



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Rita Correia Barata

OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CAMPYLOBACTER*
EM EXPLORAÇÕES LEITEIRAS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada
pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva e pelo
Doutor Gonçalo Nieto Almeida apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Rita Correia Barata

**OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE
CAMPYLOBACTER EM EXPLORAÇÕES LEITEIRAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva e pelo Doutor Gonçalo Nieto Almeida apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

CONTEÚDOS

Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Dedicatória.....	VI
Agradecimentos.....	VII
Índices de Figuras.....	VIII
Índices de Tabelas.....	X
Glossário de Abreviaturas.....	XII
CAPÍTULO I. Introdução.....	I
1.1 Esboço da dissertação.....	2
1.2 Contexto.....	2
1.3 Objetivos.....	3
CAPÍTULO II. Estado da arte.....	4
2.1 Doenças transmitidas por alimentos.....	5
2.2 O género <i>Campylobacter</i>	7
2.2.1 Crescimento e características de sobrevivência.....	10
2.2.2 Patogénese.....	10
2.2.3 Campilobacteriose: epidemiologia.....	11
2.2.4 Prevalência em géneros alimentícios e alimentação animal.....	14
2.2.4.1 <i>Campylobacter</i> em amostras de leite de vaca cru.....	15
2.2.4.2 <i>Campylobacter</i> em amostras de água.....	16
2.2.4.3 <i>Campylobacter</i> em amostras de alimentação de bovino.....	16
2.3 Isolamento e identificação de <i>Campylobacter</i> spp. em géneros alimentícios e alimentação animal.....	17
2.3.1 Método de referência ISSO.....	17
2.3.2 Métodos baseados na amplificação de ADN.....	20
CAPÍTULO III. Componente experimental.....	24
3.1 Desenho do estudo.....	25
3.1.1 Determinação da ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de leite cru... 3.1.2 Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em explorações leiteiras.....	25
3.2 Recolha das amostras.....	27
3.3 Material e equipamentos utilizados.....	27
3.3.1 Preparação das amostras.....	29
3.3.2 Deteção de <i>Campylobacter</i> spp.....	29
3.3.2.1 Deteção de <i>Campylobacter</i> spp.....	29
3.3.2.1.1 Extração de ADN.....	29
3.3.2.1.2 Condições do PCR.....	30
3.3.2.1.3 Confirmação das amostras positivas.....	30
3.3.2.2 Identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> detetada.....	31
3.3.2.2.1 Condições do PCR.....	31
3.3.3 Conservação de cultura em crioviais.....	32

3.4 Ensaio interlaboratorial por PCR em tempo real para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp.....	32
3.4.1 Objetivo do ensaio.....	32
3.4.2 Esboço do estudo.....	32
3.4.3 Meios de cultura e reagentes.....	33
3.4.3.1 Sequências e reagentes para o ensaio PCR1.....	33
3.4.3.2 Condições do ensaio PCR1.....	33
3.4.3.3 Sequências e reagentes para o ensaio PCR3.....	34
3.4.3.4 Condições do ensaio PCR3.....	35
CAPÍTULO IV. Resultados e discussão.....	36
4.1 Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de leite cru.....	37
4.2 Avaliação da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em explorações leiteiras.....	42
4.3 Comparação entre o método PCR do <i>EURL-Campylobacter</i> e o método do INIAV...	48
4.3.1 Comparação entre o método PCR1 do <i>EURL-Campylobacter</i> e o método de referência.....	49
4.3.2 Comparação entre o método PCR1 do INIAV e o método de referência.....	50
4.3.3 Comparação entre o método PCR3 do <i>EURL-Campylobacter</i> e o método de referência.....	51
4.3.4 Comparação entre o método PCR3 do INIAV e o método de referência.....	52
CAPÍTULO V. Conclusões.....	54
CAPÍTULO VI. Referências bibliográficas.....	57
Anexos.....	73

RESUMO

Durante os últimos anos, tem ocorrido um aumento significativo do número de casos de intoxicação alimentar nas pessoas causado por *Campylobacter* spp. O leite cru, ao lado da carne de aves, é considerado a causa mais frequente de intoxicação alimentar causada pela bactéria em questão, embora não seja sempre possível isolar as células de *Campylobacter* spp. do leite contaminado. Muito provavelmente esta dificuldade é causada pela baixa concentração deste agente patogénico no leite. Contudo, mesmo uma baixa concentração representa um risco para a saúde humana. O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em explorações leiteiras na região norte de Portugal.

Foram realizados dois estudos para estimar a ocorrência e as vias de transmissão de *Campylobacter* spp. Durante um período de 1 ano (outubro de 2020 a setembro de 2021), um total de 249 amostras de leite cru, água, alimentação de bovino e fezes foram colhidas. Em explorações leiteiras situadas em quatro concelhos da região norte, Barcelos, Famalicão, Trofa e Vila do Conde. A deteção, confirmação e identificação de *Campylobacter* spp. foram realizadas através do método de PCR em tempo real e da metodologia ISO. Para o primeiro estudo, 100 explorações leiteiras foram selecionadas e como amostra combinada, foram colhidas 100 amostras de leite do tanque de refrigeração. A ocorrência de *Campylobacter* spp. correspondeu a 4,0%. Para o segundo estudo, sete explorações foram visitadas em três alturas do ano. As amostras fecais demonstraram uma percentagem de ocorrência de contaminação de 4,2%. Todas as ocorrências sucederam nos meses de verão. Foi feita a pesquisa de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, contudo *C. jejuni* foi documentada como a única espécie encontrada.

Os resultados demonstraram que o leite cru amostrado em Portugal, como noutros países, contém inevitavelmente este agente patogénico e, por conseguinte, um controlo por pasteurização ou equivalente no tratamento do leite cru continua a ser primordial.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp.; exploração leiteira; leite cru; ocorrência; PCR em tempo real.

ABSTRACT

During the last few years, a huge increase in the number of cases of food poisoning in people caused by *Campylobacter* spp. has occurred. Raw milk, next to poultry meat, is considered the most frequent cause of food poisoning caused by this bacteria, although it is not always possible to isolate *Campylobacter* spp. cells from contaminated milk. Most likely this difficulty is caused by the low concentration of this pathogen in milk. However, even a low concentration represents a risk to human health. The present study aimed to determine the occurrence of *Campylobacter* spp. in dairy farms in the northern region of Portugal.

Two studies were conducted to estimate the occurrence and transmission routes of *Campylobacter* spp. isolates. Over a 1-year period (October 2020 to September 2021), a total of 249 samples of raw milk, water, cattle feed and feces were collected. The samples were collected from farms located in four counties in the northern region, Barcelos, Famalicão, Trofa and Vila do Conde. Detection, confirmation and identification of *Campylobacter* spp. were performed using the real-time PCR method and ISO methodology. For the first study, 100 dairy farms were selected and 100 milk samples were collected as pooled sample. The occurrence of *Campylobacter* spp. was listed as 4.0%. For the second study, seven farms were visited at three times of the year. The fecal samples showed an occurrence percentage of contamination of 4.2%. All occurrences were in the summer months. *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* were tested for, but *C. jejuni* was documented as the only species found.

The results showed that raw milk sampled in Portugal, as in other countries, inevitably contains this pathogen and therefore control by pasteurization or equivalent treatment of raw milk remains paramount.

Keywords: *Campylobacter* spp.; dairy farm; raw milk; occurrence; real time PCR.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Dedico-vos este trabalho, não só como agradecimento por tudo aquilo que fizeram por mim ao longo destes anos, mas mais que isso, por tudo aquilo que ainda fazem e por tudo o que ainda irão fazer. Por todas as vezes que me incentivaram a dar o meu melhor. Por todas as vezes que aplaudiram um feito meu. E por todos os dias menos bons, em que não faltaram palavras de amor e de fé em mim.

Vocês demonstram-me todos os dias o que duas pessoas com garra e determinação podem alcançar, seja em que contexto for. A vocês agradeço todo o meu trabalho e tudo o que sou.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores. À Professora Doutora Gabriela Silva por ainda ser uma professora que se dedica aos seus alunos e que ensina com paixão e devoção. Ao Doutor Gonçalo Almeida quero agradecer a oportunidade de trabalhar ao seu lado, obrigada pelo apoio e disponibilidade que sempre dispôs na realização desta dissertação, por todo o ano de trabalho, disponibilidade e acima de tudo por todas as oportunidades e desafios que me lançou ao longo deste ano.

Agradeço a todos os que, no INIAV, tive oportunidade de conhecer, trabalhar e partilhar este último ano. Ao Ricardo que este sempre disposto a ajudar. Ao João que teve sempre tempo para me dedicar e explicar tudo quanto podia. À Marta, que foi das melhores surpresas que tive, um grande suporte para mim, quer profissional quer pessoalmente. E em especial, ao Hugo, por todo o tempo despendido, por todo o conhecimento que me transmitiu e acima de tudo por todo o carinho com que me recebeu.

Quero agradecer a todos os produtores que se disponibilizaram a participar neste estudo, por nos permitem a recolha de amostras e por se mostrarem sempre tão recetivos e disponíveis para ensinar e esclarecer qualquer dúvida que surgisse.

Agradeço à minha instituição, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, instituição que me acolheu desde 2015, aos seus docentes, e a todos os fazem parte dela, por terem contribuído para a profissional que sou hoje.

Aos meus amigos da faculdade, Eduardo, Francisco, João, Maria João, Mariana e Newton às minhas amigas da RAJA, Ana Luísa, Daniela, Diana, Joana, Mariana e Sofia e a todos os outros que fui fazendo pelo caminho, a todos vocês agradeço tudo o que passámos em Coimbra, vocês são os que “*levo comigo para a vida*”.

À Rita, minha madrinha, das primeiras pessoas que me acolheu em Coimbra. Mostrou-me a cidade, as suas tradições e acima de tudo a grande paixão que nutria por esta cidade. É graças a ela que Coimbra tem tanto encanto, principalmente na “*hora da despedida*”. Obrigada a ti, por todos os conselhos, exemplos e carinho que me deste.

À Andreia e à Sónia, que me acompanharam tão de perto neste último ano, nos finais dos dias que entre correções e modificações na tese, ríamos e ríamos e não nos fartávamos.

Agradeço do fundo do coração à minha família pelo apoio indescritível. Sempre me apoiaram em todos os momentos, mesmo nos mais complicados. Sempre me incentivaram a fazer mais e melhor. Sem vocês não seria capaz.

A todos vocês, o meu mais sincero,

F-R-A!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Números relatados e taxas de notificação de zoonoses humanas confirmadas na UE, 2019.....	6
Figura 2 Imagem de microscópio elétrico de <i>C. jejuni</i>	11
Figura 3 Imagem de microscópio elétrico de <i>C. concisus</i>	11
Figura 4 Imagem de microscópio elétrico de uma CVNC <i>C. jejuni</i>	11
Figura 5 Taxas de campilobacteriose por 100.000 habitantes na UE, por país, em 2019.....	12
Figura 6 Tendência em casos humanos confirmados de campilobacteriose na UE, por mês, 2015–2019.....	13
Figura 7 Colónias características de <i>Campylobacter</i> spp. em mCCDA.....	18
Figura 8 Colónias presumidas como <i>Campylobacter</i> inoculadas em CBA.....	19
Figura 9 Coloração de Gram da amostra de leite E042.....	20
Figura 10 Teste de oxidase.....	20
Figura 11 Perfil térmico utilizado no método PCR para a pesquisa e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.....	21
Figura 12 Representação gráfica de uma curva de amplificação do método de PCR.....	22
Figura 13 Representação gráfica do método de PCR com representação da curva de amplificação do controlo positivo e amplificação dos controlos internos.....	23
Figura 14 Representação gráfica do método PCR com representação da curva de amplificação do controlo positivo.....	23
Figura 15 Representação gráfica do método PCR com representação da curva de amplificação dos controlos internos.....	23
Figura 16 Localização dos concelhos em estudo.....	25
Figura 17 Imagens de explorações leiteiras.....	27
Figura 18 Amostras durante o processo de extração de ADN.....	29
Figura 19 Representação gráfica do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras de leite E030 a E044.....	38
Figura 20 Representação gráfica do método PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> das amostras de leite E033 e E042.....	39
Figura 21 Representação gráfica do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras de leite E065 a E070.....	40
Figura 22 Representação gráfica do método PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> nas amostras de leite E067 e E068.....	40
Figura 23 Representação gráfica da percentagem de amostras de leite cru com resultado positivo para a presença de <i>Campylobacter</i> spp.....	41
Figura 24 Representação gráfica do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras da exploração E001 e E002.....	41
Figura 25 Representação gráfica do método PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> nas amostras de leite E001 e E002.....	44
Figura 26 Representação gráfica do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras da exploração E007.....	45

Figura 27 Representação gráfica do método PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> na amostra fecal E007.....	45
Figura 28 Representação gráfica da percentagem de explorações leiteiras positivas para <i>Campylobacter</i> spp.....	49
Figura 29 Gráfico do método PCR I realizado segundo o protocolo do EURL- <i>Campylobacter</i>	50
Figura 30 Gráfico do método PCR I realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV.....	51
Figura 31 Gráfico do método PCR 3 realizado segundo o protocolo do EURL- <i>Campylobacter</i>	52
Figura 32 Gráfico do método PCR 3 realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV.....	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Hospitalizações relatadas e casos fatais devido a zoonoses em casos humanos confirmados na UE, 2019.....	6
Tabela 2 Hospedeiros relatados para os membros do género <i>Campylobacter</i> - Parte I....	8
Tabela 3 Hospedeiros relatados para os membros do género <i>Campylobacter</i> - Parte II.....	9
Tabela 4 Estudos analisados sobre a ocorrência de <i>Campylobacter</i> em amostras de leite cru retiradas de tanques de explorações leiteiras de países da EU.....	15
Tabela 5 Estudos analisados sobre a ocorrência de <i>Campylobacter</i> em amostras de água de explorações leiteiras de países da EU.....	16
Tabela 6 Interpretação dos valores de Cq dos gráficos do método PCR.....	23
Tabela 7 Número de cada amostra recolhida nas diferentes rondas.....	26
Tabela 8 Equipamentos utilizados na componente laboratorial e finalidades.....	27
Tabela 9 Materiais e reagentes utilizados na componente laboratorial e finalidades.....	28
Tabela 10 Lista de primers e sondas utilizados no método de PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp.....	30
Tabela 11 Lista de primers e sondas utilizados no método de PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i>	31
Tabela 12 Lista de primers e sondas utilizados no ensaio de PCR1.....	32
Tabela 13 Lista de reagentes utilizados no ensaio de PCR1.....	32
Tabela 14 Lista de primers e sondas utilizados no ensaio de PCR3.....	33
Tabela 15 Lista de reagentes utilizados no ensaio de PCR3.....	33
Tabela 16 Resultados do estudo da ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de leite cru – Parte I.....	37
Tabela 17 Resultados do estudo da ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de leite cru – Parte II.....	38
Tabela 18 Valores de Cq do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras de leite E030 a E044.....	39
Tabela 19 Valores de Cq do método de PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> presente nas amostras de leite E033 e E042.....	39
Tabela 20 Valores de Cq do método de PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras de leite E065 a E070.....	40
Tabela 21 Valores de Cq do método de PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> presente nas amostras de leite E067 e E068.....	41
Tabela 22 Resultados do estudo do impacto da sazonalidade na ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de exploração leiteira – Parte I.....	42
Tabela 23 Resultados do estudo do impacto da sazonalidade na ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de exploração leiteira – Parte II.....	43
Tabela 24 Valores de Cq do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras das explorações E001 e E002.....	44
Tabela 25 Valores de Cq do método PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> presente nas amostras de leite E001 e E002.....	44
Tabela 26 Valores de Cq do método PCR para a pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. na amostra fecal E007.....	45

Tabela 27 Valores de Cq do método PCR para a identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> presente na amostra fecal E007.....	47
Tabela 28 Resumo dos resultados positivos por ronda.....	48
Tabela 29 Comparação de resultados entre o ensaio PCR1 <i>EURL-Campylobacter</i> e o método de referência.....	50
Tabela 30 Comparação de resultados entre o ensaio PCR1 INIAV e o método de referência.....	51
Tabela 31 Comparação de resultados entre o ensaio PCR3 <i>EURL-Campylobacter</i> e o método de referência.....	52
Tabela 32 Comparação de resultados entre o ensaio PCR1 INIAV e o método de referência.....	53

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

- ADN** - Ácido desoxirribonucleico
- CBA** - *Columbia blood agar*
- Cq** - Ciclo de quantificação
- CVNC** - Célula viável não cultivável
- dNTP** - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- DTA** - Doenças de transmissão alimentar
- ECDC** - *European Centre for Disease Prevention and Control*
- EFSA** - *European Food Safety Authority*
- EM** - Estados membros
- EUA** - Estados Unidos da América
- EURL-Campylobacter** - Europeu de Referência de *Campylobacter*
- FAO** - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- ISO** - *International Standardization Organization*
- mCCDA** - *modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar*
- MgCl₂** - Cloreto de Magnésio
- min** - Minutos
- OMS** - Organização mundial de saúde
- PCR** - *Polymerase chain reaction*
- pH** - potential Hydrogen
- qPCR** - *quantitative polymerase chain reaction*
- rRNA** - RNA ribossômico
- seg** - Segundos
- STEC** - *E. coli* produtora de toxinas *Shiga*
- UE** - União Europeia
- UHT** - *Ultra-High Temperature*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Esboço da dissertação

Esta dissertação está repartida em 7 capítulos. Este primeiro capítulo consiste numa breve contextualização do tema abordado nesta dissertação e define os objetivos iniciais propostos para este projeto.

No segundo capítulo, é apresentado o estado da arte em relação às doenças transmitidas por alimentos. Também é realizada uma revisão do género *Campylobacter* spp., onde são abordados vários aspetos relacionados a dados epidemiológicos, vias de transmissão, e métodos de deteção. Neste capítulo, são referidos os principais meios de deteção, bem como os métodos de isolamento e ainda nos testes que devem ser realizados para a correta pesquisa, identificação e confirmação de *Campylobacter* spp. de acordo com procedimentos normalizados.

O terceiro capítulo aborda os principais objetivos propostos para esta dissertação, a deteção e confirmação de *Campylobacter* spp. nas amostras recolhidas e a identificação das espécies. É ainda abordado um ensaio interlaboratorial organizado pelo laboratorial Europeu de Referência de *Campylobacter* (EURL-Campylobacter), realizado durante o decorrer deste projeto, para a validação de um método de PCR para a confirmação e identificação de *Campylobacter* spp. Neste capítulo, são apresentados o material e os métodos utilizados para atingir todos os objetivos.

No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos do trabalho laboratorial referido no terceiro capítulo e uma breve discussão dos mesmos.

No sexto capítulo, são descritas as conclusões dos resultados obtidos nos trabalhos laboratoriais referidos no quarto capítulo e possíveis futuros trabalhos relacionados com o tema.

O sétimo capítulo abarca as referências bibliográficas onde se baseia a componente científica que tem por base esta dissertação.

1.2 Contexto

As doenças alimentares constituem um grave problema de saúde pública e um obstáculo significativo ao desenvolvimento socioeconómico por todo o mundo. Durante muitos anos, o peso das doenças alimentares tem sido subestimado devido à subnotificação e à dificuldade de estabelecer relações causais entre a contaminação dos alimentos e a consequente doença ou morte. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que quase uma em cada dez pessoas em todo o mundo adoeça depois de comer alimentos

contaminados, causando mais de 420.000 mortes. Tipicamente, estes agentes são infecciosos ou tóxicos na natureza e podem ser causados por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas que entram no corpo através de alimentos ou água contaminados. Mais de 250 doenças alimentares diferentes foram descritas, no entanto Norovírus, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. estão entre os agentes patogénicos alimentares mais comuns.

À medida que há um aumento da população mundial, também tem de ser intensificada a industrialização da agricultura e da produção animal para conseguir responder ao aumento que a procura de alimentos criou. Este facto acarreta inúmeros desafios para a segurança alimentar. Para além das consequências para a saúde pública, o potencial impacto de um único evento de uma doença alimentar numa empresa ligada a alimentos pode ser devastador. Por consequência, para proteger os consumidores e os produtores, foram adotadas várias abordagens integradas em termos de segurança alimentar tais como a iniciativa "farm to fork". No entanto, a indústria alimentar é muito complexa e a contaminação pode ocorrer em qualquer ponto da cadeia de produção - durante a produção, transformação, distribuição ou preparação - o que torna o controlo dos patogénicos uma tarefa difícil mesmo com programas de segurança rigorosos.

1.3. Objetivos

Sabendo que mais de 200 doenças são causadas pela ingestão de alimentos contaminados com bactérias, mas que são subnotificados e que *Campylobacter* spp. está entre os agentes patogénicos alimentares mais comuns, o presente projeto pretende realizar dois estudos.

O primeiro estudo, prende-se com a análise epidemiológica de *Campylobacter* spp. em leite cru, recolhido em explorações leiteiras da região norte de Portugal.

O segundo estudo pretende compreender o possível impacto da sazonalidade na epidemiologia de *Campylobacter* spp. em amostras de explorações leiteiras e as possíveis vias de contaminação dentro da própria exploração. Neste estudo os objetivos são a recolha diversas amostras de explorações leiteiras da região norte de Portugal. A determinação da ocorrência de *Campylobacter* spp. e identificação das espécies encontradas e estabelecer as rotas de transmissão e retirar conclusões referentes ao ciclo de contaminação das explorações leiteiras da região norte de Portugal.

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

As doenças alimentares têm sido um tema importante para todas as sociedades desde o início da humanidade. Embora os tipos e consequências destas doenças tenham mudado ao longo dos tempos, continuam a ser um problema crescente de saúde pública em todo o mundo e, conseqüentemente, uma grande preocupação da comunidade internacional ¹.

Além da sua óbvia implicação na saúde humana, o impacto potencial dos surtos de doenças alimentares num negócio alimentar pode ser devastador e desencadear um alarme social que pode ser muito difícil de controlar, resultando em perdas económicas e de reputação inimagináveis para a empresa ². Embora a análise económica dos custos relacionados com a segurança alimentar tenha demonstrado que é muito mais barato para um produtor investir na prevenção de eventos de surtos alimentares do que lidar com um surto, a enorme pressão sobre as empresas de alimentos para serem competitivas a nível global pode, por vezes, resultar numa atitude descontráida em relação ao controlo da segurança alimentar ³.

