as que se encontram mais relacionadas com infeções gastrointestinais (Hu & Kopecko, 2003). No ano de 2018, dos casos relatados de campilobacteriose na União Europeia (UE), 83,9% foram provocados por *C. jejuni*, 10,3% por *C. coli*, 0,1% por *C. lari*, 0,1% *C. upsaliensis* e 0,1% por *C. fetus* (EFSA-ECDC, 2019). Das espécies de *Campylobacter* termófilas, as mais frequentemente associadas a infeção por *Campylobacter* no Homem são *C. jejuni* e *C. coli*.

A suscetibilidade a uma infeção por *Campylobacter* está relacionada com as características específicas do hospedeiro como: a genética, a idade, a imunidade, terapia iniciada (medicação);

com fatores específicos da estirpe, que lhe conferem virulência (Agnetti *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2011); como a dose ingerida; o veículo onde se encontra o agente infetante e as condições no local da colonização, tais como a acidez do estômago e microbiota intestinal (Dicksved *et al.*, 2014; Janssen *et al.*, 2008). A sintomatologia da infeção por *Campylobacter* geralmente é caracterizada por diarreia (habitualmente com sangue), febre e cólicas estomacais podendo este quadro ser acompanhado por náuseas e vómitos. Os sintomas começam 2 a 5 dias depois do indivíduo ingerir um alimento contaminado com *Campylobacter* e têm a duração de uma semana (WHO, 2020). Por vezes, as infeções por *Campylobacter* podem repercutir-se noutras patologias, como a síndrome do intestino irritável, paralisia temporária ou artrite. Em pessoas com o sistema imunológico debilitado, infeções por *Campylobacter* ocasionalmente pode dar origem a patologias mais graves como septicémias, artrite reativa e síndrome de Guillain Barré (SGB) (Moore *et al.*, 2005; Wassenaar & Blaser, 1999).

Em Portugal, os dados relativos à infeção por *Campylobacter* são escassos uma vez que só a partir do ano de 2014 é que a campilobacteriose passou a ser uma doença de notificação obrigatória (DGS, 2016).

Apesar da vigilância na maioria dos estados-membro da UE, os casos notificados não representam a totalidade dos casos de infeções por *Campylobacter* (EFSA-ECDC, 2019). Alguns países mostraram um aumento de casos notificados, nomeadamente Portugal. Este aumento pode ser resultante do avanço nos sistemas de vigilância, melhores diagnósticos clínicos de rotina, um reforço na obrigatoriedade de os laboratórios de análises clínicas terem um sistema de notificação de resultados positivos, mas também, poderá ser um aumento resultante da exposição ao agente patogénico.

Pelo exposto, foi considerado pertinente desenvolver um estudo sobre *Campylobacter* e qual o seu impacte na Saúde Humana e na Segurança Alimentar definindo como objetivos específicos:

- validar uma metodologia que utiliza uma reação em cadeia da polimerase a partir do caldo de enriquecimento (*Screening-PCR*), para detetar a presença de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de carne de frango e em esfregaços de superfícies de embalagens que acondicionam carne de frango;

1-Contextualização e Objetivos

- implementar e validar a metodologia de *Screening-PCR* a partir de *pools* de amostras de carne de frango e de *pools* de esfregaços de superfícies de embalagens, onde estas se encontravam acondicionadas;
- monitorizar a presença de *Campylobacter* spp. em carne de frango no retalho;
- monitorizar a presença de *Campylobacter* spp. na superfície de embalagens que acondicionam carne de frango no retalho.

2. INTRODUÇÃO

2.1 *Campylobacter* spp.

Este género bacteriano foi observado e identificado pela primeira vez, em 1886, por Theodor Escherich, em amostras de fezes de crianças cuja causa de morte foi diagnosticada como “cólera infantil”, onde foi detetado um novo microrganismo que denominou por “pequeno *Vibrio*” (King & Adams, 2008; Samanta & Bandyopadhyay, 2019; Vandamme *et al.*, 2010). Em 1963, Sebal e Véron diferenciaram as bactérias da família *Vibrionaceae* e, devido à falta de semelhanças entre esta família bacteriana e os microrganismos denominados por “pequeno *Vibrio*”, foi proposto um novo género bacteriano, *Campylobacter* (Tresse *et al.*, 2017; Whitehouse *et al.*, 2018).

O género *Campylobacter* é constituído por bactérias gram-negativo com morfologia de bacilo, com forma espiral ou curva, muito fino e comprido (0,2-0,8 µm de largura e 0,5-5 µm de comprimento) (Bolton, 2015; Kaakoush *et al.*, 2015). A maioria é móvel apresentando um movimento típico em espiral conhecido como “corkscrew”, devido à presença de um flagelo polar numa ou em ambas as extremidades das células (Bolton, 2015; Samanta & Bandyopadhyay, 2019). São bactérias produtoras de oxidase e quimiorganotróficas, cuja fonte de energia são aminoácidos e intermediários do ciclo carboxílico (Debruyne *et al.*, 2008). São microaerófilas, requerendo uma atmosfera com concentrações de 5% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e 85% de azoto (Facciola *et al.*, 2017). Algumas espécies deste género são termófilas, ou seja, têm a capacidade de crescer a temperaturas entre os 30° C e os 47° C, sendo a temperatura ótima de crescimento 41,5° C, não apresentando crescimento abaixo dos 30° C (Bhunia, 2008; Garénaux *et al.*, 2008; Levin, 2007).

Tanto a sua capacidade de multiplicação como a de crescimento encontram-se dependentes do stresse osmótico provocado pelo meio envolvente em que se encontram observando-se crescimento quando:

- 1) as concentrações de cloreto de sódio são inferiores a 2%, sendo a concentração ótima para o seu crescimento 0,5%;
- 2) os níveis de atividade de água (aw) se encontram acima de 0,987, sendo 0,997 apresentado como valor ideal para o seu crescimento;
- 3) os níveis de pH se encontram entre 6,5 e 7,5 (Chlebicz & Ślizewska, 2018; Facciola *et al.*, 2017; Levin, 2007; Senok & Botta, 2009).

Perante condições adversas como baixos níveis nutricionais ou ambientes aeróbios, *Campylobacter* possui uma elevada capacidade de sobrevivência em biofilmes (Chlebicz & Śliżewska, 2018; Reuter *et al.*, 2010). De forma a aumentar a sua resistência estas bactérias têm a capacidade de criar biofilmes em cooperação com outros microrganismos (Ica *et al.*, 2012) e consegue ainda assumir um estado viável mas não cultivável (VBNC) (Senok & Botta, 2009). Quando as células bacterianas se encontram nesta fase de dormência frequentemente sofrem alterações na sua morfologia, adquirindo a forma de cocos e uma redução de tamanho (Bronowski *et al.*, 2014). Apesar de continuarem possuidoras de flagelo perdem a sua mobilidade mas a capacidade de adesão aos alimentos e às células intestinais *in vivo* permanece inalterada (Patrone *et al.*, 2013). As espécies de *Campylobacter* são geneticamente diversificadas (Meinersmann *et al.*, 2002) e relativamente frágeis dificultando a sua deteção através de métodos culturais em laboratório (Bronowski *et al.*, 2014).

Com base na análise filogenética da sequência 16S ARNr, este género pertence à classe das ϵ -proteobactérias, nomeadamente à família *Campylobacteriaceae* (Liu *et al.*, 2018; Tresse *et al.*, 2017; Vandamme *et al.*, 1991).

2.2 Epidemiologia

Campylobacter é um microrganismo comumente encontrado no intestino de animais de sangue quente, nomeadamente em animais selvagens, animais domésticos e também em animais de produção (Damborg *et al.*, 2004; Facciola *et al.*, 2017; WHO, 2020).

A transmissão de *Campylobacter* ocorre por via fecal-oral através do consumo de água e alimentos contaminados (Igwaran & Okoh, 2019; Newell *et al.*, 2001; Ternhag *et al.*, 2005).

Estima-se que a fonte de transmissão, em cerca de 80% dos casos de campilobacteriose, tem origem em aves (EFSA BIOHAZ, 2010). A carne de frango é apontada como o principal veículo de transmissão de *Campylobacter*, nomeadamente através da manipulação ou consumo de carne crua ou mal cozinhada (Bronowski *et al.*, 2014; EFSA-ECDC, 2019; Sheppard *et al.*, 2009; Uyttendaele *et al.*, 2006).

Existem vários fatores que influenciam a presença de *Campylobacter* na carne de frango. Um deles é a elevada sensibilidade à desidratação, sendo esta apontada como a causa para uma

elevada concentração de *Campylobacter* muitas vezes encontrada em carnes de aves, devendo-se ao facto das carcaças se manterem húmidas após o abate, sendo embaladas logo de seguida possibilitando a sobrevivência prolongada deste microrganismo neste tipo de género alimentício (ACMSF, 2019). Outro fator importante é o facto do género *Campylobacter* possuir a capacidade de criar biofilmes, o que lhes confere maior resistência às lavagens e desinfecções em matadouros (Koolman *et al.*, 2015), além do que, a utilização de água com cloro não se revelou eficaz na desinfecção de carcaças de aves (Northcutt *et al.*, 2005). Mesmo apresentando uma elevada sensibilidade ao oxigénio têm sido observadas estirpes nomeadamente de *Campylobacter jejuni*, que apresentam uma hiperaerotolerância e que geralmente estão presentes em carnes de aves (Oh *et al.*, 2015). As células adaptadas ao stress oxidativo são relatadas como sendo as mais virulentas (Mihaljevic *et al.*, 2007), existindo isolados e com um período prolongado de sobrevivência em carnes de frango (Oh *et al.*, 2017), sendo estes pertencentes a complexos clonais frequentemente implicados em infeção humana (Oh *et al.*, 2015, 2017).

De acordo com um estudo da literatura, cerca de 60% a 80% das carnes de aves presentes em supermercados estão contaminadas com *Campylobacter*, mais concretamente com *C. jejuni* (Bull *et al.*, 2006). As células bacterianas do género *Campylobacter* têm a capacidade de contaminar tanto o exterior como o interior da carcaça do frango, estando este fator relacionado com o excessivo manuseamento durante as etapas de processamento (On & Jordan, 2003).

Atualmente também existe uma maior preocupação relativamente à possibilidade de transmissão do microrganismo a partir da parte exterior de embalagens onde se encontram acondicionadas carnes de frango (Burgess *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2019). De acordo com estudos realizados no Reino Unido, 3 a 6% das embalagens que acondicionavam carne de aves encontravam-se contaminadas com *Campylobacter*. Na Nova Zelândia, cerca de 24% das embalagens apresentavam positividade para o género *Campylobacter* (Burgess *et al.*, 2005; EFSA, 2010).

A transmissão pode ainda ocorrer através do consumo de leite cru, vegetais e carnes vermelhas mal cozinhadas (Igwara & Okoh, 2019; Rapp *et al.*, 2012). Diferentes veículos contribuem para a disseminação de *Campylobacter*, podendo também ocorrer a transmissão através de insetos, como a mosca (Facciola *et al.*, 2017), assim como por via de contacto com material fecal de aves selvagens em espaços públicos com jardins (Waldenström *et al.*, 2010). Outros fatores de risco

incluem nadar em águas superficiais contaminadas, assim como o contacto direto com animais infetados (EFSA-ECDC, 2019). As vias de transmissão e contaminação de *Campylobacter* encontram-se esquematizadas na Figura 1.

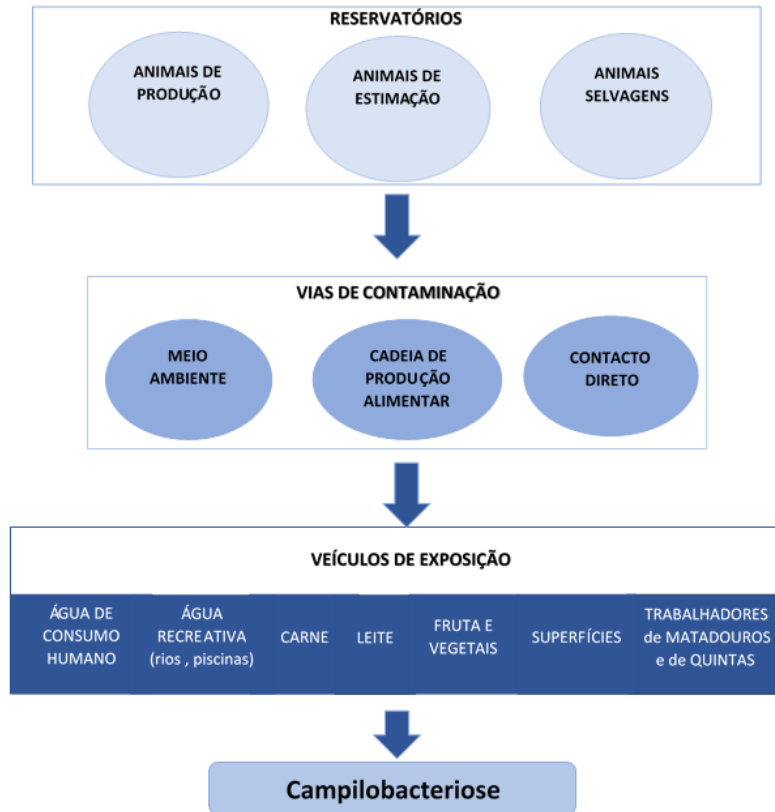


Figura 1-Reservatórios, vias de contaminação e veículos de exposição de *Campylobacter* (Wagenaar et al., 2013)).

Um dos pontos críticos na via de transmissão de *Campylobacter* ocorre na produção primária (EFSA, 2010). O material fecal de frangos permite uma fácil disseminação ambiental de *Campylobacter* (Meunier et al., 2016). A contaminação nos aviários através do ambiente é considerada a maior fonte de contaminação de *Campylobacter* em frangos (Horrocks et al., 2009).

Do mesmo modo os matadouros também representam um ponto crítico no controlo da disseminação de *Campylobacter*, pois ao longo da linha de processamento há uma redução gradual na concentração de *Campylobacter* nas carcaças devido à remoção das penas, às lavagens e aos processos de refrigeração; mas quando se dá uma rotura do intestino durante a evisceração, além de ocorrer uma contaminação local, ocorre também uma contaminação das

carcaças posteriores (White *et al.*, 1997). Após serem eviscerados, os frangos passam por uma etapa de imersão, onde pode ocorrer um aumento de contaminação quando as condições operacionais não são as mais adequadas. Esta situação pode ocorrer como consequência de um efluxo inadequado de água, uma vez que o material fecal vai ficando acumulado nesta água facilitando a disseminação das bactérias (FAO & WHO, 2009).

Campylobacter spp. apresenta uma dose infecciosa relativamente baixa, sendo apenas necessário uma concentração de 500 a 800 microrganismos para que a doença se possa manifestar no hospedeiro, facto que evidencia a elevada infecciosidade deste género bacteriano (Black *et al.*, 1988; Chlebicz & Ślizewska, 2018; Epps *et al.*, 2013).

Segundo dados obtidos pela EFSA, em 2018 foram confirmados 246.571 casos de campilobacteriose em 28 estados-membro da UE, correspondendo a uma taxa de notificação de 64,1 casos por 100.000 habitantes. Portugal, encontra-se no grupo de países pertencentes à UE com menor taxa de notificação, 5,9 casos por 100.000 habitantes (EFSA-ECDC, 2019). Nos últimos anos, especificamente entre 2014 e 2018, os casos de infeção por *Campylobacter* na UE têm-se mantido estáveis, sendo que 93,8% dos casos notificados tiveram origem dentro da UE. Dos casos notificados, 83,9% foram causados por *C. jejuni* e 10,3% por *C. coli*. A mortalidade devido a casos de infeção por *Campylobacter* é baixa (0.03%) (EFSA-ECDC, 2019).

Observa-se sazonalidade relativamente ao número de casos reportados, verificando-se um aumento de campilobacteriose nos meses de verão. Em alguns anos têm sido observados picos nos meses de inverno, nomeadamente durante os meses de dezembro e janeiro (Rosenquist *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). O aumento de casos no verão pode estar relacionado com o aumento de insetos, nomeadamente moscas (Facciola *et al.*, 2017), e os picos verificados no inverno podem estar associados às épocas festivas, sendo este um período associado a um aumento de viagens (EFSA-ECDC, 2019). Surtos por *Campylobacter* são raros, geralmente quando ocorre uma infeção é de natureza esporádica com casos isolados, existindo dificuldade no apuramento da causa dessa mesma infeção (Bronowski *et al.*, 2014; Nachamkin & Nguyen, 2017; Whitehouse *et al.*, 2018). Um dos surtos mais recentemente notificado ocorreu na Suécia, tendo tido como causa o consumo de carne de aves contaminada. Este surto contabilizou mais 5000 casos reportados do que no ano anterior no mesmo período (agosto de 2016 e julho de 2017) (EFSA-ECDC, 2019).

As manifestações clínicas de infeções por *Campylobacter* variam desde diarreia aquosa até diarreia com sangue, dores abdominais, febre, podendo surgir náuseas e vômitos (Epps *et al.*, 2013; Gould *et al.*, 2000). O período de incubação varia entre 2 e 5 dias embora em alguns casos possa chegar aos 10 dias. A maioria das gastroenterites entéricas são autolimitadas (Samanta & Bandyopadhyay, 2019). A campilobacteriose pode ainda desencadear infeções extraintestinais, tais como septicemia, abscesso, meningite, hepatite e pancreatite (Fitzgerald, 2015; O'Brien, 2017). Indivíduos infetados por *Campylobacter* possuem um risco aumentado de desenvolver complicações pós-infeciosas, incluindo artrite reativa (2% a 5%), síndrome do intestino irritável (9% a 13%) e ainda síndrome de Guillain Barré (SGB) (0,1%), estando esta última fortemente associada a infeções causadas por *C. jejuni* (Facciola *et al.*, 2017; Samanta & Bandyopadhyay, 2019). Estas complicações estão vulgarmente associadas a grupos de risco como idosos ou imunocomprometidos (Agnetti *et al.*, 2019). Geralmente as enterites causadas por *C. jejuni* e *C. coli* são praticamente indistinguíveis uma vez que, apresentam sintomas semelhantes (Whitehouse *et al.*, 2018).

Como referido anteriormente, a maioria das infeções causadas por *Campylobacter* são autolimitadas, sendo o tratamento recomendado a hidratação e a reposição de eletrólitos (Tang *et al.*, 2017; Whitehouse *et al.*, 2018). O recurso a antimicrobianos não é frequente, sendo usado apenas em infeções graves e prolongadas (Osaili & Alaboudi, 2017). Os fármacos mais utilizados para este tipo de infeções são as fluoroquinolonas e os macrólidos, podendo também serem usadas as tetraciclina, eritromicina e gentamicina (Osaili & Alaboudi, 2017; Tang *et al.*, 2017). Um dos maiores desafios da atualidade é o facto do género bacteriano em estudo apresentar, por vezes, uma elevada resistência a antibióticos (Wang *et al.*, 2014). Esta resistência de *Campylobacter* a determinados antimicrobianos foi confirmada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), levando a que o género *Campylobacter* fosse inserido na lista dos 12 patogénicos com prioridade global para os quais são necessários desenvolver novos tratamentos (WHO, 2017).

2.3. Mecanismos de Patogenicidade

A colonização do trato gastrointestinal do hospedeiro começa após a ingestão de alimentos contaminados por *Campylobacter* (Bhunia, 2008). As bactérias *C. jejuni* e *C. coli* possuem uma cápsula de polissacarídeos que facilitam a sua sobrevivência durante o processo de colonização do hospedeiro (Bolton, 2015), nomeadamente quando estas entram em contacto com o

ambiente ácido do estômago (Bhunia, 2008). As células bacterianas sobreviventes continuam o seu percurso ao longo do trato gastrointestinal, colonizando o íleo e o cólon (Bhunia, 2008). A colonização depende de vários fatores, tais como:

- 1) **Sistema de mobilidade e quimiotaxia:** a mobilidade é um fator determinante para a colonização da mucosa intestinal, sendo esta dependente de um sistema flagelar (Dasti *et al.*, 2010; Guerry, 2007; Jain *et al.*, 2008) que em cooperação com a sua morfologia em espiral e com o movimento “corkscrew” conferem vantagem às células bacterianas quando presentes no ambiente viscoso da mucosa intestinal. (Ferrero & Lee, 1988). Também o mecanismo de quimiotaxia tem extrema importância na mobilidade bacteriana (Chlebicz & Śliżewska, 2018; Poly & Guerry, 2008), uma vez que permite que o microrganismo se movimente na direção de estímulos químicos, que são favoráveis ao seu crescimento (Konkel *et al.*, 2001). A mucina presente na mucosa intestinal funciona como principal quimioatratador, pois liberta L-fucose, sendo esta substância fonte de crescimento bacteriano (Doyle, 1989; Silva *et al.*, 2011).
- 2) **Adesão à mucosa intestinal:** a adesão é um importante fator para que ocorra a colonização, sendo mediada por adesinas que se encontram localizadas no flagelo e nos lipopolissacarídeos (LPS) (Guerry, 2007). As adesinas são macromoléculas expostas na superfície celular que facilitam a ligação com as células hospedeiras, sendo as mais conhecidas a *Campylobacter adhesion to fibronectin* (CadF) e a *Campylobacter adhesion protein* (CapA) (Facciola *et al.*, 2017).
- 3) **Invasão:** Após a adesão ocorre a invasão do epitélio intestinal. O contacto das células bacterianas com as células epiteliais provoca danos, desencadeando inflamação celular e distúrbios na capacidade de absorção intestinal (Konkel *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011). Este processo é iniciado por endocitose e ocorre através de sinalização celular entre a superfície das células do hospedeiro e os recetores presentes na membrana celular das bactérias do género *Campylobacter* (Levin, 2007).
- 4) **Produção de toxinas:** as células bacterianas pertencentes ao género bacteriano *Campylobacter* possuem a capacidade de produzir tanto enterotoxinas como citotoxinas, aumentando assim, a sua patogenicidade (Samanta & Bandyopadhyay,

2-Introdução

2019). A *cytolethal toxin* (CDT) é formada pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* e promove a paragem do ciclo celular, nomeadamente na fase G2/M, resultando na morte da célula (Abuoun *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2008). Esta toxina encontra-se também relacionada com a inibição da resposta imunitária, uma vez que é responsável por estimular apoptose das células imunes, o que resulta numa cura lenta e perduração de sintomas (Doyle, 1989; Smith & Bayles, 2006). As enterotoxinas produzidas por *Campylobacter*, tais como *Escherichia coli heat-labile enterotoxin* (LT) e *cholera toxin* (CT), possuem a capacidade de se ligarem a recetores presentes nas células hospedeiras, sendo responsáveis por desregular os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), resultando no aumento do efluxo de fluidos e eletrólitos. As enterotoxinas são as responsáveis pelo aparecimento de diarreia aquosa nas infeções por *Campylobacter* (Doyle, 1989; Wassenaar, 1997).

2.4. Prevenção e Controlo

Um programa de vigilância da campilobacteriose bem estruturado fornece informações de extrema importância ao nível da saúde pública, contribuindo assim para um melhor entendimento da doença, assim como dos processos de transmissão mais comumente observados (Facciola *et al.*, 2017). É importante que exista uma vigilância a nível nacional mas também a nível internacional, onde conste a informação de todos os casos notificados, assim como a tipificação dos isolados (Facciola *et al.*, 2017).

As medidas preventivas podem ser aplicadas diretamente aos humanos, mas também devem ser direcionadas para a produção animal (Hansson *et al.*, 2018). A produção primária é um ponto crítico de controlo para a prevenção da disseminação de *Campylobacter*, portanto se este for monitorizado e forem exercidas boas práticas a probabilidade da sua disseminação em matadouros e retalho será reduzida, assim como a incidência da doença no consumidor (Meunier *et al.*, 2016).

Uma das medidas que apresenta um maior impacto na diminuição de campilobacteriose é a implementação de barreiras de biossegurança nos aviários e nos matadouros (Sarp *et al.*, 2016). Geralmente as medidas utilizadas são: 1) controlo rigoroso do acesso ao estabelecimento para minimizar a entrada de pessoas não autorizadas; 2) controlo de insetos; 3) controlo das práticas de higiene dos trabalhadores; 4) purificação de águas; 5) higienização de todo o ambiente e equipamentos (Facciola *et al.*, 2017).

O Regulamento (CE) nº2017/1495 que se encontra em vigor desde 1 de janeiro de 2018, altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 no que diz respeito à concentração de *Campylobacter* em carcaças de frangos de carne estabelecendo como critério de higiene o limite máximo de 1.000 UFC/g em carne de frango no fim do processo de fabrico. Este critério visa diminuir infeções por *Campylobacter* através do consumo de carnes de aves (EFSA-ECDC, 2018).

Atualmente não existem vacinas que previnam a colonização entérica de *Campylobacter* nem para aves, nem para mamíferos (Hansson *et al.*, 2018). O objetivo da vacina aplicada a humanos seria impedir sequelas em indivíduos que apresentassem a doença de uma forma mais grave ou mesmo a sua morte. O desenvolvimento deste tipo de vacinas preventivas para o *C.jejuni* é limitado devido ao entendimento incompleto dos mecanismos de patogenicidade(Facciola *et al.*, 2017).

De forma a ultrapassar o uso indiscriminado de antibióticos na produção de frangos em aviários têm sido usados pré e probióticos para ajudar a promover o crescimento saudável dos animais (Silva *et al.*, 2011). Outra estratégia utilizada é o uso de bacteriófagos, cuja administração durante 5 dias resulta numa diminuição de *Campylobacter* de 0,5 a 5 log UFC/g no conteúdo cecal (Carvalho *et al.*, 2010). O desenvolvimento de tratamentos recorrendo a fagos mostram-se eficazes, uma vez que é efetuada uma seleção cuidadosa de fagos líticos e de cocktails com o intuito de minimizar o aparecimento de estirpes resistentes a estes. Esta estratégia tem como objetivo reduzir a colonização/ contaminação dos bandos de aves, para que o número de *Campylobacter* presente nas carcaças de frangos tratados com esta terapia fágica diminua e, por conseguinte, que o número de infeções adquiridas pelo consumo da carne destes frangos seja reduzida (Silva *et al.*, 2011).

Quanto às embalagens que acondicionam carne de frango têm sido desenvolvidas técnicas que permitem reduzir a concentração de *Campylobacter* utilizando nanofibras de gelatina contendo óleo essencial de tomilho. Estas novas embalagens mostraram uma ótima atividade antimicrobiana resultando em danos na membrana celular de *C. jejuni* e, concomitantemente, sem serem alteradas as propriedades da carne de frango(Lin *et al.*, 2018).

