



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA**

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE E.COLI, COLIFORMES  
FECAIS E TOTAIS E SALMONELLA SPP. NOS ALIMENTOS**

Trabalho submetido por  
**Magda Sofia Cardoso Cordeiro**  
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública

**Novembro de 2014**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE  
PÚBLICA**

**CORRELAÇÃO ENTRE E. COLI, COLIFORMES FECAIS E  
TOTAIS E SALMONELLA SPP. EM ALIMENTOS PRONTOS A  
COMER**

Trabalho submetido por  
**Magda Sofia Cardoso Cordeiro**  
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde  
Pública

Trabalho orientado por  
**Mestre Maria Isabel da Silva Santos**

e coorientado por  
**Dr.<sup>a</sup> Maria Margarida Saraiva e Doutora Laurentina Pedroso**

**Novembro de 2014**

***“ Mais vale fazermos asneira mas avançarmos do que não fazer nada.”***

Pilar del Rio

## AGRADECIMENTOS

À Professora Mestre Maria Isabel da Silva Santos, por ter aceitado ser minha orientadora. Um eterno agradecimento por todo o apoio, incentivo, estímulo, compreensão, total disponibilidade, e principalmente por não ter desistido, sem ela não seria possível!

À Dra. Maria Margarida Saraiva, por ter aceitado coorientar esta dissertação e pela cedência dos dados para a elaboração da tese, pela revisão bibliográfica e todo o apoio prestado;

À Eng.<sup>a</sup> Anabela Santos pelo apoio e ajuda na criação de base de dados e respetiva análise estatística;

Aos elementos do Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge do Porto, pela boa disposição e amabilidade com que me receberam;

À minha mãe, pai e irmãs por todo o acompanhamento e dedicação;

A toda a minha família e amigos, aos que estão e aos que já partiram, pois todos contribuíram para a pessoa que hoje sou.

A todos um obrigado!!!

## RESUMO

As doenças de origem alimentar constituem um problema crescente em saúde pública. Na União Europeia a maioria dos surtos destas doenças são originados por *Salmonella* spp, agente que tem como *habitat* primário o trato intestinal do Homem e animais.

É internacionalmente aceite que coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* funcionam como indicadores de presença deste patogénico, no entanto, não existem evidências laboratoriais desta situação.

O objetivo deste trabalho foi averiguar se existe relação entre a presença de *Salmonella* spp., *E. coli* e coliformes fecais e totais em alimentos prontos a comer.

Os dados laboratoriais foram tratados com o *software* SPSS.

Os resultados obtidos para *E. coli* pelo Teste Exato de Fisher, apresentaram um  $P - value < 0.001$ , mostrando que as variáveis são dependentes. Através do parâmetro  $\lambda$  verificou-se uma associação muito fraca a fraca, com o valor 0,167 com erro padrão associado de 0,117. Em 68 amostras sem *E. coli* detetou-se *Salmonella* spp. (47,2%). Por outro lado, para *E. coli* positivo apenas 2 apresentaram ausência de *Salmonella* spp. (2,2 %).

No caso dos Coliformes totais, obteve-se igualmente um  $P - value < 0.001$ . A força da associação foi 0,194 com erro padrão associado de 0,041, igualmente uma associação muito fraca a fraca. Verificou-se que foi detetada *Salmonella* spp. em 13 amostras com contagens positivas de Coliformes totais (13,7%). Em 49 amostras (54,4%) os Coliformes totais foram positivos sem ter sido detetada *Salmonella* spp.

Relativamente à correlação entre Coliformes fecais e *Salmonella* spp. nada se pode concluir estatisticamente. Dado que o número de amostras positivas (54,3%) e negativas (45,7%) para Coliformes fecais é muito semelhante e se verificou sempre a presença de *Salmonella* spp, parece não existir relação entre estes dois parâmetros.