Por estas razões, várias agências globais separadas, como a OMS e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), bem como agências regionais como a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), têm programas para apoiar a análise de riscos e segurança alimentar. As primeiras estimativas da carga global e regional de doenças transmitidas por alimentos, publicadas pela OMS em dezembro de 2015, mostram que a carga é significativa por todo o mundo. Este relatório apresenta dados para a comunidade europeia da OMS. Todos os anos, mais de 23 milhões de pessoas adoecem pela ingestão de alimentos contaminados, resultando em 5000 mortes e em mais de 400000 anos de vida ajustados por incapacidade. As causas mais frequentes de doenças diarreicas transmitidas por alimentos são o Norovírus seguido por *Campylobacter* spp. e *Salmonella* não tifóide ⁴.

Segundo o relatório de zoonoses elaborado pela EFSA e o ECDC em 2021, onde são reportadas 13 zoonoses (Figura 1), a campilobacteriose tem sido a zoonose mais relatada, desde 2005, representando 50% de todos os casos reportados. A campilobacteriose foi seguida por outras doenças bacterianas, salmonelose, infeções STEC e yersiniose, contudo continua a ser a mais frequentemente relatada. A gravidade das doenças foi analisada com base na hospitalização e no resultado dos casos reportados (Tabela 1) ⁵.

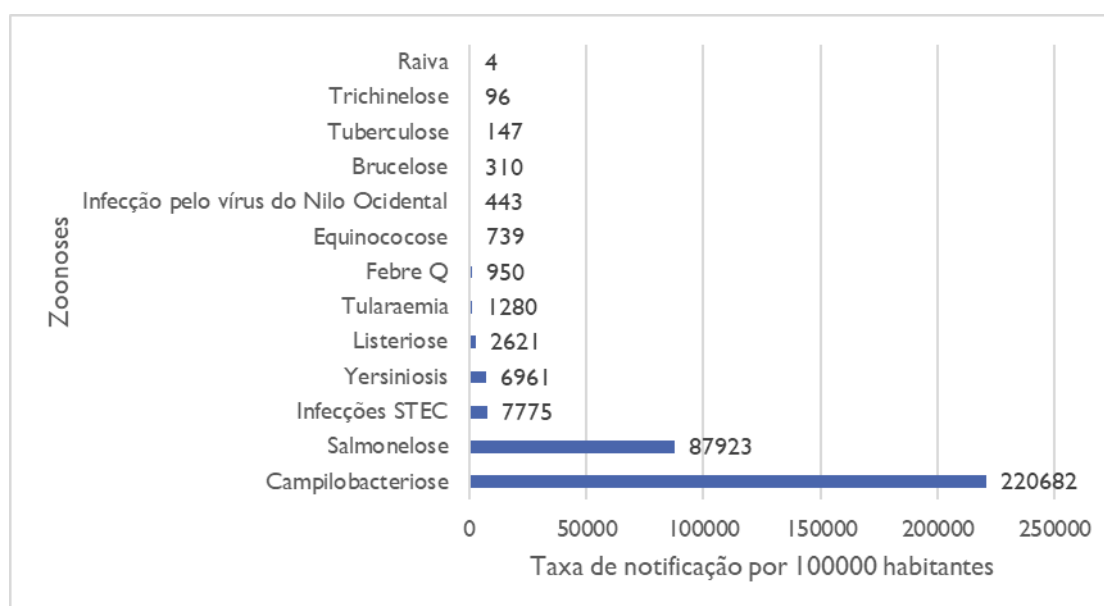


Figura 1 Números relatados e taxas de notificação de zoonoses humanas confirmadas na UE, 2019⁶

Tabela 1 Hospitalizações relatadas e casos fatais devido a zoonoses em casos humanos confirmados na UE, 2019⁶

Zoonose	Nº de casos humanos confirmados	Casos hospitalares reportados	Mortes reportadas	Mortalidade (%)
Campilobacteriose	220,682	20,432	47	0.03
Salmonelose	87,923	16,628	140	0.22
Infecções STEC	7,775	1,100	10	0.21
Yersiniose	6,961	648	2	0.05
Listeriose	2,621	1,234	300	17.6
Tularaemia	1,280	149	1	0.36
Equinococose	739	109	2	0.86
Febre Q	950	NA	4	0.63
Infecção do vírus do Nilo	443	347	52	11.8
Brucelose	310	98	2	1.75
Triquinelose	96	6	1	4.20
Raiva	4	NA	3	100.0

A maioria dos Estados-Membros (EM) da União Europeia (UE) reportou um aumento das taxas de notificação dos casos de *Campylobacter* em 2015, com quase metade a reportar aumentos significativos desde 2008. Dos casos relatados de campilobacteriose na UE que forneceram informações sobre a espécie, 81,0% foram causados por *C. jejuni*, 8,4%

por *C. coli*, 0,2% por *C. fetus*, 0,1% por *C. lari* e 0,09% por *C. upsaliensis*. Outras espécies de *Campylobacter* foram responsáveis pelos restantes 10,3%, mas a grande maioria desses casos foi reportada como "*C. jejuni* / *C. coli* / *C. lari*" não diferenciado ⁷.

Embora a notificação seja exigida na maioria dos Estados Membros (EM) (Portugal reportou dados de campilobacteriose pela primeira vez em 2015), não existe atualmente qualquer vigilância obrigatória de *Campylobacter* na UE para alimentos. Com este sistema de vigilância inadequado, a ameaça de campilobacteriose tornar-se-á um problema ainda maior para a sociedade se não forem tomadas medidas. Por conseguinte, a vigilância e a constante avaliações dos géneros alimentícios são uma prática prioritária para a maioria dos retalhistas, empresas relacionadas com os alimentos ou autoridades de saúde pública, a fim de prevenir a libertação e a propagação de produtos contaminados no mercado alimentar ⁸.

2.2 O Género *Campylobacter*

Do ponto de vista histórico, o género *Campylobacter* foi descrito pela primeira vez a 2 de fevereiro de 1906 por John McFadyean e Stewart Stockman quando estes descrevem a presença de “grande número de um organismo peculiar” no muco uterino de uma ovelha grávida ⁹. Contudo, acredita-se que o primeiro relato deste organismo tenha sido em 1886, quando Theodore Escherich observou e descreveu bactérias em forma de espiral não cultiváveis que foram encontradas no cólon de crianças com uma doença entérica chamada “cólera infantil”. A primeira cultura bem-sucedida de *Campylobacter*, foi de abortos ovinos, realizada por McFadyean e Stockman em 1913 ¹⁰. Mais tarde, em 1927, Theobald Smith e Marion Orcutt descobriram um grupo de bactérias semelhantes a *Vibrio* em fezes de bovinos com diarreia e, em 1931, Jones e os seus colegas de trabalho demonstraram a relação entre os *Vibrios* microaerofílicos e a disenteria bovina, e o organismo foi eventualmente chamado *Vibrio jejuni* ¹¹. Em 1944, Doyle isolou um organismo *Vibrio* diferente das fezes de porcos com diarreia e classificou-o como *Vibrio coli* ¹². Já em 1963, Seabald e Vernon propuseram o género *Campylobacter* distinguindo-o do género *Vibrio* com base na sua baixa composição de guanina e citosina (GC), metabolismo não fermentativo e suas necessidades de crescimento microaerofílico ^{13; 14}.

A família *Campylobacteraceae* é um grupo diversificado de bactérias patogênicas, comensais Gram negativas, atualmente composta por 3 gêneros: *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*¹⁵. O primeiro caso bem documentado de infecção humana causada por *Campylobacter* ocorreu em 1938 quando um surto de diarreia foi transmitido pelo leite que infetou 355 utentes de duas instituições prisionais nos Estado Unidos da América (EUA)¹⁶. Desde o seu início, o género *Campylobacter* passou por grandes mudanças e algumas partes da estrutura taxonómica atual ainda permanecem um assunto controverso. Mais recentemente, 35 espécies foram descritas (Tabela 2).

Tabela 2 Fontes relatadas para os membros do género *Campylobacter*- Parte I

Espécies e subespécies	Fontes	Referência
<i>C. armoricus</i>	Água, humanos	17
<i>C. avium</i>	Frango, peru	18
<i>C. blaseri</i>	Focas	19
<i>C. canadensis</i>	Grus	20
<i>C. coli</i>	Bovinos, frango, cachorro, pato, cabra, macaco, porco, gaivota, ovelha, humano	21
<i>C. concisus</i>	Bovinos, cães, humanos	22
<i>C. corcagiensis</i>	Macaco de cauda de leão	23
<i>C. cryaerophilus</i>	Bovinos, suínos	24
<i>C. cuniculorum</i>	Coelhos	25
<i>C. curvus</i>	Cães, humanos	26
<i>C. fetus</i>	Bovinos, humanos, ovelhas	27
<i>C. geochelonis</i>	Tartaruga de Hermann	28
<i>C. gracilis</i>	Cães, humanos	29
<i>C. helveticus</i>	Cães, gatos, humanos	30
<i>C. hepaticus</i>	Frango	31
<i>C. hominis</i>	Humanos	32
<i>C. hyointestinalis</i>	Bovinos, cães, hámsteres, humanos, ovelhas, renas, suínos, veados	33
<i>C. iguaniorum</i>	Répteis	34
<i>C. insulaenigrae</i>	Cetáceos, humanos, pinípedes	35
<i>C. jejuni</i>	Bovinos, frango	21
<i>C. lanienae</i>	Bovinos, humanos, ovinos, suínos	36
<i>C. lari</i>	Cães, frangos, gaivotas, gatos, ostras	37
<i>C. mucosalis</i>	Cães, humanos, suínos	38
<i>C. novaezeelandiae</i>	Aves	39
<i>C. ornithocola</i>	Aves selvagens	40

Tabela 3 Hospedeiros relatados para os membros do género *Campylobacter*- Parte II

Espécies e subespécies	Fontes	Referência
<i>C. peloridis</i>	Marisco	41
<i>C. pinnipediorum</i>	Leão-marinho	42
<i>C. portucalensis</i>	Touros	43
<i>C. rectus</i>	Cães, humanos	26
<i>C. showae</i>	Cães, humanos	44
<i>C. sputorum</i>	Bovinos, cães, humanos, ovelhas, suínos	21
<i>C. subantarcticus</i>	Pinguins	45
<i>C. upsaliensis</i>	Cães, gatos, humanos	46
<i>C. ureolyticus</i>	Bovinos, cavalos, humanos	47
<i>C. volucris</i>	Gaivotas de cabeça preta, humanos	48

As bactérias pertencentes ao género *Campylobacter* são bacilos Gram negativos, delgados e curvos ou helicoidais (Figura 2). Têm entre 0,2 - 0,9 µm de largura e 0,5 - 5,0 µm de comprimento e são móveis por meio de um único flagelo polar não revestido numa extremidade ou um flagelo em cada extremidade (Figura 3), exceto *C. gracilis* e *C. hominis* que são não móveis e *C. showae* que possui múltiplos flagelos ⁴⁹. Tipicamente, as bactérias *Campylobacter* têm um baixo teor de G+C (29 - 47 mol%) ¹³. A maioria das espécies são possuidoras da enzima citocromo-oxidase e da catalase, não possuem a enzima urease e exibem resistência à cefoperazona e às fluoroquinolonas, normalmente usadas para tratar doenças humanas ⁵⁰. Em culturas antigas, ou culturas expostas a condições de crescimento desfavoráveis, as células de *Campylobacter*, podem mudar para formas esféricas ou de cocos e formar células viáveis mas não cultiváveis (CVNC) (Figura 4) ¹³.

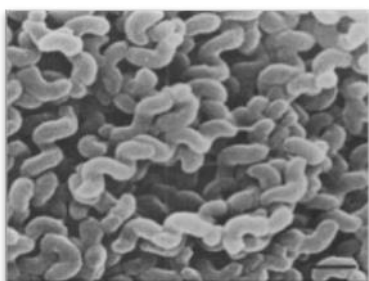


Figura 2 Imagem de microscópio elétrico de *C. jejuni* ⁴⁹



Figura 3 Imagem de microscópio elétrico de *C. concisus* ⁴⁹

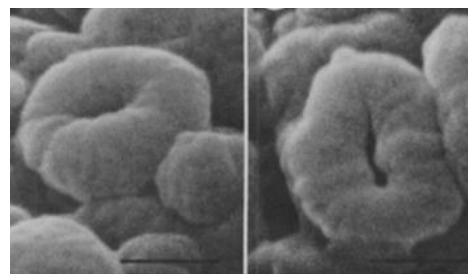


Figura 4 Imagem de microscópio elétrico de CVNC *C. jejuni* ¹³

As espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são denominadas de *Campylobacter* termófilos, visto que crescem numa faixa de temperatura, que varia entre 30 °C e 47 °C, com uma temperatura ótima de 42 °C. Estes microrganismos são altamente sensíveis ao sal, sendo esta sensibilidade variável em função da temperatura. São também bastante sensíveis à desidratação e a valores de pH ácido, crescendo na faixa de pH entre 5,5 - 8,0, com valor ótimo próximo do neutro (6,5 - 7,5) ⁵¹.

Embora várias espécies de *Campylobacter* sejam ubiqüitárias, algumas como *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são isoladas frequentemente a partir de casos de gastroenterite humana, sendo *C. jejuni* a principal espécie associada às doenças de transmissão alimentar ⁵².

2.2.1 Crescimento e características de sobrevivência

A fonte de energia utilizada por estas bactérias é derivada de aminoácidos ou de intermediários do ciclo de Krebs, ao contrário dos hidratos de carbono que não são utilizados. Ainda que o oxigénio seja necessário para a respiração, as espécies de *Campylobacter* são microaerofílicas fastidiosas, sendo o seu crescimento reduzido em condições de aerobiose e seja nulo em condições de anaerobiose. O crescimento ideal ocorre em atmosferas microeróbias geralmente compreendendo 5% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e 85% de azoto ⁵³.

Para além das espécies termotolerantes que têm uma temperatura ótima de crescimento de 42 °C, o que reduz a capacidade destas bactérias para desenvolverem hospedeiros externos durante o processamento e armazenamento de alimentos, também outras espécies com temperatura ótima de crescimento na faixa dos 30 – 37 °C foram descritas como possíveis causadores de doenças em humanos ^{14; 54}.

O congelamento e o descongelamento também afetam negativamente o crescimento de *Campylobacter* spp. Em culturas puras, estas bactérias são normalmente inativadas por armazenamento através da congelação a -15 °C durante 3 dias, contudo, o congelamento não elimina o agente patogénico dos alimentos anteriormente contaminados ⁵⁵.

2.2.2 Patogénese

Os mecanismos exatos da patogénese de *Campylobacter* spp. ainda não são completamente conhecidos ^{56; 57}. São vários os requisitos de patogenicidade, conhecidos como fatores de virulência, que foram identificados, que abrangem flagelos para mobilidade, fatores de adesão e invasão e a capacidade de excretar toxinas ⁵⁸.

Os flagelos desempenham um papel fulcral na colonização do intestino delgado e cólon dos seres humanos^{59 : 60}. A inflamação celular no intestino é provocada pela fase de invasão, que é seguida por uma redução na capacidade de absorção de nutrientes do intestino⁶¹. O primeiro local de colonização em humanos é o intestino delgado e parece que a virulência da bactéria e a imunidade do hospedeiro têm um papel importante na determinação da gravidade da doença⁶².

As manifestações clínicas de infeções de *Campylobacter* são muitas vezes impossíveis de diferenciar das infeções causadas por *Shigella* e *Salmonella*⁶³. O principal sintoma desta caracteriza-se por diarreia aguda, mas autolimitada^{64 : 65}. Ao contrário de outras doenças bacterianas causadoras de diarreia, o microrganismo é frequentemente isolado das fezes semanas após o episódio, com tempos médios de excreção relatados após a diarreia de até 14 dias^{66 : 67}. Biologicamente, existem dados científicos para acreditar que a infeção por *Campylobacter* pode ter um impacto duradouro no crescimento infantil. Além de sequelas no sistema imunitário de longo prazo mais raras, incluindo artrite reativa e síndrome de Guillain-Barré, *Campylobacter* é um fator de risco para síndrome inflamatória pós-infeciosa do intestino e, mais controversamente, doença inflamatória intestinal^{68 : 69}. Está também descrito que a campilobacteriose afeta a integridade da barreira epitelial, sugerindo que a excreção prolongada pode estar associada a lesões persistentes na mucosa⁷¹.

2.2.3 Campilobacteriose: epidemiologia

Com base nos Relatórios de Zoonoses da Comunidade da EFSA, a campilobacteriose é a zoonose mais comumente relatada desde 2005. Em 2005, *Campylobacter* tornou-se a principal causa de doença zoonótica em humanos, com 197363 casos confirmados⁶. Contudo, foi apenas a partir de 2008 que os dados começaram a preocupar as instituições da autoridade alimentar, quando 212064 casos de campilobacteriose humana foram notificados na UE⁷². Quando comparados com os dados de 2015 (220,682 casos confirmados), observou-se um aumento de cerca de 4% no número de casos⁶.

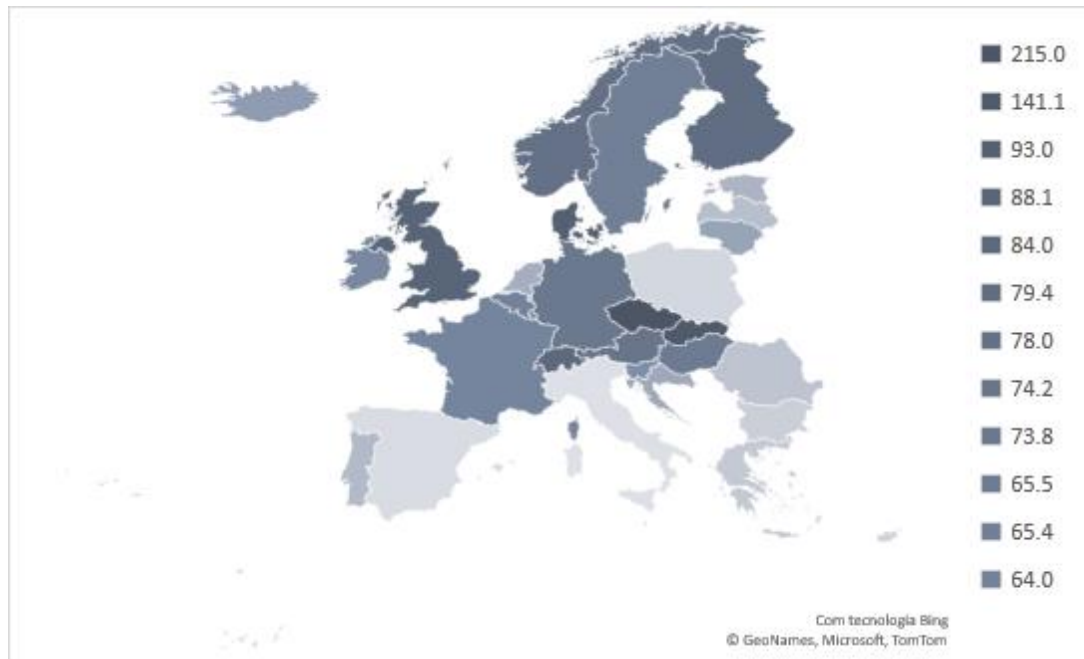


Figura 5 Taxas de campilobacteriose por 100000 habitantes na UE, por país, em 2019⁶

Não obstante, acredita-se que muitos mais casos permaneçam sem diagnóstico/não notificados, subestimando o número real de casos de campilobacteriose por todo o mundo. Só na UE, estima-se que os cerca de 200000 casos notificados por ano podem ser traduzidos em não menos de dois milhões e possivelmente até em 20 milhões de casos por ano⁶³. Referente aos países em desenvolvimento, relatórios precisos são ainda mais difíceis de obter, tornando ainda mais árdua a avaliação da verdadeira incidência mundial de gastroenterites causadas por *Campylobacter* spp⁷³.

Alguns dos estudos dos casos de campilobacteriose não parecem ter preferência racial, mas alguns estudos revelam que estes organismos são isolados com maior frequência no género masculino do que no género feminino. No entanto, parece que quando apenas os casos com sintomas graves mais imediatos são considerados, as mulheres podem estar em maior risco. As razões para isso são desconhecidas, mas provavelmente são fisiológicas⁷⁴.

Apesar das infeções poderem ocorrer em todas as faixas etárias, nos países em desenvolvimento os casos de campilobacteriose são mais comuns nos primeiros 5 anos de vida, enquanto que nos países desenvolvidos, os estudos apresentam um pico de incidência em crianças menores de um ano e em pessoas com idade entre os 15 e 29 anos⁷².

É ainda interessante assinalar que os dados de campilobacteriose entre 2015 e 2019 mostram uma variação sazonal clara de casos confirmados de campilobacteriose relatados na UE com picos acentuados nos meses de verão (Figura 6) ⁶. Embora as razões para a sazonalidade de *Campylobacter* não sejam ainda bem compreendidas, fatores como o aumento de potenciais reservatórios, comportamento humano e clima mais quente são usados como possíveis explicações ⁷⁵. No entanto, a maioria dos casos ocorre como eventos pontuais isolados, não como parte de surtos notórios. Na verdade, os surtos relatados de campilobacteriose transmitidos por alimentos são limitados. Em 2019, os surtos confirmados na UE constituíram apenas 0,6% de todos os casos notificados de campilobacteriose ⁶. Mesmo assim, os casos de surto são importantes, pois servem como fonte de estudo para a compreensão dos diversos mecanismos de transmissão.