A contaminação por *Campylobacter* pode ocorrer em diferentes fases e consequentemente em diferentes locais, como em aviários e matadouros, no retalho e também na cozinha do consumidor. Portanto é muito importante que existam campanhas de consciencialização e de

literacia da população (Silva *et al.*, 2011). No Reino Unido foi desenvolvida uma estratégia que consistiu em alertar o consumidor para este tipo de contaminação e aconselhá-lo a que o frango que chega à sua cozinha deveria ser cozinhado sem ser, previamente, lavado, pois quando ocorre essa lavagem existe uma maior probabilidade de contaminação do ambiente envolvente (Silva *et al.*, 2011). Segundo a Agência Federal Belga para segurança na Cadeia Alimentar, os consumidores podem prevenir a campilobacteriose através de processos como a cozedura do frango até que a sua temperatura interna seja superior a 70°C, permitindo assim que as bactérias sejam eliminadas do género alimentício (Sampers *et al.*, 2009); e a sua congelação (Sandberg *et al.*, 2006), uma vez que quanto menor a temperatura de congelação, maior a redução da concentração de *Campylobacter* (Georgsson *et al.*, 2006).

Embora o controlo da contaminação por *Campylobacter* seja um problema global, cada país deve desenvolver estratégias de forma a que os casos de campilobacteriose diminuam (Silva *et al.*, 2011).

2.5. Métodos de Detecção

Com o aumento do número de notificações de campilobacteriose é extremamente importante que os métodos de deteção de *Campylobacter* sejam rápidos e precisos (Ricke *et al.*, 2018).

A deteção de *Campylobacter* em amostras alimentares é baseada em métodos culturais podendo a sua confirmação ser realizada através de testes bioquímicos, moleculares e pelo método *matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) (EFSA-ECDC, 2019).

Os métodos culturais usados na deteção de bactérias do género *Campylobacter*, recorrem à utilização de meios seletivos, com o objetivo de inibir o crescimento da microbiota envolvente favorecendo o crescimento do microrganismo a ser detetado (Ricke *et al.*, 2018). Ao contrário de outros patogénicos de origem alimentar, *Campylobacter* apresenta características biológicas e fisiológicas que podem interferir na sensibilidade e especificidade dos métodos dependentes da cultura (Ricke *et al.*, 2018). Os métodos culturais não detetam células bacterianas no estado VBNC. Quando bactérias do género *Campylobacter* se apresentam neste estado, não é possível serem detetadas por métodos microbiológicos tradicionais, pois o microrganismo não apresenta crescimento. Outro inconveniente deste método é o facto de ser demorado (Castro *et al.*, 2018).

Atualmente recorre-se ao uso de técnicas moleculares para a identificação das espécies do género *Campylobacter* uma vez que permitem uma deteção rápida e precisa (McSweeney *et al.*, 2009). As técnicas moleculares baseadas em ácidos nucleicos têm como base o reconhecimento de sequências únicas e altamente específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou ácido ribonucleico (ARN), que podem ser amplificadas e visualizadas num gel de eletroforese e ainda sequenciadas (McSweeney *et al.*, 2009). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que consiste na utilização de oligonucleótidos específicos que se ligam a genes únicos, transportados por espécies individuais ou a uma única sequência que exhibe variação sequencial ou de comprimento e a amplifica (Ricke *et al.*, 2018). Como o nome indica, a PCR é uma reação em cadeia e para que a reação ocorra é necessário o uso de uma enzima que faz com que ocorra uma duplicação na cadeia que se pretende analisar. A enzima utilizada é uma polimerase (*Taq* polimerase), que tem como função juntar fragmentos individualizados de ADN e formar cadeias. Para que a reação ocorra a enzima polimerase necessita de nucleótidos e de *primers* assim como de uma molécula de ADN, que funciona como cadeia molde (Joshi & Deshpande, 2011). Esta técnica tem a capacidade de detetar diferenças genómicas num microrganismo de forma a diferenciá-lo ou correlacioná-lo com outros microrganismos (Hill & Wachsmuth, 1996). Estudos baseados em PCR têm sido bem-sucedidos na deteção de espécies de *Campylobacter* comumente encontradas em aves domésticas. Um dos possíveis alvos, com bastante importância, é o gene 16S, que codifica para o ARN ribossomal. Esta técnica de PCR embora apresente várias vantagens em relação às técnicas microbiológicas dependentes do cultivo (Ricke *et al.*, 2018), tem como principal desvantagem a incapacidade de diferenciar bactérias mortas de bactérias vivas, sendo a diferenciação entre células viáveis e VBNC um ponto crítico na avaliação da contaminação de alimentos, pois apenas as células vivas apresentam risco para a saúde pública (Castro *et al.*, 2018). Para tentar superar este e outros problemas pode recorrer-se à utilização de um enriquecimento da amostra antes do PCR e ao uso de técnicas que quando conjugadas com PCR possam transmitir maior sensibilidade ao método (Ricke *et al.*, 2018). Uma das técnicas mais usadas é a utilização de corantes como Monoazida de Propídeo (PMA), um derivado do iodeto de propídeo, que tem a capacidade de se intercalar com o ADN de células mortas, impedindo a sua amplificação nas reações de PCR, possibilitando assim a diferenciação entre microrganismos viáveis e VBNC dos que não são viáveis (Cangelosi & Meschke, 2014; Castro *et al.*, 2018). A separação de ácidos nucleicos por eletroforese em gel de agarose ocorre por migração dos fragmentos de ADN baseados nas suas propriedades químicas. As moléculas de ADN possuem uma carga negativa que lhes é conferida pelo grupo fosfato e através de um campo elétrico os ácidos nucleicos

2-Introdução

migram em direção ao polo positivo , sendo que os que apresentam menor comprimento/peso molecular movem-se mais rápido no gel (Lorsch, 2013).

Existem ainda outras abordagens para a identificação ou confirmação de espécies. A técnica MALDI-TOF-MS possui um tempo de análise muito rápido, cerca de dois minutos para identificação de uma colónia isolada. Segundo a Public Health England (PHE), a MALDI-TOF pode fornecer identificações rápidas e precisas de espécies como *C.jejuni* e *C.coli*, entre outras, mas apresenta como principal desvantagem o facto de as colónias retiradas a partir do meio modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar (mCCDA) afetarem adversamente os espetros e, como tal, é necessário efetuar a subcultura em agar não seletivo antes de recorrer à utilização desta técnica (ACMSF, 2019).

Deste modo as técnicas seleccionadas e utilizadas no presente estudo tiveram como referência a ISO 10272-1 :2017, tendo sido efetuada a identificação da espécie das estirpes isoladas PCR Convencional.

3. METODOLOGIA

3.1. Estirpes Bacterianas

As estirpes bacterianas utilizadas como controlos positivos neste trabalho foram duas bactérias de referência, ou seja, duas estirpes bacterianas provenientes de uma coleção de culturas da American Type Culture Collection (ATCC), reconhecidas internacionalmente, *C. jejuni* ATCC 33291 e *C. coli* ATCC 33559.

Estas duas estirpes foram utilizadas como controlos positivos de processos, procedimentos e técnicas referenciados na ISO 10272-1:2017 e também na determinação dos limites de deteção na PCR.

3.2. Seleção das Amostras

As amostras foram recolhidas entre os meses de dezembro de 2019 e março de 2020 em diferentes superfícies comerciais, talhos e em produtores caseiros.

No presente estudo foram analisadas 123 amostras variando entre dois tipos de matrizes, carne de frango (n=60) e esfregaços de superfícies de embalagens que acondicionavam carne de frango(n=63), na zona norte de Portugal.

O estudo dos géneros alimentícios consistiu na análise de partes exteriores da carcaça de frango, nomeadamente da pele de frango proveniente de diferentes partes: pescoço, pernas, coxas e asas. Também se procedeu à análise de partes internas do frango, mais concretamente, de moelas. Em relação às amostras de superfícies, os esfregaços foram realizados em embalagens rígidas, termo-seladas de origem (tipo cuvete), e em embalagens de plástico flexíveis (tipo saco de plástico).

Foram adquiridas amostras refrigeradas, cujo transporte, desde o local de recolha até ao laboratório de microbiologia dos alimentos, se realizou acondicionando-as num saco isotérmico com acumuladores de frio. Quanto às amostras de moelas, a maioria era congeladas.

3.3. Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas segundo as normas ISO 18593:2018 e ISO 6881-2:2017.

De acordo com a ISO 18593:2018, foi realizado um esfregaço em toda a superfície da embalagem que acondicionava carne de frango usando uma esponja estéril humedecida (*POLYWIPES™*, MWE MEDICAL WIRE). De seguida colocou-se a esponja num saco de colheita estéril (ISO 18593, 2018).

Quanto à preparação dos géneros alimentícios e sendo estes produtos cárneos, esta foi feita de acordo com a ISO 6887-2:2017. As amostras congeladas ficaram a descongelar à temperatura ambiente (18^o a 27^o C) numa câmara de segurança biológica num tempo máximo de 3h ou em refrigeração 5^o ±3^o C num máximo de 24h, antes da sua preparação (ISO 6887-2, 2017).

3.4. Condições de Cultura e Isolamento

Geralmente as amostras alimentares encontram-se contaminadas com baixas concentrações de *Campylobacter* (Bolton *et al.*, 1984), por esse motivo, recorre-se ao uso de um meio de enriquecimento, também, com a finalidade de recuperar as células que se encontram sob stresse devido aos processos de congelação e refrigeração, falta de nutrientes e exposição ao oxigénio (Humphrey & Muscat, 1989).

O meio de enriquecimento utilizado foi o caldo de Bolton (*Bolton Broth CM0983*, OXOID). Este meio possui características seletivas as quais são conferidas por alguns dos seus componentes, que favorecem o crescimento do género bacteriano em estudo inibindo os outros microrganismos. O meio contém hemina, um composto fundamental para o crescimento de microrganismos exigentes; piruvato de sódio e metabissulfito de sódio, que permitem maior resistência ao oxigénio, e carbonato, que tem a capacidade de fornecer dióxido de carbono ao meio de cultura (Corry *et al.*, 1995). Ao caldo de enriquecimento- base foi adicionado um suplemento que resulta numa mistura de antibióticos (*Bolton Broth Selective Supplement SRO183E*, OXOID), nomeadamente, cefoperazona, vancomicina, trimetoprim e ciclohexamida, cuja função é permitir o crescimento da bactéria-alvo, inibindo a flora associada presente na amostra. Outro dos suplementos adicionados foi sangue de cavalo hemolisado (*LAKED HORSES*

BLOOD, SR0048C, OXOID), cuja finalidade é capturar o oxigénio, promovendo desta forma uma condição mais favorável para que possa ocorrer o crescimento de *Campylobacter*. Só com estes dois suplementos adicionados ao meio base é que este se encontra pronto a utilizar.

Ao saco de plástico estéril que continha a esponja com que se efetuou o esfregaço e/ou ao saco *stomacher* com filtro que continha as 10 g de carne de frango foi-lhes adicionado 90 ml/g do caldo de Bolton para fazer uma diluição de 1/10 (volume/volume ou massa/massa). Procedeu-se à sua homogeneização num homogeneizador (*Stomacher 400*[®]) a uma velocidade média durante 60 segundos (ISO 10272-1, 2017).

Posteriormente as suspensões foram incubadas numa atmosfera de microaerofilia. Para tal, foram usadas jarras de incubação, nas quais foram colocados geradores de gás (*Genbox microaer 96125*, BIOMÉRIEUX), de forma a gerar uma atmosfera favorável ao crescimento de *Campylobacter*. Estes geradores têm a capacidade de permitir que ocorram ligações químicas entre os gases libertados e os existentes dentro da jarra até uma determinada concentração de oxigénio, fazendo com que sejam libertadas quantidades definidas de dióxido de carbono. Durante a incubação, as suspensões foram sujeitas a um gradiente de tempo/ temperatura que consistiu numa primeira incubação durante 4h a 6h a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, e as restantes $44\text{h} \pm 4\text{h}$ de incubação a $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Este gradiente tempo/temperatura serviu para que as bactérias do género *Campylobacter*, quando presentes, se adaptassem às temperaturas mais elevadas gradualmente, uma vez que poderiam estar sob condições de stresse.

Após as 48h de incubação foi realizada a subcultura do meio de enriquecimento em meios sólidos seletivos. Caso não fosse possível prosseguir com o procedimento no final do tempo de incubação, as culturas eram refrigeradas a $5^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ no máximo, até 48h para se fazer o isolamento.

Os meios utilizados para isolamento foram o mCCDA (*Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base CM0739*, OXOID), cuja seletividade é conferida pelo carvão, sendo este um inibidor de oxigénio; peptonas, que fornecem aminoácidos essenciais ao crescimento bacteriano; caseína hidrolisada, que é uma fonte de proteína; e por sulfato ferroso e piruvato de sódio, que aumentam a tolerância ao oxigénio (Laborclin, 2016). Esta seletividade também é incrementada pela adição de uma solução antibiótica (*CCDA Selective Supplement SR0155E*, OXOID), constituída por cefoperazona e anfotericina B, de forma a inibir o crescimento de

microrganismos competitivos. A subcultura em mCCDA a partir do enriquecimento foi efetuada através do método de isolamento por estrias, utilizando uma ansa de 10 µl. O crescimento de *Campylobacter* em mCCDA pode ser observado na Figura 2. O segundo meio usado foi o meio gelose de sangue (*Columbia agar + 5% sheep blood*, BIOMÉRIEUX) associado a um filtro de celulose com porosidade de 0,65 µm, o que lhe confere seletividade (*Cellulose Nitrate Filter*, SARTORIUS STENDIM BIOTECH GmbH), pois as bactérias com dimensões superiores ao diâmetro do filtro e que não apresentem mobilidade ficam retidas na superfície do filtro (Speegle *et al.*, 2009). Na gelose de sangue é colocado o filtro, na superfície do qual são espalhados 100uL do caldo de enriquecimento, que é retirado da placa e descartado após 15 minutos à temperatura ambiente. Os meios de cultura são incubados em atmosfera de microaerofilia durante 44h ±4h a 41,5^o ± 1^oC.

Segundo a ISO 10272-1:2017 as bactérias do género *Campylobacter spp.*, quando cultivadas no meio de mCCDA, apresentam habitualmente as seguintes características fenotípicas: acinzentadas com um brilho metálico, planas e húmidas, com tendência a espalharem-se. A aparência varia de acordo com o meio, por exemplo, quando cultivadas no meio gelose de sangue, o brilho metálico não é evidente (Figura 2 e 3).

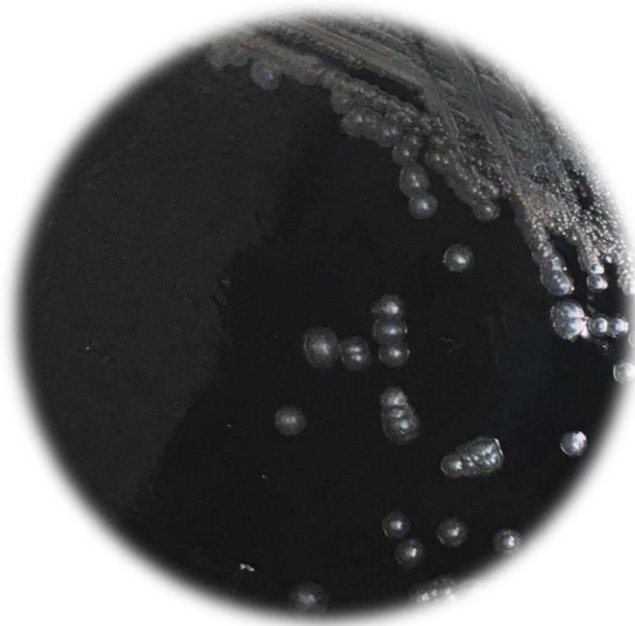


Figura 2-Crescimento de *Campylobacter coli* ATCC 33559 no meio seletivo mCCDA.

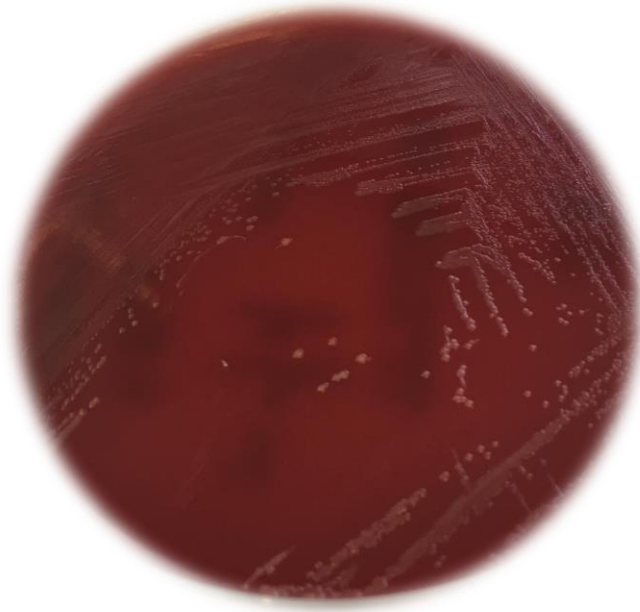


Figura 3-Crescimento de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 no meio de Gelose de sangue.

3.5. Testes de confirmação das estirpes para o género *Campylobacter*

Realizaram-se os testes de confirmação de acordo com a ISO 10272:2017 das colónias típicas, ou suspeitas de forma a averiguar se eram pertencentes ao género bacteriano *Campylobacter*.

Selecionaram-se 5 colónias as quais foram re-isoladas para duas placas de gelose de sangue, uma delas incubou 44h \pm 4h numa atmosfera de microaerofilia a 41,5^o \pm 1^o C e a outra incubou durante o mesmo intervalo de tempo mas numa atmosfera de aerofilia a 25^o \pm 1^o C. Após o tempo de incubação, as colónias que só cresceram em microaerofilia a 41,5^o \pm 1^o C foram submetidas às restantes provas de confirmação do género *Campylobacter*, ou seja, foi visualizada a sua morfologia e propriedades tintoriais, a partir de uma coloração de gram; a sua mobilidade, a partir da visualização microscópica de um exame a fresco; e a pesquisa da enzima Citocromo C Oxidase.

Para visualizar a morfologia e a mobilidade, foi necessário recorrer ao uso do microscópio. No caso da prova da mobilidade, foi recolhida parte da colónia selecionada e suspensa numa gota de soro fisiológico numa lamina, à qual se sobrepôs uma lamela e foi, posteriormente,

observada ao microscópio. As bactérias do género *Campylobacter* apresentam um movimento típico, movendo-se em “corkscrew”. Foi também realizada coloração de gram de forma a verificar se apresentavam as características típicas, isto é, bacilos encurvados de dimensões reduzidas com o aparecimento de estruturas em forma de “asas de gaivota”, cujas propriedades tintoriais, devido à constituição da sua parede celular, as classificam de gram-negativo (Figura 4).

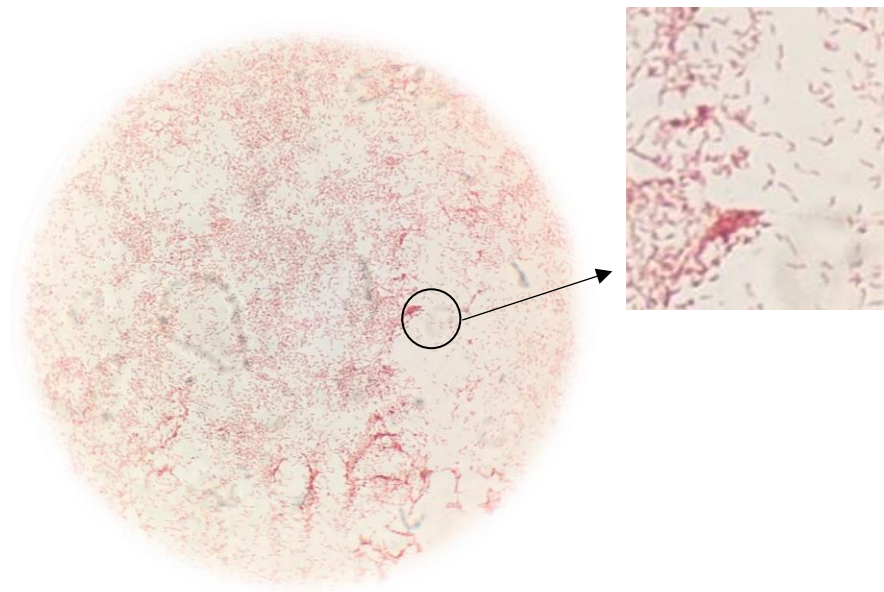


Figura 4-Morfologia de *Campylobacter* (Coloração de Gram).

A pesquisa da enzima citocromo C oxidase foi também realizada para a confirmação de bactérias do género bacteriano em estudo, uma vez que esta enzima é produzida pela bactéria. Este teste consiste em colocar uma porção da colónia suspeita, com o auxílio de uma ansa plástica estéril, em contacto com o reagente, fenilenodiamina/ dicloridrato de N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilenodiamina ou N -dimetil- p -fenilenodiamina (DMPD), impregnado em papel de filtro. O aparecimento de uma cor violeta ou azul dentro de 10 a 30 segundos indica uma reação positiva, sendo que reações tardias ou ausência de cor é indicativo de reação negativa (Figura 5). Culturas envelhecidas podem dar resultados de oxidase falsos negativos.

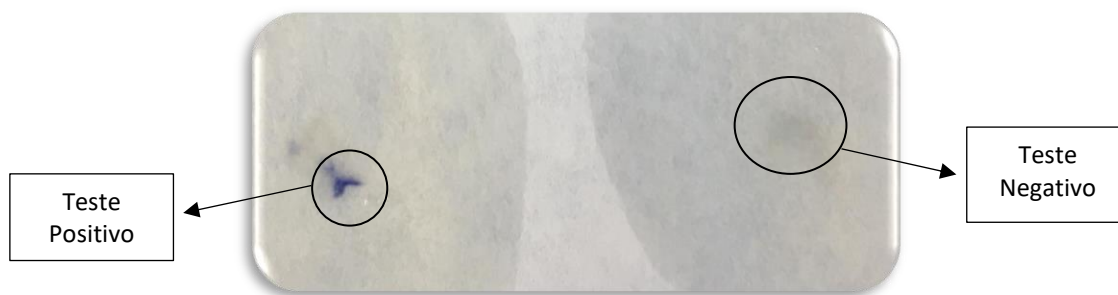


Figura 5-Pesquisa de Citocromo C oxidase.

Se os resultados obtidos estiverem de acordo com a Tabela 1, pode concluir-se que, de acordo com a ISO 10272:2017, a bactéria em estudo pertence ao género *Campylobacter*.

Tabela 1-Testes de confirmação para o género *Campylobacter* (ISO10272:2017).

Teste	<i>Campylobacter</i> spp.
Coloração de Gram	-
Mobilidade	+
Oxidase	+
Crescimento em aerofilia a 25 ± 1 °C	-
Crescimento em microaerofilia $41,5 \pm 1$ °C	+

Após as provas de confirmação, as colónias pertencentes ao género *Campylobacter* foram identificadas quanto à espécie por métodos moleculares, neste caso por PCR convencional e apenas para as espécies *C. jejuni* e *C. coli*.

3.6. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A escolha dos *primers* foi efetuada através de uma revisão bibliográfica tendo sido selecionados os referenciados no procedimento da Technical University of Denmark, (DTU) (DTU, 2013) o gene *mapA*, na espécie *C. jejuni*, e do gene *ceuE*, na espécie *C. coli* (Best *et al.*, 2003; Stucki *et al.*, 1995).

O produto genético do gene *mapA* é designado MAPA, uma lipoproteína da membrana procariótica. A proteína MAPA está presente em todos os *C. jejuni* e ausente em todos os *C. coli* e outras espécies (Stucki *et al.*, 1995). O gene *ceuE* codifica uma lipoproteína envolvida no sistema de transporte de sideróforos, uma vez que a aquisição de ferro é um aspeto crucial na virulência (Richardson & Park, 1995).

O gene-alvo, os *primers*, a sequência destes e o tamanho esperado do fragmento amplificado encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2-Primers utilizados para a deteção das duas espécies do género *Campylobacter*, *C. jejuni* e *C. coli* (DTU, 2013).

Gene-Alvo	Primer	Sequência	Tamanho do amplificação
<i>mapA C.jejuni</i>	MDmapA1	5'-CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG- 3'	589 pb
<i>mapA C.jejuni</i>	MDmapA2	5'-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A-3'	
<i>ceuE C.coli</i>	COL3	5'-AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG - 3'	462 pb
<i>ceuE C.coli</i>	MDCOL2	5'-TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG- 3'	

3.6.1. Extração e Purificação do ADN

No presente estudo efetuou-se a extração de ADN através de duas metodologias distintas dependendo se esta se efetuava a partir do caldo de enriquecimento ou a partir de colónias

isoladas. É necessário utilizar técnicas de extração das quais se obtenham boas concentrações de ácidos nucleicos que tenham boa integridade e valores de pureza aceitáveis para poderem ser utilizados neste estudo e em metodologias subsequentes.

No caso de a extração ter sido efetuada a partir do caldo de enriquecimento da amostra recorreu-se ao uso de um kit comercial (Kit QIAamp® DNA Mini, QIAGEN) para extração do ADN genómico. A extração do ADN é feita através de sílica não magnética em coluna. Neste método de extração, os ácidos nucleicos ligam-se à camada de sílica enquanto que as proteínas, os restos celulares e os contaminantes são removidos no fluxo de tampão de lavagem, no final utiliza-se um tampão de eluição (TE) apropriado para recuperar o ADN através de centrifugação.

Recorreu-se à utilização do protocolo *Isolation of genomic DNA from bacterial suspension cultures* estabelecido pelo fornecedor (QIAGEN, 2016), para extração de ADN com ligeiras alterações.

Protocolo de extração a partir do meio de enriquecimento:

- 1- centrifugar 1 ml do meio de enriquecimento a 5000xg (7500 rpm) durante 5 minutos, rejeitar o sobrenadante;
- 2- adicionar 160 µl Buffer ATL para se obter um volume total de 180 µl (misturando o *pellet* com o Buffer ATL);
- 3- adicionar 20 µl Proteinase K no fundo do tubo;
- 4- agitar no *vortex*;
- 5- incubar a 56^o C durante 10 minutos;
- 6- realizar um *spin*
- 7- adicionar 200 µl de Buffer AL, agitar no *vortex* durante 15 segundos;
- 8- incubar a 70^o C durante 10 minutos, fazer um *spin*;
- 9- adicionar 200 µl de etanol (96% -100%) e agitar no *vortex* 15 segundos, fazer um novo *spin*;
- 10- transferir todo o volume da suspensão (incluindo os precipitados) para a coluna do Kit;
- 11- centrifugar a 6000xg (8000 rpm) durante 1 minuto;
- 12- rejeitar o tubo coletor que contém o líquido filtrado e colocar a coluna num novo tubo coletor;
- 13- adicionar 500 µl de tampão de lavagem Buffer AW1 de seguida centrifugar a 6000xg (8000 rpm) durante 1 minuto;

- 14- rejeitar o tubo coletor que contém o líquido filtrado e colocar outro tubo coletor
- 15- adicionar 500 µl de tampão de lavagem Buffer AW2;
- 16- centrifugar 20000xg (max.15000 rpm) durante 3 minutos;
- 17- rejeitar o tubo coletor que contém o líquido filtrado, colocar outro tubo coletor;
- 18- sem adicionar nada, voltar a centrifugar a 20000xg (max:15000 rpm) durante 1 minuto;
- 19- rejeitar o tudo coletor com o filtrado e transferir a coluna para um novo tubo *ependorf*;
- 20- adicionar 200 µl de tampão eluente Buffer AE para remoção do ADN da coluna;
- 21- deixar atuar 5 minutos à temperatura ambiente;
- 22- centrifugar a 6000xg (8000 rpm) durante 1 minuto;
- 23- rejeitar a coluna e conservar o tubo *ependorf* que contém os ácidos nucleicos a $5^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ ou a -20°C se não se realizarem os ensaios nesse dia.