Os resultados estatísticos obtidos neste trabalho apontam para uma correlação fraca a muito fraca. Podemos concluir que os indicadores estudados não são bons indicadores da presença de *Salmonella* spp.

Palavras chave: indicadores fecais, *Salmonella* spp., doenças de origem alimentar, correlação

## ABSTRACT

The foodborne diseases are a growing public health problem. In European Union, most outbreaks of these illnesses are originated by *Salmonella* spp. This agent has the intestinal tract of man and animals as primary habitat.

It is internationally accepted that coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli* are indicators of the presence of this pathogen. However, there are no laboratory evidence of this situation.

The objective of this study was to investigate whether there is a relationship between the presence of *Salmonella* spp., *E. coli* and fecal coliforms in ready to eat foods.

Laboratory data were processed with SPSS software.

The results obtained for *E. coli* by Fisher's exact test indicated a P-value <0.001, showing that the variables are dependent. Through the parameter  $\lambda$  there has been found a weak to a very weak association with the value 0,167 with a standard error of 0,117.

In 68 samples without *E. coli*, *Salmonella* spp. was detected (47.2%). On the other hand, for positive *E. coli* only 2 samples showed absence of *Salmonella* spp. (2.2%).

In the case of total coliforms was obtained also a P-value <0.001. The strength of the correlation was 0,194 with a standard error of 0,041 associated, is also a weak to a very weak association. It was found that *Salmonella* was detected in 13 samples with positive total coliform counts (13.7%). In 49 samples (54.4%) total coliforms were positive without being detected *Salmonella* spp.

Regarding the correlation between fecal coliforms and *Salmonella* spp. nothing can be concluded statistically. Since the number of positive samples (54.3%) and negative (45.7%) for fecal coliforms is very similar and always showed the presence of *Salmonella* spp. it seems that no relation exists between these two parameters.

The statistical results of this study indicate a weak to a very weak correlation. We can conclude that the studied indicators are not good indicators of the presence of *Salmonella* spp..

Key words: fecal indicators, *Salmonella* spp., foodborne disease, correlation.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	3
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	5
ÍNDICE GERAL .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
I. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 ENQUADRAMENTO .....	11
1.2 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR .....	15
1.3 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR NA EUROPA .....	20
1.3.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR NA EUROPA ATRIBUÍDAS A <i>SALMONELLA</i> .....	21
1.3.2 CASOS HUMANOS DE SALMONELOSE A NÍVEL DA UNIÃO EUROPEIA .....	22
1.3 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR EM PORTUGAL .....	23
1.3.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR EM PORTUGAL ATRIBUÍDAS A <i>SALMONELLA</i> .....	24
1.3.2 CASOS HUMANOS DE SALMONELOSE EM PORTUGAL .....	25
1.4 CONTROLO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. ....	26
1.5 INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE SEGURANÇA ALIMENTAR .....	27
1.5.1. GRUPO COLIFORMES TOTAIS .....	29
1.5.2 GRUPO COLIFORMES FECAIS .....	30
1.5.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	30
1.5.4 Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	31
1.5.5 <i>SALMONELLA</i> SPP. ....	32
1.6 OBJETIVOS .....	33
II- MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.1 Pesquisa de Bactérias Coliformes .....	35
2.2 CONTAGEM DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	35
2.3 PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. ....	37
2.4 TRATAMENTO DOS DADOS .....	40