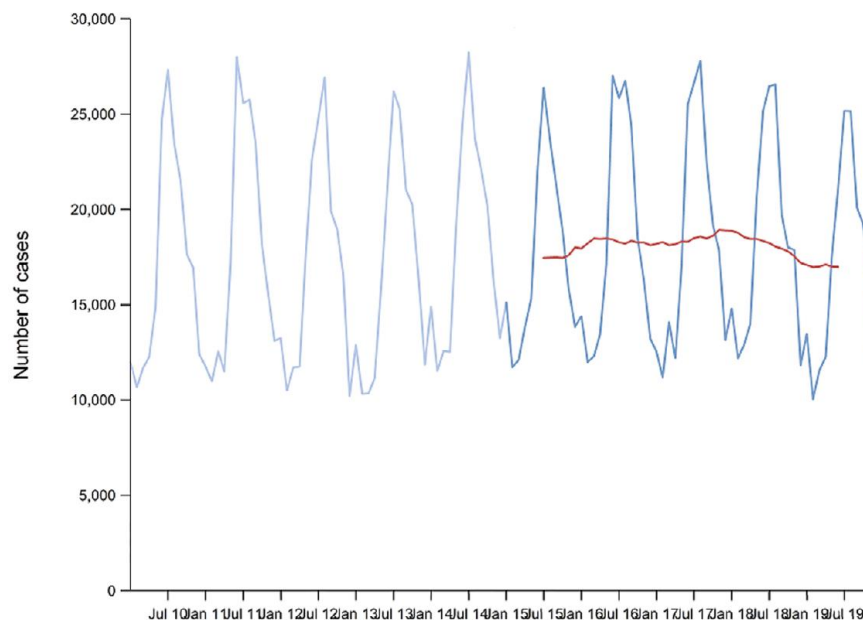


Figura 6 Tendência em casos humanos confirmados de campilobacteriose na UE, por mês, 2015–2019 ⁶

— Número de casos 2010-2014 — Número de casos 2015-2019 — Média de 12 meses 2015-2019

2.2.4 Prevalência em géneros alimentícios e alimentação animal

Os organismos *Campylobacter* colonizam regularmente o trato intestinal de uma ampla variedade de animais, animais esses que atuam como reservatórios para a transmissão zoonótica ao homem. Estas bactérias são eliminadas nas fezes desses animais para o meio ambiente ⁷⁶.

Embora as aves domésticas sejam descritas como a principal fonte de campilobacteriose humana, os ruminantes são responsáveis pelo segundo maior número de infecções humanas por *C. jejuni* ^{77 ; 78}. De acordo com o relatório da EFSA, foram relatados 36% de géneros alimentícios positivos para a presença de *Campylobacter* de 2015 a 2018, dos quais 8% eram derivados de laticínios ⁶. Em explorações leiteiras, o gado infetado com *Campylobacter* pode libertar bactérias, aumentando o risco de infeção para outros animais ou humanos por contaminação ambiental ⁷⁹. Portanto, se o ambiente da exploração estiver contaminado e não for tratado adequadamente, as bactérias eliminadas nas fezes do gado leiteiro pode ser facilmente transmitidas ao homem por meio de produtos lácteos, como leite não pasteurizado, ou até mesmo contaminar outros setores da exploração ⁸⁰. Além disso, foi relatado recentemente que as espécies de *C. jejuni*, tolerantes a diversos fatores de stresse, em leite cru podem sobreviver a processos de pasteurização UHT. Assim, compreender a prevalência de *C. jejuni* em rebanhos leiteiros é essencial para o controle e prevenção desta patologia ⁸¹.

A via de transmissão ao homem pode ser por meio da alimentação, do consumo de carne mal cozinhada, leite cru ou vegetais contaminados com fezes ou efluentes de animais ⁸². A transmissão também pode ocorrer através do contato direto com animais ou contato com água contaminada ⁸³. Trabalhadores que contactem diretamente com animais representam um dos principais grupos de risco com alta probabilidade de contrair campilobacteriose, principalmente devido às más práticas de higiene e maus hábitos de segurança alimentar ^{63 ; 84 ; 85}. Depois de um género alimentício ser contaminado por *Campylobacter*, é levado para a cozinha do consumidor, onde pode contaminar os utensílios de cozinha e infetar os consumidores dos referidos géneros alimentícios ^{86 ; 87}

A pesquisa de casos e surtos de campilobacteriose, envolve a recolha de evidências epidemiológicas e microbiológicas para rastrear e verificar a origem da infeção. A melhor estratégia para prevenir esta patologia é entender as vias de transmissão da bactéria na fonte primária, isto é, o reservatório animal ⁸⁸.

2.2.4.1 *Campylobacter* em amostras de leite de vaca cru

O leite é um produto rico em nutrientes que contém proteínas de alta qualidade e quantidade e grande parte das vitaminas e minerais necessários para uma dieta completa ⁸⁹. No entanto, o leite é um alimento complexo que pode conter uma grande variedade de microrganismos, alguns potenciais agentes patogénicos ⁹⁰.

Os agentes patogénicos podem contaminar o leite, vindos diretamente do úbere de animais infetados ou indiretamente do ambiente da exploração leiteira durante e após a ordenha. Devido à proximidade do pH neutro, alta atividade de água e alta composição de nutrientes, os patogénicos multiplicam-se facilmente no leite armazenado ^{83 ; 84}. Muitos têm sido os estudos realizados sobre a ocorrência destes agentes em leite não pasteurizado, onde *Campylobacter* spp. é comumente relatado ^{85 ; 86}.

O consumo de leite de vaca cru tem se popularizado nos últimos anos, principalmente entre os consumidores urbanos, forçando uma flexibilização da legislação que restringe a comercialização de leite cru. O lançamento das vendas de leite cru desafia a gestão da segurança alimentar na cadeia de produção do leite, que depende da pasteurização para eliminar bactérias patogénicas ⁹⁵.

Em vários países, o leite não pasteurizado e produtos derivados podem ser vendidos em certas quintas ou mercados de produtores. Como *Campylobacter* spp. é comumente encontrado no intestino de bovinos saudáveis, pode facilmente contaminar o úbere e o leite, sendo este último, um veículo bem conhecido para vários agentes patogénicos ⁹⁶.

Entre os artigos analisados (Tabela 4) não foram encontrados dados relativos à incidência desta bactéria na amostra referida nas explorações leiteiras de Portugal. Os dados que foram analisados não estão atualizados ou em número suficiente para obtermos uma visão geral da ocorrência e disseminação atual deste agente na UE.

Tabela 4 Estudos analisados sobre a ocorrência de *Campylobacter* em amostras de leite cru retiradas de tanques de explorações leiteiras de países da EU

País	Data	% de <i>Campylobacter</i> encontrado em amostras de leite cru	Fonte
Alemanha	N.R	0,5	97
França	1996	1,4	98
Finlândia	2015	0	95
Irlanda	2002	1,6	99
Itália	2012	12	80
Polónia	N.R	4,6	100

N.R- Não reportado

2.2.4.2 *Campylobacter* em amostras de água

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os bovinos podem ser infectados pelo consumo de água contaminada com fezes e outras excreções bovinas ⁸⁰. A água contaminada resultante do escoamento agrícola é responsável por vários surtos por todo o mundo. Por exemplo, o primeiro surto relatado de campilobacteriose associado a amostras de água afetou 3.000 pessoas em Vermont, EUA, devido à distribuição de água contaminada por toda a cidade ¹⁰¹. Já na Nova Zelândia, o consumo de água não tratada foi o terceiro fator de risco mais relatado associado à campilobacteriose em 2015 ¹⁰². A importância do escoamento agrícola para as águas subterrâneas é cada vez mais reconhecida como fator desencadeante de surtos associados ao abastecimento de águas subterrâneas ⁷⁸.

Campylobacter pode sobreviver na água por vários meses, dependendo das condições ambientais e da espécie em questão. Uma importante estratégia de sobrevivência desta bactéria é formar ou integrar em biofilmes, o que permite que o microrganismo sobreviva em ambientes onde normalmente pereceria ¹⁰³.

Como referido anteriormente, nos artigos analisados (Tabela 5) não foram encontrados dados relativos à incidência desta bactéria na amostra referida nas explorações leiteiras de Portugal. Os dados que foram analisados não estão atualizados ou em número suficiente para obtermos uma visão geral da ocorrência e disseminação atual deste agente na EU.

Tabela 5 Estudos analisados sobre a ocorrência de *Campylobacter* em amostras de água retiradas de tanques de explorações leiteiras de países da EU

País	Data	% de <i>Campylobacter</i> encontrado em amostras de água	Fonte
Finlândia	2015	0.5	95
Holanda	N.R	25	104

N.R- Não reportado

2.2.4.3 *Campylobacter* em amostras de alimentação de bovino

As silagens estão entre os ingredientes dietéticos mais comumente empregues nas modernas operações lácteas e de carne bovina ^{105; 106}. Contudo, a qualidade da silagem é frequentemente avaliada sem a apreciação da presença de microrganismos patogénicos e toxinas ¹⁰⁷. Não obstante, as silagens mal feitas ou contaminadas podem conter agentes patogénicos que reduzem o desempenho animal, como por exemplo, a produção de leite,

podem causar doenças ao gado e podem assim constituir uma ameaça para a saúde humana

108 ; 109 ; 110

2.3 Isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. em géneros alimentícios

A indústria alimentar é uma indústria complexa, de tal forma que a contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção, desde a exploração até ao consumo final. Esta complexidade torna o controlo de agentes patogénicos alimentares, uma tarefa difícil mesmo com programas de segurança rigorosos. Desta forma, a chave para a prevenção de doenças alimentares parece ser a rápida identificação dos alimentos contaminados de forma a evitar que cheguem ao consumidor final ¹¹¹. Ao longo das últimas décadas, as verificações a que os alimentos estão sujeitos, sofreram uma grande mudança, sendo agora completamente dependentes de protocolos microbiológicos para a integração de métodos moleculares avançados. Embora esta transição tenha tido um enorme impacto na indústria alimentar, aperfeiçoando drasticamente a segurança alimentar, os surtos alimentares continuam a ser comuns em muitos países ¹¹².

Tradicionalmente, a análise microbiológica dos alimentos é baseada no isolamento dos microrganismos por métodos de cultura e na confirmação por meios visuais, bioquímicos, molecular, imunológicos ou genéticos, antes ou após o enriquecimento. Atualmente, existe uma variedade de métodos para a deteção de agentes patogénicos alimentares que podem ser distinguidos em várias categorias, entre eles os métodos de cultura tradicional e métodos baseados na amplificação dos ácidos nucleicos ¹¹³.

2.3.1 Método de referência ISO

A *International Organization for Standardization* (ISO) é uma organização internacional não governamental independente que reúne especialistas para partilhar conhecimento e desenvolver Normas Internacionais. O objetivo destas normas é auxiliar na criação de produtos e serviços seguros, fiáveis e de boa qualidade ¹¹⁴. Tipicamente, diferentes métodos são usados por diferentes grupos de investigação para o isolamento e identificação de agentes patogénicos alimentares, no entanto, os métodos padronizados, como por exemplo os métodos ISO, são geralmente considerados os métodos de referência analíticos para controlos oficiais ¹¹⁵.

Atualmente, o método padrão para a deteção e enumeração de *Campylobacter* spp. em alimentos é ISO 10272:2017. O método descrito compreende duas partes: parte I:

Método de deteção e parte 2: técnica de contagem de colónias. Este documento especifica um método horizontal para a deteção por enriquecimento ou isolamento direto de *Campylobacter* spp. É aplicável a produtos destinados ao consumo humano, produtos destinados à alimentação animal, amostras ambientais na área de produção, manuseamento e amostras da fase de produção primária ¹¹⁶.

Para iniciar, é importante que o laboratório receba uma amostra representativa que não tenha sido danificada ou alterada durante o transporte e/ou armazenamento. Para o enriquecimento de amostras de géneros alimentícios, as mesmas devem ser colocadas num meio de enriquecimento líquido, homogeneizadas e microaerobicamente incubadas a 37 °C durante 4 a 6 h e, consecutivamente, a 41,5 °C durante 44 h ± 4 h. O volume do meio de enriquecimento deve ser nove vezes superior à quantia das amostras do ensaio (massa ou volume) com o objetivo de obter uma relação média de ensaio/enriquecimento de 1:10 (massa/volume ou volume/ volume). Por exemplo, uma amostra de 25 g é homogeneizada em 225 mL de meio de enriquecimento. Relativamente ao meio de enriquecimento, o método ISO recomenda a aplicação de caldo Bolton quando as amostras contêm baixo número de *Campylobacter* e baixo nível de microflora de fundo e/ou com *Campylobacter* que tenha estado sob condições de stresse, e a utilização de caldo Preston para a deteção em alimentos com um elevado nível de microflora de fundo. Em seguida, o isolamento e seleção para confirmação de *Campylobacter* das culturas obtidas no enriquecimento são realizados por inoculação em dois meios sólidos seletivos: mCCDA (*Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar*) e qualquer outro meio sólido seletivo de *Campylobacter* que use princípios seletivos diferentes dos presentes no mCCDA. As placas devem ser incubadas a 41,5 °C numa atmosfera microaeróbia e visualizados após 44 h ± 4 h para detetar a presença de colónias presuntivas baseadas nas características de crescimento de *Campylobacter* no respetivo meio sólido seletivo. Entre os meios de agar seletivos, o mCCDA é o meio de isolamento mais comumente utilizado para *Campylobacter*, pois é uma das alternativas mais económicas e as colónias de *Campylobacter* adquirem características únicas (Figura 7), permitindo uma fácil identificação por pessoal treinado ¹¹⁷.



Figura 7 Colônias características de *Campylobacter* spp. em mCCDA

A- Fotografia de colônias de *C. jejuni* em mCCDA; **B-** Fotografia de colônias de *C. coli* em mCCDA; **C-** Fotografia de colônias de *C. coli* em mCCDA; **D-** Fotografia de colônias de *C. lari* em mCCDA

Normalmente, as espécies de *C. jejuni* (A) produzem colônias achatadas e húmidas, cinzentas, enquanto as espécies de *C. coli* (B e C) tendem a ser de cor cinza-cremosa, húmidas, ligeiramente salientes e frequentemente produzem colônias discretas. Algumas espécies podem apresentar tonalidade esverdeada (D) ou aspeto seco, com brilho metálico (B) ¹¹⁸. Finalmente, para confirmação, as colônias presumidas como *Campylobacter* devem ser inoculadas em *Columbia blood agar agar* (CBA) (Figura 8) e incubadas numa atmosfera microaeróbia a 41,5 °C durante 48 horas.



Figura 8 Fotografia de colônias presumidas como *Campylobacter* inoculadas em CBA

As colônias isoladas devem ser submetidas a um exame microscópico (Figura 9), a testes bioquímicos e de crescimento adequados, que avaliem a morfologia, a mobilidade, o crescimento aeróbico a 25 °C e a presença de oxidase. O teste de oxidase (Figura 10) é um procedimento qualitativo para determinar a presença ou ausência de atividade de oxidase no citocromo C nas bactérias. Os organismos que contêm o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória são positivos para a oxidase e tornam o teste púrpura. Os organismos que não contêm o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória não oxidam o reagente, deixando-o incolor dentro dos limites de tempo do teste e, por isso, são negativos para a oxidase. O estudo do crescimento aeróbico a 25 °C é realizado em placas de CBA, incubadas a 25 °C numa atmosfera aeróbia durante 44 h ± 4 h.

No final, *Campylobacter* está presente se pelo menos uma colônia apresentar pequena morfologia curva, mobilidade, ausência de crescimento a 25 °C em atmosfera aeróbia e resultado positivo no teste oxidase. Globalmente, o método de detecção recomendado pelo método ISO requer 6 a 7 dias para obter resultados definitivos da presença ou ausência de *Campylobacter*.

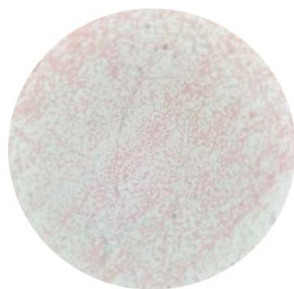


Figura 9 Coloração de Gram da amostra de leite E042



Figura 10 Teste de oxidase

2.3.3 Métodos baseados na amplificação de ADN

As técnicas de amplificação e detecção de ADN estão entre as ferramentas mais valiosas na pesquisa biológica da atualidade. Cientistas de todas as áreas das ciências da vida aplicam estes métodos numa vasta gama de ensaios e os mesmos têm vindo a ser aplicados desde o início de 1990. Para algumas aplicações, a detecção qualitativa de ADN é suficiente. Para outras, no entanto, é exigido uma análise quantitativa. O método PCR em tempo real pode ser utilizado na realização de análises qualitativas e quantitativas, escolher o melhor método para sua aplicação requer um amplo conhecimento dessa tecnologia ¹¹⁹.

Cada ciclo do método PCR em tempo real (Figura 11), também denominado de *quantitative* PCR (qPCR), é constituído por 3 etapas. A primeira etapa corresponde à desnaturação, este passo é o primeiro evento regular dos ciclos e consiste num aumento de temperatura que resulta na quebra das ligações de hidrogénio entre bases complementares do modelo de ADN de cadeia dupla, produzindo duas sequências de ADN de cadeia simples. De seguida ocorre a fase de annealing onde a temperatura de reação é reduzida, permitindo a ligação dos *primers* a cada cadeia simples de ADN. Dois primers diferentes são incluídos na mistura da reação: um para cada sequência de ADN de cadeia simples que contém a região alvo (*primer forward* e *primer reverse*). Os primers são pequenas sequências de ADN de cadeia simples, que complementam apenas sequências muito pequenas na extremidade 3' de cada cadeia da região alvo. Finalmente, na fase de extensão, a temperatura depende da ADN polimerase utilizada. Neste passo, a ADN polimerase sintetiza uma nova cadeia de ADN

complementar à cadeia de matriz por adição de dNTPs livres que são complementares ao modelo na direção 5' a 3'. O tempo preciso necessário para a extensão depende tanto da ADN polimerase utilizada, quanto do comprimento da região alvo de ADN que queremos amplificar. Em condições ideais, isto é, se não houver limitações devido a substratos ou reagentes limitantes, em cada etapa de extensão, o número de sequências alvo de ADN é duplicado. Com o término de cada ciclo, as cadeias originais do modelo mais todas as novas cadeias formadas tornam-se novos modelos para a próxima fase de extensão do ciclo seguinte, levando a amplificação exponencial da região específica do alvo de ADN.

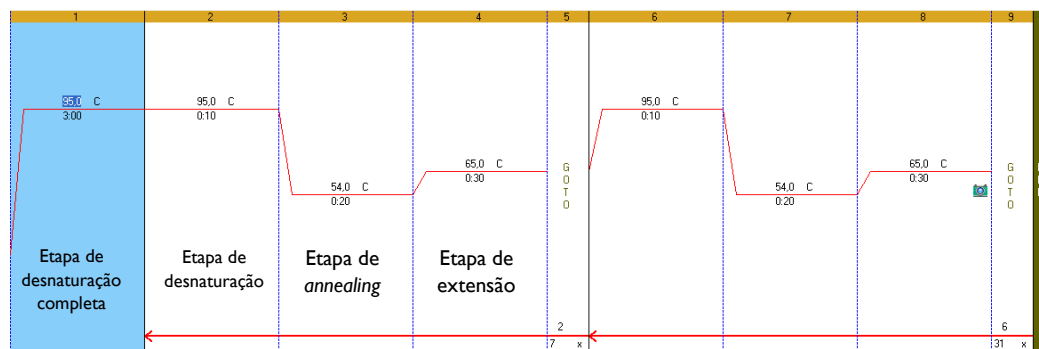


Figura 11 Perfil térmico utilizado no método PCR para pesquisa e identificação de *Campylobacter spp*

O método de sonda *TaqMan* utiliza uma sonda marcada com fluorescência que hibridiza com uma região conservada adicional que se encontra dentro da sequência alvo. A sonda *TaqMan* é marcada com fluorescência na extremidade 5' e contém uma molécula supressora na extremidade 3'. A proximidade da sonda da molécula supressora ao fluoróforo impede que haja emissão de fluorescência¹²⁰. Durante a etapa de *annealing* de cada ciclo do PCR, os *primers* e a sonda intacta ligam-se às sequências alvo. Durante a extensão da região alvo, a atividade da enzima *Taq* polimerase cliva o fluoróforo da sonda *TaqMan* e a emissão de fluorescência é detetada quando o fluoróforo e o inibidor (*quencher*) são separados. A amplificação da região alvo é assim medida pela libertação e acumulação do fluoróforo durante a fase de extensão de cada ciclo do PCR. A especificidade adicional proporcionada pela presença da sonda *TaqMan* garante que o sinal fluorescente gerado durante o processo seja derivado apenas da amplificação da sequência alvo. Múltiplas sondas *TaqMan* e conjuntos de *primers* podem ser usados em diferentes ensaios de PCR em tempo real para diferenciar entre sequências intimamente relacionadas ou podem ainda ser marcadas com diferentes fluoróforos, facilitando o desenvolvimento de protocolos qPCR multiplex em que diferentes alvos podem ser amplificados e quantificados dentro de uma única reação^{119; 121}.

O gráfico de amplificação do método qPCR é composto por duas fases, uma fase exponencial seguida por uma fase não exponencial. Durante a fase exponencial, a quantidade de produto de PCR aproximadamente dobra em cada ciclo. À medida que a reação prossegue, no entanto, os componentes da reação são consumidos e, finalmente, um ou mais dos componentes tornam-se limitantes. Neste ponto, a reação desacelera e entra na fase não exponencial. Inicialmente, a fluorescência permanece nos níveis de fundo e os aumentos na fluorescência não são detetáveis (ciclos 1–11, Figura 12). Quando o produto amplificado é suficiente para começar a produzir um sinal de fluorescência detetável chegamos ao ciclo de quantificação (Cq), ou seja, número de ciclos em que a curva de amplificação tem um valor de fluorescência superior à *threshold baseline*. Como o valor Cq é medido na fase exponencial quando os reagentes não são limitados, o PCR em tempo real pode ser usado para calcular de forma confiável e precisa a quantidade inicial de modelo presente na reação com base na função exponencial conhecida que descreve o progresso da reação. O Cq de uma reação é determinado principalmente pela quantidade de molde presente no início da reação de amplificação. Se uma grande quantidade de molde estiver presente no início da reação, relativamente poucos ciclos de amplificação serão necessários para acumular produto suficiente para dar um sinal de fluorescência superior à *threshold baseline*. Assim, a reação terá um Cq baixo ou precoce. Em contraste, se uma pequena quantidade de molde estiver presente no início da reação, mais ciclos de amplificação serão necessários para que o sinal de fluorescência suba acima da *threshold baseline*. Assim, a reação terá um Cq alto ou tardio. Essa relação forma a base para o aspecto quantitativo do PCR em tempo real ^{122; 123}.