A extração de ADN em estirpes foi efetuada usando o método de fervura, procedendo-se da seguinte forma:

1. Efetuou-se uma suspensão, com o auxílio de uma ansa estéril, de 1 µl da colónia em 100 µl de água, num *ependorf* estéril e devidamente identificado;
2. seguidamente, os *ependorfs* foram colocados num banho fervente, durante 10 minutos, seguindo-se uma centrifugação a uma velocidade de 15000 x g durante 10 minutos.
3. o sobrenadante, que continha o ADN, retirou-se para um *ependorf* estéril devidamente identificado.
4. após o procedimento de extração, as soluções de ADN foram armazenadas a $5^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ a -20°C , se os ensaios não forem realizados nesse dia.

3.7. Configuração da PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Os reagentes da PCR, tal como os volumes utilizados para realizar o ensaio no ADN extraído do meio de enriquecimento, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3-Volumes utilizados para mistura para deteção dos genes *mapA* e *ceuE* por PCR convencional, a partir do ADN do meio de enriquecimento (adaptado do protocolo da DTU(DTU, 2013).

Componentes da mistura	Volumes em μL (Vtotal = 25μL)
Master Mix (2x)	12,5
Primer F (10 μM)	0,5
Primer R (10 μM)	0,5
Água estéril	10,5
ADN	1

Quando o ADN provinha de colónias isoladas, diminuiu-se o volume total usado na reação de PCR para 12,5 μL , conforme os dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4-Volumes utilizados na preparação da mistura para a deteção dos genes *mapA* e *ceuE*, a partir do ADN de colónias isoladas.

Componentes da mistura	Volumes em μL (Vtotal = 12,5 μL)
Master Mix (2x)	6,3
Primer F (10 μM)	0,3
Primer R (10 μM)	0,3
Água estéril	4,6
ADN	1

Após se efetuar a mistura de reagentes referenciados na Tabela 3 ou na Tabela 4, os tubos da reação foram colocados no termociclador (LIFE ECO TC-96/G/H(b)C, BIOER), sendo este programado com o perfil térmico e tempos descritos na Tabela 5.

Tabela 5-Perfil térmico e tempo a programar no termociclador para amplificação os genes *mapA* e *ceuE* (DTU, 2013).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	95	600	1
Desnaturação	94	30	30
<i>Annealing</i>	59	90	
Extensão	72	60	
Extensão final	72	600	1

3.8. Eletroforese em gel de agarose

Posteriormente à reação de PCR foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose a 2%, (p / v) em TAE 1X (Tris / Acetato / EDTA). Ao gel de agarose foi adicionado um intercalante de ADN (corante Gelgreen Xpert Green ADN Stain, 20000X, Grisp) para permitir a visualização dos produtos de PCR. Quando excitado pela luz ultravioleta, ele vai emitir fluorescência.

Cada poço do gel de agarose é carregado com 10 µl do produto de PCR adicionado com corante de carregamento (*loading dye*). Num dos poços do gel coloca-se o marcador de peso molecular, ADN Ladder 100pb (Bioron). De seguida liga-se a tina a uma corrente de 100V durante 45 minutos (DTU, 2013).

A visualização dos produtos de PCR no gel de agarose foi efetuada num transiluminador com luz UV (Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software, BIO-RAD). Os fragmentos de amplificação obtidos foram comparados com o marcador de peso molecular usado e com os controlos utilizados.

3.9. Interpretação dos resultados

As amostras que revelaram fragmentos de amplificação com o peso molecular esperado são consideradas positivas para o gene-alvo. Quando não existe amplificação do ADN e sabendo que

não houve inibição nessa reação de PCR, o resultado dessa amostra é considerado negativo. Para validar os resultados obtidos para todas as amostras que constituem a série de PCR, o controlo positivo e o branco têm de estar em conformidade.

3.10. Otimização das condições da PCR

3.10.1. PCR em amostras Simples

O passo inicial consistiu em hidratar os *primers* com água estéril milliQ de forma a obter uma concentração de 100 μM , seguindo as indicações estabelecidas pelo fornecedor, pois os *primers* estavam na forma liofilizada.

É importante que o ADN usado apresente um grau de pureza dentro dos valores espectáveis. Resíduos químicos ou resíduos provenientes do meio de enriquecimento podem contribuir para que ocorra interferência na reação, provocando a sua inibição (Kermekchiev *et al.*, 2009).

De forma a controlar a reação de PCR, foram adicionados a cada série de PCR um controlo positivo e um branco. A mistura de PCR foi a descrita nas Tabelas 3 e 4, sendo adicionado aos tubos de controlo da reação 0,5 μl de ADN da amostra e 0,5 μl do ADN da estirpe de referência, de forma a averiguar se houve ou não inibição da PCR. Foram também adicionados em cada série de PCR um tubo de controlo positivo, que continha 1 μl de ADN da estirpe de referência, tendo este como finalidade averiguar se o método tinha a capacidade de amplificar adequadamente o ADN-alvo e um tubo que continha, em vez do ADN molde, 1 μl de água, sendo este o branco da reação. O branco serviu para averiguar se não ocorreu contaminação nas diferentes etapas de preparação da mix e na fase de adição do ADN.

3.11. Limites de Detecção

3.11.1. Limites de Detecção da Reação de PCR convencional a partir de ADN extraído de colónias

Foram testadas 4 diluições do ADN extraído da estirpe de referência ATCC 33291. Após extração do ADN foram efetuadas 4 diluições decimais (1/10;1/100,1/1000 e 1/10.000) em triplicado, para assim se poder analisar o limite de deteção da metodologia utilizada.

Os resultados do estudo estão apresentados na Figura 6.

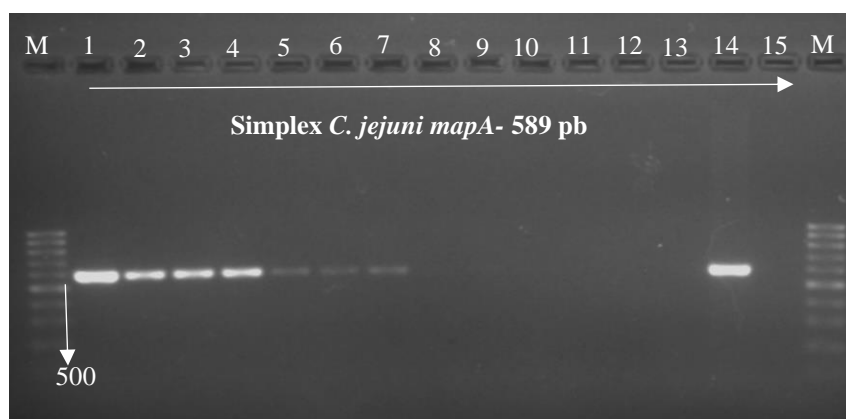


Figura 6-Limite de deteção para ocorrer a amplificação através de PCR.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1 – Solução mãe (ATCC 33291); 2,3 e 4 – Diluição 1/10 da solução-mãe ; 5,6 e 7- Diluição 1/100 da solução-mãe; 8,9 e 10- Diluição 1/1000 da solução-mãe; 11,12 e 13- Diluição 1/10000 da solução-mãe; 14- Controlo Positivo (ATCC 33291); 15- Branco (água estéril).

Desta forma, foi possível verificar que o limite de deteção para identificar a espécie em colónias isoladas, por PCR convencional, encontra-se na diluição 1:1.000 da metodologia utilizada. Em vez de suspender a ansa de 1 µl da estirpe em 100 µl de água esta poderia ser suspensa em 100 ml. Esta é a diluição máxima possível de um *pick up* da estirpe isolada com uma ansa de 1 µl, para que seja possível a sua deteção.

3.11.2. Otimização das condições do *Screening-PCR* a partir do ADN obtido do meio de enriquecimento Bolton Broth

Como referido anteriormente, o caldo de enriquecimento Bolton Broth, contém na sua composição sangue de cavalo hemolisado e, sendo a hemoglobina um dos maiores inibidores

da *taq* polimerase (Kermekchiev *et al.*, 2009), o *screening* a partir do meio de enriquecimento era uma incógnita. Procedeu-se ao *Screening-PCR* das amostras a partir do ADN obtido do meio de enriquecimento, no final das 48h de incubação, de forma a verificar se o meio de enriquecimento Bolton Broth, nomeadamente alguns dos seus constituintes, tinha algum efeito inibitório na reação de PCR.

Os resultados do *Screening-PCR* encontram-se apresentados na Figura 7.

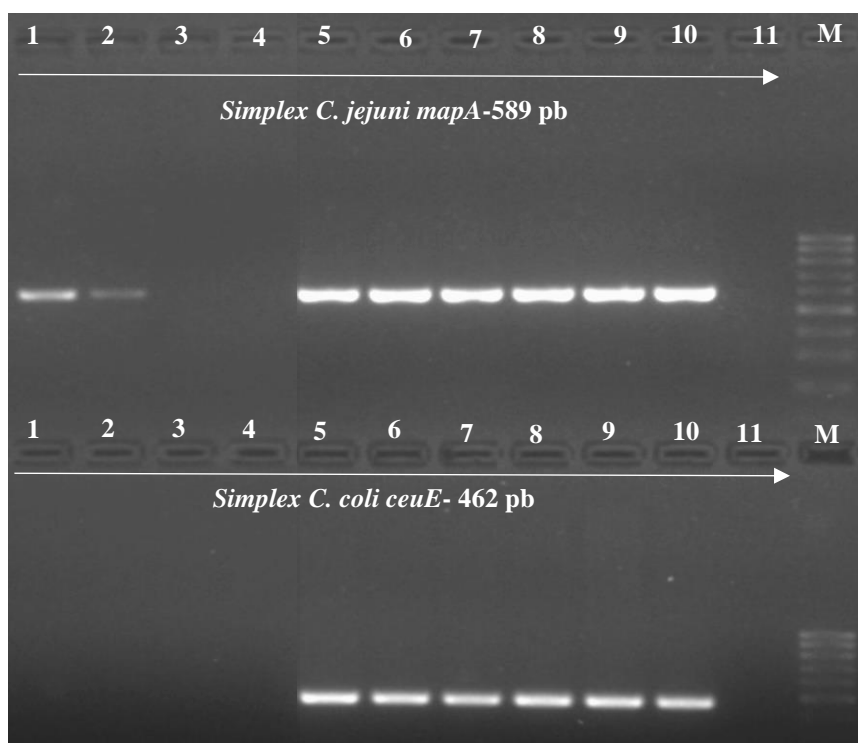


Figura 7-Amplificação por PCR de genes *mapA* e *ceuE*, de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/13808; 19/13809; 19/16670 e 19/16671.

Legenda: **Simplex *C. jejuni*** : M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/13808; 2- ADN da amostra 19/13809; 3- ADN da amostra 19/19670; 4- ADN da amostra 19/19671; 5- ADN da amostra 19/13808 e ADN da ATCC 33291; 6- ADN da amostra 19/13809 e ADN da ATCC 33291; 7- ADN da amostra 19/19670 e ADN da ATCC 33291; 8- ADN da amostra 19/19671 e ADN da ATCC 33291; 9 e 10- Controlo positivo ATCC 33291; 11- Branco (água estéril).

Simplex *C.coli*: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/13808; 2- ADN da amostra 19/13809; 3- ADN da amostra 19/19670; 4- ADN da amostra 19/19671; 5- ADN da amostra 19/13808 e ADN da ATCC 33559; 6- ADN da amostra 19/13809 e ADN da ATCC 33559; 7- ADN da amostra 19/19670 e ADN da ATCC 33559; 8- ADN da amostra 19/19671 e ADN da ATCC 33559; 9 e 10- Controlo positivo (ATCC 33559); 11- Branco (água estéril).

Por observação da figura, verificou-se que na reação de PCR para *C. jejuni* ocorreu amplificação do ADN-alvo (posição 1 e 2). Na reação de PCR para *C. coli* não se observaram positivos nas amostras analisadas, podendo este resultado ser justificado pela ausência desta espécie bacteriana na amostragem, tal facto foi confirmado pelos métodos de cultivo. Através dos controlos positivos e dos brancos foi possível validar as duas séries de PCR. Simultaneamente, através dos resultados obtidos nas reações 5,6,7 e 8 de cada um dos *simplex*, foi possível validar os resultados obtidos para as amostras, visto que provam não ter ocorrido inibição da reação, portanto as amostras são negativas.

É importante que o ADN que se utiliza na PCR apresente um grau de pureza dentro dos valores espectáveis (A260/A280nm deve estar aproximadamente 1,8) (N.N, 2012). Foram realizadas três suspensões bacterianas em caldo de Bolton com diferentes cargas microbianas. As suspensões

bacterianas tinham as seguintes cargas: a primeira tinha <10 UFC de *Campylobacter*; uma segunda com carga >10<100 UFC de *Campylobacter*; e uma terceira com carga >100 UFC de *Campylobacter*. O objetivo destas contaminações era saber qual a carga microbiana mínima de *Campylobacter* que a amostra continha, para que fosse possível a deteção do microrganismo pela metodologia de *Screening-PCR*.

Os resultados das PCR efetuadas para avaliar o limite de deteção de ADN extraído do Caldo de Bolton podem ser observados na Figura 8.

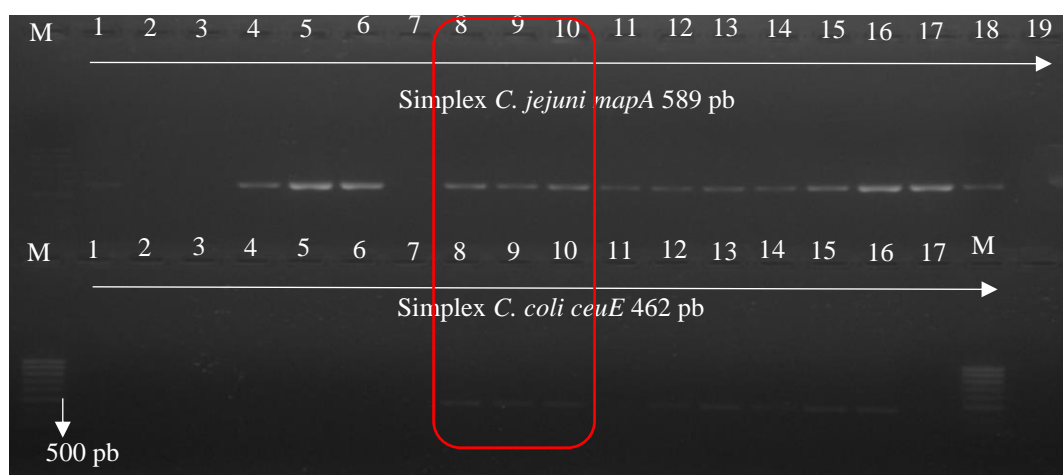


Figura 8- *Screening-PCR*– Estudo de limites de deteção através da amplificação dos genes *mapA* e *ceuE*.

Legenda: **Simplex *C. jejuni***: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 8- Amostra contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559; 9- Amostra contaminada com 340 UFC de ATCC 33291 e com 20 UFC de ATCC 33559; 10- Amostra contaminada com 4.000 UFC de ATCC 33291 e com 150 UFC ATCC 33559; 18- Controlo positivo ATCC 33291; 19- Branco (água estéril).

Simplex *C. coli*: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 8- Amostra contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559; 9- Amostra contaminada com 340 UFC de ATCC 33291 e com 20 UFC de ATCC 33559; 10- Amostra contaminada com 4.000 UFC de ATCC 33291 e com 150 UFC de ATCC 33559; 13- Amostra contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 14- Amostra contaminada com 340 UFC de ATCC 33291 e com 20 UFC de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 15- Amostra contaminada com 4.000 ATCC 33291 e com 150 UFC de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 16- Controlo Positivo (ATCC 33559); 17- Branco (água estéril).

Ao realizar a reação de PCR, foi possível observar amplificação em todas as amostras contaminadas artificialmente, com as diferentes diluições efetuadas. Concluiu-se que, mesmo que as amostras possuam baixos números de *Campylobacter*, nomeadamente uma carga inferior a 10 UFC/g, a sua deteção através da técnica de *Screening-PCR* é possível, confirmando-se desta forma, que esta técnica molecular apresenta sensibilidade na deteção do género bacteriano mais concretamente das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, para a carga microbiana testada.

É possível concluir que a solução de ADN resultante da extração a partir do meio de enriquecimento Bolton Broth não continha substâncias provenientes do meio de cultura ou mesmo resíduos químicos da fase de extração capazes de inibir a reação de PCR. Desta forma, conclui-se que o *Screening-PCR* foi possível ser feito a partir do meio Bolton Broth ao fim das 48h de incubação.

A norma ISO 10272-1:2017 sugere a utilização de Bolton Broth para enriquecer amostras que apresentam baixos números de *Campylobacter*, reduzidos níveis de microbiota envolvente ou em amostras que apresentem células do género *Campylobacter* sob condições de stress (ISO 10272-1, 2017).

Sendo assim, este meio de enriquecimento pode ser utilizado na pesquisa *Campylobacter* spp. por exame cultural, assim como na deteção através da metodologia de *Screening -PCR*.

3.12. *Screening-PCR* de pools de amostras

Porções-teste do mesmo tipo de produto ou amostras ambientais da mesma origem e do mesmo lote podem ser analisadas em *pool* (ISO 6887-1:2017).

Foram realizadas análises de *pools* de 5 amostras, de carne de aves e de esfregaços de superfícies, de forma a averiguar se era viável detetar a positividade para *Campylobacter* em *pools* das amostras. A análise teve como objetivo minimizar o tempo e os gastos no laboratório. Este teste teve como objetivo averiguar se, sempre que uma das amostras constituintes da *pool* apresentasse positividade para o género bacteriano em estudo, a análise da *pool* teria de apresentar também um resultado positivo.

Após as 48h de incubação dos caldos de enriquecimento, foram colocados 1 ml de cada uma das 5 suspensões a serem analisadas, num tubo estéril, efetuando deste modo a *pool* das amostras (Figura9). Homogeneizou-se no vortex e, da *pool* bem homogeneizada, retirou-se 1ml e procedeu-se à extração do ADN, seguiu-se o *Screening- PCR*, utilizando o ADN extraído da *pool* como ADN-molde.

3-Metodologia

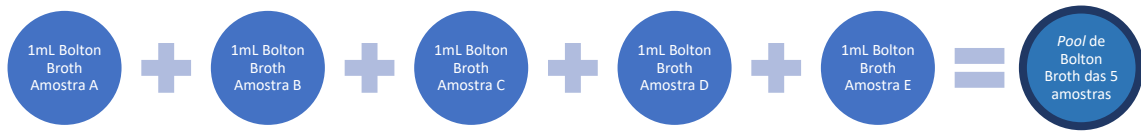


Figura 9-Procedimento de elaboração de uma *pool*.

Fizeram-se 9 amostras de *pools* de esfregaços de superfícies e 3 *pools* de carne de frango, os resultados encontram-se abaixo descritos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Protocolo de verificação de *Pools* de amostras, no *Screening-PCR*

Porções-teste do mesmo tipo de produto, ou amostras ambientais da mesma origem e amostras de um mesmo lote podem ser analisadas em *pool* (ISO 6887-1:2017). O protocolo estabelecido e descrito no ponto 3.12 foi validado para comprovar que a metodologia de *pools* não aumentava a probabilidade de resultados falsos negativos.

Adicionámos 34 UFC de *C. jejuni* e 2 UFC de *C. coli* a 1 de 5 suspensões iniciais de esfregaços de superfícies e incubaram-se todas as 5 suspensões, de acordo com a ISO 10272-1:2017. No final da incubação, retirou-se 1 ml do meio de enriquecimento de cada uma para um mesmo tubo, homogeneizou-se e retirou-se 1ml, da qual se fez a extração de ADN. Em paralelo realizou-se a extração em 1ml de cada suspensão, individualmente.

A *pool* e a única suspensão contaminada com baixos números apresentaram-se positivas para *C. jejuni* e *C. coli*. Os resultados são apresentados na Figura 10.

4-Resultados e Discussão

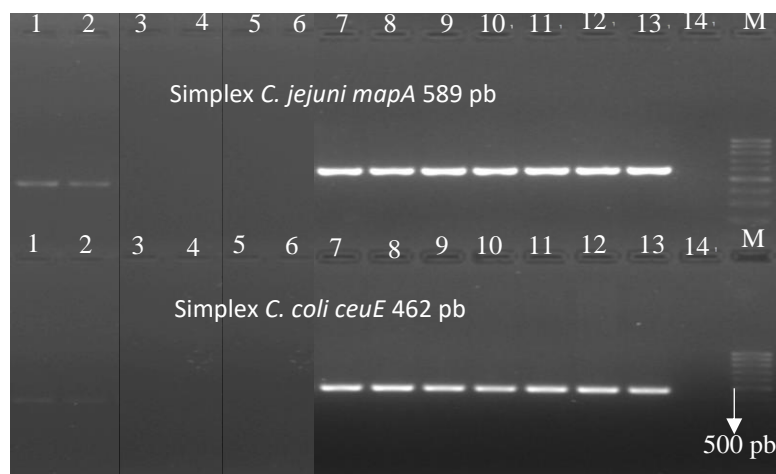


Figura 10-Screening-PCR da *pool* contaminada de amostras de esfregaços de superfícies de embalagens que acondicionam carne de frango.

Legenda: **Simplex *C. jejuni***: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1-ADN da *Pool* referente às amostras 20/4644 contaminada até à 20/4648) 2- ADN da amostra 20/4644 contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559; 3- ADN da amostra 20/4645; 4- ADN da amostra 20/4646; 5- ADN da amostra 20/4647; 6- ADN da amostra 20/4648; 7- ADN da *Pool* referente às amostras 20/4644 contaminada até à 20/4648)e ADN do ATCC 33291; 8- ADN da amostra 20/4644 contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33291; 9- AND da amostra 20/4645 e ADN do ATCC 33291; 10- ADN da amostra 20/4646 e ADN do ATCC 33291; 11- ADN da amostra 20/4647 e ADN do ATCC 33291; 12- ADN da amostra 20/4648 e ADN do ATCC 33291; 13- Controlo positivo ATCC 33291; 14- Branco (água estéril).

Simplex *C. coli*: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1-ADN da *Pool* referente às amostras 20/4644 contaminada até à 20/4648) 2- ADN da amostra 20/4644 contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559; 3- ADN da amostra 20/4645; 4- ADN da amostra 20/4646; 5- ADN da amostra 20/4647; 6- ADN da amostra 20/4648; 7- ADN da *Pool* referente às amostras 20/4644 contaminada até à 20/4648)e ADN do ATCC 33559; 8- ADN da amostra 20/4644 contaminada com 34 UFC de ATCC 33291 e com 2 UFC de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 9- AND da amostra 20/4645 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da amostra 20/4646 e ADN do ATCC 33559; 11- ADN da amostra 20/4647 e ADN do ATCC 33559; 12- ADN da amostra 20/4648 e ADN do ATCC 33559; 13- Controlo positivo ATCC 33559; 14- Branco (água estéril).

De seguida fizeram-se múltiplas amostras: 9 de *pools* de esfregaços de superfícies de embalagens e 3 de *pools* de carne de frango. Os resultados das *pools* analisadas foram concordantes com o resultado de cada uma das amostras individualizadas (consultar Tabela 6 e Tabela 7).

4-Resultados e Discussão

Tabela 6- Resultados da amplificação dos genes *mapA* e *ceuE* em *pools* de esfregaços de superfícies de embalagens e nas amostras individualizadas que constituem as *pools*.

Pools de esfregaços de superfícies	PCR Bolton Broth 48h		Amostras constituintes da pool	PCR Bolton Broth 48h	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>		<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>
20/6083	Positivo	Negativo	20/4649	Negativo	Negativo
			20/4650	Positivo	Negativo
			20/4651	Positivo	Negativo
			20/4652	Positivo	Negativo
			20/4653	Negativo	Negativo
20/6084	Negativo	Negativo	20/4644	Negativo	Negativo
			20/4645	Negativo	Negativo
			20/4646	Negativo	Negativo
			20/4647	Negativo	Negativo
			20/4648	Negativo	Negativo
20/7919	Positivo	Negativo	20/7914	Positivo	Negativo
			20/7915	Negativo	Negativo
			20/7916	Positivo	Negativo
			20/7917	Positivo	Negativo
			20/7918	Positivo	Negativo
20/12229	Positivo	Negativo	20/12224	Positivo	Negativo
			20/12225	Negativo	Negativo
			20/12226	Positivo	Negativo
			20/12227	Positivo	Negativo
			20/12228	Positivo	Negativo
20/16201	Positivo	Negativo	20/13254	Negativo	Negativo
			20/13255	Negativo	Negativo
			20/13256	Negativo	Negativo
			20/13257	Positivo	Negativo
			20/13258	Negativo	Negativo
20/16202	Positivo	Negativo	20/13259	Negativo	Negativo
			20/13260	Negativo	Negativo
			20/132061	Positivo	Negativo
			20/13276	Negativo	Negativo
20/16216	Negativo	Negativo	20/16211	Negativo	Negativo
			20/16212	Negativo	Negativo
			20/16213	Negativo	Negativo
			20/16214	Negativo	Negativo
			20/16215	Negativo	Negativo
20/16222	Positivo	Negativo	20/16217	Positivo	Negativo
			20/16218	Positivo	Negativo
			20/16219	Negativo	Negativo
			20/16220	Positivo	Negativo
20/18084	Positivo	Positivo	20/16683	Negativo	Negativo
			20/16684	Negativo	Negativo
			20/16685	Negativo	Negativo
			20/16686	Negativo	Negativo
			20/16687	Positivo	Positivo

Tabela 7-Resultados da amplificação dos genes *mapA* e *ceuE* em *pools* de géneros alimentícios e nas amostras individualizadas que constituem as *pools*.