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	42
V. BIBLIOGRAFIA.....	49
VI. ANEXOS .....	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de surtos de <i>Salmonella</i> spp. no período de 2008-2012 (Fonte: EFSA 2010-2014).....	22
Figura 2. Evolução dos casos humanos ligados aos surtos (Fonte: EFSA 2010-2014).....	22
Figura 3. Número de casos de salmonelose ocorridos na União Europeia no período 2008-2012. (Fonte: EFSA 2010-2014).....	23
Figura 4. Número de casos confirmados de salmonelose atribuídos a <i>Salmonella</i> spp. em Portugal no período 2007-2012 (Fonte: adaptado de EFSA 2009-2014).....	26
Figura 5. Transmissão dos microrganismos por via fecal-oral (Fonte: Anónimo, 2011).....	27
Figura 6. Relação ideal entre um microrganismo indicador e o patogénico associado; o indicador deve existir em níveis mais elevados do que o patogénico durante a existência deste (Fonte: Jay et al., 2005).....	28
Figura 7. Frequência dos Resultados globais de todas as amostras para <i>E. coli</i> , Coliformes totais e Coliformes fecal.....	43
Figura 8 Frequência dos resultados de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> .....	44
Figura 9 Frequência dos resultados de <i>Salmonella</i> spp. e Coliformes totais.....	45
Figura 10 Frequência das amostras que apresentaram presença ou ausência de Coliformes fecais.....	46

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores que aumentam a suscetibilidade do hospedeiro (Fonte: IFT, 2002).....	16
Tabela 2. Número estimado anual de casos de doenças de origem alimentar, hospitalizações e mortes causados por 31 patogênicos e agentes desconhecidos nos Estados Unidos da América (Fonte: Scallan <i>et al.</i> , 2011b).....	19
Tabela 3. Surtos investigados pelo INSA nos quais foi identificado o agente causal, 2008-2013 (Fonte: adaptado de Correia <i>et al.</i> , 2013 e Viegas <i>et al.</i> , 2014)..	24
Tabela 4. Surtos por <i>Salmonella</i> spp. no período de 1993-2000 (Fonte: adaptado de 7º e 8º relatório da WHO).....	25
Tabela 5. Força da associação entre as variáveis.....	41
Tabela 6. Resumo dos valores obtidos pela Estatística Descritiva dos Indicadores Fecais.....	42
Tabela 7. Alimentos que estiveram na origem de toxinfecções alimentares.....	57
Tabela 8 Alimentos que não estiveram na origem de toxinfecções alimentares.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG:	Agar Glucosado
ASAE:	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
APT:	Água peptonada tamponada
BSE:	Bovine spongiform encephalopathy
BPF:	Boas Práticas de Fabrico
CE:	Comissão Europeia
DOA:	Doenças de Origem Alimentar
DGV:	Direção Geral de Veterinária
BPL:	Boas Práticas de Laboratório
ECDC:	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EUA:	Estados Unidos da América
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i>
FOS:	<i>Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases</i>
HACCP:	<i>Hazard Analyses Critical and Control Point</i>
HSU:	Síndrome Hemolítico Urémico <del>Hemolítico</del>
IFT:	<i>Institut of Food Technologists</i>
MKTTn.T	<i>Muller-Kauffmann tetrarationato e novobiocina</i>
NA:	Agar Nutritivo
NMP:	Número Mais Provável
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PIGA:	Plano de Inspeção de Géneros Alimentícios
Rpm:	Rotações por minuto
RVS-T	<i>Rappaport Vassiliadis soja</i>
SMID	Gélose chromID <sup>TM</sup> Salmonella
TS:	Triptona Salina
UE:	União Europeia
VTEC:	<i>Escherichia coli</i> produtor de verotoxina
VB:	Verde Brilhante
VRBL:	<i>Violet Red Bile Lactose Agar</i>
VRBG:	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>
XLD:	<i>Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar</i>
WHO:	<i>World Health Organization</i>

## **I. INTRODUÇÃO**

### **1.1 ENQUADRAMENTO**

É um direito básico de todo o ser humano que os alimentos que consome sejam seguros e próprios para consumo e permitam incrementar a sua saúde (World Health Organization (WHO), 2002).