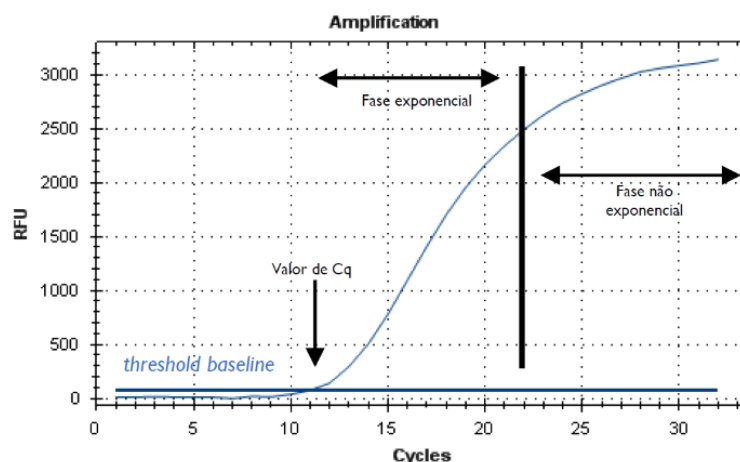


Figura 12 Representação de uma curva de amplificação de PCR

O valor de C_q , é demonstrado graficamente pelo valor de ciclos em que a curva de amplificação da amostra ultrapassa a *threshold baseline*. Para garantir que não houve inibições ou erros associados à elaboração do método PCR, normalmente é adicionado um controlo interno e consoante o valor de C_q da amostra e do controlo interno (Tabela 6) (Figura 13) é possível obter várias informações. Quando há valores de C_q para a amostra e para o controlo interno, concluímos que o resultado é positivo. Quando há valores de C_q para a amostra, mas não há valor de C_q para o controlo interno, concluímos que o resultado é positivo e não houve amplificação do controlo interno pois os reagentes foram todos consumidos na amplificação da amostra. Quando não há valor de C_q para a amplificação da amostra, mas há valor de C_q para a amplificação do controlo interno, concluímos que o resultado é negativo. Se não houve valores de amplificação da amostra nem do controlo interno estamos perante um resultado inibido e é necessário repetir a corrida.

Tabela 6 Interpretação dos alores de C_q do método PCR

Alvo	Controlo interno	Interpretação
$C_q \geq 5$		Positivo
$C_q \geq 5$	$C_q = \text{N/A}$	Positivo
$C_q = \text{N/A}$	$C_q \geq 10$	Negativo
$C_q = \text{N/A}$	$C_q = \text{N/A}$	Inibição

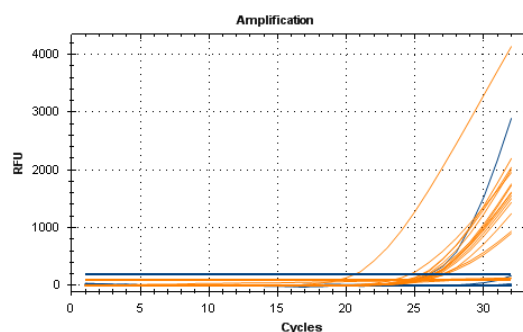


Figura 13 Representação gráfica do método de PCR com representação da curva de amplificação do controlo positivo e amplificação dos controlos internos

Também se recorre à utilização de controlos positivos e negativos para a validação das corridas de PCR. Se houve amplificação do controlo positivo (Figura 14) e não do controlo negativo a corrida é considerada válida. Se, porventura, nenhum dos controlos amplificar (Figura 15), a corrida de PCR não é válida e tem de se proceder a uma repetição.

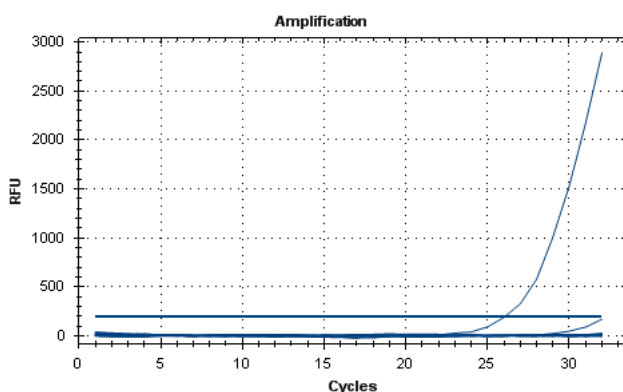


Figura 14 Representação gráfica do método de PCR com representação da curva de amplificação do controlo positivo

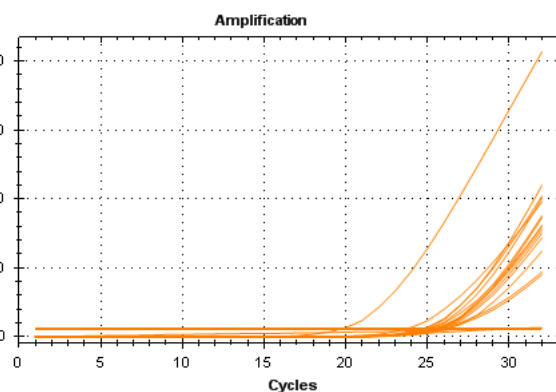


Figura 15 Representação gráfica do método de PCR com representação da curva de amplificação dos controlos internos

CAPÍTULO III
COMPONENTE EXPERIMENTAL

3.1 Desenho do estudo

Os estudos sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em ambientes de explorações leiteiras foram efetuados na região norte de Portugal. Nesta região “Entre-Douro e Minho” é geralmente, conhecida como Bacia Leiteira, uma vez que possui um elevado número de explorações leiteiras.

3.1.1 Determinação da ocorrência de *Campylobacter* spp em amostras de leite cru

Para o estudo da ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru, 100 amostras de leite foram colhidas de 100 explorações leiteiras diferentes entre novembro de 2020 e agosto de 2021 pertencentes aos concelhos de Barcelos, Famalicão, Trofa e Vila do Conde (Figura 16). As explorações tinham o número de vacas em período de lactação entre 12 e 266.

3.1.2 Ocorrência de *Campylobacter* spp em explorações leiteiras

Para o estudo da ocorrência de *Campylobacter* spp. em explorações leiteiras, foram visitadas oito explorações em três diferentes alturas do ano (inverno, primavera e verão), entre novembro de 2020 e setembro de 2021 nos concelhos de Famalicão e Vila do Conde (Figura 16). O número de vacas em período de lactação variou de 40 a 120.

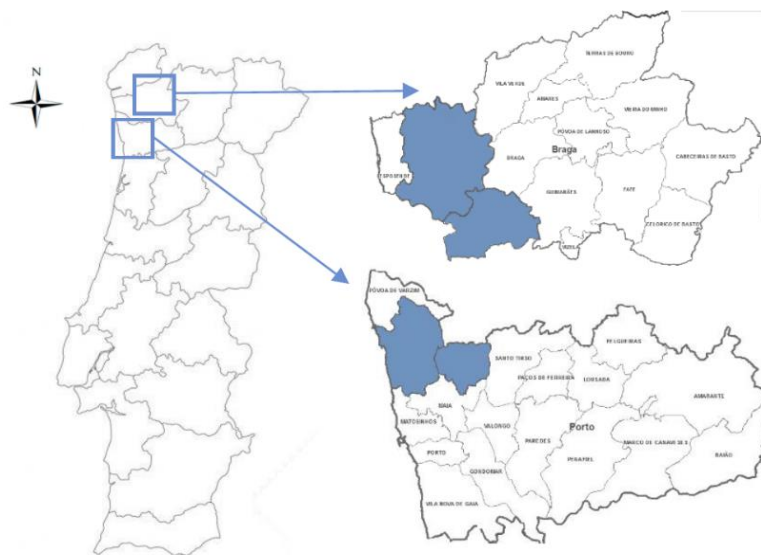


Figura 16 Localização dos concelhos em estudo.

Na primeira ronda de colheita de amostras (Tabela 7), foram colhidas amostras de água da torneira dada de beber às vacas lactantes, amostras de leite cru (correspondem às primeiras amostras de leite cru do estudo da ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru), amostras de fecais retiradas do curral que correspondem apenas às fezes das vacas lactantes na altura da colheita e esfregaços às tetinas realizadas com zaragatoas após a ordenha. Relativamente às amostras de alimentação dos bovinos, foram recolhidas amostras de alimentação da manjedoura, que corresponde à mistura de ração com as silagens produzidas pela própria exploração e disponível na altura da colheita. Também foram recolhidas amostras de silagem em separado da ração, o que correspondeu a amostras de silagem de erva, amostras de silagem de milho e amostra de pastone, milho colhido, triturado e armazenado em silo. Na segunda ronda de colheita de amostras (Tabela 7), foram colhidas amostras de água dada de beber às vacas lactantes, amostras de leite cru, amostras fecais e esfregaços às tetinas realizadas com zaragatoas após a ordenha. Relativamente às amostras de alimentação dos bovinos, foram recolhidas amostras de alimentação da manjedoura, amostras de erva silada, amostras de milho silado, amostra de Pastone e amostra de luzerna. Finalmente, na terceira ronda de colheita de amostras (Tabela 7), foram colhidas amostras de água dada de beber às vacas lactantes, amostras de leite cru, amostras fecais e esfregaços às tetinas realizadas com zaragatoas após a ordenha, amostras de alimentação da manjedoura, amostras de erva silada e amostras de milho silado.

As amostras foram recolhidas como amostras combinadas e disponibilizadas pelos produtores exclusivamente para efeitos deste estudo. As amostras foram transportadas para o laboratório e imediatamente processadas para cultura de *Campylobacter* spp..

Tabela 7 Número de cada amostra recolhida nas diferentes rondas

	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
Amostra água	8	8	8
Amostra de leite	8	8	8
Amostra fecal	8	8	8
Esfregaço às tetinas	7	7	5
Amostra de alimentação	8	8	8
Amostra da silagem de erva	5	4	7
Amostra da silagem de milho	8	8	7
Amostra de pastone	1	1	N.R
Amostra de luzerna	N.R	1	N.R
Total de amostras recolhidas para o estudo		157 amostras	

N.R- Não recolhido

3.2 Recolha das amostras

Foram colhidos 1 litro de cada amostra líquida (água e leite) (Figura 17 - D) para frascos estéreis e as amostras sólidas foram colhidas para sacos (Figura 17 - A e C). As amostras foram enviadas para o laboratório no dia da colheita e foram analisadas em 24 horas.



Figura 17 *Imagens das explorações leiteiras*

A- Vacaria da E002; B- Vaca da E002; C- Recolha de amostra do silo de milho E002; D- Recolha de amostra de leite E002

3.3 Material e equipamentos utilizados

Na Tabela 8 estão indicados os equipamentos utilizados na componente laboratorial e as respetivas finalidades e na Tabela 9 os materiais e reagentes utilizados na componente laboratorial e as respetivas finalidades utilizados durante o trabalho experimental.

Tabela 8 *Equipamentos utilizados na componente laboratorial e as respetivas finalidades*

Equipamento	Marca e referência	Finalidade de utilização
Autoclave	Trade RAYPA	Esterilizar os meios de cultura
Balança	Mettler toledo, Ref: PG3001-S	Balança onde foram realizadas as pesagens para a realização dos meios
Balança	Startorius, Ref: BL600	Balança onde foram realizadas as pesagens das amostras
Centrifuga	BIO RAD: Model I6 Microcentrifuge	Realização da extração de ADN
Microscópio	LEICA Ref: DM LB2	Visualização da morfologia e mobilidade da bactéria
Rampa de filtração	NEUBERGER, Ref: D-79112	Equipamento utilizado para filtrar as amostras de água
Sistema de <i>real time</i>	BIO-RAD, Ref: CFX96	Realização da leitura das curvas de amplificação em tempo real
Termobloco	VWR: Digital Healtblock	Realização da extração de ADN
Termociclador	BIO-RAD, Ref: C1000	Termociclador onde foram realizados os PCR

Tabela 9 Materiais e reagentes utilizados na componente laboratorial e as respectivas finalidades

Material	Marca e referência	Finalidade de utilização
Anças de 1 µl estéreis	SARSTEDT Ref: 86.1567.010	Realizar inoculações a partir de meio sólido
Anças de 10 µl estéreis	Deltalab Ref: 302754	Realizar inoculações a partir de meio líquido
Eppendorf estéreis	Vitor M. F. Norte, Ref: CL724/S	Realização da extração de ADN e Mix
GENbag microaer estéril	BIOMÉRIEUX, Ref: 96125	Gerador de atmosfera microaerofílica para sacos
GENbox microaer estéril	BIOMÉRIEUX, Ref: 45532	Gerador de atmosfera microaerofílica para jarras
Meio Bolton	OXOID, Ref: CM0983	Meio de enriquecimento seletivo para <i>Campylobacter</i>
Meio Columbia 5% s. cavalo estéril	Biogerm, Ref: MP020.1027	Meio não seletivo nutritivo para o crescimento e isolamento bacteriano
Meio mCCDA estéril	Biogerm, Ref: MP020.1014	Meio de cultura seletivo para o crescimento e isolamento de <i>Campylobacter</i>
Membranas MCE de Ø47mm c/ grelha estéreis	Frilabo, Ref: A045H047A	Filtros utilizados durante a filtração
Sacos de homogeneização estéreis	VWR, Ref: 129-0733	Armazenamento das amostras durante o enriquecimento
Sangue de cavalo estéril	ThermoFischer, Ref: SR0048C	Meio de cultura o crescimento e isolamento bacteriano
Suplemento seletivo para o caldo de Bolton estéril	OXOID, Ref: SR0183E	Inibição da microflora
SsoAdvanced Universal Probes Supermix estéril	BIO-RAD, Ref: 1725281	Reagente necessários à realização do PCR
Tampão de lise de células bacterianas NZY estéril	Nzytech, Ref: MB178	Reagente utilizado na rutura da parede celular de bactérias
Tubos crioviais	Laboratórios Microkit, 1807/3213 6	Armazenar os isolados a -80 °C

Todos os meios não estéreis foram autoclavados com a finalidade de esterilizar os meios de cultura a 121 °C durante 15 min.

3.3.1 Preparação das amostras

Atendendo ao tipo de amostras testadas e ao objetivo do ensaio, o procedimento de deteção utilizado foi o procedimento de deteção A: Deteção de *Campylobacter* por enriquecimento, em amostras com um baixo número de *Campylobacter* e/ou com *Campylobacter* que tenham sido expostas a algum tipo de stresse, seguindo a ISO 10272-1:2017(E)

Para todas as amostras sólidas e para as amostras de leite, pesaram-se assepticamente 25 g de produto a analisar para sacos de homogeneização esterilizados. Para as amostras de água, a totalidade da amostra foi filtrada numa rampa de filtração utilizando filtros 0,45 µm. Os filtros foram removidos assepticamente usando pinças para sacos de homogeneização esterilizados e adicionaram-se 225 ml de caldo Bolton 5% v/v de sangue de cavalo lisado. Os sacos foram homogeneizados manualmente durante 1 minuto e de seguida foram incubados a 41,5 °C numa atmosfera microaerófila durante 44 h ± 4 h.

3.3.2 Deteção de *Campylobacter* spp.

A deteção de *Campylobacter* spp foi realizada após a incubação do caldo de Bolton utilizando métodos de PCR simplex desenhados e validados pelo INIAV.

3.3.2.1 Extração de ADN

A extração de ADN (Figura 18) foi realizada a partir do caldo Bolton. Após o período de incubação retirou-se 1,5 ml dos sacos de homogeneização para um *eppendorf* (A) e centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 min (B). Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 250 µl de reagente lise e colocou-se a 98 °C durante 15 min (C), de seguida elaborou-se uma nova centrifugação (D).

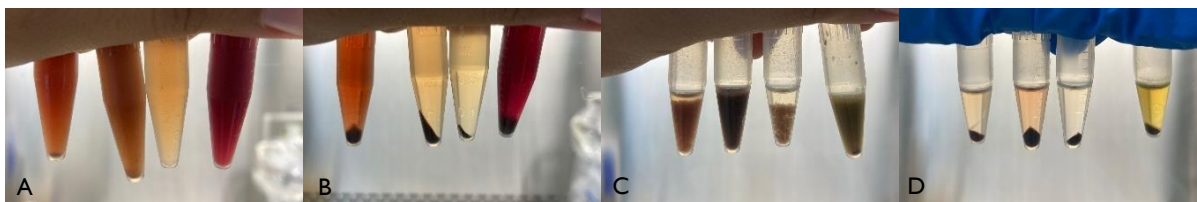


Figura 18 Amostras durante o processo de extração de ADN

3.3.2.2 Condições do PCR

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado num volume de 50 µl e continha reagente iQ Supermix (1x); *primers* (400 nM), sondas (200 nM), *pucI9* (100 cópias), 5 µl de ADN da amostra e água ultrapura para prefazer o volume.

Tabela 10 Lista de *primers* e sondas utilizados no método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter spp.*

Gene	Primer/sonda	Sequência (5'→3')	Referência
16S rRNA	<i>Campy spp. sonda</i>	FAM - CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG – BHQ1	124
	<i>Campy spp. FWD</i>	TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA	
	<i>Campy spp. RVE</i>	TGT CAT CCT CCA CGC GGC CT	
IAC	<i>pucI9 sonda</i>	ROX - AGA GCG AGG TAT GTA GGC GG – BHQ2	125
	<i>pucI9 FWD</i>	GCA GCC ACT GGT AAC AGG AT	
	<i>pucI9 REV</i>	GCA GAG CGC AGA TAC CAA AT	

O perfil térmico inicia-se com um ciclo de 95 °C durante 3 min para a desnaturação completa das cadeias de ADN. Em seguida, realizam-se seis ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 54 °C durante 20 seg e 65 °C durante 30 seg. Finalmente realizam-se 30 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 54 °C durante 20 seg e 65 °C durante 30 segundos.

3.3.2.3 Confirmação das amostras positivas

No caso de um resultado positivo no PCR procede-se ao isolamento retirando uma ança de 10 µl do enriquecimento e inoculando numa placa de *mCCDA* e incuba-se em microaerofilia a 41,5 °C por 44 h ± 4 h. Passado o período de incubação, selecionam-se colónias isoladas e características de *Campylobacter spp.* e repicam-se por isolamento para *CBA* e incubam-se durante 44 h ± 4 h a 41,5 °C numa atmosfera microaerofílica. Finalmente, as colónias isoladas em *CBA* são submetidas a testes bioquímicos para a confirmação de *Campylobacter spp.* As colónias que apresentam resultados positivos para o teste de oxidase, forma de bacilos Gram negativos, mobilidade e ausência de crescimento a 25 °C numa atmosfera aeróbia, são confirmadas como colónias de *Campylobacter spp.*

3.3.2.4 Identificação da espécie de *Campylobacter* detetada

Para a identificação das espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* utilizou-se o método PCR multiplex.

A extração de ADN foi realizada a partir das colónias isoladas do CBA. Retirou-se, com uma ança de 1 µl, uma colónia isolada em 250 µl de reagente lise num *eppendorf* e colocou-se a 98 °C durante 15 minutos. De seguida, centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi utilizado para a realização do PCR multiplex, onde se utilizou 5 µl de sobrenadante e 25 µl de *mix* preparada no momento da realização do método PCR multiplex e a identificação da espécie de *Campylobacter* foi realizada.

Tabela II Lista de primers e sondas utilizados no método de PCR para a identificação das espécies de *Campylobacter* spp.

Gene	Primer/ sonda	Concentração (nM)	Sequência (5'→3')	Ref
hipO	<i>C. jejuni</i> Probe	200	FAM- TTG CAA CCT CAC TAG CAA AAT CCA CAG CT-BHQ1	
	<i>C. jejuni</i> FWD	400	TGC ACC AGT GAC TAT GAA TAA CGA	
	<i>C. jejuni</i> REV	400	TCC AAA ATC CTC ACT TGC CAT T	
glyA	<i>C. coli</i> Probe	200	HEX- TAA GCT CCA ACT TCA TCC GCA ATC TCT CTA AAT TT -BHQ2	
	<i>C. coli</i> FWD	400	CTA ATT GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG	126
	<i>C. coli</i> REV	400	AGT CCA GCA ATG TGT GCA ATG	
bipA	<i>C. lari</i> Probe	200	Cy5- ACC ACA CCA GTA AAA TCA TCA GGC ACA TCA -BHQ2	
	<i>C. lari</i> FWD	400	CAT TTC AGC TTT TCT TTT GCC TAG T	
	<i>C. lari</i> REV	400	AAA ACC GAA CCA TTT GAA CAC TTA G	
IAC	<i>pucI9</i> sonda	200	ROX- AGA GCG AGG TAT GTA GGC GG -BHQ2	
	<i>pucI9</i> FWD	400	GCA GCC ACT GGT AAC AGG AT	125
	<i>pucI9</i> REV	400	GCA GAG CGC AGA TAC CAA AT	

3.3.2.5 Condições do PCR

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado num volume de 30 µl e continha reagente iQ Supermix (1x); primers (400 nM), sondas (200 nM), *pucI9* (100 cópias), 5 µl de ADN da amostra e água ultrapura para prefazer o volume.

O perfil térmico do método de PCR para a identificação da espécie de *Campylobacter* é idêntico ao perfil térmico do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp.

3.3.3 Conservação de cultura em crioviais

Os isolados foram conservados por criopreservação. Para tal, utilizou-se um ança estéril para recolher uma grande parte da cultura e adicionou-se ao tubo. De seguida, homogeneizou-se bem o tubo com o microrganismo presente e retirou-se o líquido. Por último, colocaram-se todos os tubos para congelar a uma temperatura de -80 °C.

3.4 Ensaio interlaboratorial por PCR em tempo real para a deteção de *Campylobacter* spp.

Durante o período de realização desta dissertação, o INIAV participou num ensaio interlaboratorial realizado pelo EURL-*Campylobacter*, laboratório de referência Europeu de *Campylobacter*. O ensaio consistiu na realização de PCR em tempo real para a deteção e identificação da espécie de *Campylobacter*. O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito pelo EURL-*Campylobacter* CEN/TC 463/WG3 e pelo procedimento implementado e validado pelo INIAV e os resultados foram comparados.

3.4.1 Objetivo do ensaio

Dois sistemas de PCR em tempo real foram selecionados para serem incluídos na ISO 10272:2017 para confirmação e/ou identificação de *Campylobacter* spp termotolerante. Os sistemas de PCR foram avaliados por um estudo de comparação de método, onde os resultados de PCR foram comparados com o método de referência, conforme descrito na ISO 10272: 2017. Este estudo interlaboratorial (ILS) foi organizado pela EURL-*Campylobacter* e foi a última parte da validação de acordo com a ISO 16140-6.