Pools de esfregaços de superfícies	PCR Bolton Broth 48h		Amostras constituintes da pool	PCR Bolton Broth 48h	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>		<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>
20/16203	Positivo	Positivo	20/13262	Positivo	Negativo
			20/13263	Positivo	Negativo
			20/13264	Positivo	Negativo
			20/13265	Positivo	Positivo
			20/13266	Positivo	Positivo
20/16204	Positivo	Positivo	20/13267	Positivo	Negativo
			20/13268	Positivo	Positivo
			20/13269	Positivo	Positivo
			20/13277	Positivo	Negativo
20/18086	Positivo	Positivo	20/16688	Positivo	Negativo
			20/16689	Positivo	Negativo
			20/16690	Positivo	Positivo
			20/16691	Positivo	Negativo
			20/16692	Positivo	Negativo

As Tabelas 6 e 7 sintetizam os resultados obtidos pelo *Screening-PCR*. As *pools* foram constituídas por 4 ou 5 amostras cada. Verificou-se que, das 9 *pools* de esfregaços de superfícies, 6 foram positivas só para 1 dos genes, neste caso para o *mapA*; 1 foi positiva para os 2 genes *mapA* e *ceuE*; e 2 foram negativas para ambos. Relativamente às 3 *pools* de géneros alimentícios, constatou-se que em todas houve amplificação dos dois genes, o *mapA* e o *ceuE*. Os resultados obtidos individualmente foram reprodutíveis quando as amostras foram analisadas em conjunto, ou seja, em *pools*. As 2 *pools* em que não houve amplificação para nenhum dos genes em estudo foram consistentes com os resultados de cada uma das amostras que as constituíam. Não existiram falsos negativos quanto à pesquisa dos genes *mapA* e o *ceuE* em *pools* de 5 amostras no máximo.

Alguns dos resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7, que estão também demonstrados nas imagens seguintes, Figura 11,12 e 13, correspondem à visualização dos produtos de PCR após eletroforese.

4-Resultados e Discussão

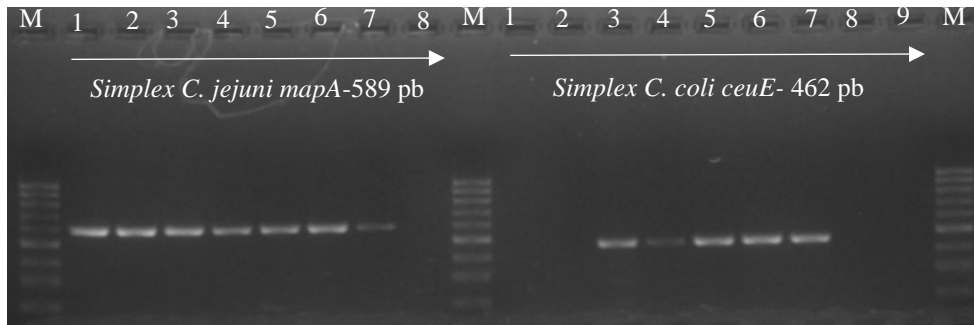


Figura 11-Amplificação, dos genes *mapA* e *ceuE* em *pools* de géneros alimentícios e em *pools* de esfregaços de superfícies de embalagens.

Legenda: **Simplex C. jejuni**: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Biorom); 1- ADN da *pool* 20/16201; 2- ADN da *pool* a 20/16202; 3- ADN da *pool* 20/16203; 4- ADN da *pool* 20/16204; 5- ADN da *pool* 20/16201 e ADN do ATCC 33291; 6- ADN da *pool* 20/16203 e ADN do ATCC 33291; 7- Controlo positivo (ATCC 33291); 8- Branco (água estéril).

Simplex C. coli: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Biorom); 1- ADN da *pool* 20/16201; 2- ADN da *pool* a 20/16202; 3- ADN da *pool* 20/16203; 4- ADN da *pool* 20/16204; 5- ADN da *pool* 20/16202 e ADN do ATCC 33559; 6- ADN da *pool* 20/16204 e ADN do ATCC 33559; 7- Controlo positivo (ATCC 33559); 8- Branco (água estéril); 9- ADN da amostra 20/13267 (repetição).

4-Resultados e Discussão

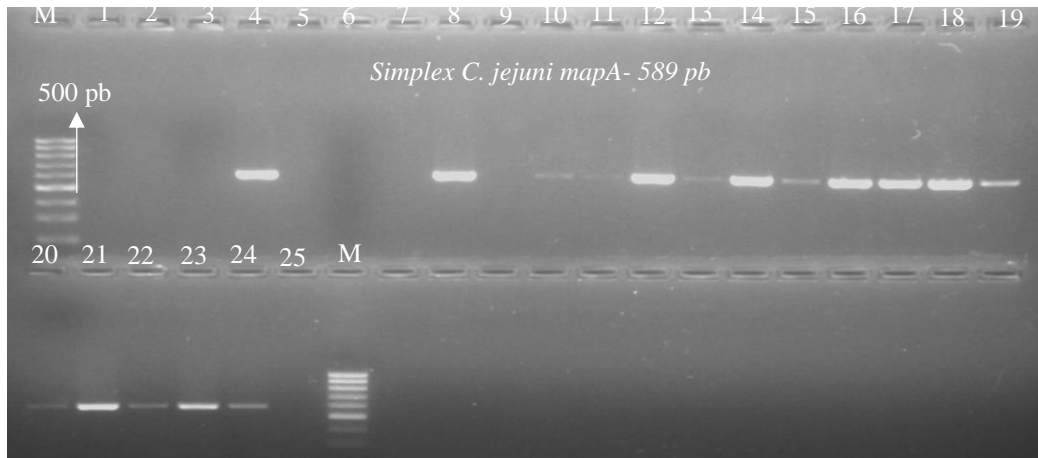


Figura 12-Amplificação do gene *mapA* nas amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 20/13263; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13276 e 20/13277.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Biorom); 1- ADN da amostra 20/13254; 2- ADN da amostra 20/13255; 3- ADN da amostra 20/13256; 4- ADN da amostra 20/13257; 5- ADN da amostra 20/13258; 6- ADN da amostra 20/13259; 7- ADN da amostra 20/13260; 8- ADN da amostra 20/13261; 9- ADN da amostra 20/13276; 10- ADN da amostra 20/13262; 11- ADN da amostra 20/1363; 12- ADN da amostra 20/13264; 13- ADN da amostra 20/13265; 14- ADN da amostra 20/13266; 15- ADN da amostra 20/13267; 16- ADN da amostra 20/13268; 17- ADN da amostra 20/13269; 18- 20/13277; 19- ADN da amostra 20/13262 e ADN do ATCC 33291; 20- ADN da amostra 20/13263 e ADN do ATCC 33291; 21- ADN da amostra 20/13264 e ADN do ATCC 33291; 22- ADN da amostra 20/13265 e ADN do ATCC 33291; 23- ADN da amostra 20/13266 e ADN do ATCC 33291; 24-Controlo positivo (ATCC 33291); 25- Branco (água estéril).

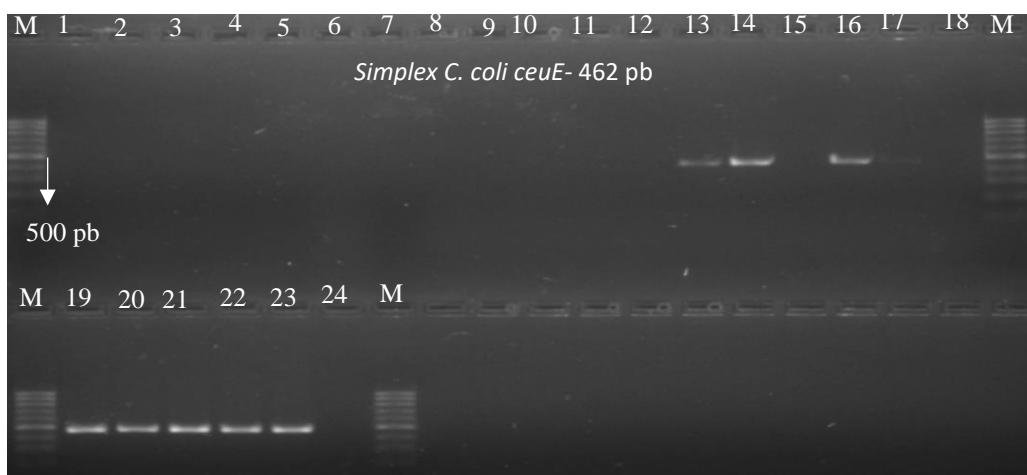


Figura 13-Amplificação do gene *ceuE* nas amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 20/13263; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13276 e 20/13277.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/13254; 2- ADN da amostra 20/13255; 3- ADN da amostra 20/13256; 4- ADN da amostra 20/13257; 5- ADN da amostra 20/13258; 6- ADN da amostra 20/13259; 7- ADN da amostra 20/13260; 8- ADN da amostra 20/13261; 9- ADN da amostra 20/13276; 10- ADN da amostra 20/13262; 11- ADN da amostra 20/1363; 12- ADN da amostra 20/13264; 13- ADN da amostra 20/13265; 14- ADN da amostra 20/13266; 15- ADN da amostra 20/13267; 16- ADN da amostra 20/13268; 17- ADN da amostra 20/13269; 18- 20/13277; 19- ADN da amostra 20/13267 e ADN do ATCC 33559; 20- ADN da amostra 20/13268 e ADN do ATCC 33559; 21- ADN da amostra 20/13269 e ADN do ATCC 33559; 22- ADN da amostra 20/13277 e ADN do ATCC 33559; 23- Controlo positivo (ATCC 33559); 24- Branco (água estéril).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que, tal como esperado, se no mínimo uma amostra constituinte de uma determinada *pool* fosse positiva para a presença de alguma das duas espécies de *Campylobacter*, o resultado da análise da *pool* à qual esta pertencia também se apresentaria positivo. Desta forma, demonstrou-se que a análise de amostras de géneros alimentícios e de esfregaços de superfícies é possível ser feita em *pools* com um máximo de 5 unidades. A realização de *pools* de amostras vai levar a uma diminuição de custos e de trabalho, podendo por isso possibilitar um aumento do número de amostras em análise, num mesmo período de tempo.

4.2. Resultados do *Screening-PCR* e resultados obtidos pela ISO 10272-1:2017 em amostras de carne de frango e em esfregaços de superfícies de embalagens

A pesquisa de *Campylobacter* spp. em 10 g de carne de frango, nas 60 amostras colhidas no retalho e em 10 ml resultante do esfregaço realizado na superfície exterior de 63 embalagens que acondicionaram carne de frango, foi efetuada após um enriquecimento, seguido da

pesquisa realizada em paralelo por duas metodologias: *Screening-PCR*; e confirmação por cultura de acordo com a ISO 10272-1:2017. Das 57 amostras positivas para *C. jejuni/C. coli*, no *Screening-PCR* foi confirmada a presença de *Campylobacter* spp. em 52 (42%). Não foi detetado *C. jejuni/C.coli* em 66 amostras no *Screening-PCR*, e a confirmação destas amostras pela ISO 10272-1:2017 foi 100% concordante. No total, os resultados foram concordantes em 118 das 123 amostras ensaiadas (96%) e não foram detetados falsos negativos, permitindo considerar viável a hipótese de só os resultados positivos no *Screening-PCR* serem confirmados pelo método cultural.

Tabela 8-Resultados obtidos no *Screening-PCR* e resultados obtidos pela confirmação com base na ISO 10272-1:2017 em amostras de carne de frango e em esfregaços de superfícies, quanto à pesquisa de *Campylobacter* spp.

Tipo de matriz	Nº de Amostras			
	Detetado <i>Campylobacter jejuni</i> ou <i>Campylobacter coli</i>	Confirmada a Detecção <i>Campylobacter</i> spp	Não Detetado <i>Campylobacter jejuni</i> ou <i>Campylobacter coli</i>	Confirmada a Não Detecção de <i>Campylobacter</i> spp
	<i>Screening-PCR</i>	ISO 10272-1:2017	<i>Screening-PCR</i>	ISO 10272-1:2017
Carne de frango (10 g) n=60	38 (63%)	35 (58%)	22 (37%)	22(37%)
Esfregaço da superfície exterior de embalagens de carne de frango n=63	19 (30%)	17 (27%)	44 (70%)	44(70%)
Total de amostras n=123	57 (46%)	52 (42%)	66 (54%)	66 (54%)

A identificação das espécies foi realizada pela técnica de PCR convencional nas colónias isoladas, identificadas como pertencentes ao género *Campylobacter*.

A monitorização da presença de *Campylobacter* em amostras de carne de frango e em superfícies de embalagens de carne de frango permitiu detetar a sua presença, respetivamente em 58% (35/60), e 27% (17/63) das amostras ensaiadas. Foi detetada a presença de *C. jejuni* em 88% (46/52) e *C. coli* em 25% (13/52) das amostras positivas para *Campylobacter*. A percentagem de resultados onde se detetou *Campylobacter* spp. é idêntica aos resultados

obtidos num estudo mencionado na bibliografia (Brown *et al.*, 2014; Di Giannatale *et al.*, 2019). Nas 16 amostras positivas no *Screening-PCR* para ambas as espécies não se conseguiram isolar as duas espécies reveladas em 13 (81%) das amostras.

4.3- Presença das espécies de *Campylobacter* em amostras de carne de frango e em superfícies de embalagens de carne de frango

4.3.1- Presença de *Campylobacter* em amostras de carne de frango

Analisando as amostras de carne de frango verificou-se que, no *Screening-PCR*, 58% (22/38) das amostras amplificaram para o gene *mapA* e não amplificaram para o gene *ceuE*. Destas 22 amostras, foi possível o isolamento da espécie *C. jejuni* em 20 (91%). Em relação às amostras positivas, só para *C. coli* houve uma concordância de 100% entre os dois métodos. Foi detetada a presença de ambas as espécies bacterianas em 39% (15/38) das amostras positivas no *Screening-PCR*, no entanto, destas, só se isolaram 11 estirpes de *C. jejuni* e 11 de *C. coli*. Os resultados podem ser consultados na Tabela 9.

Através da análise efetuada, verificou-se que *C. jejuni* é a espécie mais isolada nas carnes de frango analisadas, estes dados encontram-se concordantes com os resultados descritos na bibliografia, referentes à incidência de *C. jejuni* em carnes de frango (Di Giannatale *et al.*, 2019; García-Sánchez *et al.*, 2018). Também de acordo com a revisão bibliográfica, *Campylobacter jejuni* é a espécie responsável por causar o maior número de gastroenterites em países industrializados (Ica *et al.*, 2012). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a carne de frango pode ser um importante veículo de transmissão alimentar do género *Campylobacter*.

4.3.2- Presença de *Campylobacter* em amostras de superfícies de embalagens de carne de frango

Através dos resultados obtidos por *Screening-PCR*, em 18 das 19 amostras detetaram-se genes para *C. jejuni*. Numa destas amostras, também foram detetados, simultaneamente, genes para *C. coli*. Através dos métodos de cultivo, *C. jejuni* foi positiva em 79% (15/19). Numa amostra que continha genes para ambas as espécies, foi possível o isolamento apenas de *C. coli*. Com base no *Screening-PCR* em amostras de esfregaços de embalagens, nenhuma revelou somente a presença de genes para *C. coli*, apresentando-se assim concordante com os resultados obtidos pela ISO 10272-1:2017. Os resultados podem ser consultados na tabela 9.

Deste modo, as superfícies de embalagens de carne de frango podem representar um risco de contaminação de outras superfícies e de alimentos prontos para serem consumidos, uma vez que, segundo os resultados obtidos, as bactérias do género *Campylobacter* estão presentes nestas. Neste caso das espécies isoladas, *C. jejuni* foi a que se encontrou num maior número de amostras. Como referido anteriormente, as embalagens podem contactar com outros produtos alimentares, ou mesmo com outras superfícies em diferentes circunstâncias, como a ida ao supermercado ou nas cozinhas dos consumidores, podendo deste modo ocorrer a disseminação de *Campylobacter*. Também é de realçar que os exsudados da carne, muitas vezes encontrados nas embalagens, facilitam a sobrevivência e consequentemente a disseminação deste género bacteriano (Brown *et al.*, 2014).

Tabela 9-Resultados da presença das espécies de *Campylobacter* em amostras de carne de frango e em superfícies de embalagens de carne de frango, através do *Screening-PCR* e identificação das espécies de *Campylobacter* das colónias isoladas através do PCR convencional.

Tipo de matriz	Espécies de <i>Campylobacter</i>	Nº de Amostras em que foram identificadas espécies de <i>Campylobacter</i> e percentagem de concordância com o <i>Screening-PCR</i>)		
		<i>Screening-PCR</i>	PCR estirpes	
			Isolado <i>C.jejuni</i>	Isolado <i>C.coli</i>
Carne de frango (10 g) n=38	<i>Campylobacter jejuni</i>	22 (58%)	20 (91%)	0 (100%)
	<i>Campylobacter jejuni e Campylobacter coli</i>	15 (39%)	11 (73%)	11 (73%)
	<i>Campylobacter coli</i>	1 (3%)	0 (100%)	1 (100%)
Esfregaço da superfície exterior de embalagens de carne frango n=19	<i>Campylobacter jejuni</i>	18 (95%)	15(79%)	0 (100%)
	<i>Campylobacter jejuni e Campylobacter coli</i>	1 (5%)	0 (0%)	1 (100%)
	<i>Campylobacter coli</i>	0 (0%)	0 (100%)	0 (100%)
Total	<i>Campylobacter jejuni</i>	56	46 (82%)	
	<i>Campylobacter coli</i>	17		13 (76%)

Detetou-se no *Screening-PCR* genes que codificam para *C. jejuni*, em 56 amostras, e genes para *C. coli*, em 17, tendo as estirpes sido isoladas, respetivamente, em 46 (82%) e em 13 (76%) das amostras onde estes foram detetados. O facto de só se terem isolado inicialmente 5 colónias para realizar a pesquisa e confirmação/deteção da espécie poderá ter sido insuficiente para a

deteção de mais de uma espécie, influenciando o resultado obtido. Consideramos que, para a deteção de várias espécies presentes numa amostra, o *Screening-PCR* poderá ser uma vantagem, mas deverá ser aumentado o número de colónias a serem ensaiadas, incrementando, deste modo, a probabilidade de serem encontradas todas as espécies detetadas no *screening*.

Deste modo pode concluir-se que a técnica de *Screening-PCR* é vantajosa para a deteção de *Campylobacter*, permitindo que apenas as amostras que apresentem amplificação para os genes codificadores deste prossigam a sua análise de acordo com a ISO 10272-1:2017, tendo como vantagem minimizar o tempo de análise, aumentar o número de amostras que se pode analisar na mesma reação de PCR, assim como reduzir os gastos.

Após a identificação do género e da espécie das colónias isoladas, estas foram conservadas em meio de conservação de estirpes composto por triptona de soja broth com 20% de glicerol (*CRYOINSTAT NATURAL 822075ZA*, VWR BDH CHEMICALS) e acondicionadas numa arca de congelação a -80° C.

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

5.1 Conclusão

A presente dissertação sobre o impacte do *Campylobacter* ao nível da saúde e da segurança alimentar foi desenvolvida tendo por base quatro objetivos. Dois deles tinham por fim melhorar a metodologia de deteção para rentabilizar recursos técnicos e materiais, e os outros dois tinham como finalidade monitorizar a presença de *Campylobacter* e das suas espécies *C. jejuni* e *C. coli* no retalho, no norte de Portugal.

De forma a averiguar a presença de *Campylobacter*, foram analisadas dois tipos de matrizes quanto à presença ou ausência do género *Campylobacter*: carnes de frango e superfícies de embalagens que acondicionavam carne de frango, pelo risco que ambas podem representar para o consumidor.

Das amostras que se revelaram positivas para a presença do género *Campylobacter*, foi feita ainda a identificação da espécie dentro das patogénicas para o ser humano e que são as mais comumente isoladas como agentes de gastroenterites em países industrializados, sendo elas *C. jejuni* e *C. coli*.

As amostras de carne de frango apresentaram uma maior percentagem de positivos para o género *Campylobacter* (58%), quando comparadas com a percentagem de positivos das superfícies exteriores das embalagens de carne de frango (27%).

Quanto à incidência das duas espécies de *Campylobacter* em estudo, constatou-se que a espécie *C. jejuni* foi a mais incidente, estando presente em 88% das amostras, sendo que apenas 25% das amostras deram positivas para *C. coli*.

Nas amostras positivas no *Screening-PCR* para ambas as espécies (n=16), não se conseguiram isolar as duas espécies amplificadas em 13 (81%) das amostras. Esta dificuldade na deteção da espécie pode estar relacionada com o reduzido número de colónias usadas para a deteção e identificação. As 5 colónias provaram ser insuficientes para a deteção da espécie. Deste modo, em posteriores estudos, seria importante aumentar o número de colónias ensaiadas de forma a aumentar a probabilidade de se conseguir isolar as diferentes espécies deste género. Outra possibilidade para a dificuldade no isolamento das espécies pode ser o facto de estas poderem estar sob condições de stress e por isso adquirirem a forma de VBNC.

Outro dos objetivos deste trabalho foi implementar e validar o *Screening-PCR* a partir das amostras enriquecidas em Bolton Broth; apesar de ser um meio de enriquecimento seletivo com componentes na sua constituição que poderiam ser inibidores da reação de PCR, revelou não interferir nesta reação, uma vez que não houve inibição quando o ADN-molde foi extraído a partir deste.

O processo de extração de ADN é fundamental neste procedimento, pois é de extrema importância que o ADN final tenha um grau de pureza aceitável, prevenindo deste modo possíveis inibições da reação de PCR. De acordo com os resultados obtidos foi possível implementar o *Screening-PCR*. A presente dissertação apresenta uma metodologia que rapidamente diferencia os casos negativos dos prováveis positivos, sendo necessário, apenas nestes casos, prosseguir o ensaio para confirmação da presença de *Campylobacter* spp. por isolamento de estirpes.

Foi implementada e validada a metodologia de *Screening-PCR* em *pools* de amostras, tanto em amostras de carne de frango como em amostras de superfícies de embalagens que acondicionam carne de frango. Analisaram-se amostras através de amostras compostas, ou seja, *pools*. O objetivo consistiu em averiguar se a análise de uma *pool* possuía veracidade nos resultados, ou seja, se o resultado da *pool* era o somatório dos resultados das amostras individualizadas. Concluiu-se que foi possível implementar o *Screening-PCR* fazendo *pools* de amostras, tendo a vantagem de serem feitas até 5 amostras numa mesma reação.

5.2. Perspetivas Futuras

Futuramente deveria ser feita a quantificação de *Campylobacter* na carne de frango no retalho. As 59 estirpes isoladas neste estudo podem ser utilizadas em estudos de avaliação de resistência de *Campylobacter* a antimicrobianos, servir para avaliar fatores de virulência, comparar com estirpes isoladas em humanos, animais e no ambiente, entre outros estudos que irão ajudar ao conhecimento da epidemiologia da campilobacteriose, facilitando a gestão do risco.

Seria importante averiguar outros procedimentos para a pesquisa de *Campylobacter*, de forma a colmatar ou contornar aspetos menos positivos nos procedimentos que foram usados. Seria

de grande interesse utilizar uma técnica que conseguisse fazer uma captura das bactérias de interesse no passo prévio à subcultura do meio de enriquecimento em placas de agar seletivas. Seria essencial utilizar um meio de cultura, para se fazer o isolamento, que fosse seletivo mas também diferencial, de forma a que estirpes de géneros e/ou espécies diferentes apresentassem características fenotípicas diferentes assim como um meio de cultura cromogénico que fosse constituído pelo maior número de substratos possível e cujos resultados fossem fidedignos.

Para finalizar e perante os resultados obtidos neste estudo, é extremamente importante que sejam implementadas campanhas de sensibilização de forma a consciencializar os consumidores para as regras de higiene na manipulação de carne de frango e suas embalagens, em todas as fases do processamento de alimentos desde a sua aquisição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuoun, M., Manning, G., Cawthraw, S. A., Ridley, A., Ahmed, I. H., Wassenaar, T. M., & Newell, D. G. (2005). Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infection and Immunity*, 73(5), 3053–3062. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.3053-3062.2005>
- ACMSF. (2019). *Ad Hoc Group on Campylobacter Third Report on Campylobacter Advises the Food Standards Agency on the Microbiological Safety of Food*. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food.
- Agnetti, J., Seth-Smith, H. M. B., Ursich, S., Reist, J., Basler, M., Nickel, C., Bassetti, S., Ritz, N., Tschudin-Sutter, S., & Egli, A. (2019). Clinical impact of the type VI secretion system on virulence of *Campylobacter* species during infection. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 237. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3858-x>
- Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A., & Frost, J. A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 237–241. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00845-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00845-0)
- Bhunja, A. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4>
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., & Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 157(3), 472–479. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.472>
- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>
- Bolton, F. J., Coates, D., & Hutchinson, D. N. (1984). The ability of *campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. *The Journal of Applied Bacteriology*, 56(1), 151–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb04707.x>
- Bronowski, C., James, C. E., & Winstanley, C. (2014). Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters*, 356(1), 8–19. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12488>
- Brown, H. L., Reuter, M., Salt, L. J., Cross, K. L., Betts, R. P., & Vliet, A. H. M. van. (2014). Chicken Juice Enhances Surface Attachment and Biofilm Formation of *Campylobacter jejuni*.

- Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 7053–7060.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02614-14>
- Bull, S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J. E. L., Gillard-King, J., & Humphrey, T. J. (2006). Sources of *Campylobacter spp.* Colonizing housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 645–652. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.645-652.2006>
- Burgess, F., Little, C. L., Allen, G., Williamson, K., & Mitchell, R. T. (2005). Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the External Packaging of Raw Meat. *Journal of Food Protection*, 68(3), 469–475. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.3.469>
- Cangelosi, G. A., & Meschke, J. S. (2014). Dead or Alive: Molecular Assessment of Microbial Viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5884–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-14>
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M., & Azeredo, J. (2010). The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, 10(1), 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-232>
- Castro, A. G. S. A., Dorneles, E. M. S., Santos, E. L. S., Alves, T. M., Silva, G. R., Figueiredo, T. C., Assis, D. C. S., Lage, A. P., & Cançado, S. V. (2018). Viability of *Campylobacter spp.* In frozen and chilled broiler carcasses according to real-time PCR with propidium monoazide pretreatment. *Poultry Science*, 97(5), 1706–1711. <https://doi.org/10.3382/ps/pey020>
- Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2018). *Campylobacteriosis*, *Salmonellosis*, *Yersiniosis*, and *Listeriosis* as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
- Corry, J. E., Post, D. E., Colin, P., & Laisney, M. J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*, 26(1), 43–76. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00044-k](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00044-k)
- Damborg, P., Olsen, K. E. P., Møller Nielsen, E., & Guardabassi, L. (2004). Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1363–1364. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1363-1364.2004>
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., & Groß, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms.