Ao longo dos tempos, o conceito de Segurança Alimentar evoluiu lado a lado com a evolução do homem, da alimentação e da Ciência. Numa visão mais primitiva este conceito estava relacionado com a disponibilidade de alimentos para garantir a vida, enquanto numa perspetiva mais recente implica a garantia de que os géneros alimentícios ingeridos pelo Homem não irão causar danos à sua saúde. Esta visão acarreta que os alimentos sejam controlados ao longo de toda a Cadeia Alimentar, “Do prado ao prato”, ou seja, desde a exploração primária e a produção de alimentos até à venda ou fornecimento de géneros alimentícios, uma vez que cada etapa pode ter um impacto potencial nessa segurança (Mendes, 2004; Kennedy & Busta, 2007).

Nos dois últimos séculos as dietas alimentares sofreram profundas transformações fundamentalmente nos países ricos, relacionadas, em grande parte, com a revolução agroindustrial no século XIX, que proporcionou os conhecimentos fundamentais para produzir e consumir produtos alimentares cada vez mais sofisticados.

A modernização da agricultura resultante da aplicação dos avanços científicos nesta área, nomeadamente o recurso a equipamentos mecânicos e automáticos, o melhoramento genético e o desenvolvimento de fertilizantes e de pesticidas permitiu um aumento da produção, garantido assim melhores alimentos a um melhor preço. Este tipo de produção agrícola promoveu a industrialização das sociedades que eram maioritariamente agrícolas, estimulando assim a economia e conduzindo a uma crescente urbanização (Schmidhuber & Shetty, 2005).

Como consequência do que foi dito, os hábitos alimentares e os estilos de vida também se alteraram. Anteriormente os alimentos consumidos eram de produção local, apresentavam baixo risco de contaminação e eram saudáveis. O modo de vida moderno, com a maior participação da mulher no mercado de trabalho permitiu, por um lado a melhoria dos padrões de vida e um aumento ao acesso aos serviços, por outro lado, o tempo disponível para preparar refeições diminuiu tendo vindo a ocorrer consequências

negativas em termos de padrões alimentares inadequados (Moreira & Padrão, 2004; Nishida, Shetty & Uauy, 2004; Santos & Cunha, 2007; Viana, Santos & Guimarães, 2008; Raymundo, 2013). Hoje em dia, num mercado globalizado, encontra-se à disposição dos consumidores uma enorme diversidade de alternativas que facilitam a vida das famílias quer se trate de alimentos adquiridos já preparados e prontos a consumir, quer para preparações em casa, cantinas, restaurantes e estabelecimentos de *fast-food*. Estes avanços possibilitam a disponibilidade de uma grande variedade de alimentos e introduzem novos sabores e experiências de degustação mas também causam algumas preocupações, quer do ponto de vista nutricional, uma vez que é frequente o recurso a alimentos ricos em calorias, quer do ponto de vista da segurança alimentar (Santos & Cunha, 2007; Kent-Smith, 2013).

Com efeito, tem-se verificado um aumento do número de DOA na segunda metade do século XX (Santos & Cunha, 2007; WHO, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ao longo dos tempos os perigos alimentares têm sido referidos como um problema para a saúde do ser humano.

Atualmente existe um grande esforço por todo o Mundo, no sentido de promover a melhoria contínua da segurança da cadeia alimentar, porém a ocorrência de DOA continua a ser um problema significativo de saúde pública, quer nos países desenvolvidos quer nos países em vias de desenvolvimento. Estima-se que anualmente, 1,8 milhões de pessoas morram devido a doenças diarreicas, que, na maioria dos casos, estão diretamente ligadas a alimentos e/ou água contaminados (OMS, 2006). A maioria destas doenças são originadas por microrganismo patogénicos e é habitual serem denominadas toxinfecções alimentares (Veiga *et al.*, 2009). Existem mais de 200 doenças conhecidas que são transmitidas através dos alimentos (WHO, 2014).