O ensaio de PCR 1 é um método de PCR multiplex em tempo real baseado em sonda baseado na atividade de exonuclease 5' para a deteção de um fragmento do rRNA 16S de *Campylobacter* spp termotolerante. Este ensaio pode ser usado para confirmação de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. O ensaio de PCR 3 é um método de PCR multiplex em tempo real baseado em sonda baseado na atividade de exonuclease 5' para a deteção de genes específicos para três espécies diferentes de *Campylobacter* termotolerante; *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

3.4.2 Esboço do estudo

Para o ensaio de PCR 1, um total de 24 espécies foram analisadas. Para os ensaios PCR 2 e 3, foram analisadas as 50 espécies totais. Todas as espécies também foram

submetidas a análise pelo método de referência, conforme descrito nos pontos 9.5 e 9.6 da ISO 10272:2017.

3.4.3 Meios de cultura e reagentes

A composição e preparação dos meios de cultura e reagentes para a realização testes bioquímicos são descritos na ISO 10272: 2017.

3.4.3.1 Sequências e reagentes para o ensaio PCR I

Na Tabela 12 encontram os *primers* e sondas utilizados para a realização do ensaio PCR I segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter* e na Tabela 13 encontram-se os reagentes utilizados par a elaboração do mesmo.

Tabela 12 Lista de *primers* e sondas utilizados no ensaio PCR I

Gene	Primer/sonda	Sequência (5'→3')
16S rRNA	Jos-F1	CCT GCT TAA CAC AAG TTG AGT AGG
	Jos-F2	TTC CTT AGG TAC CGT CAG AAT TC
	Jos-P	FAM- TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC- NFQ
Internal Amplification Controlo (IAC)	IPC-ntb2-fw	ACC ACA ATG CCA GAG TGC CAA C
	IPC-ntb2-re	TAC CTG GTC TCC AGC TTT CAG TT
	IPC-ntb2-probe	ROX- CAG GCG CAT GTT AGG GGA CCA- NFQ

Tabela 13 Lista de reagentes utilizados no ensaio PCR I

Reagente	Concentração final	Volume por amostra (µl)
Template DNA (1:1 000 dilution)	Máximo 250 ng	2,5
PCR grade water	---	Como requerido
PCR-buffer	1x	Como requerido
MgCl ₂ solution	2,5 mM	Como requerido
dNTP solution	0,2 mM	Como requerido
PCR primers	500 nM de cada	Como requerido
PCR probes	100 nM de cada	Como requerido
IPC-ntb2- plasmid	25 cópias por reação	Como requerido
Hot strat Taq DNA Polymerase	1 U	Como requerido
Volume total	---	25

3.4.3.2 Condições do ensaio PCR I

O perfil térmico inicia-se com um ciclo de 95 °C durante 3 min para a desnaturação completa das cadeias de ADN. De seguida, realizam-se 44 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min e 72 °C durante 30 seg.

3.4.3.3 Sequências e reagentes para o ensaio PCR3

Na Tabela 14 encontram os *primers* e sondas utilizados para a realização do ensaio PCR I segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter* e na Tabela 15 encontram-se os reagentes utilizados par a elaboração do mesmo.

Tabela 14 Lista de *primers* e sondas utilizados no ensaio PCR3

Espécies (gene)	Primer/sonda	Sequência (5' →3')
<i>C. jejuni</i> (mapA)	Primer mapA-fw	CTG GTG GTT TTG AAG CAA AGA TT
	Primer mapA-re	CAA TAC CAG TGT CTA AAG TGC GTT TAT
	Probe mapA	FAM- TTG AAT TCC AAC ATC GCT AAT GTA TAA AAG CCC TTT – NFQ
<i>C. coli</i> (ceuE)	Primer ceuE-fw	AAG CTC TTA TTG TTC TAA CCA ATT CTA ACA
	Primer ceuE-re	TCA TCC ACA GCA TTG ATT CCT AA
	Probe ceuE	Cy5- TTG GAC CTC AAT CTC GCT TTG GAA TCA TT - NFQ
<i>C. lari</i> (gyrA)	Primer gyrA1-fw1	GAT AAA GAT ACG GTT GAT TTT GTA CC
	Primer gyrA1-fw2	GAT AAA GAT ACG GTT GAT TTT ATA CC
	Primer gyrA1-re1	CAG CTA TAC CAC TTG ATC CAT TAA G
	Primer gyrA1-re2	TGC AAT ACC ATC TGA ACC ATT A
	Probe gyrA1	ROX- TTA TGA TGA TTC TAT GAG TGA GCC TGA TG - NFQ
Internal Amplification Controlo (IAC)	IPC-ntb2-fw	ACC ACA ATG CCA GAG TGC CAA C
	IPC-ntb2-re	TAC CTG GTC TCC AGC TTT CAG TT
	IPC-ntb2-probe	ROX- CAG GCG CAT GTT AGG GGA CCA- NFQ

Tabela 15 Lista de reagentes utilizados no ensaio PCR3

Reagente	Concentração final	Volume por amostra (µl)
<i>Template DNA (1:1 000 dilution)</i>	Máximo 250 ng	2,5
<i>PCR grade water</i>	---	Como requerido
<i>PCR-buffer</i>	1x	Como requerido
<i>MgCl₂ solution</i>	2,5 mM	Como requerido
<i>dNTP solution</i>	0,2 mM	Como requerido
<i>PCR primers</i>	500 nM de cada	Como requerido
<i>PCR probes</i>	100 nM de cada	Como requerido
<i>IPC-ntb2- plasmid</i>	25 cópias por reação	Como requerido
<i>Hot strat Taq DNA Polymerase</i>	1 U	Como requerido
Volume total	---	25

3.4.3.4 Condições do ensaio PCR3

O perfil térmico inicia-se com um ciclo de 95 °C durante 3 min para a desnaturação completa das cadeias de ADN. De seguida, realizam-se 44 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 60 °C durante 45 seg e 72 °C durante 30 seg.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru

O consumo de leite em Portugal ronda os 72,7 Kg/ habitante/ ano. A venda de leite cru era proibida em Portugal para consumo público (Portaria 473/87). Hoje em dia, o Regulamento (UE) n° 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de dezembro de 2013, considera o leite cru como um leite de consumo que não tenha sido aquecido a mais de 40 °C, nem tenha sido submetido a qualquer tratamento com efeito equivalente. O consumo de leite cru é uma tendência atual. Os consumidores do leite sem processamento defendem que se trata de um produto mais saudável. Apesar de ser conhecido que o tratamento térmico do leite elimina patogénicos que podem causar doenças como *Brucella* spp., *Coxiella burnetti*, *Mycobacterium* sp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.¹²⁷.

Dos leites recolhidos nas 100 explorações leiteiras foi detetada a presença de *Campylobacter* spp em 4 amostras (Tabela 16 e Tabela 17).

Tabela 16 Resultados do estudo da ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru – Parte I

Exploração	Presença de <i>Campylobacter</i>	Exploração	Presença de <i>Campylobacter</i>
E001	Negativo	E026	Negativo
E002	Negativo	E027	Negativo
E003	Negativo	E028	Negativo
E004	Negativo	E029	Negativo
E005	Negativo	E030	Negativo
E006	Negativo	E031	Negativo
E007	Negativo	E032	Negativo
E008	Negativo	E033	Positivo
E009	Negativo	E034	Negativo
E010	Negativo	E035	Negativo
E011	Negativo	E036	Negativo
E013	Negativo	E037	Negativo
E013	Negativo	E038	Negativo
E014	Negativo	E039	Negativo
E015	Negativo	E040	Negativo
E016	Negativo	E041	Negativo
E017	Negativo	E042	Positivo
E018	Negativo	E043	Negativo
E019	Negativo	E044	Negativo
E020	Negativo	E045	Negativo
E021	Negativo	E046	Negativo
E022	Negativo	E047	Negativo
E023	Negativo	E048	Negativo
E024	Negativo	E049	Negativo
E025	Negativo	E050	Negativo

Tabela 17 Resultados do estudo da ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru – Parte II

Exploração	Presença de <i>Campylobacter</i>	Exploração	Presença de <i>Campylobacter</i>
E051	Negativo	E076	Negativo
E052	Negativo	E077	Negativo
E053	Negativo	E078	Negativo
E054	Negativo	E079	Negativo
E055	Negativo	E080	Negativo
E056	Negativo	E081	Negativo
E057	Negativo	E082	Negativo
E058	Negativo	E083	Negativo
E059	Negativo	E084	Negativo
E060	Negativo	E085	Negativo
E061	Negativo	E086	Negativo
E063	Negativo	E087	Negativo
E063	Negativo	E088	Negativo
E064	Negativo	E089	Negativo
E065	Negativo	E090	Negativo
E066	Negativo	E091	Negativo
E067	Positivo	E092	Negativo
E068	Positivo	E093	Negativo
E069	Negativo	E094	Negativo
E070	Negativo	E095	Negativo
E071	Negativo	E096	Negativo
E072	Negativo	E097	Negativo
E073	Negativo	E098	Negativo
E074	Negativo	E099	Negativo
E075	Negativo	E100	Negativo

Na Figura 19 são apresentadas as curvas obtidas no PCR em tempo real nas quais se observa duas amplificações da curva para as amostras leite E033 e leite E042. A Tabela 18 mostra os valores encontrados para quinze amostras de leite que inclui as amostras de leite E033 e E042 nas quais se obteve um resultado positivo com os valores de Cq de 23,63 e 20,71, respetivamente.

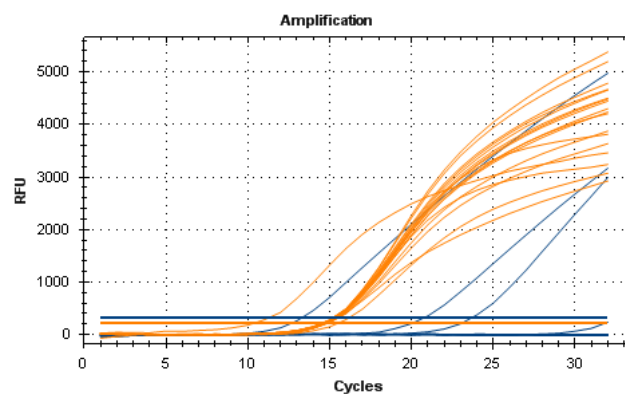


Figura 19 Representação gráfica do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E030 a E044

Tabela 18 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E030 a E044

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado	
A01	FAM	Campy sp	Leite 30	00,00	ROX	IAC	14,76	Negativo
A02	FAM	Campy sp	Leite 39	00,00	ROX	IAC	14,87	Negativo
A03	FAM	Campy sp	Controlo Negativo	00,00	ROX	IAC	14,71	Negativo
B01	FAM	Campy sp	Leite 31	00,00	ROX	IAC	14,98	Negativo
B02	FAM	Campy sp	Leite 40	00,00	ROX	IAC	14,66	Negativo
B03	FAM	Campy sp	Leite 37	00,00	ROX	IAC	14,90	Negativo
C01	FAM	Campy sp	Leite 32	00,00	ROX	IAC	14,72	Negativo
C02	FAM	Campy sp	Leite 41	00,00	ROX	IAC	14,98	Negativo
D01	FAM	Campy sp	Leite 33	23,63	ROX	IAC	14,66	Positivo
D02	FAM	Campy sp	Leite 42	20,71	ROX	IAC	14,92	Positivo
E01	FAM	Campy sp	Leite 34	00,00	ROX	IAC	14,80	Negativo
E02	FAM	Campy sp	Leite 43	00,00	ROX	IAC	14,60	Negativo
F01	FAM	Campy sp	Leite 35	00,00	ROX	IAC	14,63	Negativo
F02	FAM	Campy sp	Leite 44	00,00	ROX	IAC	14,82	Negativo
G01	FAM	Campy sp	Leite 36	00,00	ROX	IAC	14,69	Negativo
G02	FAM	Campy sp	Leite 38	00,00	ROX	IAC	14,68	Negativo
H02	FAM	Campy sp	Controlo Positivo	13,25	ROX	IAC	10,49	Positivo

A identificação da espécie, realizada a partir do isolado, das amostras de leite E033 e E042 correspondeu a *C. jejuni* tal com valores de Cq de 10,39 e 10,84 tal como pode ser visto na Figura 20 e Tabela 19.

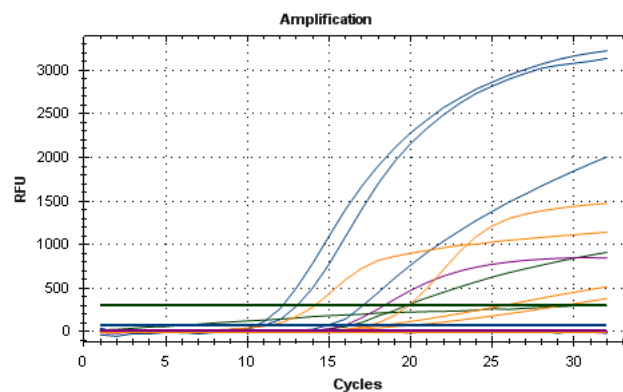


Figura 20 Representação gráfica do método de PCR para a identificação da espécie de *Campylobacter* das amostras de leite E033 e E042

Tabela 19 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E033 e E042

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
A01	FAM	<i>jejuni</i>	Leite 33	10,39	ROX	IAC	11,56
	HEX	<i>coli</i>		00,00			
	Cy5	<i>lari</i>		00,00			
B01	FAM	<i>jejuni</i>	Leite 42	10,84	ROX	IAC	7,03
	HEX	<i>coli</i>		00,00			
	Cy5	<i>lari</i>		00,00			
C01	FAM	<i>jejuni</i>	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	9,73
	HEX	<i>coli</i>		00,00			
	Cy5	<i>lari</i>		00,00			
D01	FAM	<i>jejuni</i>	Controlo positivo	14,71	ROX	IAC	00,00
	HEX	<i>coli</i>		19,84			
	Cy5	<i>lari</i>		14,33			

Na Figura 21 são apresentadas as curvas obtidas no PCR em tempo real nas quais se observa duas amplificações da curva para as amostras leite E067 e leite E068. A Tabela 20 mostra os valores encontrados para seis amostras de leite que inclui as amostras de leite E067 e E068 nas quais se obteve um resultado positivo com os valores de Cq de 25,93 e 17,13, respetivamente.

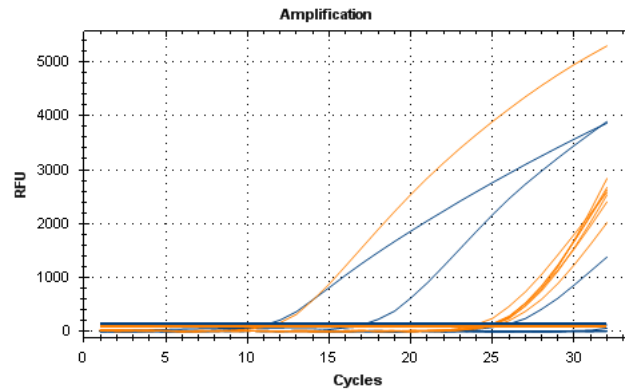


Figura 21 Representação gráfica do método PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E065 a E070

Tabela 20 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E065 a E070

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado	
A01	FAM	Campy sp	Leite 65	00,00	ROX	IAC	24,83	Negativo
B01	FAM	Campy sp	Leite 66	00,00	ROX	IAC	24,16	Negativo
C01	FAM	Campy sp	Leite 67	25,93	ROX	IAC	24,25	Positivo
D01	FAM	Campy sp	Leite 68	17,13	ROX	IAC	23,37	Positivo
E01	FAM	Campy sp	Leite 69	00,00	ROX	IAC	24,17	Negativo
F01	FAM	Campy sp	Leite 70	00,00	ROX	IAC	24,45	Negativo
G01	FAM	Campy sp	Controlo positivo	11,19	ROX	IAC	11,04	Positivo
H01	FAM	Campy sp	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	24,24	Negativo

A identificação da espécie, realizada a partir do isolado, das amostras de leite E067 e E068 correspondeu a *C. jejuni*, com valores de Cq de 14,88 e 12,20, respetivamente, tal como pode ser visto na Figura 22 e Tabela 21.

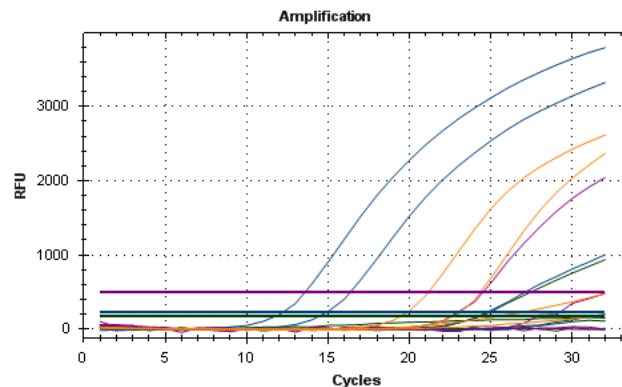


Figura 22 Representação gráfica do método de PCR para a identificação da espécie de *Campylobacter* das amostras de leite E065 a E070

Tabela 21 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E067 e E068

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
A01	FAM	jejuni	Leite 67	14,88	ROX	IAC	25,23
	HEX	coli		00,00			
	Cy5	lari		00,00			
B01	FAM	jejuni	Leite 68	12,20	ROX	IAC	30,82
	HEX	coli		00,00			
	Cy5	lari		00,00			
C01	FAM	jejuni	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	22,59
	HEX	coli		00,00			
	Cy5	lari		00,00			
D01	FAM	jejuni	Controlo positivo	24,71	ROX	IAC	19,38
	HEX	coli		24,24			
	Cy5	lari		24,51			

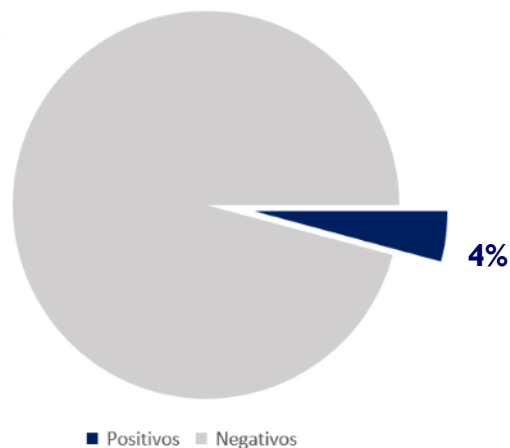


Figura 23 Representação gráfica da percentagem de amostras de leite cru positivas para *Campylobacter* spp.

Por conseguinte, foi confirmada uma ocorrência de *Campylobacter* de 4% (4 isolados) (Figura 23) em amostras de leite cru de explorações leiteiras. Este valor encontra-se entre outros valores de ocorrência de *Campylobacter* spp. que foram comunicados por outros países da UE: 0% na Finlândia ⁹⁵, 0,5% na Alemanha ⁹⁷, 1,4% em França ⁹⁸, 1,6% na Irlanda ⁹⁹, 4,6% na Polónia ¹⁰⁰ 12% em Itália ⁸⁰.

Esta monitorização de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru é de extrema importância a nível de segurança alimentar visto que já foram documentados surtos de campilobacteriose associados a leite cru contaminado ^{128; 129; 130; 131; 132}.

4.1 Avaliação da presença de *Campylobacter* spp. em explorações leiteiras

Das oito explorações leiteiras foram recolhidas 157 amostras e foi detetada a presença de *Campylobacter* spp. em três amostras de três explorações (E001, E002 e E007) como se pode observar nas Tabela 22 e Tabela 23.

Tabela 22 Resultados da avaliação da presença de *Campylobacter* spp. em amostras de explorações leiteiras – Parte I

Exploração	Amostras	Presença de <i>Campylobacter</i>		
		Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
E001	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Positivo
	Silo erva	N.D	Negativo	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
	Zaragatoa	N.D	Negativo	N.D
E002	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Positivo
	Silo erva	N.D	N.D	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	N.D
	Zaragatoa	Negativo	Negativo	N.D
E003	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Negativo
	Pastone	N.D	Negativo	N.D
	Silo erva	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
Zaragatoa	Negativo	Negativo	N.D	
E004	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo erva	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
	Zaragatoa	Negativo	Negativo	Negativo
E005	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo erva	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
	Zaragatoa	Negativo	Negativo	Negativo
E006	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
	Zaragatoa	Negativo	N.D	Negativo

Tabela 23 Resultados da avaliação da presença de *Campylobacter* spp. em amostras de explorações leiteiras – Parte II

Exploração	Amostras	Presença de <i>Campylobacter</i>		
		Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
E007	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Positivo
	Leite	Negativo	Negativo	Negativo
	Pastone	Negativo	N.D	N.D
	Silo erva	Negativo	Negativo	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
	Zaragatoa	Negativo	Negativo	Negativo
E008	Água	Negativo	Negativo	Negativo
	Alimentação	Negativo	Negativo	Negativo
	Fezes	Negativo	Negativo	Negativo
	Leite	Negativo	Negativo	Negativo
	Luzerna	N.D	Negativo	N.D
	Silo erva	Negativo	N.D	Negativo
	Silo milho	Negativo	Negativo	Negativo
	Zaragatoa	Negativo	Negativo	Negativo

N.D – Não determinado

Na figura 24 são apresentadas as curvas obtidas no PCR em tempo real nas quais se observa duas amplificações da curva para as amostras leite E001 e leite E002. A tabela 24 mostra os valores encontrados para as dezassete amostras recolhidas das explorações E001 e E002 que inclui as amostras de leite E001 e E002 nas quais se obteve um resultado positivo com os valores de Cq de 17,28 e 14,03, respetivamente.