- International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205–211.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002>
- Debruyne, L., Gevers, D., & Vandamme, P. (2008). *Taxonomy of the family Campylobacteraceae* (Third Edition). ASM Press.
- DGS. (2016). *Despacho n.º 15385-A/2016*. Direção Geral de Saúde, Ministério da Saúde.
- Dhama, K., Rajagunalan, S., Chakraborty, S., Verma, A. K., Kumar, A., Tiwari, R., & Kapoor, S. (2013). Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 16(20), 1076–1085. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.1076.1085>
- Di Giannatale, E., Calistri, P., Di Donato, G., Decastelli, L., Goffredo, E., Adriano, D., Mancini, M. E., Galleggiante, A., Neri, D., Antoci, S., Marfoglia, C., Marotta, F., Nuvoloni, R., & Migliorati, G. (2019). Thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken and bovine meat in Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225957>
- Dicksved, J., Ellström, P., Engstrand, L., & Rautelin, H. (2014). Susceptibility to *Campylobacter* Infection Is Associated with the Species Composition of the Human Fecal Microbiota. *mBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01212-14>
- Doyle, M. (1989). *Foodborne Bacterial Pathogens*. CRC Press.
- EFSA. (2010). Food Safety Authority of Ireland—Third National Microbiological Survey 2008 (08NS3): Prevalence of *Campylobacter* spp. On (a) surface of chicken packaging and (b) surface of display cabinets.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: Control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, 9(4), 2105. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2105>
- EFSA BIOHAZ. (2010). *Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU*. European Food Safety Authority.
- EFSA-ECDC. (2018). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017*.
- EFSA-ECDC. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2013). Foodborne *Campylobacter*: Infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6292–6304. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126292>

- Facciola, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., & Laganà, P. (2017). Campylobacter: From microbiology to prevention. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58(2), E79–E92.
- FAO, & WHO. (2009). *Salmonella and Campylobacter in chicken meat:MEETING REPORT*. <http://www.who.int/foodsafety>
- Ferrero, R. L., & Lee, A. (1988). Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: Comparison with conventional rod-shaped bacteria. *Journal of General Microbiology*, 134(1), 53–59. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-53>
- Fitzgerald, C. (2015). Campylobacter. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001>
- García-Sánchez, L., Melero, B., Diez, A. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2018). Characterization of *Campylobacter* species in Spanish retail from different fresh chicken products and their antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 76, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.004>
- Garénaux, A., Jugiau, F., Rama, F., de Jonge, R., Denis, M., Federighi, M., & Ritz, M. (2008). Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: Effect of temperature. *Current Microbiology*, 56(4), 293–297. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9082-8>
- Ge, Z., Schauer, D. B., & Fox, J. G. (2008). In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1599–1607. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01173.x>
- Geissler, C., & Powers, H. (Eds.). (2017). *Human Nutrition* (Thirteenth Edition). Oxford University Press.
- Georgsson, F., Porkelsson, Á. E., Geirsdóttir, M., Reiersen, J., & Stern, N. J. (2006). The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology*, 23(7), 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.003>
- Gould, G. W., Lund, B. M., & Baird-Parker, A. C. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Md. : Aspen Publishers. <https://trove.nla.gov.au/version/45848941>
- Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: Not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15(10), 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.006>
- Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R., & Engvall, E. O. (2018). Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65 Suppl 1, 30–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.12870>

- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, 4(3), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
- Hill, W. E., & Wachsmuth, D. K. (1996). The polymerase chain reaction: Applications for the detection of foodborne pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(1–2), 123–173. <https://doi.org/10.1080/10408399609527721>
- Horrocks, S. M., Anderson, R. C., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, 15(1–2), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.001>
- Hu, L., & Kopecko, D. (2003). *Campylobacter* species. Em *International handbook of foodborne pathogens*. (Miliotis MD, Bier JW). Marcel Dekker.
- Humphrey, T., & Muscat, I. (1989). Incubation temperature and the isolation of *Campylobacter jejuni* from food, milk or water. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 137–139. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00308.x>
- Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H. D., Ahmed, B., Call, D. R., & Beyenal, H. (2012a). Characterization of Mono- and Mixed-Culture *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1033–1038. <https://doi.org/10.1128/AEM.07364-11>
- Igwaran, A., & Okoh, A. I. (2019). Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon*, 5(11), e02814. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02814>
- ISO 6887-2. (2017). *Microbiology of the food chain—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products*. International Organization for Standardization.
- ISO 10272-1. (2017). *Microbiology of the food chain—Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. —Part 1: Detection method*. International Organization for Standardization.
- ISO 18593. (2018). *Microbiology of the food chain—Horizontal methods for surface sampling*. International Organization for Standardization.
- Jain, D., Prasad, K. N., Sinha, S., & Husain, N. (2008). Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 57(3), 267–272. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47317-0>
- Janssen, R., Krogfelt, K. A., Cawthraw, S. A., van Pelt, W., Wagenaar, J. A., & Owen, R. J. (2008). Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: The host perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 505–518. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-07>
- Jorgensen, F., Charlett, A., Swift, C., Corcionivoschi, N., & Nicola, C. (2019). *Year 4 Report*. 1–37.

- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., & Barnes, W. M. (2009). Mutants of *Taq* DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 37(5), e40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1055>
- King, S., & Adams, M. C. (2008). Incidence of *Campylobacter* in Processed Poultry: Is It a Concern for Human Health? *Journal of Food Safety*, 28(3), 376–388. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00106.x>
- Konkel, M. E., Monteville, M. R., Rivera-Amill, V., & Joens, L. A. (2001). The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2(2), 55–71.
- Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., & Bolton, D. (2015). Distribution of Virulence-Associated Genes in a Selection of *Campylobacter* Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(5), 424–432. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1883>
- Levin, R. E. (2007). *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology*, 21(4), 271–347. <https://doi.org/10.1080/08905430701536565>
- Lin, L., Zhu, Y., & Cui, H. (2018). Electrospun thyme essential oil/gelatin nanofibers for active packaging against *Campylobacter jejuni* in chicken. *LWT*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.015>
- Liu, F., Ma, R., Wang, Y., & Zhang, L. (2018). The Clinical Importance of *Campylobacter concisus* and Other Human Hosted *Campylobacter* Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 243. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00243>
- Lorsch, J. (2013). *Methods in Enzymology. Laboratory methods in enzymology: DNA. Preface*. 529.
- McSweeney, C., Kang, S., Gagen, E., Davis, C., Morrison, M., & Denman, S. (2009). Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(SPE), 341–351. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300034>

- Meinersmann, R. J., Patton, C. M., Evins, G. M., Wachsmuth, I. K., & Fields, P. I. (2002). Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 5), 1789–1797. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1789>
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Dory, D., & Chemaly, M. (2016). Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: Biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1139–1173. <https://doi.org/10.1111/jam.12986>
- Mihaljevic, R. R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S. S., & Abram, M. (2007). Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43(2), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.03.004>
- Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S. G., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D. A., Mégraud, F., Millar, B. C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J. R., Rooney, P. J., Sails, A., & Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 36(3), 351–382. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005012>
- Nachamkin, I., & Nguyen, P. (2017). Isolation of *Campylobacter* Species from Stool Samples by Use of a Filtration Method: Assessment from a United States-Based Population. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2204–2207. <https://doi.org/10.1128/JCM.00332-17>
- Newell, D. G., Shreeve, J. E., Toszeghy, M., Domingue, G., Bull, S., Humphrey, T., & Mead, G. (2001). Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2636–2640. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2636-2640.2001>
- N.N. (2012). *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. Thermo Fisher T123– Technical Bulletin, Nanodrop Lite.
- Northcutt, J. K., Smith, D. P., Musgrove, M. T., Ingram, K. D., & Hinton, A. (2005). Microbiological impact of spray washing broiler carcasses using different chlorine concentrations and water temperatures. *Poultry Science*, 84(10), 1648–1652. <https://doi.org/10.1093/ps/84.10.1648>
- O'Brien, S. J. (2017). The consequences of *Campylobacter* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, 33(1), 14–20. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000329>
- Oh, E., McMullen, L., & Jeon, B. (2015). High prevalence of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* in retail poultry with potential implication in human infection. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01263>

- Oh, E., McMullen, L. M., Chui, L., & Jeon, B. (2017). Differential survival of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* under different gas conditions. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00954>
- Oleastro, M., Santos, A., & Júlio, C. (2014). Estudo observacional da infecção por *Campylobacter* spp. Em doentes com diarreia aguda. *Boletim Epidemiológico Observações*, 3(Supl 3), 34–36.
- On, S. L. W., & Jordan, P. J. (2003). Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 330–336. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.330-336.2003>
- Osaili, T. M., & Alaboudi, A. R. (2017). Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* sp. Em *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance* (pp. 417–429). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch18>
- Patrone, V., Campana, R., Luciana, V., Dominici, S., Federici, S., Casadei, L., Gioacchini, A., Stocchi, V., & Baffone, W. (2013). CadF expression in *Campylobacter jejuni* strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9877-5>
- Poly, F., & Guerry, P. (2008). Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(1), 27–31. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f1dcb1>
- QIAGEN. (2016). *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* (Fifth).
- Rapp, D., Ross, C. M., Pleydell, E. J., & Muirhead, R. W. (2012). Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7564–7571. <https://doi.org/10.1128/AEM.01783-12>
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., & van Vliet, A. H. M. (2010). Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2122–2128. <https://doi.org/10.1128/AEM.01878-09>
- Richardson, P. T., & Park, S. F. (1995). Enterochelin acquisition in *Campylobacter coli*: Characterization of components of a binding-protein-dependent transport system. *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 12), 3181–3191. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3181>
- Ricke, S. C., Feye, K. M., Chaney, W. E., Shi, Z., Pavlidis, H., & Yang, Y. (2018). Developments in Rapid Detection Methods for the Detection of Foodborne *Campylobacter* in the United States. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3280. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03280>

- Samanta, I., & Bandyopadhyay, S. (2019). *Antimicrobial Resistance in Agriculture Perspective, Policy and Mitigation* (1st ed.). Academic Press.
- Sampers, I., Habib, I., Zutter, L., Dumoulin, A., & Uyttendaele, M. (2009). Survival of *Campylobacter* spp. In poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *International journal of food microbiology*, *137*, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.013>
- Sandberg, M., Nygård, K., Meldal, H., Valle, P. S., Kruse, H., & Skjerve, E. (2006). Incidence trend and risk factors for *campylobacter* infections in humans in Norway. *BMC Public Health*, *6*, 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-6-179>
- Senok, A. C., & Botta, G. A. (2009). *Campylobacter* enteritis in the Arabian Gulf. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *3*(02), 074–082. <https://doi.org/10.3855/jidc.52>
- Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Strachan, N. J. C., MacRae, M., McCarthy, N. D., Wilson, D. J., Gormley, F. J., Falush, D., Ogden, I. D., Maiden, M. C. J., & Forbes, K. J. (2009). *Campylobacter* Genotyping to Determine the Source of Human Infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *48*(8), 1072–1078. <https://doi.org/10.1086/597402>
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*, *2*, 200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M.-L., & Rautelin, H. I. K. (2016). *Campylobacteriosis*: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *22*(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>
- Smith, J. L., & Bayles, D. O. (2006). The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, *32*(4), 227–248. <https://doi.org/10.1080/10408410601023557>
- Speegle, L., Miller, M. E., Backert, S., & Oyarzabal, O. A. (2009). Use of cellulose filters to isolate *Campylobacter* spp. From naturally contaminated retail broiler meat. *Journal of Food Protection*, *72*(12), 2592–2596. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.12.2592>
- Tang, Y., Fang, L., Xu, C., & Zhang, Q. (2017). Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. *Animal Health Research Reviews*, *18*(2), 87–98. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000135>
- Ternhag, A., Törner, A., Svensson, A., Giesecke, J., & Ekdahl, K. (2005). Mortality following *Campylobacter* infection: A registry-based linkage study. *BMC Infectious Diseases*, *5*, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-70>

- Tresse, O., Alvarez-Ordóñez, A., & Connerton, I. (2017). Editorial: About the Foodborne Pathogen *Campylobacter*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1908. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01908>
- Uyttendaele, M., Baert, K., Ghafir, Y., Daube, G., Zutter, L., Herman, L., Dierick, K., Pierard, D., Dubois, J. J., Horion, B., & Debevere, J. (2006). Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp. in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium. *International journal of food microbiology*, 111, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.023>
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., & Falsen, E. (2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. Nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 9), 2016–2022. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017152-0>
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>
- Waldenström, J., Axelsson-Olsson, D., Olsen, B., Hasselquist, D., Griekspoor, P., Jansson, L., Teneberg, S., Svensson, L., & Ellström, P. (2010). *Campylobacter jejuni* Colonization in Wild Birds: Results from an Infection Experiment. *PLOS ONE*, 5(2), e9082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009082>
- Wang, Y., Zhang, M., Deng, F., Shen, Z., Wu, C., Zhang, J., Zhang, Q., & Shen, J. (2014). Emergence of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Species Isolates with a Horizontally Acquired rRNA Methylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5405–5412. <https://doi.org/10.1128/AAC.03039-14>
- Wassenaar, T. M. (1997). Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 466–476.
- Wassenaar, T. M., & Blaser, M. J. (1999). Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, 1(12), 1023–1033. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80520-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80520-6)
- White, P. L., Baker, A. R., & James, W. O. (1997). Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 16(2), 525–541. <https://doi.org/10.20506/rst.16.2.1046>
- Whitehouse, C. A., Zhao, S., & Tate, H. (2018). Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Species: Mechanisms and Genomic Epidemiology. *Advances in Applied Microbiology*, 103, 1–47. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.01.001>

WHO. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.*

WHO. (2020). *Campylobacter.* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>

ANEXOS

Anexo A – Diagrama de procedimentos da metodologia usada

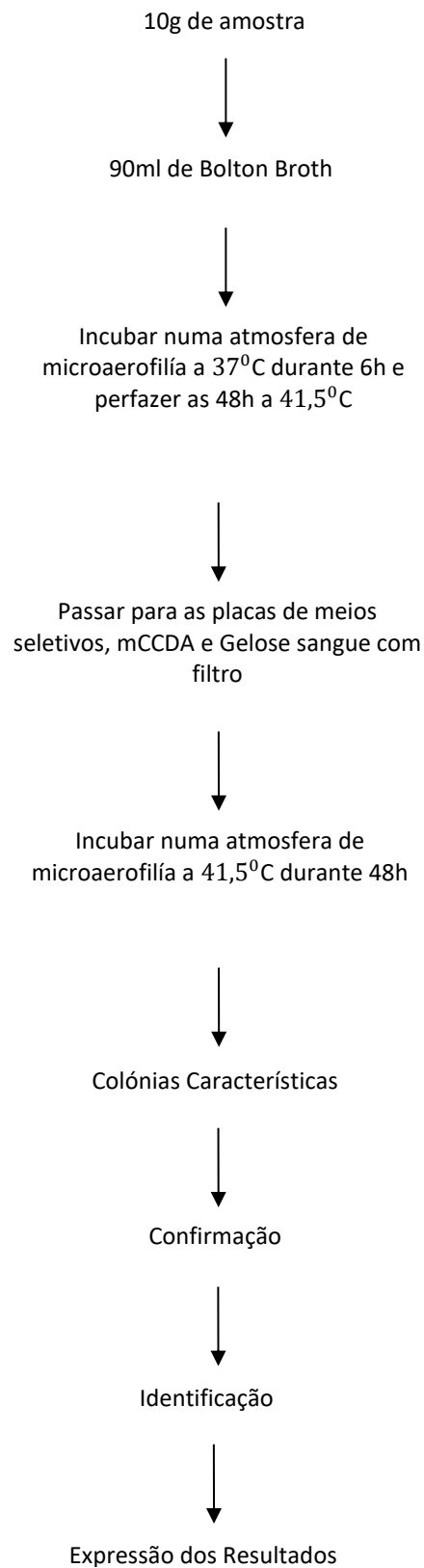


Figura 14-Diagrama de procedimentos para a deteção de *Campylobacter* spp. (Adaptado da ISO 10272-1:2017).

Anexo B- Composição de meios de cultura e reagentes

Bolton Broth

Meio Básico

- Digestão enzimático de tecido animal – 10,0g;
- Hidrolisado de lactoalbumina – 5,0g;
- Extrato de levedura – 5,0g;
- Cloreto de Sódio – 5,0g;
- Piruvato de Sódio – 0,5g;
- Metabissulfito de Sódio – 0,5g;
- Carbonato de Sódio – 0,6g;
- C₅H₅KO₅ – 0,1g;
- Hemina (dissolvida em 0,1 % de hidróxido de sódio) – 0,01g;
- Água – 945 ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Solução de Antibiótico

- Cefoperazona (C₂₅H₂₆N₉NaO₈S₂) – 0,02g;
- Vancomicina (C₆₆H₇₅Cl₂N₉O₂₄) – 0,02g;
- Trimetropim (C₁₇H₂₄N₄O₆) – 0,02g;
- Anfotericina B – 0,01g;
- Etanol e água destilada 50/50 – 5 ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Meio completo

- Meio básico – 945 ml;
- Sangue de Cavalos hemolisado – 50 ml;
- Solução de Antibiótico – 5 ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Meio Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCD agar)

Meio básico:

- Extrato de carne – 10,0g;

Anexos

- Digesta enzimático de tecido animal – 10,0g;
- Cloreto de Sódio – 5,0g;
- Carvão ativado – 4,0g;
- Digesta enzimático de caseína –3,0g;
- Desoxicolato de sódio – 1,0g;
- Sulfato de ferro (II) hidratado –0,25g;
- Piruvato de sódio –0,25g;
- Agar –8,0g para 18,0g*
- Água –1000 ml.

*Dependendo da força do gel de agar

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Suplemento de Antibiótico:

- Cefoperazona de sal de sódio – 0,032g;
- Anfotericina B –0,01g;
- Água – 2 ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Meio completo:

- Meio básico –1000 ml;
- Suplemento de Antibiótico – 5ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Meio de Gelose de Sangue (Columbia blood agar)

Meio Básico

- Digesta enzimático de tecido animal – 23,0g;
- Amido solúvel – 1,0g;
- Cloreto de sódio – 5,0g;
- Agar –8,0g para 18,0g*
- Água – 1000 ml.

*Dependendo da força do gel de agar

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Meio completo

- Meio básico – 1000 ml.
- Sangue de cavalo – 50 ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Reagente para a deteção da atividade da Oxidase

- Dicloridrato de N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-fenilenodiamina – 1,0g;
- Água – 100 ml.

(Preparação segundo a ISO 10272:2017)

Anexo C- Tabela dos resultados do *Screening-PCR* e da Identificação da Espécie

Tabela 10-Tabela dos resultados do *Screening-PCR* e do Isolamento das estirpes.

Número da Amostra	Natureza da Amostra	<i>Screening-PCR</i>		Identificação da espécie	
		<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>
19/13808	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
19/13809	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
19/19670	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19/19671	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19/27906	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
19/27907	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
19/28910	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19/28911	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
19/34547	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19/34548	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/1869	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/1979	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/1980	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/1981	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/1982	carne	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
20/1983	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Não Isolado
20/1984	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20/1985	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/1986	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/1987	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Anexos

20/1988	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4644	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4645	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4646	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4647	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4648	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4649	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4650	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/4651	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/4652	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/4653	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4655	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/4656	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6071	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6072	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6073	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6074	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6075	carne	Positivo	Positivo	Não Isolado	Positivo
20/6076	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6256	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6257	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6258	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6259	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6260	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6261	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/6262	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6263	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6264	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6266	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20/6267	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20/6268	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Não Isolado
20/6269	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/6270	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/6271	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20/6272	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/6273	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20/6274	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/7319	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7320	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7321	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7322	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7910	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7911	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7912	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7913	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Anexos

20/7914	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/7915	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7916	embalagem	Positivo	Negativo	Não Isolado	Negativo
20/7917	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/7918	embalagem	Positivo	Negativo	Não Isolado	Negativo
20/7020	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/7921	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7922	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20/7923	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/7924	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/12224	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/12225	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/12226	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/12227	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/12228	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/12230	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13254	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13255	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13256	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13257	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/13258	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13259	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13260	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13261	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/13262	carne	Positivo	Negativo	Não Isolado	Negativo
20/13263	carne	Positivo	Negativo	Não Isolado	Negativo
20/13264	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/13265	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Não Isolado
20/13266	carne	Positivo	Positivo	Não Isolado	Positivo
20/13267	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/13268	carne	Positivo	Positivo	Não isolado	Não Isolado
20/13269	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Não Isolado
20/13276	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/13277	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16211	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16212	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16213	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16214	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16215	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16217	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16218	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16219	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16220	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16221	embalagem	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16223	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Anexos

20/16224	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16683	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16684	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16685	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16686	embalagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16687	embalagem	Positivo	Positivo	Não Isolado	Positivo
20/16688	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16689	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16690	carne	Positivo	Positivo	Não Isolado	Positivo
20/16691	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16692	carne	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20/16693	carne	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20/16694	carne	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Anexo D- Visualização dos produtos de PCR resultantes do *Screening-PCR* a partir do ADN extraído do meio de enriquecimento

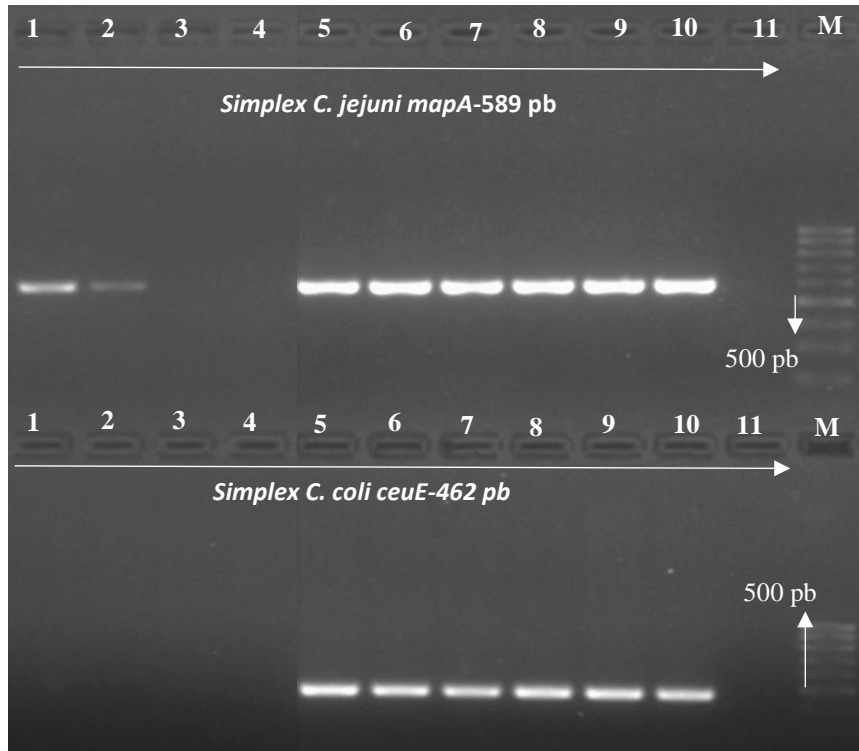


Figura 15-Amplificação por PCR de genes *mapA* e *ceuE*, de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/13808; 19/13809; 19/16670 e 19/16671.

Legenda: **Simplex C. jejuni** : M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/13808; 2- ADN da amostra 19/13809; 3- ADN da amostra 19/19670; 4- ADN da amostra 19/19671; 5- ADN da amostra 19/13808 e ADN da ATCC 33291; 6- ADN da amostra 19/13809 e ADN da ATCC 33291; 7- ADN da amostra 19/19670 e ADN da ATCC 33291; 8- ADN da amostra 19/19671 e ADN da ATCC 33291; 9 e 10- Controlo positivo ATCC 33291; 11- Branco (água estéril).

Simplex C.coli: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/13808; 2- ADN da amostra 19/13809; 3- ADN da amostra 19/19670; 4- ADN da amostra 19/19671; 5- ADN da amostra 19/13808 e ADN da ATCC 33559; 6- ADN da amostra 19/13809 e ADN da ATCC 33559; 7- ADN da amostra 19/19670 e ADN da ATCC 33559; 8- ADN da amostra 19/19671 e ADN da ATCC 33559; 9 e 10- Controlo positivo (ATCC 33559); 11- Branco (água estéril).

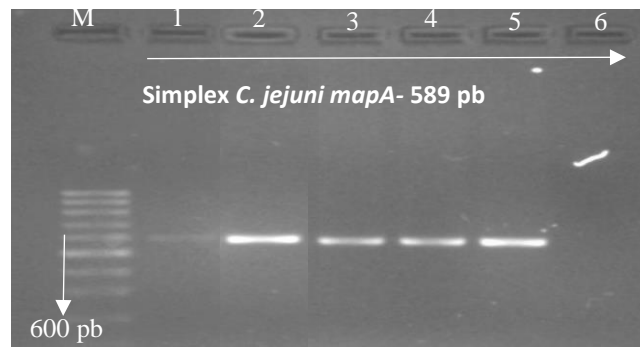


Figura 16-Amplificação por PCR do gene *mapA*, de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/27906 e 20/27907.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/27906; 2- ADN da amostra 19/27907; 3- ADN da amostra 19/27906 e ADN da ATCC 33291; 4- ADN da amostra 19/27907 e ADN da ATCC 33291; 5- Controlo positivo (ATCC 33921); 6- Branco (água estéril)

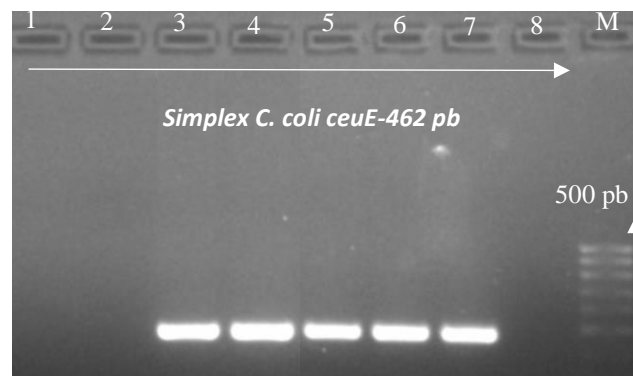


Figura 17-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/27906 e 20/27907.

Legenda: 1- ADN da amostra 19/27906; 2- ADN da amostra 19/27907; 3- ADN da amostra 19/27906 e ADN da ATCC 33559; 4- ADN da amostra 19/27907 e ADN da ATCC 33559; 5- Controlo positivo (ATCC 33559); 6- Branco (água estéril); M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron).