A OMS adverte ainda para a importância da formação dos operadores da cadeia alimentar, no que respeita à responsabilidade dos mesmos na Segurança Alimentar. As investigações epidemiológicas permitem evidenciar que embora a origem da contaminação dos géneros alimentícios possa ocorrer em qualquer ponto da cadeia de fabrico uma grande maioria tem origem por práticas incorretas nas últimas fase do processamento em casas particulares ou serviços de restauração. Assim, as boas práticas de higiene (BPH) são de fulcral importância para a segurança alimentar. O risco da ocorrência de uma toxinfecção alimentar aumenta quando os alimentos se destinam a ser consumidos por segmentos da população com o sistema imunitário mais vulnerável como é o caso de crianças com menos de 5 anos de idade, idosos, grávidas e

imunocomprometidos. Como consequência, a educação da população no sentido de aumentar a consciência sobre os riscos da segurança alimentar é fundamental para prevenir o aparecimento destas doenças. Nesse sentido, no início dos Anos 90, a OMS publicou *The Ten Golden Rules for Safe Food Preparation*, permitindo assim melhorar a segurança dos géneros alimentícios. Estas regras podem ser adotadas como medidas de prevenção e facilitar a diminuição da ocorrência de toxinfecções alimentares:

1. Cozinhar completamente os alimentos crus;
2. Consumir o mais breve possível os alimentos após a confeção;
3. Preparar apenas uma refeição ou conservar os alimentos preparados a temperaturas seguras e reaquecer a uma temperatura homogénea pelo menos de 70 °C;
4. Evitar o contacto de alimentos crus e cozinhados;
5. Escolher alimentos em conserva para garantir a segurança em casos de emergência;
6. Lavar as mãos sempre que necessário e repetidamente;
7. Manter todas as superfícies e utensílios que contactem com os alimentos devidamente higienizados;
8. Utilizar sempre água potável;
9. Selecionar cuidadosamente os alimentos;
10. Amamentar as crianças pequenas (Wisner & Adams, 2002).

Em 2006 foi publicado o documento as “Cinco Chaves para uma Alimentação mais Segura” de modo a tornar mais simples e de mais fácil apreensão a mensagem constante do documento anteriormente referido: 1) Manter a limpeza; 2) Separar os alimentos crus dos alimentos cozinhados; 3) Confeccionar bem os alimentos; 4) Manter os alimentos a temperaturas seguras; 5) Utilizar água e matérias-primas seguras (OMS, 2006).

Por outro lado, e como consequência das crises e escândalos alimentares que têm ocorrido nas últimas décadas nomeadamente a elevada prevalência de *Salmonella* Enteritidis nos ovos, *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE), *Listeria monocytogenes* em queijos de pasta mole, dioxinas e nitrofuranos em carne de frango entre outras, os consumidores têm vindo a formar uma progressiva consciência crítica, apercebendo-se cada vez melhor das consequências que alguns perigos específicos veiculados na sua alimentação podem ter sobre a sua saúde (Anónimo, s.d; Fernandes, Silva & Ramalhosa 2012).

No sentido de reforçar, melhorar e desenvolver os sistemas de segurança alimentar e aumentar os níveis de confiança dos consumidores a União Europeia (UE) reformulou a legislação e criou uma bordagem global e integrada da cadeia alimentar. Assim, em Abril de 1997, é publicado um documento de reflexão e debate sobre os Princípios Gerais da Legislação Alimentar da UE – Livro Verde COM (97) 176 por parte da Comissão Europeia (CE). Este documento deu origem em Janeiro de 2000 ao Livro Branco sobre segurança alimentar com propostas de ação comunitária referentes a segurança alimentar, que se refletiram mais tarde na publicação do Regulamento (CE) N.º 178/2002. Este Regulamento estabelece os princípios gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Com estes documentos foram estabelecidas as bases metodológicas que dão suporte à execução de uma política integrada de Segurança Alimentar ao nível da UE (Mendes, 2004).