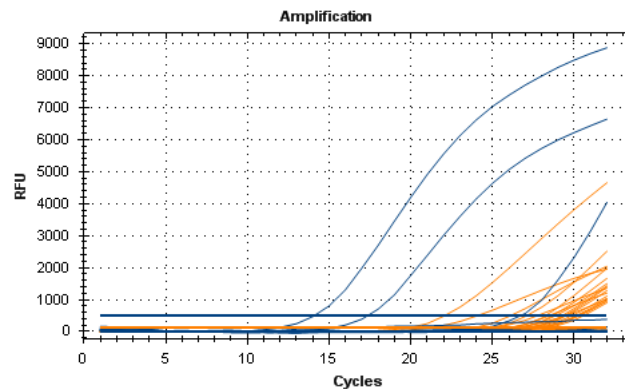


Figura 24 Representação gráfica do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras da exploração E001 e E002

Tabela 24 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E001 a E002

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado	
A01	FAM	Campy sp	Água E001	00,00	ROX	IAC	27,08	Negativo
A02	FAM	Campy sp	Alimentação E003	00,00	ROX	IAC	26,48	Negativo
B01	FAM	Campy sp	Água E002	00,00	ROX	IAC	26,06	Negativo
B02	FAM	Campy sp	Silo erva E001	00,00	ROX	IAC	27,24	Negativo
B03	FAM	Campy sp	Fezes E001	00,00	ROX	IAC	00,00	Inibido
C01	FAM	Campy sp	Água E003	00,00	ROX	IAC	26,05	Negativo
C02	FAM	Campy sp	Silo erva E002	00,00	ROX	IAC	27,93	Negativo
C03	FAM	Campy sp	Fezes E002	00,00	ROX	IAC	27,70	Inibido
D01	FAM	Campy sp	Leite E001	17,28	ROX	IAC	23,80	Positivo
D02	FAM	Campy sp	Silo erva E003	00,00	ROX	IAC	28,21	Negativo
D03	FAM	Campy sp	Fezes E003	00,00	ROX	IAC	00,00	Negativo
E01	FAM	Campy sp	Leite E002	14,03	ROX	IAC	25,07	Positivo
E02	FAM	Campy sp	Silo milho E001	00,00	ROX	IAC	27,39	Negativo
E03	FAM	Campy sp	Controlo positivo	00,00	ROX	IAC	19,84	Positivo
F01	FAM	Campy sp	Leite E003	00,00	ROX	IAC	26,53	Negativo
F02	FAM	Campy sp	Silo milho E003	00,00	ROX	IAC	27,80	Negativo
F03	FAM	Campy sp	Negativo	00,00	ROX	IAC	24,77	Negativo
G01	FAM	Campy sp	Alimentação E001	00,00	ROX	IAC	27,10	Negativo
H01	FAM	Campy sp	Alimentação E002	00,00	ROX	IAC	26,26	Negativo

A identificação da espécie, realizada a partir do isolado, das amostras de leite E001 e E002 correspondeu a *C. jejuni* tal com valores de Cq de 7,50 e 7,28 tal como pode ser visto na Figura 25 e Tabela 25.

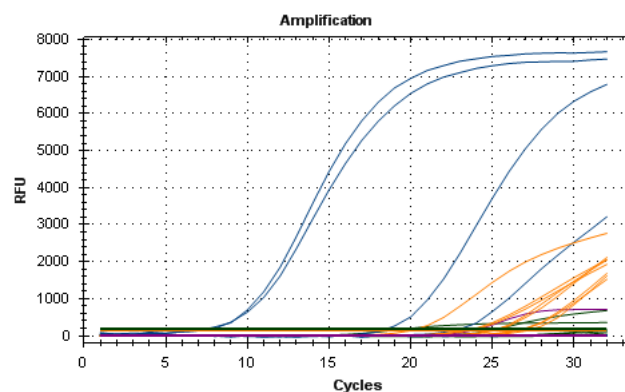


Figura 25 Representação gráfica do método de PCR para a identificação da espécie de *Campylobacter* das amostras de leite E001 e E002

Tabela 25 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de leite E001 e E002

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
A01	FAM	<i>jejuni</i>	Leite 001	07,50	ROX	IAC	<i>C. jejuni</i>
	HEX	<i>coli</i>		00,00			
	Cy5	<i>lari</i>		00,00			
B01	FAM	<i>jejuni</i>	Leite 002	07,28	ROX	IAC	<i>C. jejuni</i>
	HEX	<i>coli</i>		00,00			
	Cy5	<i>lari</i>		00,00			
C01	FAM	<i>jejuni</i>	Controlo positivo	22,82	ROX	IAC	Positivo
	HEX	<i>coli</i>		25,32			
	Cy5	<i>lari</i>		21,10			
D01	FAM	<i>jejuni</i>	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	Negativo
	HEX	<i>coli</i>		00,00			
	Cy5	<i>lari</i>		00,00			

Na figura 26 estão apresentadas as curvas obtidas no PCR em tempo real nas quais se observa uma amplificação da curva para a amostra fecal E007. A tabela 26 mostra os valores encontrados para as sete amostras recolhidas da exploração E007 que inclui a amostra fecal E007 na qual se obteve um resultado positivo com os valores de Cq de 24,33.

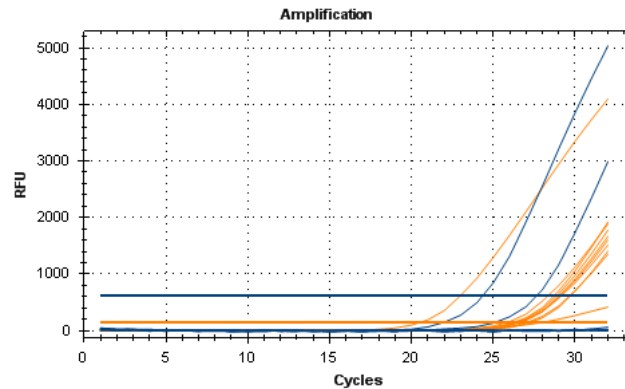


Figura 26 Representação gráfica do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras da exploração E007

Tabela 26 Valores do Cq do método de PCR para a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de fezes E007

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	IAC	Cq (IAC)	Resultado
A01	FAM	Campy sp	Água E007	00,00	ROX	IAC	27,08	Negativo
A02	FAM	Campy sp	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	26,25	Negativo
B01	FAM	Campy sp	Leite E007	00,00	ROX	IAC	27,24	Negativo
C01	FAM	Campy sp	Alimento E007	00,00	ROX	IAC	25,84	Negativo
D01	FAM	Campy sp	Erva ensilada E007	00,00	ROX	IAC	26,35	Negativo
E01	FAM	Campy sp	Milho ensilado E007	00,00	ROX	IAC	26,54	Negativo
F01	FAM	Campy sp	Fezes E007	24,33	ROX	IAC	28,05	Positivo
G01	FAM	Campy sp	Zaragatoa E007	00,00	ROX	IAC	26,60	Negativo
H01	FAM	Campy sp	Controlo positivo	27,62	ROX	IAC	20,53	Positivo

A identificação da espécie, realizada a partir do isolado, da amostra fecal E007 correspondeu a *C. jejuni* tal com valores de Cq de 7,14 tal como pode ser visto na Figura 27 e Tabela 27.

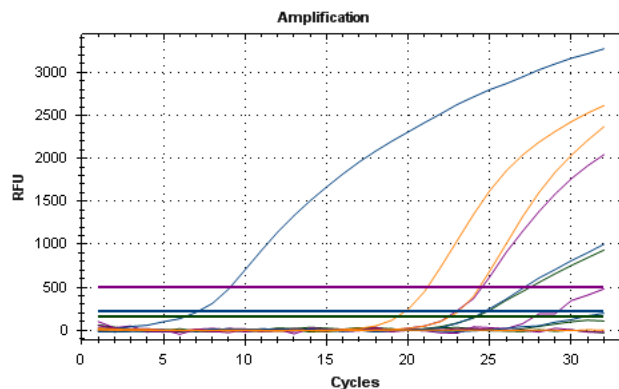


Figura 27 Representação gráfica do método PCR para a identificação da espécie de *Campylobacter* spp. presente na amostra fecal E007

Tabela 27 Valores do Cq do método PCR para a identificação da espécie de *Campylobacter* spp. presente na amostra fecal E007

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
C03	FAM	jejuni	Fezes 001	07,14	ROX	IAC	00,00
	HEX	coli		00,00			
	Cy5	lari		00,00			
C04	FAM	jejuni	Controlo positivo	24,71	ROX	IAC	19,38
	HEX	coli		24,24			
	Cy5	lari		24,51			
D04	FAM	jejuni	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	22,59
	HEX	coli		00,00			
	Cy5	lari		00,00			

Quando analisamos a ocorrência de *Campylobacter* spp. no total das 24 amostras fecais analisadas, obtemos uma ocorrência de 4,2%. Este valor é inferior ao valor registado noutros países da UE: 77% na Suécia ¹⁰³ em 2021, 30,5% nos Países Baixos ¹²¹ em 1988 e 20,5% em Espanha ¹²² em 2010, estudos em que o método de recolha da amostra foi igual ao realizado neste estudo. Contudo, se analisarmos a ocorrência de *Campylobacter* spp. nas oito amostras fecais que correspondem às recolhas realizadas nos meses de verão, obtemos uma ocorrência de 37,5%, valor este que já se insere entre os referenciados anteriormente. Outro fator a ter em conta é o tamanho da amostragem, visto que a maioria dos artigos analisados terem uma amostragem muito superior à amostragem deste estudo.

A deteção desta bactéria nas amostras fecais não é um dado inovador pois sabemos que sendo *Campylobacter* spp. um agente comum do trato intestinal bovino onde pode subsistir sem causar qualquer tipo de patologia a estes animais, a excreção do mesmo pelas fezes não é anómala. A contaminação verificada no leite pode advir exatamente dessa excreção, devido ao facto dos animais se deitarem em locais contaminados com amostras fecais e assim contaminarem as tetas, que contaminam o leite na altura da ordenha ¹⁰⁰. O facto de não ter sido detetada contaminação nas duas amostras (leite e fezes) na mesma exploração no mesmo momento da colheita, pode dever-se a vários fatores. O primeiro prende-se com o facto de estar a ser realizado um bom procedimento de higiene, o que impede a contaminação das fezes chegar às amostras de leite. O segundo, no caso de não estar a ser executado um bom procedimento de higiene, relaciona-se com o facto da contaminação poder vir a ser detetada no leite, mas após algum tempo, e para confirmar esse facto mais recolhas teriam de ser feitas no período de tempo seguinte. Ainda no caso de não estar a ser executado um bom procedimento de higiene, e ter sido apenas detetada contaminação nas amostras de leite, podemos também especular que a recolha das amostras fecais pode não ter sido demonstrativa visto que foi recolhida diretamente do chão do estábulo.

O último fator está relacionado com ter sido detetadas contaminações apenas no leite nas explorações E001 e E002. Estas contaminações podem dever-se a contaminações ambientais. Vários tipos de aves fazem do ambiente da maioria das explorações leiteiras e estas têm sido descritas como reservatórios de *Campylobacter* e a excreção no ambiente circundante da exploração leiteira pode ser um vetor de transmissão deste microrganismo¹³³. Para apoiar esta especulação, foi realizada uma segunda colheita às explorações E067 e E068 para tentar concluir de onde podia provir a contaminação. Nesta segunda recolha foram analisadas todas as amostras disponíveis nas explorações leiteiras (água, leite, alimentação, silagem de milho, silagem de erva, fezes e esfregaço às tetinas após a ordenha) e esfregaços a amostras fecais de pássaros frescas por toda a exploração. Todas as amostras deram resultado negativo para a presença de *Campylobacter* spp., exceto a amostra fecal da exploração E067. Foi também identificada a espécie, *C. jejuni*, correspondendo com a espécie identificada na primeira recolha. Esta amostra não pode ser reportada como resultado positivo, pois não foi possível executar o isolamento da mesma, possivelmente por ser uma CVNV.

No que toca a não ter sido encontrada nenhuma contaminação nos esfregaços realizados às tetinas da ordenha, demonstra que a desinfecção que é realizada após a ordenha que é realizada a cada vaca destinta, é eficaz e necessária para a eliminação de potenciais agentes patogénicos ou que, neste caso, *Campylobacter* spp. ser um microrganismo microaerófilico e por isto não conseguir sobreviver à exposição do oxigénio.

Apesar de não ter sido detetado *Campylobacter* spp. em amostras de silagem ou de água, estas foram recolhidas e analisadas na mesma pois já foi anteriormente documentado a presença deste microrganismo nestas matrizes^{95; 133}

Os três isolados foram detetados na ronda 3 (Tabela 28), que corresponde aos meses do Verão. Isto demonstra que existe uma variação sazonal clara na deteção deste agente patogénico que provavelmente está na base do aumento de casos confirmados de campilobacteriose relatados na UE nos meses de verão^{134; 135; 136}.

Tabela 28 Resumo dos resultados positivos por ronda

	Ronda 1 (Inverno)	Ronda 2 (Primavera)	Ronda 3 (Verão)
Exploração 001	Negativo	Negativo	Positivo
Exploração 002	Negativo	Negativo	Positivo
Exploração 003	Negativo	Negativo	Negativo
Exploração 004	Negativo	Negativo	Negativo
Exploração 005	Negativo	Negativo	Negativo
Exploração 006	Negativo	Negativo	Negativo
Exploração 007	Negativo	Negativo	Positivo
Exploração 008	Negativo	Negativo	Negativo

Em suma, foi confirmada uma ocorrência de *Campylobacter* spp. em três amostras (duas amostras de leite e uma amostra fecal) correspondentes a três explorações (E001, E002 e E007) das oito explorações leiteiras analisadas o que resulta de uma ocorrência de 37,5% em explorações leiteiras nos meses de verão (Figura 28).



Figura 28 Representação gráfica da percentagem de amostras de leite cru positivas para *Campylobacter* spp.

4.2 Comparação entre o método PCR do *EURL-Campylobacter* e o método do INIAV

Para a comparação dos métodos dos dois ensaios de PCR realizados segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter* e o protocolo do INIAV, utilizaram-se as seguintes definições, segundo a ISO 16140.

Exatidão relativa – grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e pelo método alternativo em amostras idênticas.

- $$AC = \frac{\text{N}^\circ \text{ de resultados concordantes}}{\text{N}^\circ \text{ total de resultados}} \times 100\%$$

Sensibilidade relativa – capacidade do método alternativo detetar o analito quando este é detetado pelo método de referência.

- $$SE = \frac{\text{N}^\circ \text{ de resultados positivos concordantes}}{\text{N}^\circ \text{ de resultados positivos obtidos no método de referência}} \times 100\%$$

Especificidade relativa – capacidade do método alternativo de não detetar um analito quando este não é detetado pelo método de referência.

- $$SP = \frac{\text{N}^\circ \text{ de resultados negativos concordantes}}{\text{N}^\circ \text{ de resultados negativos obtidos no método de referência}} \times 100\%$$

4.2.1 Comparação de resultados entre o ensaio PCR I *EURL-Campylobacter* e o método de referência

O ensaio PCR I foi usado para confirmar a presença de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Na Figura 29 estão representadas as curvas de amplificação resultantes do ensaio PCR I realizado segundo o protocolo descrito pelo *EURL-Campylobacter*. No PCR I, 24 amostras foram analisadas para a presença de *Campylobacter* termotolerantes.

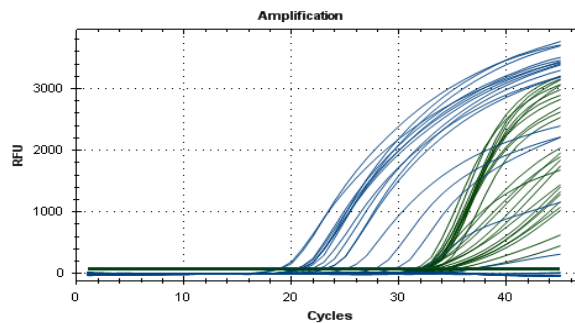


Figura 29 Gráfico do método PCR I realizado segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter*

Os resultados obtidos do ensaio PCR I segundo o protocolo *EURL-Campylobacter* foram comparados com o método de referência (Tabela 29). Segundo o ensaio realizado de acordo com o protocolo do *EURL-Campylobacter*, 15 isolados foram identificados como *Campylobacter* termotolerante e os restantes nove isolados foram dados como negativos para a presença de *Campylobacter* termotolerante. Quando o mesmo ensaio é realizado segundo o método de referência, 16 isolados foram identificados como *Campylobacter* termotolerante e os restantes oito isolados foram dados como negativos para a presença de *Campylobacter* termotolerante.

Tabela 29 Comparação de resultados entre o ensaio PCR I *EURL-Campylobacter* e o método de referência

Método de referência	Método PCR do <i>EURL-Campylobacter</i>		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	15	1	16
Negativos	1	8	8
Total	15	9	24

- Exatidão relativa: AC= 95,8%
- Sensibilidade relativa: SE = 93,8%
- Especificidade relativa: SP =100%

4.2.2 Comparação de resultados entre o ensaio PCR I INIAV e o método de referência

Em paralelo foi realizado o mesmo ensaio, mas com o protocolo do INIAV, onde os reagentes do método PCR estão descritos no ponto 3.3.2.2. Na Figura 30 estão representadas as curvas de amplificação resultantes do ensaio PCR I realizado segundo o protocolo descrito pelo INIAV.

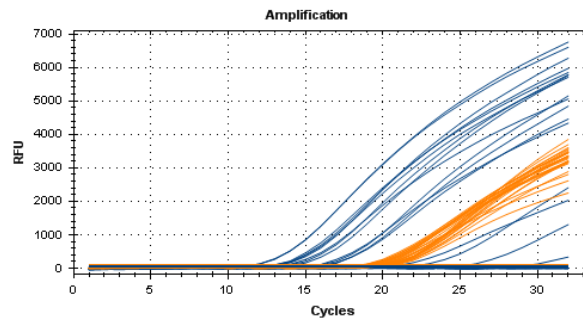


Figura 30 Gráfico do método PCR I realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV

Os resultados obtidos do ensaio PCR I segundo o protocolo do INIAV também foi comparado com o método de referência (Tabela 30). Segundo o ensaio realizado de acordo com o protocolo do INIAV, 15 isolados foram identificados como *Campylobacter* termotolerante e os restantes nove isolados foram dados como negativos para a presença de *Campylobacter* termotolerante. Quando o mesmo ensaio é realizado segundo o método de referência, 16 isolados foram identificados como *Campylobacter* termotolerante e os restantes oito isolados foram dados como negativos para a presença de *Campylobacter* termotolerante.

Tabela 30 Comparação de resultados entre o ensaio PCR I INIAV e o método de referência

Método de referência	Método PCR do INIAV		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	15	1	16
Negativos	0	8	8
Total	15	9	24

- AC = 95,8%
- SE = 93,8%
- SP = 100%

4.2.2 Comparação de resultados entre o ensaio PCR3 *EURL-Campylobacter* e o método de referência

O ensaio PCR3 foi usado para identificar a espécie de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Na Figura 31 estão representadas as curvas de amplificação resultantes do ensaio PCR3 realizado segundo o protocolo descrito pelo *EURL-Campylobacter*. No PCR3, 50 amostras foram analisadas para a identificação da espécie de *Campylobacter* termófilos.

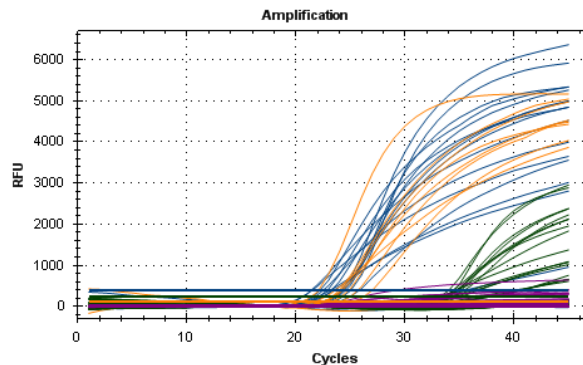


Figura 31 Gráfico do método PCR 3 realizado segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter*

Os resultados obtidos do ensaio PCR3 segundo o protocolo *EURL-Campylobacter* foram comparados com o método de referência. Segundo o ensaio realizado de acordo com o protocolo do *EURL-Campylobacter*, 38 isolados foram identificados como *C. jejuni*, *C. coli* ou *C. lari* e os restantes 12 isolados foram dados como negativos para estas espécies. Quando o mesmo ensaio é realizado segundo o método de referência, 40 isolados foram identificados como *C. jejuni*, *C. coli* ou *C. lari* e os restantes 10 isolados foram dados como negativos para estas espécies como demonstrado na Tabela 31.

Tabela 31 Comparação de resultados entre o ensaio PCR3 *EURL-Campylobacter* e o método de referência

Método de referência	Método PCR do <i>EURL-Campylobacter</i>		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	38	2	40
Negativos	0	10	10
Total	38	12	50

- AC = 96,0%
- SE = 95,0%
- SP = 100%

4.2.3 Comparação de resultados entre o ensaio PCR3 INIAV e o método de referência

Em paralelo foi realizado o mesmo ensaio, mas com o protocolo do INIAV, onde os reagentes do método PCR estão descritos no ponto 3.3.2.4. Na Figura 32 estão representadas as curvas de amplificação resultantes do ensaio PCR3 realizado segundo o protocolo descrito pelo INIAV.

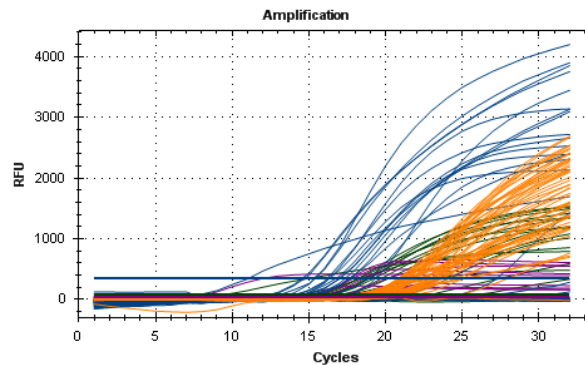


Figura 32 Gráfico do método PCR 3 realizado segundo o protocolo do INIAV

Os resultados obtidos do ensaio PCR3 segundo o protocolo do INIAV foram comparados com o método de referência (Tabela 32). Segundo o ensaio realizado de acordo com o protocolo do INIAV, 39 isolados foram identificados como *C. jejuni*, *C. coli* ou *C. lari* e os restantes 11 isolados foram dados como negativos para estas espécies. Quando o mesmo ensaio é realizado segundo o método de referência, 40 isolados foram identificados como *C. jejuni*, *C. coli* ou *C. lari* e os restantes 10 isolados foram dados como negativos para estas espécies.