Anexos

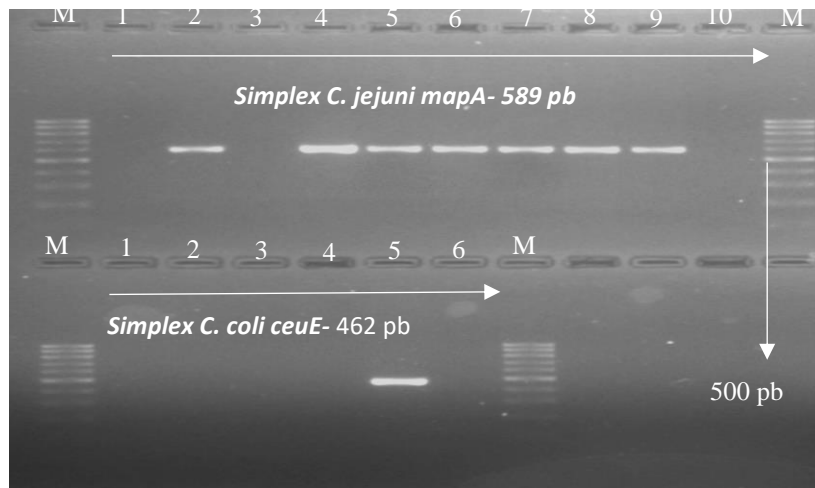


Figura 18-Amplificação por PCR dos genes *mapA* e *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/28910 e 19/28911.

Legenda: **Simplex *C. jejuni***: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/28910; 2- ADN da amostra 19/28911; 3- ADN da amostra 19/28910 (repetição); 4- ADN da amostra 19/28911 (repetição); 5- ADN da amostra 19/28910 e ADN ATCC33291; 6- ADN da amostra 19/28911 e ADN ATCC 33291; 7- ADN da amostra 19/28911 (repetição) e ADN ATCC 33291; 8- ADN da amostra 19/28911 e ADN ATCC 33291; 9- Controlo Positivo (ATCC 33291); 10- Branco (água estéril). **Simplex *C. coli***: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/28910; 2- ADN da amostra 19/28911; 3- ADN da amostra 19/28910 (repetição); 4- ADN da amostra 19/28911(repetição) ; 5- Controlo Positivo (ATCC 33559); 10- Branco (água estéril).

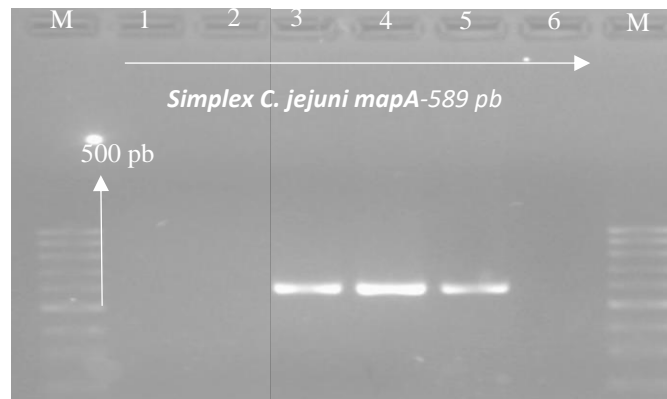


Figura 19-Amplificação por PCR do gene *mapA*, de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/34547 e 19/34548.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/34547; 2- ADN da amostra 19/34548; 3- ADN da amostra 19/34547 e ADN da ATCC 33291; 4- ADN da amostra 19/34548 e ADN da ATCC 33291; 5- Controlo positivo (ATCC 33291); 6- Branco (água estéril);

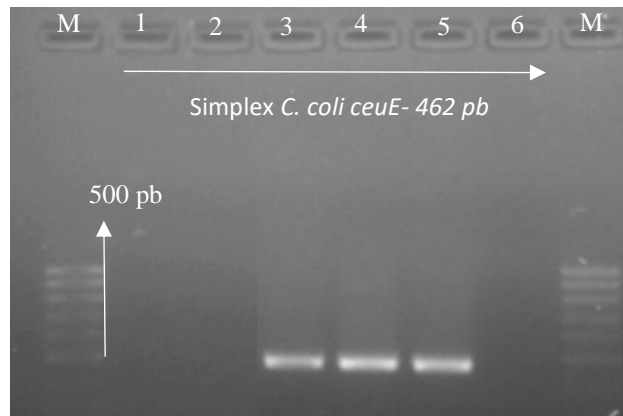


Figura 20-Amplificação por PCR do gene *ceuE*, de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 19/34547 e 19/34548.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/34547; 2- ADN da amostra 19/34548; 3- ADN da amostra 19/34547 e ADN da ATCC 33559; 4- ADN da amostra 19/34548 e ADN da ATCC 33559; 5- Controlo positivo (ATCC 33559); 6- Branco (água estéril);

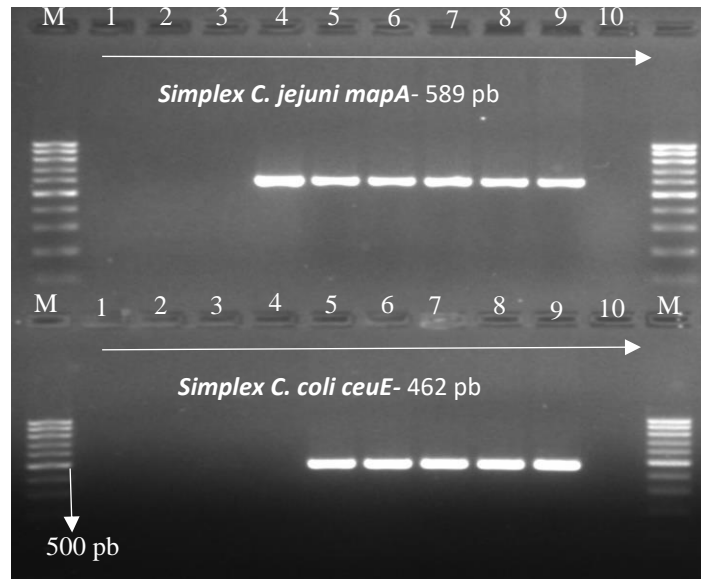


Figura 21-Amplificação por PCR dos genes *mapA* e *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1979; 20/1980; 20/1981 e 20/1982.

Legenda: **Simplex *C. jejuni***: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/1979; 2- ADN da amostra 19/1980; 3- ADN da amostra 19/1982; 4- ADN da amostra 19/1981; 5- ADN da amostra 19/1979 e ADN da ATCC 33291; 6- ADN da amostra 19/1980 e ADN da ATCC 33291; 7- ADN da amostra 19/1982 e ATCC 33291; 8- ADN da amostra 19/1981 e ADN ATCC 33291; 9- Controlo positivo (ATCC 33291); 10- Branco (água estéril).

Simplex *C. coli*: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/1979; 2- ADN da amostra 19/1980; 3- ADN da amostra 19/1982; 4- ADN da amostra 19/1981; 5- ADN da amostra 19/1979 e ADN da ATCC 33559; 6- ADN da amostra 19/1980 e ADN da ATCC 33559; 7- ADN da amostra 19/1982 e ATCC 33559; 8- ADN da amostra 19/1981 e ADN ATCC 33559; 9- Controlo positivo (ATCC 33559); 10- Branco (água estéril);

Anexos

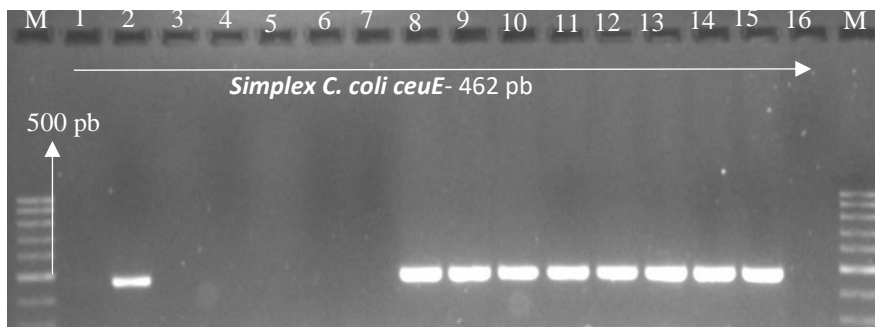


Figura 22-Amplificação por PCR do gene *ceuE*, de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1869; 20/1983; 20/1984; 20/1985; 20/1986; 20/1987 e 20/1988.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/1983; 2- ADN da amostra 19/1984; 3- ADN da amostra 19/1985; 4- ADN da amostra 19/1986; 5- ADN da amostra 19/1987; 6- ADN da amostra 19/1988; 7- ADN da amostra 19/1869; 8- ADN da amostra 19/1983 e ADN ATCC 33559; 9- ADN da amostra 19/1984 e ADN ATCC 33559; 10- ADN da amostra 19/1985 e ADN ATCC 33559; 11- ADN da amostra 19/1986 e ADN ATCC 33559; 12- ADN da amostra 19/1987 e ADN ATCC 33559; 13- ADN da amostra 19/1988 e ADN ATCC 33559; 14- ADN da amostra 19/1869 e ADN ATCC 33559; 15- Controlo positivo (ATCC 33559); 16- Branco (água estéril);

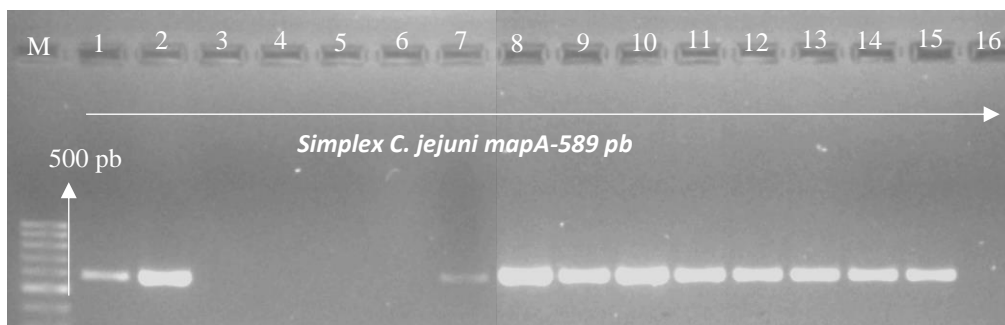


Figura 23-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1869; 20/1983; 20/1984; 20/1985; 20/1986; 20/1987 e 20/1988.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 19/1983; 2- ADN da amostra 19/1984; 3- ADN da amostra 19/1985; 4- ADN da amostra 19/1986; 5- ADN da amostra 19/1987; 6- ADN da amostra 19/1988; 7- ADN da amostra 19/1869; 8- ADN da amostra 19/1983 e ADN ATCC 33291; 9- ADN da amostra 19/1984 e ADN ATCC 33291; 10- ADN da amostra 19/1985 e ADN ATCC 33291; 11- ADN da amostra 19/1986 e ADN ATCC 33291; 12- ADN da amostra 19/1987 e ADN ATCC 33291; 13- ADN da amostra 19/1988 e ADN ATCC 33291; 14- ADN da amostra 19/1869 e ADN ATCC 33291; 15- Controlo positivo (ATCC 33291); 16- Branco (água estéril);

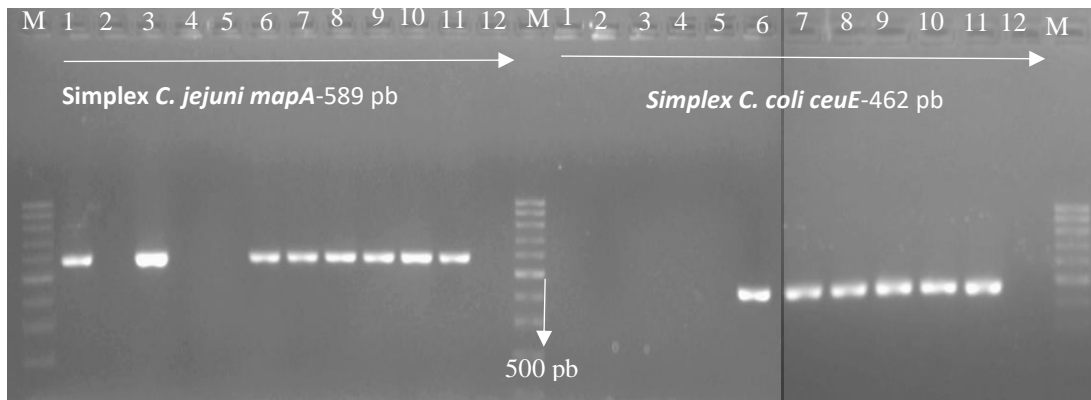


Figura 24-Amplificação por PCR dos genes *mapA* e *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das *pools* das amostras 20/4649 a 20/4653; *pool* das amostras 20/4644 a 20/4648); 20/4655 e 20/4656.

Legenda: **Simplex *C. jejuni*** : M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* (20/4649 até 20/4653); 2- ADN da *pool* (20/4644 até 20/4648); 3- Controlo positivo (amostra contaminada com 1 ml 10⁻⁷); 4- ADN da amostra 20/4655; 5- ADN da amostra 20/4656; 6- ADN da *pool* (20/4649 até 20/4653) e ADN do ATCC 33291; 7- ADN da *pool* (20/4644 até 20/4648) e ADN do ATCC 33291; 8- Controlo positivo (amostra contaminada com 1 ml 10⁻⁷) e ADN do ATCC 33291; 9- ADN da amostra 20/4655 e ADN do ATCC 33291; 10- ADN da amostra 20/4656 e ADN do ATCC 33291; 11- Controlo positivo ATCC 33291; 12- Branco (água estéril).

Simplex *C.coli*: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* (20/4649 até 20/4653); 2- ADN da *pool* (20/4644 até 20/4648); 3- Controlo positivo (amostra contaminada com 1 ml 10⁻⁷); 4- ADN da amostra 20/4655; 5- ADN da amostra 20/4656; 6- ADN da *pool* (20/4649 até 20/4653) e ADN do ATCC 33559; 7- ADN da *pool* (20/4644 até 20/4648) e ADN do ATCC 33559; 8- Controlo positivo (amostra contaminada com 1 ml 10⁻⁷) e ADN do ATCC 33559; 9- ADN da amostra 20/4655 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da amostra 20/4656 e ADN do ATCC 33559; 11- Controlo positivo ATCC 33559; 12- Branco (água estéril).

Anexos

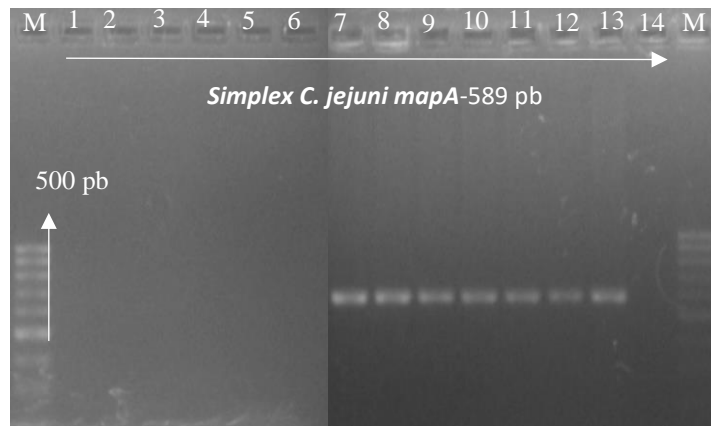


Figura 25-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/6071; 20/6072; 20/6073; 20/6074; 20/6075 e 20/6076.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/6071; 2- ADN da amostra 20/6072; 3- ADN da amostra 20/6073; 4- ADN da amostra 20/6074; 5- ADN da amostra 20/6075; 6- ADN da amostra 20/6076; 7- ADN da amostra 20/6071e ADN do ATCC 33291; 8- ADN da amostra 20/6072 e ADN do ATCC 33291; 9- ADN da amostra 20/6073e ADN do ATCC 33291; 10- ADN da amostra 20/6074 e ADN do ATCC 33291; 11- ADN da amostra 20/6075 e ADN do ATCC 33291; 12- ADN da amostra 20/6076 e ADN do ATCC 33291; 13- Controlo positivo ATCC 33291; 14- Branco (água estéril).

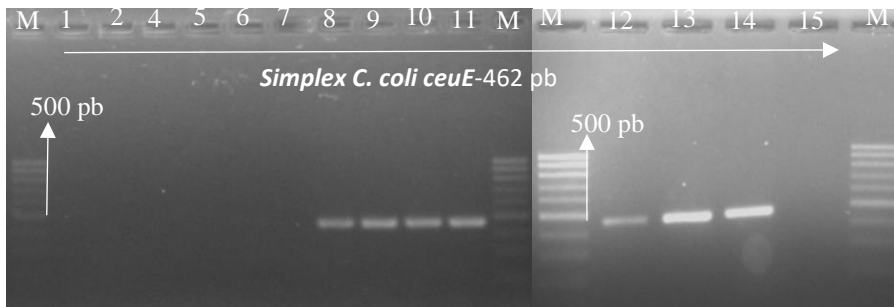


Figura 26-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/6071; 20/6072; 20/6073; 20/6074; 20/6075 e 20/6076.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Biorom); 1- ADN da amostra 20/6071; 2- ADN da amostra 20/6072; 3- ADN da amostra 20/6073; 4- ADN da amostra 20/6074; 5- ADN da amostra 20/6075; 6- ADN da amostra 20/6076; 7- ADN da amostra 20/6071e ADN do ATCC 33559; 8- ADN da amostra 20/6072 e ADN do ATCC 33559; 9- ADN da amostra 20/6073 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da amostra 20/6074 e ADN do ATCC 33559; 11- ADN da amostra 20/6075 e ADN do ATCC 33559; 12- ADN da amostra 20/6076 e ADN do ATCC 33559; 13- Controlo positivo ATCC 33559; 14- Branco (água estéril).

Anexos

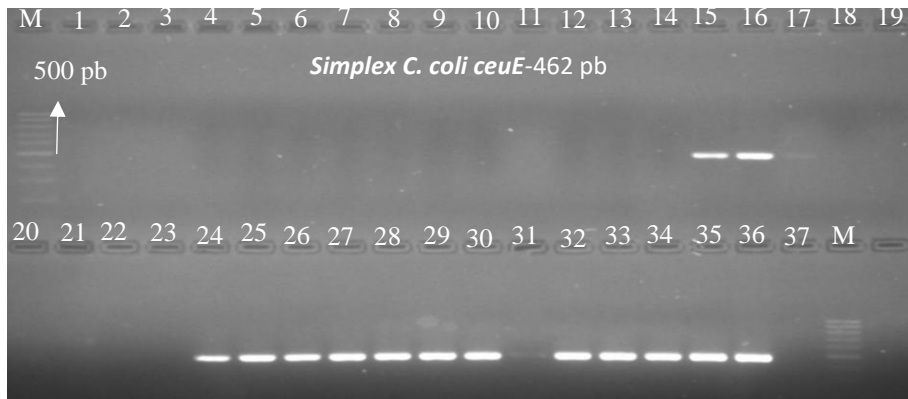


Figura 27-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/4649; 20/4650; 20/4651; 20/4652; 20/4653; 20/6256; 20/6257; 20/6258; 20/6259; 20/6260; 20/6261; 20/6262;20/6263; 20/6264; 20/6266; 20/6267; 20/6268; 20/6269; 20/6270; 20/6271; 20/6272; 20/6273; 20/6274.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/4649; 2- ADN da amostra 20/4650; 3- ADN da amostra 20/4651; 4- ADN da amostra 20/4652; 5- ADN da amostra 20/4653; 6- ADN da amostra 20/6256; 7- ADN da amostra 20/6257; 8- ADN da amostra 20/6258; 9- ADN da amostra 20/6259; 10- ADN da amostra 20/6260; 11- ADN da amostra 20/6261; 12- ADN da amostra 20/6262; 13- ADN da amostra 20/6263; 14- ADN da amostra 20/6264; 15- ADN da amostra 20/6266; 16- ADN da amostra 20/6267; 17- ADN da amostra 20/6268; 18- ADN da amostra 20/6269; 19- ADN da amostra 20/6270; 20- ADN da amostra 20/6271; 21- ADN da amostra 20/6272; 22- ADN da amostra 20/6273; 23- ADN da amostra 20/6274; 24- ADN da amostra 20/4649 e ADN do ATCC 33559; 25- ADN da amostra 20/4650 e ADN do ATCC 33559; 26- ADN da amostra 20/4651 e ADN do ATCC 33559; 27- ADN da amostra 20/4652 e ADN do ATCC 33559; 28- ADN da amostra 20/4653 e ADN do ATCC 33559; 29- ADN da amostra 20/6256 e ADN do ATCC 33559; 30- ADN da amostra 20/6257 e ADN do ATCC 33559; 31- ADN da amostra 20/6258 e ADN do ATCC 33559; 32- ADN da amostra 20/6259 e ADN do ATCC 33559; 33- ADN da amostra 20/6260 e ADN do ATCC 33559; 34- ADN da amostra 20/6261 e ADN do ATCC 33559; 35- ADN da amostra 20/6262 e ADN do ATCC 33559; 36- Controlo positivo ATCC 33559; 37- Branco (água estéril).

Anexos

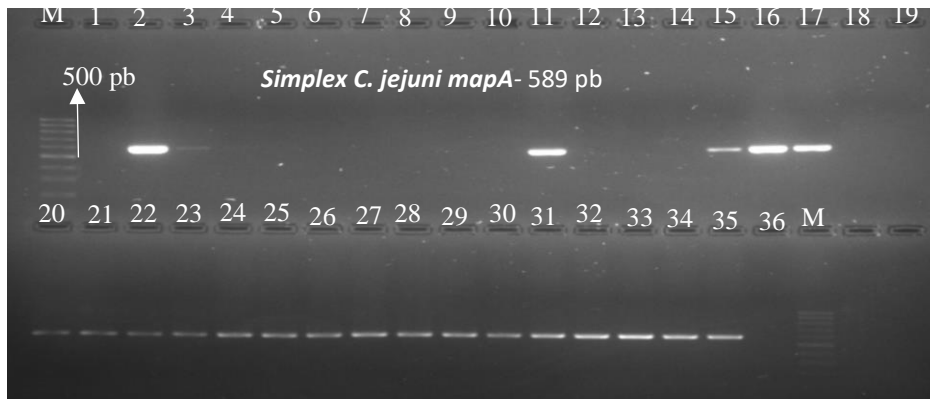


Figura 28-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/4649; 20/4650; 20/4651; 20/4652; 20/4653; 20/6256; 20/6257; 20/6258; 20/6259; 20/6260; 20/626.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/4649; 2- ADN da amostra 20/4650; 3- ADN da amostra 20/4651; 4- ADN da amostra 20/4652; 5- ADN da amostra 20/4653; 6- ADN da amostra 20/6256; 7- ADN da amostra 20/6257; 8- ADN da amostra 20/6258; 9- ADN da amostra 20/6259; 10- ADN da amostra 20/6260; 11- ADN da amostra 20/6261; 12- ADN da amostra 20/6262; 13- ADN da amostra 20/6263; 14- ADN da amostra 20/6264; 15- ADN da amostra 20/6266; 16- ADN da amostra 20/6267; 17- ADN da amostra 20/6268; 18- ADN da amostra 20/6269; 19- ADN da amostra 20/6270; 20- ADM da amostra 20/6271; 21- ADN da amostra 20/6272; 22- ADN da amostra 20/6273; 23- ADN da amostra 20/6274; 24- ADN da amostra 20/6263 e ADN do ATCC 33291; 25- ADN da amostra 20/6264 e ADN do ATCC 33291; 26- ADN da amostra 20/6266 e ADN do ATCC 33291; 27- ADN da amostra 20/6267 e ADN do ATCC 33291; 28- ADN da amostra 20/6268 e ADN do ATCC 33291; 29- ADN da amostra 20/6269 e ADN do ATCC 33291; 30- ADN da amostra 20/6270 e ADN do ATCC 33291; 31- ADN da amostra 20/6271 e ADN do ATCC 33291; 32- ADN da amostra 20/6272 e ADN do ATCC 33291; 33- ADN da amostra 20/6273 e ADN do ATCC 3329; 34- ADN da amostra 20/6274 e ADN do ATCC 33291; 35- Controlo positivo ATCC 33291; 36- Branco (água estéril).

Anexos

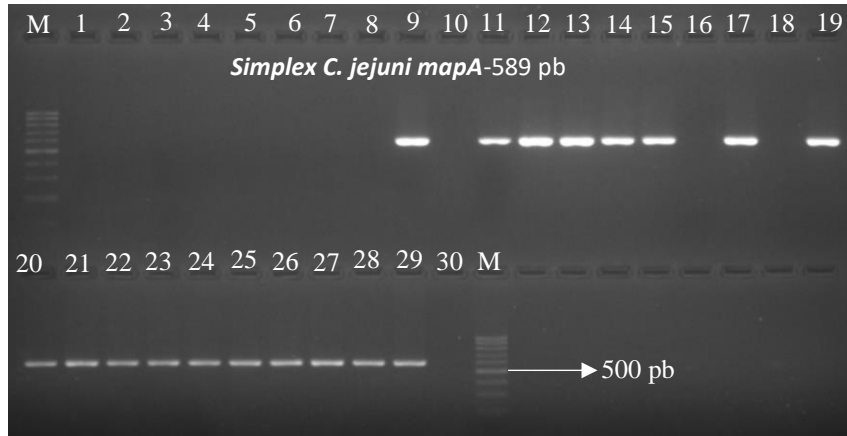


Figura 29-Amplificação por PCR do gene *mapA* ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/7319; 20/7320; 20/7321; 20/7322; 20/7910; 20/7911; 20/7912; 20/7913; 20/7914; 20/7915; 20/7916; 20/7917; 20/7918; 20/7319; 20/7920; 20/7921; 20/7922; 20/7923; 20/7924.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/7319; 2- ADN da amostra 20/7320; 3- ADN da amostra 20/4621; 4- ADN da amostra 20/7322; 5- ADN da amostra 20/7910; 6-ADN da amostra 20/7911; 7- ADN da amostra 20/7912; 8- ADN da amostra 20/7913; 9- ADN da amostra 20/7914; 10- ADN da amostra 20/7915; 11- ADN da amostra 20/7916; 12- ADN da amostra 20/7917; 13- ADN da amostra 20/7918; 14- ADN da amostra 20/7919 *pool* da amostra 20/7913 a 20/7918); 15- ADN da amostra 20/7920; 16- ADN da amostra 20/7921; 17- ADN da amostra 20/7922; 18- ADN da amostra 20/7923; 19- ADN da amostra 20/7924; 20- ADN da amostra 20/7319 e ADN do ATCC 33291; 21- ADN da amostra 20/7320 e ADN do ATCC 33291; 22- ADN da amostra 20/7321 e ADN do ATCC 33291; 23- ADN da amostra 20/7322 e ADN do ATCC 33291; 24- ADN da amostra 20/7910 e ADN do ATCC 33291; 25- ADN da amostra 20/7911 e ADN do ATCC 33291; 26- ADN da amostra 20/7912 e ADN do ATCC 33291; 27- ADN da amostra 20/7913 e ADN do ATCC 33291; 28- ADN da amostra 20/7914 e ADN do ATCC 33291; 29 - Controlo positivo ATCC 33291; 30- Branco (água estéril).