Assim, os operadores do setor alimentar, por imposição da legislação e com o objetivo de corresponder às exigências dos consumidores por uma alimentação segura, adotaram um sistema preventivo de segurança alimentar. O sistema adotado foi o *Hazard Analyses and Critical Control Point* (HACCP), sistema de controlo preventivo da segurança alimentar, identificando os perigos e as medidas preventivas a adotar para controlar esses mesmos perigos ao longo de todas as etapas de produção, apresentando uma abordagem sistemática, documentada e passível de ser verificada (Panisello, Rooney, Quantick & Stanwell-Smith, 2000; *Codex Alimentarius Commission* (CAC), 2003; Pedroso, 2009; Surak, 2009). Assim, tendo em vista a Segurança Alimentar, tem ocorrido um aumento da procura de indicadores que avaliem, precocemente e de modo eficaz, pontos críticos de controlo. Deste modo, poderão ser identificados e detetados precocemente alterações no processamento, manuseamento e conservação dos alimentos, que interfiram na segurança, higiene e/ou qualidade do produto, garantindo assim a proteção da saúde dos consumidores, tendo como principal objetivo a segurança alimentar.

Neste contexto, os indicadores microbiológicos, podem dar preciosas informações sobre a eficácia dos processamentos utilizados. Refletindo as boas práticas agrícolas (BPA), BPH e de fabrico (BPF).

A identificação e o conhecimento dos indicadores microbiológicos é muito importante na:

1. Monitorização do processo;

2. Constituição de uma base de dados microbiológicos possibilitando a melhoria contínua dos processos;

3. Definição do tempo de vida de prateleira do produto

De um modo geral os indicadores microbiológicos podem fornecer indicações sobre a qualidade ou sobre a segurança dos produtos alimentares. Na indústria alimentar é comum tomarem-se as contagens de microrganismos aeróbios totais, enquanto indicadores de alteração de higiene dos processos e dos produtos, e conseqüentemente dos prazos de validade.

Acresce que, normalmente, a presença dos indicadores microbiológicos de higiene em alimentos em níveis superiores aos admissíveis, não indicam a presença de microrganismos patogénicos. Porém, podem ser considerados indicadores da possível presença de patogénicos (Jay, Loessner & Golden, 2005).

## **1.2 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR**

As DOA resultam do consumo de alimentos contaminados com níveis inaceitáveis de qualquer agente químico, biológico, físico ou outra substância, não intencionalmente adicionada ao alimento com capacidade de provocar dano na saúde. O consumo deste tipo de alimentos, para além de um risco para a saúde dos consumidores pode ainda levar a consideráveis perdas económicas individuais ou nacionais.

As DOA podem definir-se como doenças de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos (WHO, 2013a).

Relativamente a intoxicações por perigos de natureza química, devido ao tempo, geralmente longo que decorre entre a exposição e a manifestação do efeito é difícil atribuir ao alimento que a doença é causada por agentes químicos nele presente. Estes agentes podem ter origem em poluentes do meio ambiente (cádmio, chumbo, mercúrio, bifenilos policlorados, etc), práticas agrícolas (pesticidas, resíduos de medicamentos veterinários), compostos naturais (glicosídeos cianogénicos, micotoxinas, ficotoxinas, etc) e do processamento de alimentos a partir da alteração de ingredientes naturais (aminas heterocíclicas, acrilamida ou cloropropanodios) (EFSA, 2012).

As DOA provocadas por microrganismos (bactérias, vírus e parasitas) são as mais frequentes, estimando-se que sejam cerca de 90% da totalidade destas situações.



Praticamente todos os alimentos apresentam algum nível de microrganismos mas a transmissão de patogênicos aos consumidores, como já referido, resulta, na maioria dos casos, da utilização de práticas incorretas nas últimas etapas da confecção ou distribuição (Veiga et al., 2009).