Tabela 32 Comparação de resultados entre o ensaio PCR I INIAV e o método de referência

Método de referência	Método PCR do INIAV		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	39	1	40
Negativos	0	10	10
Total	39	11	50

- AC = 98,0%
- SE = 97,5%
- SP = 100%

Comparando os valores da exatidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa entre o ensaio PCR1 realizado segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter* e o realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV, podemos concluir que os três valores foram idênticos. No que toca ao ensaio PCR3 realizado segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter* e o realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV, os valores já foram diferentes. Na Tabela 33 podemos observar que os valores da exatidão relativa e da sensibilidade relativa foram mais elevados para o ensaio realizado com o protocolo do INIAV quando comparado com o realizado com o protocolo do *EURL-Campylobacter*.

Tabela 33 Comparação de resultados de AC, SE e SP dos PCR1 e PCR3 realizados pelo *EURL-Campylobacter* e pelo INIAV

	Ensaio PCR1		Ensaio PCR3	
	Protocolo <i>EURL-Campylobacter</i>	Protocolo INIAV	Protocolo <i>EURL-Campylobacter</i>	Protocolo INIAV
Exatidão relativa	95,8%	95,8%	96,0%	98,0%
Sensibilidade relativa	93,8%	93,8%	95,0%	97,5%
Especificidade relativa	100%	100%	100%	100%

Relativamente ao PCR3 pode-se concluir que o protocolo implementado no INIAV tem um maior grau de correspondência entre a resposta obtida pelo mesmo e pelo método de referência do que o protocolo do *EURL-Campylobacter*. Também o protocolo implementado no INIAV tem maior capacidade de detetar o analito quando este é detetado pelo método de referência do que o protocolo do *EURL-Campylobacter*.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

Campylobacter spp. é um organismo zoonótico encontrado no trato intestinal de vários animais e é o maior causador de gastroenterite na União Europeia. O leite cru ou inadequadamente pasteurizado, as aves mal cozinhadas e a água não tratada têm sido os principais alimentos associados aos surtos documentados. Consequentemente, é primordial o seu controlo e entendimento das vias de transmissão uma vez que pode constituir um fator de risco para a saúde humana. Até à data, este estudo é a primeira descrição da presença de *Campylobacter* spp. em explorações leiteiras em Portugal.

Como supracitado inicialmente, esta dissertação de mestrado tinha dois objetivos principais. O primeiro envolveu o estudo da epidemiologia molecular de *Campylobacter* em amostras de leite cru e a sua identificação. O segundo objetivo envolveu a análise das possíveis vias de transmissão dentro do ambiente de uma exploração leiteira.

Relativamente ao primeiro objetivo, foram recolhidas 100 amostras de leite cru retiradas do tanque da ordenha. Das amostras analisadas, *Campylobacter* spp. estava presente em 4%. No que toca ao segundo objetivo, foram recolhidas diferentes tipos de amostras de sete explorações leiteiras em três alturas do ano distintas. Foi isolado *Campylobacter* spp. de três amostras, duas de leite cru e uma amostra fecal, em três explorações diferentes. Todos os isolados foram identificados como *C. jejuni*.

No que diz respeito ao ensaio interlaboratorial a comparação entre os resultados permitiu validar a robustez do método do INIAV e apoiar o *EURL-Campylobacter* na decisão do uso de outros reagentes e perfis térmicos.

Comparativamente ao método ISO, o método PCR em tempo real é um método muito mais rápido, mais sensível, específico e que consegue fazer a deteção de microrganismos de *Campylobacter* spp. mesmo que estes estejam num estado viável, mas não cultivável. Contudo, é um método de alto custo quando comparado com o método ISO. Já este é um método moroso, que precisa de seis a sete dias para que possam ser apresentados resultados, pode ocorrer a errada identificação de amostras negativas para *Campylobacter* spp. quando estas bactérias podem estar apenas num estado de CVNC e por ser um método que necessitava de mais etapas para ser realizado estar sujeito a mais erros por parte do operador.

Por último, os dados deste estudo justificam mais estudos não só em Portugal, mas também noutros países europeus para determinar a ocorrência, o impacto da sazonalidade e particularmente dos fatores de risco associados à sua presença em explorações leiteiras. Isto é de particular importância, uma vez que os agentes patogénicos são, na sua maioria,

microrganismos zoonóticos. Estes resultados indicam o risco potencial de campilobacteriose nos consumidores de leite cru, ou leite cuja pasteurização foi mal realizada, uma vez que a espécie de *Campylobacter* identificada é de facto a mais descrita como causadora de campilobacteriose humana.

São necessários estudos mais extensivos sobre a ocorrência deste microrganismo, estudos em que um maior número de explorações e de amostras ambientais que coabitam o envolvente da exploração, seja integrado a fim de compreender todas as possíveis fontes de contaminação que podem estar na base da presença desta bactéria. Também deve ser realizado um estudo do impacto da sazonalidade ao longo das quatro estações do ano, visto que este só cobriu três estações. Seria também inserir um estudo da tipagem dos isolados encontrados para entender se há ligação entre os isolados clínicos e os isolados recolhidos das explorações. É também importante inserir o estudo da resistência antimicrobiana destes agentes patogénicos, uma vez que ambas as bactérias adquirem facilmente resistência aos antibióticos e a resistência aos antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global, à segurança alimentar e ao desenvolvimento atual.

CAPÍTULO VII
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAPOCEFALO, Matteo *et al.* - **MALDI-TOF MS: A rapid microbiological confirmation technique for food and water analysis.** [S.l.] : Elsevier Inc., 2016
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416999-9/00009-5> ISBN 9780124171701.
2. HUSSAIN, Malik; DAWSON, Christopher - Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. **Foods.** ISSN 2304-8158. 2:4 (2013) 585–589. doi: 10.3390/foods2040585.
3. RIBERA, Luis A. *et al.* - Economic Analysis of Food Safety Compliance Costs and Foodborne Illness Outbreaks in the United States. **HortTechnology.** ISSN 10630198. 22:2 (2012) 150–156. doi: 10.21273/horttech.22.2.150.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION - The Burden of Foodborne Diseases in the WHO European Region. **World Health Organization.** 2017).
5. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal.** ISSN 18314732. 17:12 (2019). doi: 10.2903/j.efsa.2019.5926.
6. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal.** ISSN 18314732. 19:2 (2021). doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406.
7. EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.** ISSN 15607917. 17:10 (2012) 1–442. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597.
8. GARCÍA-SÁNCHEZ, Lourdes; MELERO, Beatriz; ROVIRA, Jordi - Campylobacter in the Food Chain. 2018) 1–38. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.04.005.
9. SKIRROW, Martin B. - John McFadyean and the centenary of the first isolation of Campylobacter species. **Clinical Infectious Diseases.** ISSN 10584838. 43:9 (2006) 1213–1217. doi: 10.1086/508201.
10. CRUSHELL, Ellen *et al.* - Enteric Campylobacter: Purging Its Secrets? **Pediatric Research.** ISSN 00313998. 55:1 (2004) 3–12. doi: 10.1203/01.PDR.0000099794.06260.71.
11. JONES, Bx F. S.; ORCUTT, Marion; LITTLE, A Ralph B. - Method of Obtaining Vibrios from the Intestinal Tract. **Cultures.** 12 (1931) 853–864.

12. DOYLE, M. P.; ROMAN, D. J. - Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 00992240. 43:6 (1982) 1343–1353. doi: 10.1128/aem.43.6.1343-1353.1982.
13. ON, S. L. - Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **Symposium series (Society for Applied Microbiology)**. ISSN 14674734. 30 (2001) 1–15.
14. SILVA, Joana *et al.* - *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 2:SEP (2011) 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200.
15. ROSENBERG, Eugene *et al.* - The prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria. **The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria**. 9783642390:November 2015 (2014) 1–413. doi: 10.1007/978-3-642-39044-9.
16. LEVY, A. J. - A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. **The Yale journal of biology and medicine**. ISSN 00440086. 18:1 (1946) 243–258.
17. BOUKERB, Amine M. *et al.* - *Campylobacter armoricus* sp. Nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from surface water and stools from humans with enteric infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665034. 69:12 (2019) 3969–3979. doi: 10.1099/ijsem.0.003836.
18. ROSSI, Mirko *et al.* - *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 59:9 (2009) 2364–2369. doi: 10.1099/ijms.0.007419-0.
19. GILBERT, Maarten J. *et al.* - *Campylobacter blaseri* sp. Nov., isolated from common seals (*Phoca vitulina*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 68:5 (2018) 1787–1794. doi: 10.1099/ijsem.0.002742.
20. INGLIS, G. Douglas *et al.* - *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 57:11 (2007) 2636–2644. doi: 10.1099/ijms.0.65061-0.

21. VERON, M.; CHATELAIN, R. - Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Veron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. **International Journal of Systematic Bacteriology**. ISSN 0020-7713. 23:2 (1973) 122–134. doi: 10.1099/00207713-23-2-122.
22. TANNER, Anne C. R. *et al.* - *succinogenes* Wolin *et al.*) comb . nov ., and Description of from Humans with Periodontal Disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 31:4 (1981) 432–445.
23. KOZIEL, Monika *et al.* - *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 64:PART 8 (2014) 2878–2883. doi: 10.1099/ijms.0.063867-0.
24. CUMMINS, C. S.; HARRIS, H. - Taxonomic position of *Arthrobacter*. **Nature**. ISSN 00280836. 184:4689 (1959) 831–832. doi: 10.1038/184831a0.
25. ZANONI, Renato Giulio *et al.* - *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 59:7 (2009) 1666–1671. doi: 10.1099/ijms.0.007286-0.
26. VANDAMME, P. *et al.* - Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen . nov . **International Journal of Systematic Bacteriology**. 41:1 (1991) 88–103.
27. SPRENGER, H.; ZECHNER, Ellen L.; GORKIEWICZ, Gregor - So close and yet so far — Molecular microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies . **European Journal of Microbiology and Immunology**. ISSN 2062-509X. 2:1 (2012) 66–75. doi: 10.1556/eujmi.2.2012.1.10.
28. PICCIRILLO, Alessandra *et al.* - *Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 66:9 (2016) 3468–3476. doi: 10.1099/ijsem.0.001219.
29. KERSTERS, K.; GOOSSENS, H.; MOSS, C. W. - *ureolyticus* and Reclassification of *B. gracilis* as. 1995) 145–152.

30. STANLEY, J. *et al.* - *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: Characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. **Journal of General Microbiology**. ISSN 00221287. 138:11 (1992) 2293–2303. doi: 10.1099/00221287-138-11-2293.
31. VAN, Thi Thu Hao *et al.* - *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 66:11 (2016) 4518–4524. doi: 10.1099/ijsem.0.001383.
32. LAWSON, A. J. *et al.* - *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 51:2 (2001) 651–660. doi: 10.1099/00207713-51-2-651.
33. GEBHART, C. J. *et al.* - «*Campylobacter hyointestinalis*» sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 00951137. 21:5 (1985) 715–720. doi: 10.1128/jcm.21.5.715-720.1985.
34. GILBERT, Maarten J. *et al.* - *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 65:3 (2015) 975–982. doi: 10.1099/ijsem.0.000048.
35. FOSTER, Geoffrey *et al.* - *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 54:6 (2004) 2369–2373. doi: 10.1099/ijsem.0.63147-0.
36. LOGAN, Julie M. J. *et al.* - *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 50:2 (2000) 865–872. doi: 10.1099/00207713-50-2-865.
37. BENJAMIN, J. *et al.* - Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. **Current Microbiology**. ISSN 03438651. 8:4 (1983) 231–238. doi: 10.1007/BF01579552.
38. ROOP, R. M. *et al.* - *Campylobacter mucosalis* (Lawson, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb. nov.: Emended description. **International Journal of Systematic Bacteriology**. ISSN 00207713. 35:2 (1985) 189–192. doi: 10.1099/00207713-35-2-189.
39. BLOOMFIELD, Samuel *et al.* - *Campylobacter novaezeelandiae* sp. nov., isolated from birds and water in New Zealand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665034. 70:6 (2020) 3775–3784. doi: 10.1099/ijsem.0.004231.

40. CÁCERES, Alberto *et al.* - *Campylobacter ornithocola* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from wild bird faecal samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 67:6 (2017) 1643–1649. doi: 10.1099/ijsem.0.001822.
41. DEBRUYNE, Lies *et al.* - Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: Description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 59:5 (2009) 1126–1132. doi: 10.1099/ijms.0.000851-0.
42. GILBERT, Maarten J. *et al.* - *Campylobacter pinnipediorum* sp. Nov., isolated from pinnipeds, comprising *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum* subsp. nov. and *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *caledonicus* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 67:6 (2017) 1961–1968. doi: 10.1099/ijsem.0.001894.
43. SILVA, Marta Filipa *et al.* - *Campylobacter portucalensis* sp. nov., a new species of *Campylobacter* isolated from the preputial mucosa of bulls. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 15:1 (2020) 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0227500.
44. ETOH, Y. *et al.* - *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. **International Journal of Systematic Bacteriology**. ISSN 00207713. 43:4 (1993) 631–639. doi: 10.1099/00207713-43-4-631.
45. DEBRUYNE, Lies *et al.* - *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 60:4 (2010) 815–819. doi: 10.1099/ijms.0.011056-0.
46. SANDSTEDT, Karin; URSING, Jan - Description of *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. Previously Known as the CNW Group. **Systematic and Applied Microbiology**. ISSN 07232020. 14:1 (1991) 39–45. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80359-0.
47. VANDAMME, P. *et al.* - Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 60:9 (2010) 2016–2022. doi: 10.1099/ijms.0.017152-0.
48. DEBRUYNE, Lies *et al.* - *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 60:8 (2010) 1870–1875. doi: 10.1099/ijms.0.013748-0.

49. PENNER, J. L. - The genus *Campylobacter*: A decade of progress. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 08938512. 1:2 (1988) 157–172. doi: 10.1128/CMR.1.2.157.
50. KOENRAAD, Author P. M. F. J. *et al.* - Antibiotic Susceptibility of *Campylobacter* Isolates from Sewage and Poultry Abattoir Drain Water content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to increase productivity and facilitate new forms. 115:3 (2014) 475–483.
51. PARK, Simon F. - The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 74:3 (2002) 177–188. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00678-X.
52. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Campylobacter*** Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf> ISBN 978-85-334-1793-9.
53. DONNISON, A. M.; ROSS, C. M. - **Thermotolerant *Campylobacter***. [S.l.] : Elsevier Ltd., 2014 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00038-6> ISBN 9780123847317.
54. LORENZO, Jose M. *et al.* - **Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Inc., 2018 Disponível em WWW:<URL:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>>. ISBN 9780128110324.
55. LEE, A.; SNITH, S. C.; COLOE, P. J. - Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362028X. 61:12 (1998) 1609–1614. doi: 10.4315/0362-028X-61.12.1609.
56. AL-BANNA, Nadia A.; CYPRIAN, Farhan; ALBERT, M. John - Cytokine responses in campylobacteriosis: Linking pathogenesis to immunity. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. ISSN 18790305. 41:March (2018) 75–87. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.03.005.
57. COSTA, Daniela; IRAOLA, Gregorio - Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 10986618. 32:4 (2019). doi: 10.1128/CMR.00072-18.

58. EPPS, Sharon V. R. *et al.* - Foodborne *Campylobacter*: Infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. ISSN 16617827. 10:12 (2013) 6292–6304. doi: 10.3390/ijerph10126292.
59. O'HARA, Jennifer R. *et al.* - *Campylobacter jejuni* disrupts protective toll-like receptor 9 signaling in colonic epithelial cells and increases the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Infection and Immunity**. ISSN 00199567. 80:4 (2012) 1563–1571. doi: 10.1128/IAI.06066-11.
60. POLY, Frédéric; GUERRY, Patricia - Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**. ISSN 02671379. 24:1 (2008) 27–31. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f1dcb1.
61. DEUN, Kim VAN *et al.* - Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**. ISSN 00222615. 56:10 (2007) 1284–1289. doi: 10.1099/jmm.0.47342-0.
62. ZILBAUER, Matthias *et al.* - *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. ISSN 00359203. 102:2 (2008) 123–129. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.09.019.
63. HANSSON, I. *et al.* - Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. **Transboundary and Emerging Diseases**. ISSN 18651682. 65:December 2016 (2018) 30–48. doi: 10.1111/tbed.12870.
64. MARTIN, J. *et al.* - CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIC ASPECTS OF Infections. **Campylobacter, 3rd ed. Edited by I. Nachamkin, C. M. Szymanski, and M. J. Blaser 2008 ASM Press, Washington, DC. 2008).**
65. JANSSEN, Riny *et al.* - Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: The host perspective. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 08938512. 21:3 (2008) 505–518. doi: 10.1128/CMR.00055-07.
66. RAO, Malla R. *et al.* - Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. **American Journal of Epidemiology**. ISSN 00029262. 154:2 (2001) 166–173. doi: 10.1093/aje/154.2.166.
67. FIGUEROA, G. *et al.* - Prospective study of *Campylobacter jejuni* infection in Chilean infants evaluated by culture and serology. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 00951137. 27:5 (1989) 1040–1044. doi: 10.1128/jcm.27.5.1040-1044.1989.

68. KALISCHUK, Lisa D.; BURET, Andre G. - A role for *Campylobacter jejuni*-induced enteritis in inflammatory bowel disease? **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. ISSN 01931857. 298:1 (2010). doi: 10.1152/ajpgi.00193.2009.
69. KIRKPATRICK, Beth D.; TRIBBLE, David R. - Update on human *Campylobacter jejuni* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**. ISSN 02671379. 27:1 (2011) 1–7. doi: 10.1097/MOG.0b013e3283413763.
70. GRADEL, Kim O. *et al.* - Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or *Campylobacter* Gastroenteritis. **Gastroenterology**. ISSN 00165085. 137:2 (2009) 495–501. doi: 10.1053/j.gastro.2009.04.001.
71. CHEN, Ming L. *et al.* - Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**. ISSN 00199567. 74:12 (2006) 6581–6589. doi: 10.1128/IAI.00958-06.
72. KAAKOUSH, Nadeem O. *et al.* - Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 10986618. 28:3 (2015) 687–720. doi: 10.1128/CMR.00006-15.
73. WEST, Alex - **The global view**. ISBN 9789241564601.
74. STRACHAN, N. J. C. *et al.* - Sexual dimorphism in *Campylobacteriosis*. **Epidemiology and Infection**. ISSN 09502688. 136:11 (2008) 1492–1495. doi: 10.1017/S0950268807009934.
75. DJENNAD, Abdelmajid *et al.* - Seasonality and the effects of weather on *Campylobacter* infections. **BMC Infectious Diseases**. ISSN 14712334. 19:1 (2019) 1–10. doi: 10.1186/s12879-019-3840-7.
76. GONI, Mohammed Dauda *et al.* - *Campylobacter* in dogs and cats; Its detection and public health significance: A review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**. ISSN 23078316. 5:6 (2017) 239–248. doi: 10.17582/journal.aavs/2017/5.6.239.248.
77. MUGHINI GRAS, Lapo *et al.* - Risk factors for *Campylobacteriosis* of chicken, ruminant, and environmental origin: A combined case-control and source attribution analysis. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 7:8 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.0042599.
78. STANLEY, Karen; JONES, K. - Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. ISSN 02674440. 94:32 (2003) 104–113. doi: 10.1046/j.1365-2672.94.s1.12.x.

79. GARAU, Javier - Clinical strategies for serious infection: A European perspective. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. ISSN 07328893. 31:2 (1998) 397–404. doi: 10.1016/S0732-8893(98)00033-9.
80. BIANCHINI, Valentina *et al.* - Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of *Campylobacter jejuni* in dairy herds in Northern Italy. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 00992240. 80:6 (2014) 1832–1837. doi: 10.1128/AEM.03784-13.
81. OH, Euna *et al.* - Frequent implication of multistress-tolerant *Campylobacter jejuni* in human infections. **Emerging Infectious Diseases**. ISSN 10806059. 24:6 (2018) 1037–1044. doi: 10.3201/eid2406.171587.
82. EL-ZAMKAN, Mona A.; HAMEED, Karima G. Abde. - Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products. **Veterinary World**. ISSN 22310916. 9:10 (2016) 1147–1151. doi: 10.14202/vetworld.2016.1147-1151.
83. GILPIN, Brent J. *et al.* - A large scale waterborne *Campylobacteriosis* outbreak, Havelock North, New Zealand. **Journal of Infection**. ISSN 15322742. 81:3 (2020) 390–395. doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.065.
84. KENNEDY, J. *et al.* - Determinants of cross-contamination during home food preparation. **British Food Journal**. ISSN 0007070X. 113:2 (2011) 280–297. doi: 10.1108/00070701111105349.
85. SERRAINO, A. *et al.* - Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. **Journal of Dairy Science**. ISSN 00220302. 96:5 (2013) 2801–2807. doi: 10.3168/jds.2012-6249.
86. NAUTA, Maarten *et al.* - A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 129:2 (2009) 107–123. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.001.
87. MAIA, Rui; TEIXEIRA, Paula; JO, Maria - International Journal of Food Microbiology Cross-contamination events of *Campylobacter* spp . in domestic kitchens associated with consumer handling practices of raw poultry. 338:2021). doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108984.
88. HANSSON, I. *et al.* - Occurrence of *Campylobacter* spp. in Swedish calves, common sequence types and antibiotic resistance patterns. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 13652672. 130:6 (2021) 2111–2122. doi: 10.1111/jam.14914.

89. PEREIRA, Paula C. - Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**. ISSN 18731244. 30:6 (2014) 619–627. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011.
90. QUIGLEY, Lisa *et al.* - The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**. ISSN 01686445. 37:5 (2013) 664–698. doi: 10.1111/1574-6976.12030.
91. OLIVIER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. - S.P. OLIVER, I B.M. JAYARAO, 2 and R.A. ALMEIDA I. **Foodborne Pathogens In Milk and Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications**. 2:2 (2005) 115–137.
92. KESSEL, J. S. VAN *et al.* - Prevalence of salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**. ISSN 00220302. 87:9 (2004) 2822–2830. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73410-4.
93. CLAEYS, Wendie L. *et al.* - Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**. ISSN 09567135. 31:1 (2013) 251–262. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.035.
94. ZASTEMPOWSKA, Ewa; GRAJEWSKI, Jan; TWARUZEK, Magdalena - Food-borne pathogens and contaminants in raw milk - A review. **Annals of Animal Science**. ISSN 23008733. 16:3 (2016) 623–639. doi: 10.1515/aoas-2015-0089.
95. JAAKKONEN, Anniina *et al.* - Longitudinal study of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* on Finnish dairy farms and in raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 10985336. 85:7 (2019). doi: 10.1128/AEM.02910-18.
96. HEUVELINK, Annet E. *et al.* - Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 134:1–2 (2009) 70–74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.026.
97. MESSELHÄUSSER, Ute *et al.* - Presence of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. in cattle, food and water sources on Alpine pastures in Bavaria. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. ISSN 0003925X. 59:3 (2008) 103–106. doi: 10.2376/0003-925X-59-103.
98. DESMASURES, N.; BAZIN, F.; GUÉGUEN, M. - Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 13645072. 83:1 (1997) 53–58. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00166.x.
99. WHYTE, P. *et al.* - Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 95:2 (2004) 111–118. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.018.