Anexos

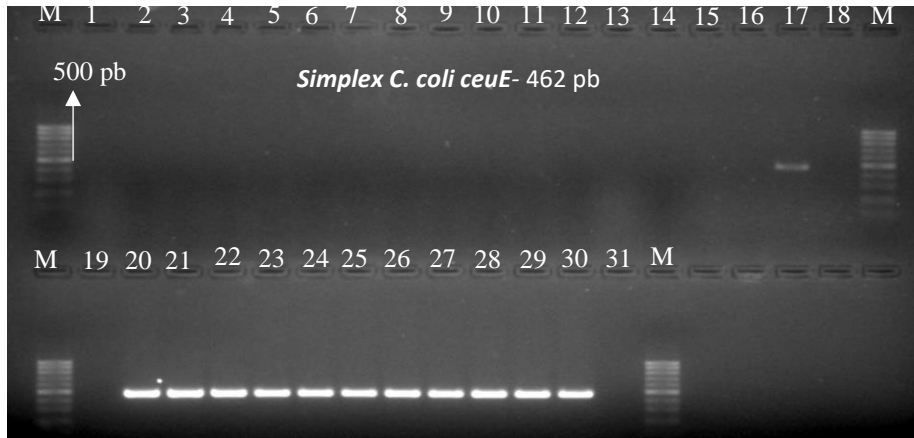


Figura 30-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/7319; 20/7320; 20/7321; 20/7322; 20/7910; 20/7911; 20/7912; 20/7913; 20/7914; 20/7915; 20/7916; 20/7917; 20/7918; 20/7319; 20/7920; 20/7921; 20/7922; 20/7923; 20/7924.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/7319; 2- ADN da amostra 20/7320; 3- ADN da amostra 20/4651; 4- ADN da amostra 20/7321; 5- ADN da amostra 20/7322; 6- ADN da amostra 20/7911; 7- ADN da amostra 20/7912; 8- ADN da amostra 20/7913; 9- ADN da amostra 20/7914; 10- ADN da amostra 20/7315; 11- ADN da amostra 20/7916; 12- ADN da amostra 20/7917; 13- ADN da amostra 20/7918; 14- ADN da amostra 20/7919 (*pool* da amostra20/7913 a 20/797918); 15- ADN da amostra 20/7920; 16- ADN da amostra 20/7921; 17- ADN da amostra 20/7922; 18- ADN da amostra 20/7923; 19- ADN da amostra 20/7924; 20- ADN da amostra 20/7915 e ADN do ATCC 33559; 21- ADN da amostra 20/7916 e ADN do ATCC 33559; 22- ADN da amostra 20/7917 e ADN do ATCC 33559; 23- ADN da amostra 20/7918 e ADN do ATCC 33559; 24- ADN da amostra 20/7919 e ADN do ATCC 33559; 25- ADN da amostra 20/7920 e ADN do ATCC 33559; 26- ADN da amostra 20/7921 e ADN do ATCC 33559; 27- ADN da amostra 20/7922 e ADN do ATCC 33559; 28- ADN da amostra 20/7923 e ADN do ATCC 33559; 29 – ADN da amostra 20/7924 e ADN do ATCC 33559; 30- Controlo positivo ATCC 33559; 31- Branco (água estéril).

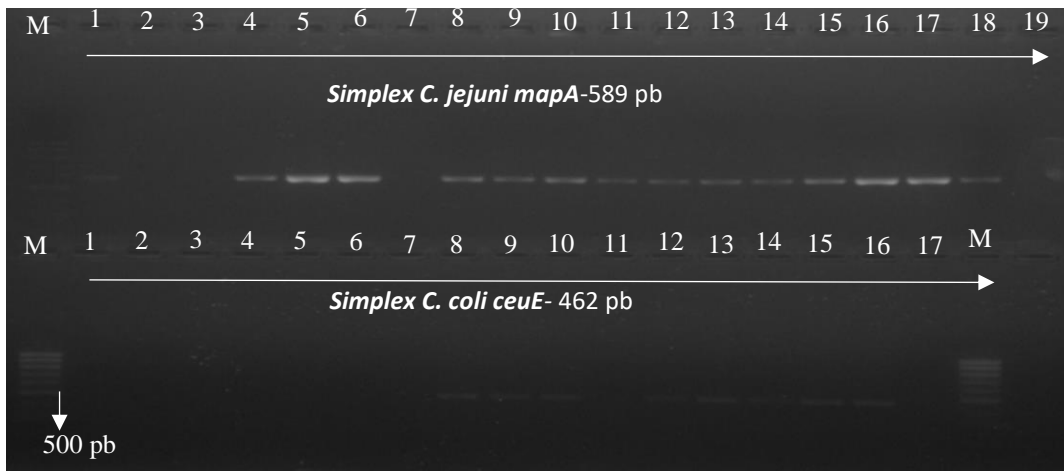


Figura 31-Deteção de limites de deteção para amostras alimentares e amplificação dos genes *mapA* e *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/12224; 20/12225; 20/12226; 20/12227; 20/12228; 20/12229; 20/12230; 20/6273(repetição).

Legenda: **Simplex C. jejuni:** M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/12224; 2- ADN da amostra 20/12225; 3- ADN da amostra 20/12226; 4- ADN da amostra 20/12227; 5- ADN da amostra 20/12228; 6- ADN da amostra 20/12229 (*pool* das amostras 20/12224 a 20/122298); 7- ADN da amostra 20/12230; 8- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-6} de ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-6} de ATCC 33559; 9- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-5} ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-5} de ATCC 33559; 10- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-4} ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-4} ATCC 33559; 11- ADN da amostra 20/6273 (repetição); 12- ADN da amostra 20/12224 e ADN do ATCC 33291; 13- ADN da amostra 20/12225 e ADN do ATCC 33291; 14- ADN da amostra 20/12226 e ADN do ATCC 33291; 15- ADN da amostra 20/12227 e ADN do ATCC 33291; 16- ADN da amostra 20/12228 e ADN do ATCC 33291; 17- ADN da amostra 20/12229 e ADN do ATCC 33291; 18- Controlo positivo ATCC 33291; 19- Branco (água estéril).

Simplex C. coli: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/12224; 2- ADN da amostra 20/12225; 3- ADN da amostra 20/12226; 4- ADN da amostra 20/12227; 5- ADN da amostra 20/12228; 6- ADN da amostra 20/12229; 7- ADN da amostra 20/12230; 8- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-6} de ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-6} de ATCC 33559; 9- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-5} ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-5} de ATCC 33559; 10- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-4} ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-4} ATCC 33559; 11- ADN da amostra 20/6273 (repetição); 12- ADN da amostra 20/12230 e ADN do ATCC 33559; 13- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-6} de ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-6} de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 14- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-5} ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-5} de ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 15- Amostra contaminada com 1 ml de 10^{-4} ATCC 33291 e com 1 ml de 10^{-4} ATCC 33559 e ADN do ATCC 33559; 16- Controlo Positivo (ATCC 33559); 17- Branco (água estéril).

Anexos

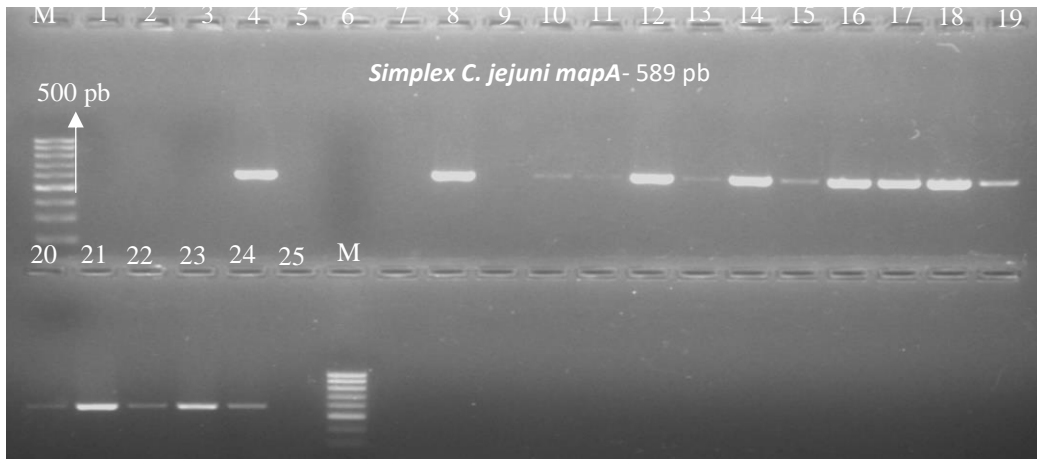


Figura 32-- Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 2063; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13277.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/13254; 2- ADN da amostra 20/13255; 3- ADN da amostra 20/13256; 4- ADN da amostra 20/13257; 5- ADN da amostra 20/13258; 6- ADN da amostra 20/13259; 7- ADN da amostra 20/13260; 8- ADN da amostra 20/13261; 9- ADN da amostra 20/13276; 10- ADN da amostra 20/13262; 11- ADN da amostra 20/1363; 12- ADN da amostra 20/13264; 13- ADN da amostra 20/13265; 14- ADN da amostra 20/13266; 15- ADN da amostra 20/13267; 16- ADN da amostra 20/13268; 17- ADN da amostra 20/13269; 18- 20/13277; 19- ADN da amostra 20/13262 e ADN do ATCC 33291; 20- ADN da amostra 20/13263 e ADN do ATCC 33291; 21- ADN da amostra 20/13264 e ADN do ATCC 33291; 22- ADN da amostra 20/13265 e ADN do ATCC 33291; 23- ADN da amostra 20/13266 e ADN do ATCC 33291; 24-Controlo positivo (ATCC 33291); 25- Branco (água estéril).

Anexos

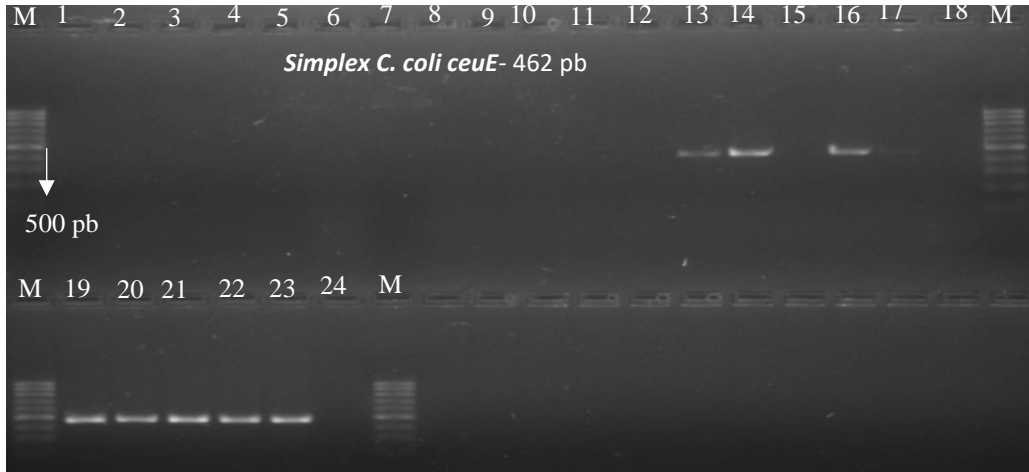


Figura 33- Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/13254; 20/13255; 20/13256; 20/13257; 20/13258; 20/13259; 20/13260; 20/13261; 20/13262; 20/13263; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13277

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/13254; 2- ADN da amostra 20/13255; 3- ADN da amostra 20/13256; 4- ADN da amostra 20/13257; 5- ADN da amostra 20/13258; 6- ADN da amostra 20/13259; 7- ADN da amostra 20/13260; 8- ADN da amostra 20/13261; 9- ADN da amostra 20/13276; 10- ADN da amostra 20/13262; 11- ADN da amostra 20/1363; 12- ADN da amostra 20/13264; 13- ADN da amostra 20/13265; 14- ADN da amostra 20/13266; 15- ADN da amostra 20/13267; 16- ADN da amostra 20/13268; 17- ADN da amostra 20/13269; 18- 20/13277; 19- ADN da amostra 20/13267 e ADN do ATCC 33559; 20- ADN da amostra 20/13268 e ADN do ATCC 33559; 21- ADN da amostra 20/13269 e ADN do ATCC 33559; 22- ADN da amostra 20/13277 e ADN do ATCC 33559; 23- Controlo positivo (ATCC 33559); 24- Branco (água estéril).

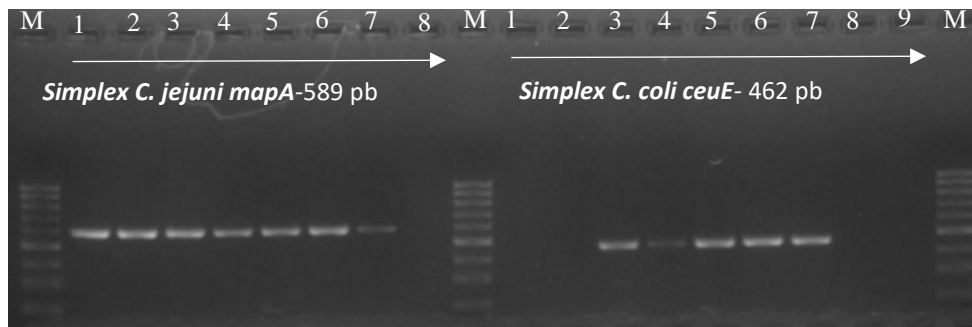


Figura 34- Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das *pools* 20/16201; 20/16202; 20/16203 e 20/16204.

Legenda: **Simplex C. jejuni:** M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* 20/16201; 2- ADN da *pool* a 20/16202; 3- ADN da *pool* 20/16203; 4- ADN da *pool* 20/16204; 5- ADN da *pool* 20/16201 e ADN do ATCC 33291; 6- ADN da *pool* 20/16203 e ADN do ATCC 33291; 7- Controlo positivo (ATCC 33291); 8- Branco (água estéril).

Simplex C. coli: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* 20/16201; 2- ADN da *pool* a 20/16202; 3- ADN da *pool* 20/16203; 4- ADN da *pool* 20/16204; 5- ADN da *pool* 20/16202 e ADN do ATCC 33559; 6- ADN da *pool* 20/16204 e ADN do ATCC 33559; 7- Controlo positivo (ATCC 33559); 8- Branco (água estéril); 9- ADN da amostra 20/13267 (repetição).

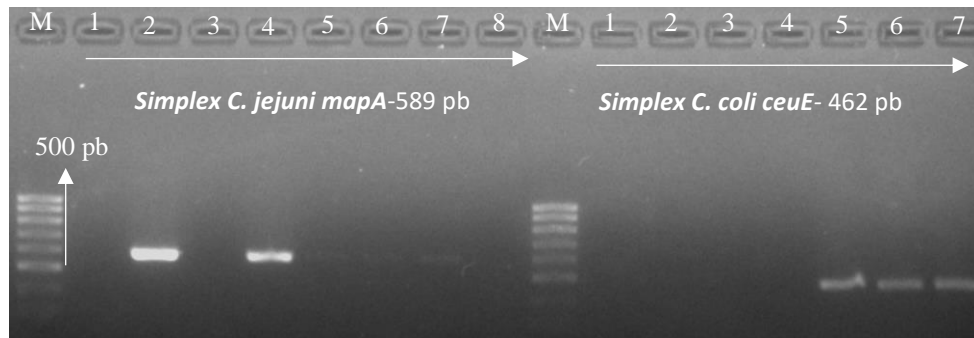


Figura 35-Amplificação por PCR dos genes *mapA* e *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento da *pool* das amostras 20/16211 a 20/16215; *pool* das amostras 20/16217 a 20/16221; amostra 20/16223; amostra 20/16224.

Legenda: **Simplex C. jejuni**: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* 20/16216 (20/16211 a 20/16215); 2- ADN da *pool* a 20/16222 (20/16217 a 20/16221); 3- ADN da amostra 20/16223; 4- ADN da amostra 20/16224; 5- ADN da *pool* 20/16216 e ADN do ATCC 33291; 6- ADN da amostra 20/16223 e ADN do ATCC 33291; 7- Controlo positivo (ATCC 33291); 8- Branco (água estéril).

Simplex C. coli: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* 20/16216(20/16211 a 20/16215); 2- ADN da *pool* a 20/16222 (20/16217 a 20/16221); 3- ADN da amostra 20/16223; 4- ADN da amostra 20/16224; 5- ADN da *pool* 20/16222 e ADN do ATCC 33559; 6- ADN da amostra 20/16224 e ADN do ATCC 33559; 7- Controlo positivo (ATCC 33291).

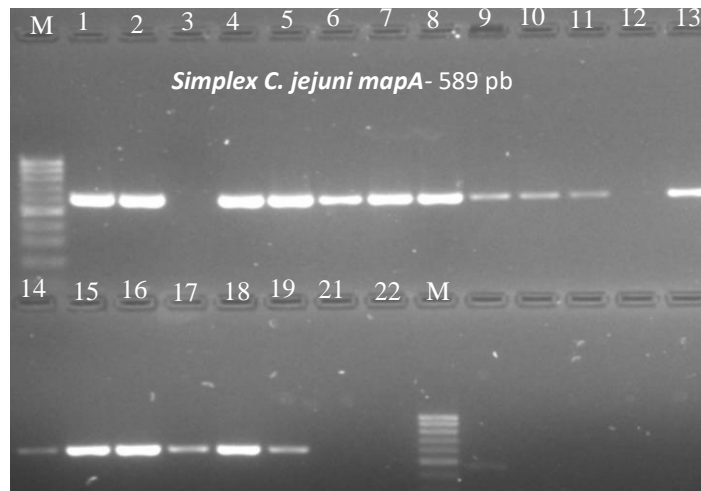


Figura 36-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/16217; 20/16218; 20/16219; 20/16220; 20/16221; *pool* das amostras 20/16683 a 20/16687; 20/16688; 20/16689; 20/16690; 20/16691; 20/16692; 20/16693; 20/16694.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da amostra 20/16217; 2- ADN da amostra 20/16218; 3- ADN da amostra 20/16219; 4- ADN da amostra 20/16220; 5- ADN da amostra 20/16221; 6- ADN da *pool* 20/18084 (20/16683 a 20/16687); 7- ADN da amostra 20/16688; 8- ADN da amostra 20/16689; 9- ADN da amostra 20/16690; 10- ADN da amostra 20/16691; 11- ADN da amostra 20/16292; 12- ADN da amostra 20/16693; 13- ADN da amostra 20/16694; 14- ADN da amostra 20/16217 e ADN do ATCC 33291; 15- ADN da amostra 20/16218 e ADN do ATCC 33291; 16- ADN da amostra 20/16219 e ADN do ATCC 33291; 17- ADN da amostra 20/16220 e ADN do ATCC 33291; 18- ADN da amostra 20/16221 e ADN do ATCC 33291; 19- ADN da amostra 20/16688 e ADN do ATCC 33291; 20- Controlo positivo ATCC 33291; 21 e 22- Branco (água estéril).

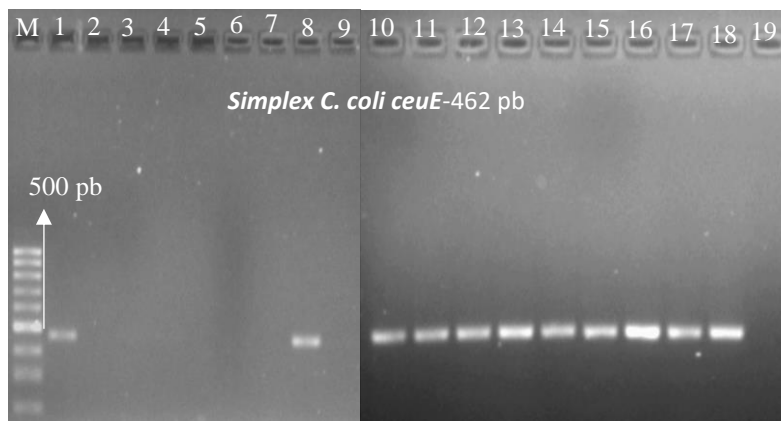


Figura 37-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento da *pool* das amostras 20/16683 a 20/16687; amostra 20/16688; 20/16689; 20/16690; 20/16691; 20/16692; 20/16693; 20/16694; *pool* 20/18086.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da *pool* 18084 (20/16683 a 20/16687); 2- ADN da amostra 20/16688; 3- ADN da amostra 20/16689; 4- ADN da amostra 20/16690; 5- ADN da amostra 20/16691; 6- ADN da amostra 20/16692; 7- ADN da amostra 20/16693; 8- ADN da amostra 20/16694; 9- ADN da *pool* 20/18086 (20/16688 a 20/16692); 10 - ADN da amostra 20/16689 e ADN do ATCC 33559; 11- ADN da amostra 20/16690 e ADN do ATCC 33559; 12- ADN da amostra 20/16691 e ADN do ATCC 33559; 13- ADN da amostra 20/16692 e ADN do ATCC 33559; 14- ADN da amostra 20/16693 e ADN do ATCC 33559; 15- ADN da amostra 20/16694 e ADN do ATCC 33559; 16- ADN da *pool* das amostras 20/16683 a 20/16687 e ADN do ATCC 33559; 17- ADN da *pool* das amostras 20/16688 a 20/16692 e ADN do ATCC 33559; 18- Controlo positivo ATCC 33559; 19- Branco (água estéril);

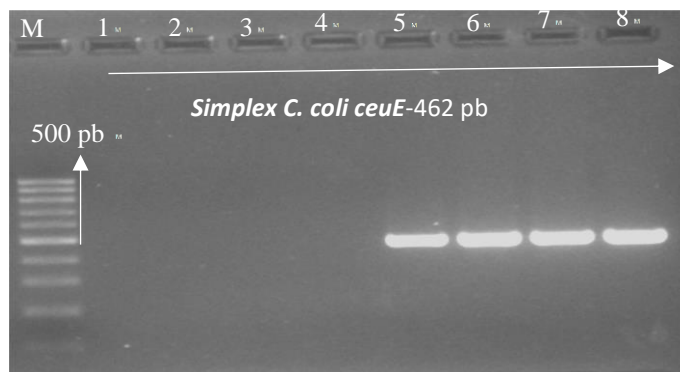


Figura 38-Amplificação por PCR do gene *ceuE* e ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/16683; 20/16684; 20/16685; 20/16686 e 20/16687.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1-ADN da amostra 20/16683; 2- ADN da amostra 20/16684; 3- ADN da amostra 20/16685; 4- ADN da amostra 20/16686; 5- ADN da amostra 20/16687; 6- ADN da amostra 20/16686 e ADN do ATCC 33559; 7- ADN da amostra 20/16687 e ADN do ATCC 33559; 8- Controlo Positivo (ATCC 33559).

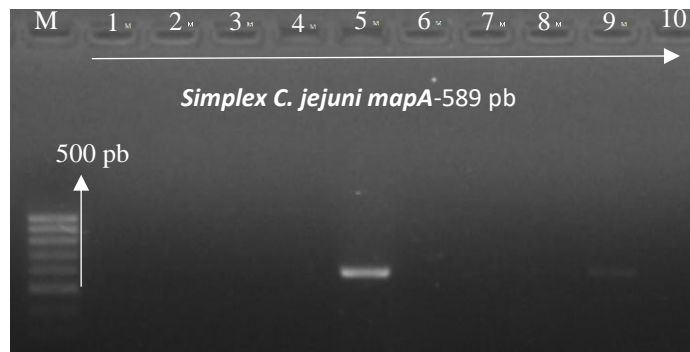


Figura 39-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/16683; 20/16684; 20/16685; 20/16686 e 20/16687.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1-ADN da amostra 20/16683; 2- ADN da amostra 20/16684; 3- ADN da amostra 20/16685; 4- ADN da amostra 20/16686; 5- ADN da amostra 20/16687; 6- ADN da amostra 20/16683 e ADN do ATCC 33291; 7- ADN da amostra 20/16684 e ADN do ATCC 33291; 8- ADN da amostra 20/16685 e ADN do ATCC 33291; 9- Controlo Positivo (ATCC 33291); 10- Branco (água estéril).

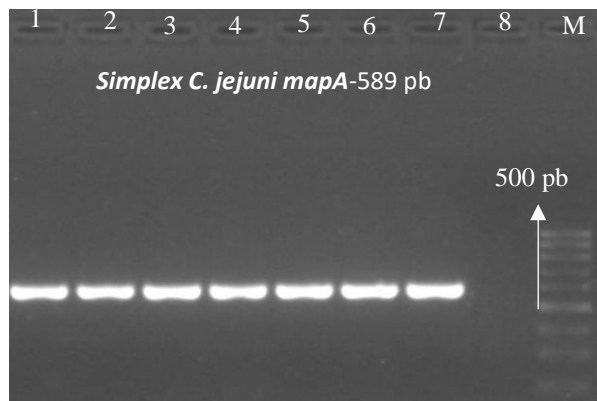


Figura 40-Repetição da amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/6075; 20/6269; 20/12226.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1-ADN da amostra 20/6075; 2- ADN da amostra 20/6269; 3- ADN da amostra 20/12226; 4- ADN da amostra 20/6075 e ADN do ATCC 33291; 5- ADN da amostra 20/6269 e ADN do ATCC 33291; 6- ADN da amostra 20/12226 e ADN do ATCC 33291; 7- Controlo Positivo (ATCC 33291); 8- Branco (água estéril).

Anexos

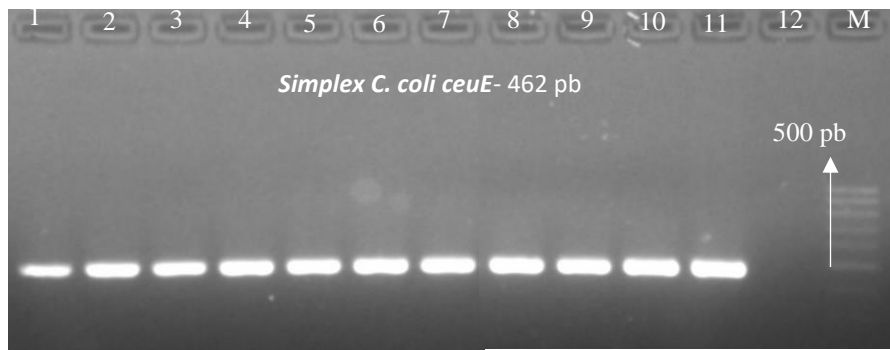


Figura 41-Repetição da amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por coluna de sílica, a partir das suspensões de enriquecimento das amostras 20/1982; 20/6075; 20/6271; 20/6273; 20/16690.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1-ADN da amostra 20/1982; 2- ADN da amostra 20/6075; 3- ADN da amostra 20/6271; 4- ADN da amostra 20/20/6273; 5- ADN da amostra 20/16690; 6- ADN da amostra 20/1982 e ADN do ATCC 33559; 7- ADN da amostra 20/6075 e ADN do ATCC 33559; 8- ADN da amostra 20/6271 e ADN do ATCC 33559; 9- ADN da amostra 20/6273 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da amostra 20/16690 e ADN do ATCC 33559; 11- Controlo Positivo (ATCC 33559); 12- Branco (água estéril)

Anexo E- Visualização dos produtos de PCR resultantes na identificação da espécie das colónias isoladas

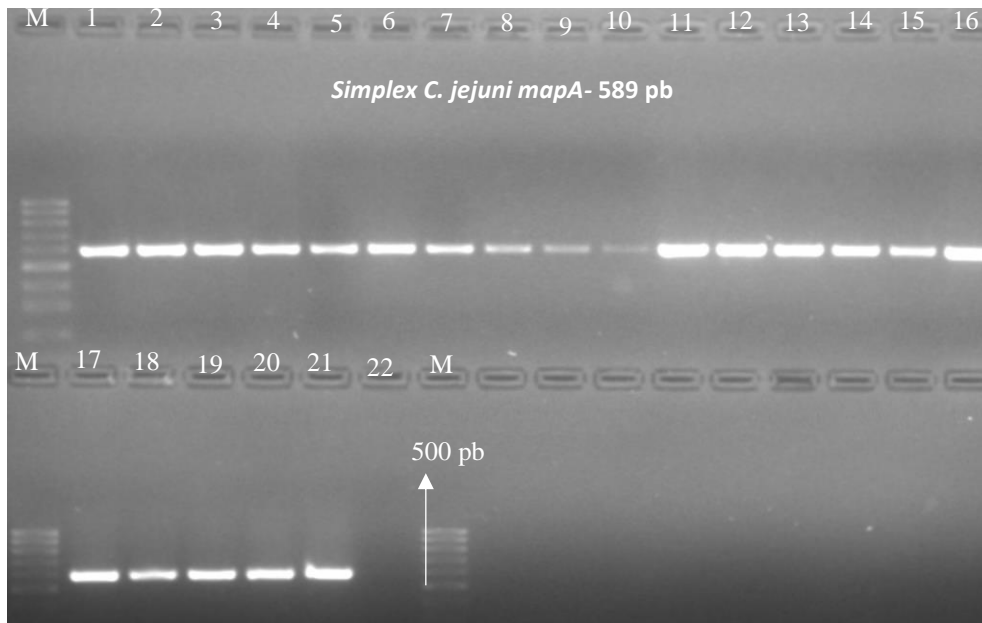


Figura 42-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 19/13808; 19/13809; 19/27906; 19/27907; 19/28911; 20/1869; 20/1981; 20/1983; 20/1984; 20/4650.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 19/13808; 2- ADN da colónia 19/13809; 3- ADN da colónia 19/27906; 4- ADN da colónia 19/27907; 5- ADN da colónia 19/28911; 6- ADN da colónia 20/1869; 7- ADN da colónia 20/1981; 8- ADN da colónia 20/1983; 9- ADN da colónia 20/1984; 10- ADN da colónia 20/4650; 11- ADN da colónia 19/13808 e ADN da ATCC 33291; 12- ADN da colónia 19/13809 e ADN da ATCC 33291; 13- ADN da colónia 19/27906 e ADN da ATCC 33291; 14- ADN da colónia 19/27907 e ADN da ATCC 33291; 15- ADN da colónia 19/28911 e ADN da ATCC 33291; 16- ADN da colónia 20/1869 e ADN da ATCC 33291; 17-ADN da colónia 20/1981 e ADN da ATCC 33291; 18- ADN da colónia 20/1983 e ADN da ATCC 33291; 19- ADN da colónia 20/1984 e ADN da ATCC 33291; 20- ADN da colónia 20/4650 e ADN da ATCC 33291; 21- Controlo positivo ATCC 33291; 22- Branco (água estéril).

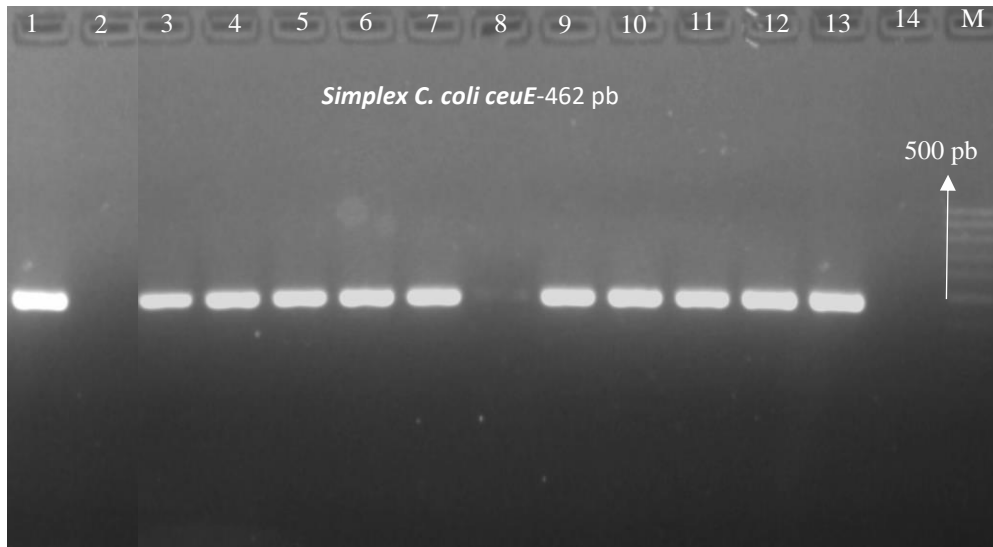


Figura 43-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/1982; 20/1983; 20/1984; 20/6075; 20/6266; 20/6267.

Legenda: : M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/1982; 2- ADN da colónia 20/1983; 3- ADN da colónia 20/1984; 4- ADN da colónia 20/6075; 5- ADN da colónia 20/6266; 6- ADN da colónia 20/6267; 7- ADN da colónia 20/1982 e ADN do ATCC 33559; 8- ADN da colónia 20/1983 e ADN do ATCC 33559; 9- ADN da colónia 20/1984 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da colónia 20/6075 e ADN do ATCC 33559; 11- ADN da colónia 20/6266 e ADN do ATCC 33559; 12- ADN da colónia 20/6267 e ADN do ATCC 33559; 13- Controlo positivo ATCC 33559; 14- Branco (água estéril);

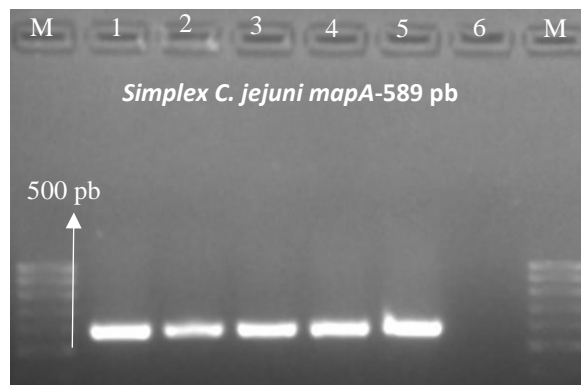


Figura 44-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/4651; 20/4652.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/4651; 2- ADN da colónia 20/4652; 3- ADN da colónia 20/4651 e ADN da ATCC 33291; 4- ADN da colónia 20/4652 e ADN da ATCC 33291; 5- Controlo positivo ATCC 33291; 6- Branco (água estéril).

Anexos

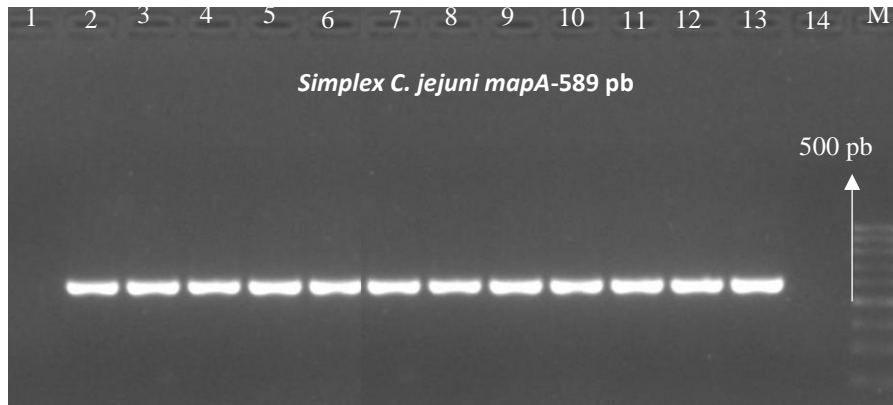


Figura 45-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/6075; 20/6261; 20/6266; 20/6267; 20/6268; 20/6269.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN das colónias 20/6075; 2- ADN das colónias 20/6261; 3- ADN das colónias 20/6266; 4- ADN da colónia 20/6267; 5- ADN da colónia 20/6268; 6-ADN da colónia 20/6269; 7- ADN da colónia 20/6075 e ADN da ATCC 33291; 8- ADN da colónia 20/6261 e ADN da ATCC 33291; 9- ADN da colónia 20/6266 e ADN da ATCC 33291; 10- ADN da colónia 20/6267 e ADN da ATCC 33291; 11- ADN da colónia 20/6268 e ADN da ATCC 33291; 12- ADN da colónia 20/6269 e ADN da ATCC 33291; 13- Controlo positivo ATCC 33291; 14- Branco (água estéril).

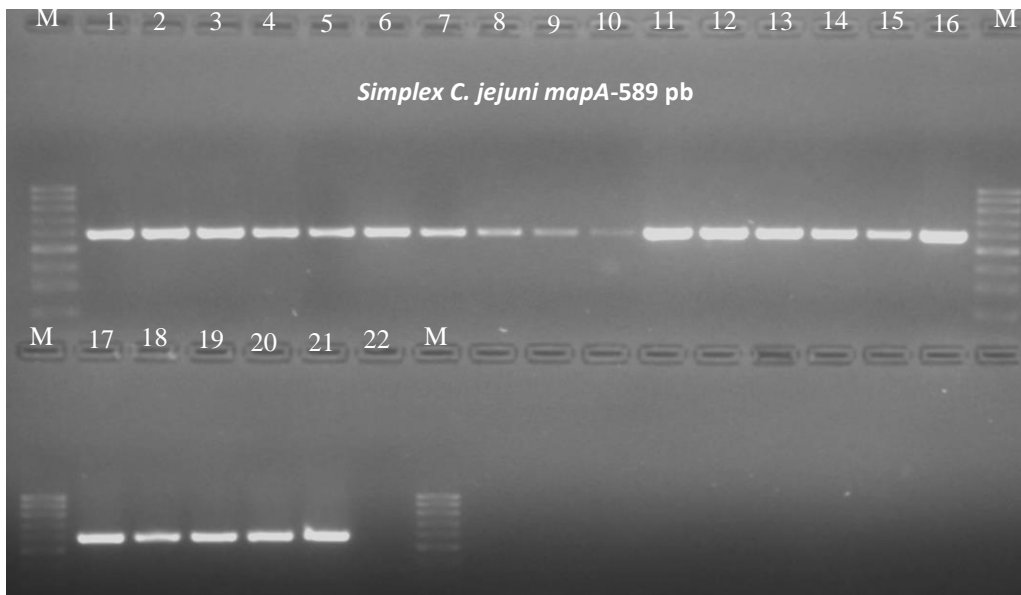


Figura 46-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/6271; 20/6272; 20/6273; 20/6274; 20/7914; 20/7917; 20/7920; 20/7921; 20/7922; 20/7924.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/6271; 2- ADN da colónia 20/6272; 3- ADN da colónia 20/6273; 4- ADN da colónia 20/6274; 5- ADN da colónia 20/7914; 6- ADN da colónia 20/7917; 7- ADN da colónia 20/7920; 8- ADN da colónia 20/7921; 9- ADN da colónia 20/7922; 10- ADN da colónia 20/7924; 11- ADN da colónia 20/6271 e ADN da ATCC 33291; 12- ADN da colónia 20/6272 e ADN da ATCC 33291; 13- ADN da colónia 20/6273 e ADN da ATCC 33291; 14- ADN da colónia 20/6274 e ADN da ATCC 33291; 15- ADN da colónia 20/67914 e ADN da ATCC 33291; 16- ADN da colónia 20/7917 e ADN da ATCC 33291; 17- ADN da colónia 20/7920 e ADN da ATCC 33291; 18- ADN da colónia 20/7921 e ADN da ATCC 33291; 19- ADN da colónia 20/7922 e ADN da ATCC 33291; 20- ADN da colónia 20/7924 e ADN da ATCC 33291; 21- Controlo positivo ATCC 33291; 22- Branco (água estéril).

Anexos

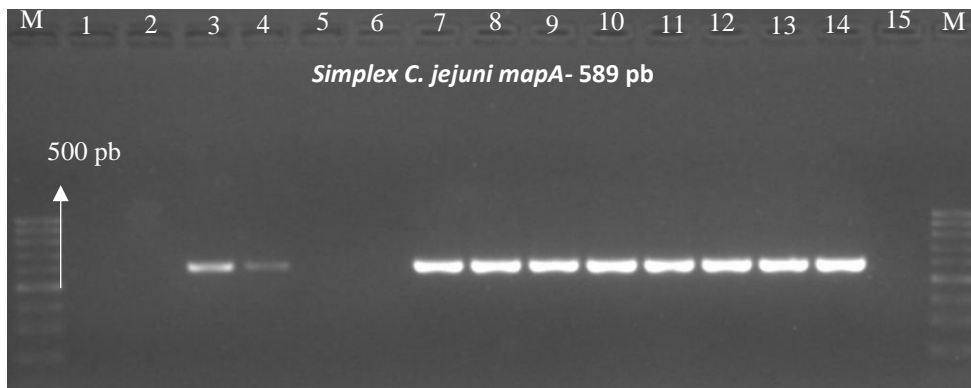


Figura 47-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/7916; 20/7918; 20/13257; 20/13261; 20/13262; 20/13263.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/7916; 2- ADN da colónia 20/7918; 3- ADN da colónia 20/13257; 4- ADN da colónia 20/13261; 5- ADN da colónia 20/13262; 6- ADN da colónia 20/13263; 7- ADN da colónia 20/7916 e ADN da ATCC 33291; 8- ADN da colónia 20/7918 e ADN da ATCC 33291; 9- ADN da colónia 20/13257 e ADN da ATCC 33291; 10- ADN da colónia 20/13261 e ADN da ATCC 33291; 11- ADN da colónia 20/13262 e ADN da ATCC 33291; 12- ADN da colónia 20/13263 e ADN da ATCC 33291; 13- Controlo positivo ATCC 33291 (fervura 19/9/19); 14 – Controlo Positivo 33291 (fervura 9/1/20); 15- Branco (água estéril).

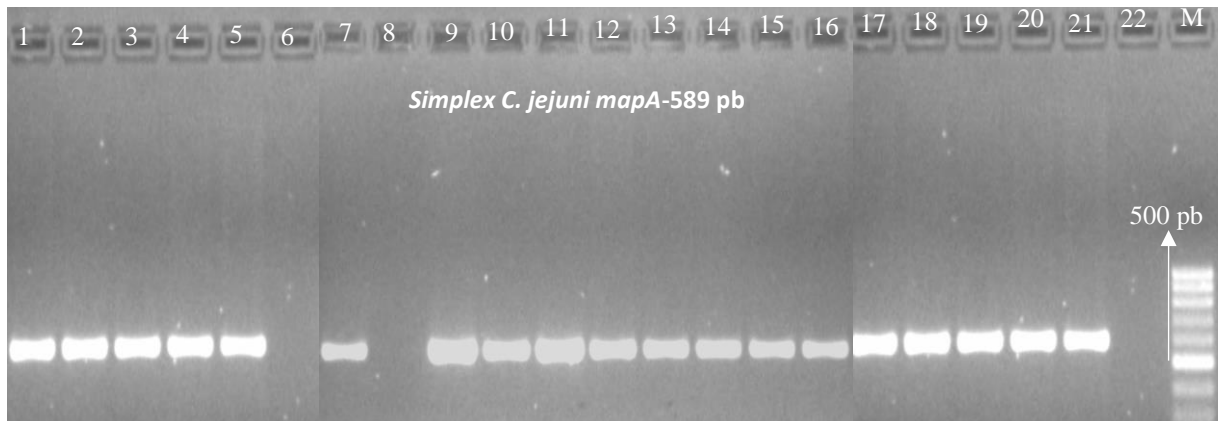


Figura 48-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/12226; 20/12227; 20/12228; 20/13264; 20/13265; 20/13266; 20/13267; 20/13268; 20/13269; 20/13277.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/12226; 2- ADN da colónia 20/12227; 3- ADN da colónia 20/12228; 4- ADN da colónia 20/13264; 5- ADN da colónia 20/13265; 6- ADN da colónia 20/13266; 7- ADN da colónia 20/13267; 8- ADN da colónia 20/13268; 9- ADN da colónia 20/13269; 10- ADN da colónia 20/13277; 11- ADN da colónia 20/12226 e ADN da ATCC 33291; 12- ADN da colónia 20/12227 e ADN da ATCC 33291; 13- ADN da colónia 20/12228 e ADN da ATCC 33291; 14- ADN da colónia 20/13264 e ADN da ATCC 33291; 15- ADN da colónia 20/13265 e ADN da ATCC 33291; 16- ADN da colónia 20/13266 e ADN da ATCC 33291; 17- ADN da colónia 20/13267 e ADN da ATCC 33291; 18- ADN da colónia 20/13268 e ADN da ATCC 33291; 19- ADN da colónia 20/13269 e ADN da ATCC 33291; 20- ADN da colónia 20/13277 e ADN da ATCC 33291; 21- Controlo positivo ATCC 33291; 22- Branco (água estéril).

Anexos

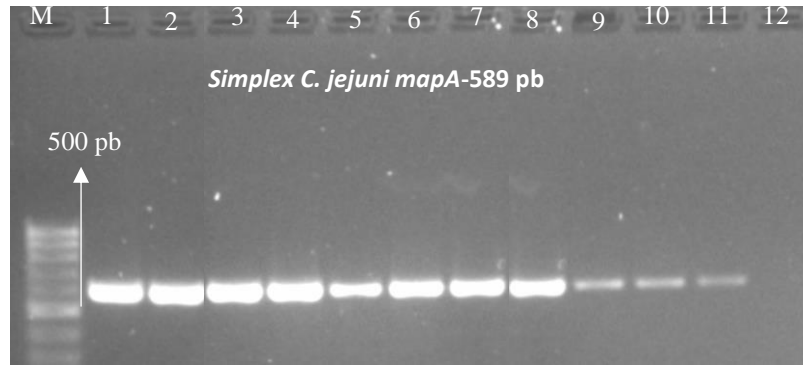


Figura 49-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/16217; 20/16218; 20/16220; 20/16221; 20/16224.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/16217; 2- ADN da colónia 20/16218; 3- ADN da colónia 20/16220; 4- ADN da colónia 20/16221; 5- ADN da colónia 20/16224; 6- ADN da colónia 20/16217 e ADN da ATCC 33291; 7- ADN da colónia 20/16218 e ADN da ATCC 33291; 8- ADN da colónia 20/16220 e ADN da ATCC 33291; 9- ADN da colónia 20/16221 e ADN da ATCC 33291; 10- ADN da colónia 20/16224 e ADN da ATCC 33291; 11- Controlo positivo ATCC 33291; 12- Branco (água estéril).

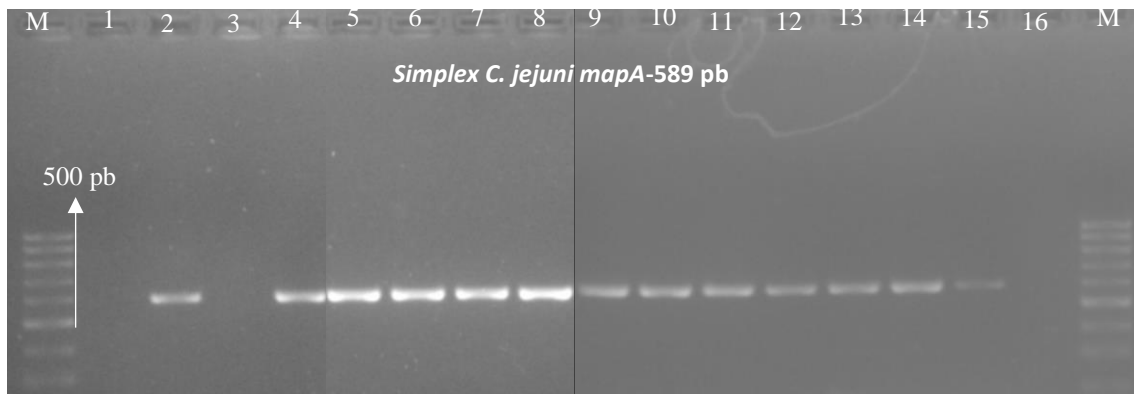


Figura 50-Amplificação por PCR do gene *mapA* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/16687; 20/16688; 20/16689; 20/16690; 20/16691; 20/16692; 20/16694.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/16687; 2- ADN da colónia 20/16688; 3- ADN da colónia 20/16689; 4- ADN da colónia 20/16690; 5- ADN da colónia 20/16691; 6- ADN da colónia 20/16692; 7- ADN da colónia 20/16694; 8-ADN da colónia 20/16687 e ADN da ATCC 33291; 9- ADN da colónia 20/16688 e ADN da ATCC 33291; 10- ADN da colónia 20/16689 e ADN da ATCC 33291; 11- ADN da colónia 20/16690 e ADN da ATCC 33291; 12- ADN da colónia 20/16691 e ADN da ATCC 33291; 13- ADN da colónia 20/16692 e ADN da ATCC 33291; 14- ADN da colónia 20/16694 e ADN da ATCC 33291; 15- Controlo positivo ATCC 33291; 16- Branco (água estéril).

Anexos

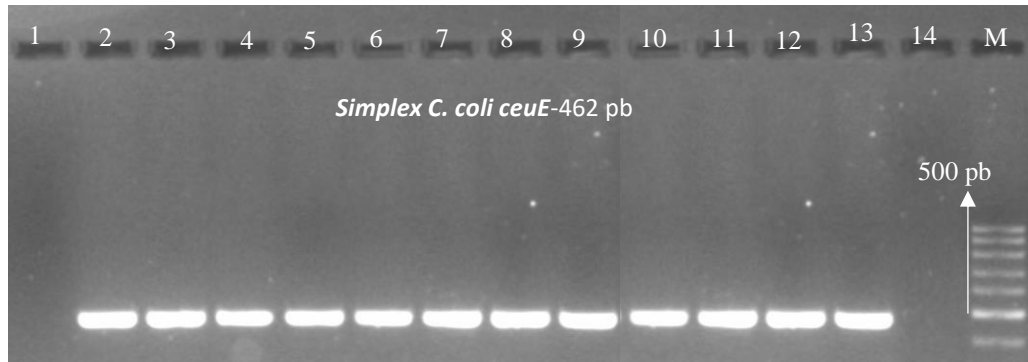


Figura 51-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/6268; 20/6271; 20/6273; 20/7922; 20/13265; 20/13266.

Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/6268; 2- ADN da colónia 20/16271; 3- ADN da colónia 20/6273; 4- ADN da colónia 20/7922; 5- ADN da colónia 20/13265; 6- ADN da colónia 20/13266; 7- ADN da colónia 20/6268 e ADN do ATCC 33559; 8- ADN da colónia 20/6271 e ADN do ATCC 33559; 9- ADN da colónia 20/6273 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da colónia 20/7922 e ADN do ATCC 33559; 11- ADN da colónia 20/13265 e ADN do ATCC 33559; 12- ADN da colónia 20/13266 e ADN do ATCC 33559; 13- Controlo positivo ATCC 33559; 14- Branco (água estéril).

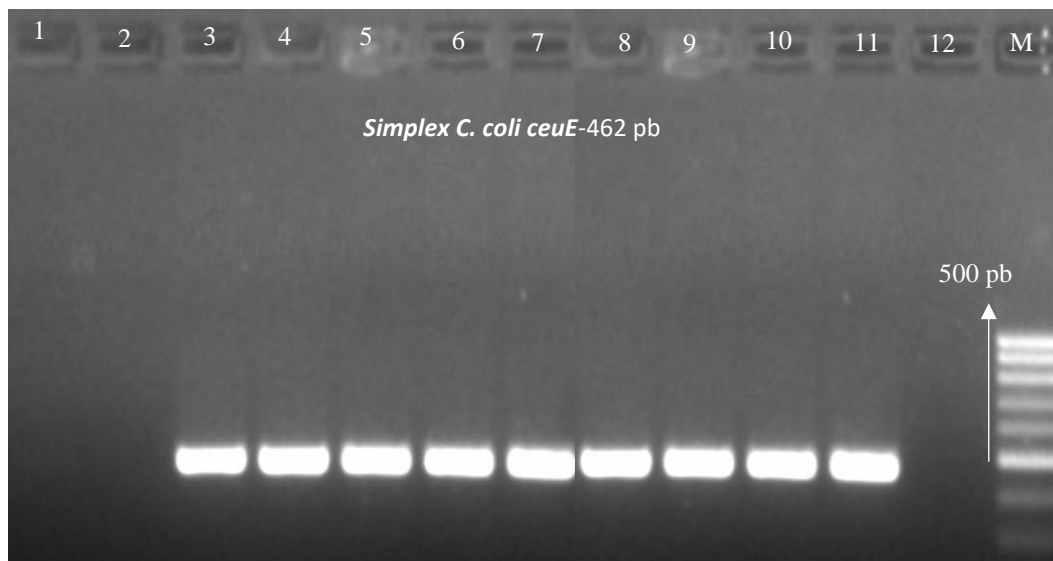


Figura 52-Amplificação por PCR do gene *ceuE* de ADN extraído através do método de extração - por fervura das colónias extraídas das amostras 20/13268; 20/13269; 20/16687; 20/16690; 20/16694.

Legenda: : M- marcador de peso molecular 100 pb (ADN Ladder 100 pb Bioron); 1- ADN da colónia 20/13268; 2- ADN da colónia 20/13269; 3- ADN da colónia 20/16687; 4- ADN da colónia 20/16690; 5- ADN da colónia 20/16694; 6- ADN da colónia 20/13268 e ADN do ATCC 33559; 7- ADN da colónia 20/13269 e ADN do ATCC 33559; 8- ADN da colónia 20/16687 e ADN do ATCC 33559; 9- ADN da colónia 20/16690 e ADN do ATCC 33559; 10- ADN da colónia 20/16694 e ADN do ATCC 33559; 11-Controlo positivo ATCC 33559; 14- Branco (água estéril);