100. WYSOK, B. *et al.* - Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in raw milk in the selected areas of Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. ISSN 15051773. 14:3 (2011) 473–477. doi: 10.2478/v10181-011-0070-3.
101. VOGT, R. L. *et al.* - *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. **Annals of Internal Medicine**. ISSN 00034819. 96:3 (1982) 292–296. doi: 10.7326/0003-4819-96-3-292.
102. FERRARI, S. *et al.* - Detection of *Campylobacter* spp. in water by dead-end ultrafiltration and application at farm level. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 13652672. 127:4 (2019) 1270–1279. doi: 10.1111/jam.14379.
103. NILSSON, Anna *et al.* - Survival of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* water isolates in lake and well water. **Apmis**. ISSN 16000463. 126:9 (2018) 762–770. doi: 10.1111/apm.12879.
104. BEUMER, R. R.; CRUYSEN, J. J. M.; BIRTANTIE, I. R. K. - The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. **Journal of Applied Bacteriology**. ISSN 13652672. 65:2 (1988) 93–96. doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb01496.x.
105. MAUREL, Blandine *et al.* - Branched and fenestrated options to treat aortic arch aneurysms. **Journal of Cardiovascular Surgery**. ISSN 00219509. 57:5 (2016) 686–697. doi: 10.1128/AEM.70.8.4458.
106. VILAR, M. J. *et al.* - Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. **Journal of Dairy Science**. ISSN 15253198. 90:11 (2007) 5083–5088. doi: 10.3168/jds.2007-0213.
107. DRIEHUIS, Frank - Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. **Agricultural and Food Science**. ISSN 17951895. 22:1 (2013) 16–34. doi: 10.23986/afsci.6699.
108. DRIEHUIS, F. *et al.* - Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**. ISSN 15253198. 101:5 (2018) 4093–4110. doi: 10.3168/jds.2017-13836.
109. OGUNADE, I. M. *et al.* - Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. **Journal of Dairy Science**. ISSN 15253198. 99:6 (2016) 4427–4436. doi: 10.3168/jds.2015-10766.

110. PEDROSO, A. F. *et al.* - Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: Efficacy and mode of action. **Journal of Dairy Science**. ISSN 00220302. 93:3 (2010) 1098–1104. doi: 10.3168/jds.2009-2433.
111. VELUSAMY, Vijayalakshmi *et al.* - An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 28:2 (2010) 232–254. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.
112. ZHANG, Grace - Foodborne Pathogenic Bacteria Detection: An Evaluation of Current and Developing Methods. **McMaster University's undergraduate Health Sciences journal**. 1:24 (2013) 27–30.
113. LÓPEZ-CAMPOS, Guillermo *et al.* - Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens. **Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens**. 2012) 1–126. doi: 10.1007/978-1-4614-3250-0.
114. ISO - Disponível em: <URL:https://www.iso.org/home.html
115. JASSON, Vicky *et al.* - Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**. ISSN 07400020. 27:6 (2010) 710–730. doi: 10.1016/j.fm.2010.04.008.
116. INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION (ISO) - INTERNATIONAL STANDARD Horizontal method for detection and. ISO10272-1:2017) 1–5.
117. FONSECA, Belchiolina Beatriz; FERNANDEZ, Heriberto; ROSSI, Daise Aparecida - *Campylobacter* spp. and related organisms in poultry. **Campylobacter Spp. and Related Organisms in Poultry: Pathogen-Host Interactions, Diagnosis and Epidemiology**. 2016) 1–206. doi: 10.1007/978-3-319-29907-5.
118. BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. - A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal of Clinical Pathology**. ISSN 00219746. 35:4 (1982) 462–467. doi: 10.1136/jcp.35.4.462.
119. SMITH, Cindy J.; OSBORN, A. Mark - Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**. ISSN 01686496. 67:1 (2009) 6–20. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
120. STEELE, Marina L. *et al.* - Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362028X. 60:11 (1997) 1341–1346. doi: 10.4315/0362-028X-60.11.1341.

121. SMITH, Cindy J. *et al.* - Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. **Environmental Microbiology**. ISSN 14622912. 8:5 (2006) 804–815. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00963.x.
122. BALDWIN, Brett R.; NAKATSU, Cindy H.; NIES, Loring - Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 00992240. 69:6 (2003) 3350–3358. doi: 10.1128/AEM.69.6.3350-3358.2003.
123. EL-GENDY, Atef M. *et al.* - Heterogeneity of *Campylobacter* species isolated from serial stool specimens of Egyptian children using pulsed field gel electrophoresis. **African Journal of Laboratory Medicine**. ISSN 2225-2002. 2:1 (2013) 1–9. doi: 10.4102/ajlm.v2i1.34.
124. KARLSSON, Maria - Optimization and validation of a triplex real-time PCR assay for thermotolerant *Campylobacter* species associated with foodborne disease. December (2013).
125. FRICKER, Martina *et al.* - Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 00992240. 73:6 (2007) 1892–1898. doi: 10.1128/AEM.02219-06.
126. VONDRAKOVA, Lucie; PAZLAROVA, Jarmila; DEMNEROVA, Katerina - Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. **Gut Pathogens**. ISSN 17574749. 6:1 (2014) 1–9. doi: 10.1186/1757-4749-6-12.
127. BERGE, A. C.; BAARS, T. - Raw milk producers with high levels of hygiene and safety. **Epidemiology and Infection**. ISSN 14694409. 2020) 1–7. doi: 10.1017/S0950268820000060.
128. DAVYS, G. *et al.* - *Campylobacteriosis* associated with the consumption of unpasteurised milk: Findings from a sentinel surveillance site. **Epidemiology and Infection**. ISSN 14694409. 2020). doi: 10.1017/S0950268819002292.
129. KENYON, J. *et al.* - *Campylobacter* outbreak associated with raw drinking milk, North West England, 2016. **Epidemiology and Infection**. ISSN 14694409. 2020) 1–6. doi: 10.1017/S0950268820000096.

130. SCHILDT, M.; SAVOLAINEN, S.; HÄNNINEN, Marja Liisa - Long-lasting *Campylobacter jejuni* contamination of milk associated with gastrointestinal illness in a farming family. **Epidemiology and Infection**. ISSN 09502688. 134:2 (2006) 401–405. doi: 10.1017/S0950268805005029.
131. BURAKOFF, Alexis *et al.* - Outbreak of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Raw Milk Consumption from a Herdshare Dairy — Colorado, 2016 . **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**. ISSN 0149-2195. 67:5 (2018) 146–148. doi: 10.15585/mmwr.mm6705a2.
132. LANGER, Adam J. *et al.* - Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and State Laws-United States, 1993-2006. **Emerging Infectious Diseases**. ISSN 10806040. 18:3 (2012) 385–391. doi: 10.3201/eid1803.111370.
133. RAPP, Delphine *et al.* - Importance of the farm environment and wildlife for transmission of *campylobacter jejuni* in a pasture-based dairy herd. **Microorganisms**. ISSN 20762607. 8:12 (2020) 1–11. doi: 10.3390/microorganisms8121877.
134. LOUIS, Valérie R. *et al.* - Temperature-driven *campylobacter* seasonality in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 00992240. 71:1 (2005) 85–92. doi: 10.1128/AEM.71.1.85-92.2005.
135. NYLEN, G. *et al.* - The seasonal distribution of *campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. **Epidemiology and Infection**. ISSN 09502688. 128:3 (2002) 383–390. doi: 10.1017/S0950268802006830.
136. FRIEDRICH, A. *et al.* - Seasonality of *Campylobacter jejuni* isolates associated with human *campylobacteriosis* in the Manawatu region, New Zealand. **Epidemiology and Infection**. ISSN 14694409. 144:4 (2016) 820–828. doi: 10.1017/S0950268815002009.

ANEXOS

Anexo A- Composição do meio Bolton

Base- Fórmula (g/l): Peptona de carne 10,0; Hidrolisato de lactalbumina 5,0; Extrato de levedura 5,0, Cloreto de sódio 5,0, Piruvato de sódio 0,5, Ácido α -ketoglutarico 1,0, Metabissulfito de sódio 0,5, Carbonato de sódio 0,6, Haemina 0,01.

Suplemento Bolton- Composição: Cefoperazona 10,0 mg, Vancomicina 10,0 mg, Trimetoprim 10,0 mg e Cicloheximida 25,0 mg

Anexo B- Valores do Cq do PCR I realizado segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter*

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IPC)	Resultado	
A01	FAM	Jos	Amostra 1	00,00	HEX	IPC	33,03	Negativo
A02	FAM	Jos	Amostra 9	20,42	HEX	IPC	33,61	Positivo
A03	FAM	Jos	Amostra 17	22,37	HEX	IPC	33,59	Positivo
A04	FAM	Jos	Controlo positivo	32,03	HEX	IPC	32,02	Positivo
B01	FAM	Jos	Amostra 2	36,78	HEX	IPC	31,97	Positivo
B02	FAM	Jos	Amostra 10	25,05	HEX	IPC	31,86	Positivo
B03	FAM	Jos	Amostra 18	27,54	HEX	IPC	32,03	Positivo
B04	FAM	Jos	Controlo negativo	00,00	HEX	IPC	31,86	Negativo
C01	FAM	Jos	Amostra 3	00,00	HEX	IPC	32,31	Negativo
C02	FAM	Jos	Amostra 11	20,72	HEX	IPC	34,07	Positivo
C03	FAM	Jos	Amostra 19	00,00	HEX	IPC	31,47	Negativo
D01	FAM	Jos	Amostra 4	00,00	HEX	IPC	32,32	Negativo
D02	FAM	Jos	Amostra 12	00,00	HEX	IPC	32,13	Negativo
D03	FAM	Jos	Amostra 20	00,00	HEX	IPC	31,75	Negativo
E01	FAM	Jos	Amostra 5	21,12	HEX	IPC	32,36	Positivo
E02	FAM	Jos	Amostra 13	18,64	HEX	IPC	36,10	Positivo
E03	FAM	Jos	Amostra 21	20,73	HEX	IPC	32,15	Positivo
F01	FAM	Jos	Amostra 6	23,14	HEX	IPC	32,35	Positivo
F02	FAM	Jos	Amostra 14	29,37	HEX	IPC	31,79	Positivo
F03	FAM	Jos	Amostra 22	00,00	HEX	IPC	31,14	Negativo
G01	FAM	Jos	Amostra 7	21,73	HEX	IPC	33,52	Positivo
G02	FAM	Jos	Amostra 15	00,00	HEX	IPC	32,01	Negativo
G03	FAM	Jos	Amostra 23	18,92	HEX	IPC	35,01	Positivo
H01	FAM	Jos	Amostra 8	20,77	HEX	IPC	33,66	Positivo
H02	FAM	Jos	Amostra 16	20,36	HEX	IPC	32,94	Positivo
H03	FAM	Jos	Amostra 24	23,14	HEX	IPC	31,75	Positivo

Anexo C- Valores do Cq do PCR I realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV

Poço	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado	
A01	FAM	Campy sp	Amostra 1	00,00	ROX	IAC	20,48	Negativo
A02	FAM	Campy sp	Amostra 9	12,47	ROX	IAC	19,13	Positivo
A03	FAM	Campy sp	Amostra 17	14,92	ROX	IAC	19,82	Positivo
A04	FAM	Campy sp	Controlo positivo	24,79	ROX	IAC	19,85	Positivo
B01	FAM	Campy sp	Amostra 2	28,61	ROX	IAC	20,33	Positivo
B02	FAM	Campy sp	Amostra 10	15,18	ROX	IAC	19,64	Positivo
B03	FAM	Campy sp	Amostra 18	20,32	ROX	IAC	20,78	Positivo
B04	FAM	Campy sp	Controlo negativo	00,00	ROX	IAC	20,13	Negativo
C01	FAM	Campy sp	Amostra 3	00,00	ROX	IAC	20,48	Negativo
C02	FAM	Campy sp	Amostra 11	12,26	ROX	IAC	19,10	Positivo
C03	FAM	Campy sp	Amostra 19	00,00	ROX	IAC	19,78	Negativo
D01	FAM	Campy sp	Amostra 4	00,00	ROX	IAC	20,10	Negativo
D02	FAM	Campy sp	Amostra 12	00,00	ROX	IAC	20,08	Negativo
D03	FAM	Campy sp	Amostra 20	00,00	ROX	IAC	20,22	Negativo
E01	FAM	Campy sp	Amostra 5	13,04	ROX	IAC	19,20	Positivo
E02	FAM	Campy sp	Amostra 13	10,82	ROX	IAC	18,69	Positivo
E03	FAM	Campy sp	Amostra 21	12,71	ROX	IAC	19,22	Positivo
F01	FAM	Campy sp	Amostra 6	15,08	ROX	IAC	19,52	Positivo
F02	FAM	Campy sp	Amostra 14	21,79	ROX	IAC	20,12	Positivo
F03	FAM	Campy sp	Amostra 22	00,00	ROX	IAC	20,09	Negativo
G01	FAM	Campy sp	Amostra 7	13,46	ROX	IAC	19,40	Positivo
G02	FAM	Campy sp	Amostra 15	00,00	ROX	IAC	20,10	Negativo
G03	FAM	Campy sp	Amostra 23	11,07	ROX	IAC	18,57	Positivo
H01	FAM	Campy sp	Amostra 8	12,49	ROX	IAC	19,10	Positivo
H02	FAM	Campy sp	Amostra 16	12,38	ROX	IAC	18,79	Positivo
H03	FAM	Campy sp	Amostra 24	15,80	ROX	IAC	19,56	Positivo

Anexo D- Valores do Cq do PCR 3 realizado segundo o protocolo do *EURL-Campylobacter*

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IPC)	Resultado
A01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	1	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	34,07	Negativo
A02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	9	00,00 22,51 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
A03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	17	23,76 00,00 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C. coli</i>
A04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	25	00,00 00,00 23,24	HEX IPC	37,44	<i>C. lari</i>
A05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	33	25,92 00,00 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C. coli</i>
A06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	41	00,00 00,00 24,12	HEX IPC	37,16	<i>C. lari</i>
A07	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	49	00,00 00,00 20,45	HEX IPC	34,18	<i>C. lari</i>
B01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	2	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	36,40	Negativo
B02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	10	00,00 25,83 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
B03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	18	29,75 00,00 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C. coli</i>
B04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	26	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	33,48	Negativo
B05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	34	00,00 22,88 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
B06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	42	00,00 24,57 00,00	HEX IPC	00,0	<i>C jejuni</i>
B07	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	50	22,27 00,00 00,00	HEX IPC	37,60	<i>C. coli</i>
C01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	3	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	34,44	Negativo
C02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	11	00,00 23,18 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
C03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	19	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	33,17	Negativo
C04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	27	00,00 35,60 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
C05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	35	00,00 00,00 25,28	HEX IPC	00,00	<i>C. lari</i>
C06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	43	00,00 24,29 00,00	HEX IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
C07	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	Positivo	26,06 36,33 26,75	HEX IPC	00,00	Positivo
D01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	4	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	34,95	Negativo
D02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	12	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	33,13	Negativo
D03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	20	00,00 00,00 00,00	HEX IPC	33,78	Negativo

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno		Cq (IPC)	Resultado
D04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	28	23,04 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
D05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	36	00,00 25,05 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
D06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	44	00,00 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	Negativo
D07	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	Negativo	00,00 00,00 00,00	HEX	IPC	33,61	Negativo
E01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	5	00,00 23,50 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
E02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	13	23,31 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
E03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	21	00,00 00,00 22,41	HEX	IPC	00,00	<i>C. lari</i>
E04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	29	00,00 00,00 00,00	HEX	IPC	34,05	Negativo
E05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	37	21,69 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
E06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	45	00,00 24,17 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
F01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	6	24,11 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
F02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	14	28,99 00,00 00,00	HEX	IPC	33,19	<i>C. coli</i>
F03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	22	00,00 00,00 00,00	HEX	IPC	34,27	Negativo
F04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	30	21,77 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
F05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	38	00,00 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	Negativo
F06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	46	24,02 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
G01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	7	00,00 00,00 22,62	HEX	IPC	00,00	<i>C. lari</i>
G02	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	15	00,00 00,00 00,00	HEX	IPC	33,83	Negativo
G03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	23	00,00 21,43 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
G04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	31	21,77 00,00 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C. coli</i>
G05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	39	00,00 00,00 21,71	HEX	IPC	00,00	<i>C. lari</i>
G06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	47	00,00 00,00 22,43	HEX	IPC	00,00	<i>C. lari</i>
H01	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	8	00,00 24,32 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
H03	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	16	00,00 22,21 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>
H04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	24	00,00 24,37 00,00	HEX	IPC	00,00	<i>C jejuni</i>

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IPC)	Resultado
H04	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	32	21,42 00,00 00,00	HEX IPC	00,00	C. coli
H05	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	40	00,00 23,28 00,00	HEX IPC	00,00	C jejuni
H06	Cy5 FAM ROX	coli jejuni lari	48	00,00 21,51 00,00	HEX IPC	00,00	C jejuni

Anexo E- Valores do Cq do PCR 3 realizado segundo o protocolo validado pelo INIAV

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
A01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	1	00,00 00,00 00,00	ROX IAC	19,23	Negativo
A02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	9	00,00 16,19 00,00	ROX IAC	18,49	C jejuni
A03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	17	17,61 00,00 00,00	ROX IAC	19,12	C. coli
A04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	25	00,00 00,00 19,15	ROX IAC	20,48	C. lari
A05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	33	20,46 00,00 00,00	ROX IAC	19,60	C. coli
A06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	41	00,00 00,00 17,36	ROX IAC	20,60	C. lari
A07	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	49	00,00 00,00 13,81	ROX IAC	19,80	C. lari
B01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	2	00,00 00,00 00,00	ROX IAC	19,48	Negativo
B02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	10	00,00 18,87 00,00	ROX IAC	20,56	C jejuni
B03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	18	21,34 00,00 00,00	ROX IAC	20,12	C. coli
B04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	26	00,00 00,00 00,00	ROX IAC	21,12	Negativo
B05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	34	00,00 17,65 00,00	ROX IAC	20,27	C jejuni
B06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	42	00,00 17,03 00,00	ROX IAC	20,06	C jejuni
B07	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	50	16,64 00,00 00,00	ROX IAC	19,53	C. coli
C01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	3	00,00 00,00 00,00	ROX IAC	19,89	Negativo
C02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	11	00,00 17,03 00,00	ROX IAC	20,38	C jejuni
C03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	19	00,00 00,00 00,00	ROX IAC	21,69	Negativo
C04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	27	00,00 27,24 00,00	ROX IAC	20,27	C jejuni
C05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	35	00,00 00,00 18,22	ROX IAC	20,09	C. lari

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
C06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	43	00,00 16,34 00,00	ROX	IAC	20,36 <i>C jejuni</i>
C07	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	Positivo	09,70 11,08 07,44	ROX	IAC	00,00 Positivo
D01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	4	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	19,31 Negativo
D02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	12	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	20,28 Negativo
D03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	20	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	20,83 Negativo
D04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	28	16,26 00,00 00,00	ROX	IAC	18,96 <i>C. coli</i>
D05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	36	00,00 19,34 00,00	ROX	IAC	19,75 <i>C jejuni</i>
D06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	44	26,23 00,00 00,00	ROX	IAC	19,51 <i>C. coli</i>
D07	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	Negativo	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	19,13 Negativo
E01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	5	00,00 16,78 00,00	ROX	IAC	18,71 <i>C jejuni</i>
E02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	13	15,27 00,00 00,00	ROX	IAC	20,49 <i>C. coli</i>
E03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	21	00,00 00,00 15,09	ROX	IAC	18,24 <i>C. lari</i>
E04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	29	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	19,54 Negativo
E05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	37	15,99 00,00 00,00	ROX	IAC	18,36 <i>C. coli</i>
E06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	45	00,00 15,35 00,00	ROX	IAC	18,55 <i>C jejuni</i>
F01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	6	17,25 00,00 00,00	ROX	IAC	18,61 <i>C. coli</i>
F02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	14	23,10 00,00 00,00	ROX	IAC	18,82 <i>C. coli</i>
F03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	22	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	18,80 Negativo
F04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	30	16,32 00,00 00,00	ROX	IAC	19,13 <i>C. coli</i>
F05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	38	17,80 00,00 00,00	ROX	IAC	24,77 <i>C. coli</i>
F06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	46	20,92 00,00 00,00	ROX	IAC	19,33 <i>C. coli</i>
G01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	7	00,00 00,00 15,49	ROX	IAC	18,53 <i>C. lari</i>
G02	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	15	00,00 00,00 00,00	ROX	IAC	19,19 Negativo
G03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	23	00,00 14,56 00,00	ROX	IAC	18,45 <i>C jejuni</i>
G04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	31	16,43 00,00 00,00	ROX	IAC	18,52 <i>C. coli</i>

Local	Fluoróforo	Alvo	Amostra	Cq	Controlo interno	Cq (IAC)	Resultado
G05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	39	00,00 00,00 16,53	ROX IAC	19,04	C. lari
G06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	47	00,00 00,00 15,22	ROX IAC	18,01	C jejuni
H01	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	8	00,00 16,32 00,00	ROX IAC	19,44	C jejuni
H03	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	16	00,00 15,41 00,00	ROX IAC	18,40	C jejuni
H04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	24	00,00 17,37 00,00	ROX IAC	18,14	C jejuni
H04	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	32	15,70 00,00 00,00	ROX IAC	17,85	C. coli
H05	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	40	00,00 17,65 00,00	ROX IAC	18,13	C jejuni
H06	HEX FAM Cy5	coli jejuni lari	48	00,00 14,73 00,00	ROX IAC	18,41	C jejuni