Estas doenças, para além dos sintomas mais frequentes de gastroenterite (vômitos e diarreia) podem de igual modo causar sintomas sistêmicos agudos incluindo febre, aborto, meningite, anemia, insuficiência renal, entre outros. Em função de fatores relacionados com a dieta, o hospedeiro e o tipo e quantidade de microrganismos ingeridos o risco e a severidade da DOA são variáveis, desde situações auto-limitantes que não requerem cuidados especiais até doenças severas que requerem cuidados médicos, ou hospitalização prolongada podendo deixar sequelas ou mesmo causar a morte (Rocourt, Moy, Vierk & Schlundt, 2003; Pedroso, 2005). Para além dos sintomas agudos alguns patogênicos podem originar sequelas crônicas que se estima que ocorram em 2% a 3% do total de DOA e incluem o Síndrome Hemolítico Urémico (HSU) em infecções por *Escherichia coli* VTEC, o Síndrome de Guillain Barré por *Campylobacter jejuni*, a artrite reativa após infecção por *Salmonella* spp. e a encefalite crônica após toxoplasmose (McDowel & MCElvaine, 1997; Lindsay, 1997).

Ainda que qualquer pessoa possa contrair DOA a suscetibilidade é mais elevada em situações que diminuam as defesas do hospedeiro. Assim, a morbidade e mortalidade é mais elevada em alguns segmentos da população com o sistema imunitário mais vulnerável, como é o caso das crianças, idosos, grávidas, doentes transplantados, doentes submetidos a quimioterapia e pessoas com doenças imunológicas congénitas ou adquiridas (Tabela 1) (Institut of Food Technologists (IFT), 2002).

É importante referir que o espectro das DOA se modifica com frequência verificando-se que a prevalência de determinadas doenças varia ao longo do tempo. Doenças que eram bastante frequentes há um século atrás como a febre tifoide, e a cólera encontram-se agora controladas como resultado de medidas de higiene implementadas nomeadamente pasteurização do leite, desinfeção da água e fabrico de conservas seguras.

Por outro lado surgem outras DOA provocadas por agentes recentemente descobertos como *Cyclospora* e VTEC ou por aqueles que adquirem novas competências como *Salmonella* Enteritidis com capacidade de sobreviver em produtos de baixa  $a_w$  como é o exemplo das amêndoas. São os denominados microrganismos emergentes. Estes

microrganismos surgem como resultado de diversos fatores sendo que quase todos se relacionam com a globalização que leva a que um produto contaminado possa causar doença em vários países.

Tabela 1 - Fatores que aumentam a suscetibilidade do hospedeiro (Fonte: IFT, 2002)

<b>Fatores Gerais</b>	<b>Fatores Específicos</b>	<b>Motivos</b>
Idade	Idade inferior a 5 anos	Sistema imunitário não desenvolvido,
	Idade superior a 50 ou 60 anos (depende do patogénico)	baixa dose infecciosa por peso necessária Sistema imunitário a falhar, enfraquecido por danos crónicos, ocorrendo cerca dos 50 aos 60 anos de idade
Populações sensíveis	Grávidas	Imunidade alterada durante a gravidez
	Pessoas hospitalizadas	Sistema imunitário enfraquecido por outras doenças ou lesões, ou em risco de exposição a estirpes resistentes a antibióticos
	Detenção de certos antigénios facilmente duplicados ou imitados pelos microrganismos	Predisposição para doenças crónicas (sequelas)
Condições médicas subjacentes	Infeções concomitantes	Sistema imunitário sobrecarregado ou danificado
	Consumo de antibióticos	Alteração da microbiota normal intestinal
	Excesso de ferro no sangue	Ferro no sangue utilizado como nutriente por certos microrganismos
	Função hepática/renal reduzida (alcoolismo)	Capacidade digestiva reduzida, alteração da concentração sanguínea de ferro
	Remoção cirúrgica de porções do estômago ou intestino	Redução no sistema normal de defesa contra a infeção
	Pessoas imunocomprometidas incluindo as que fazem quimioterapia por radiação; transplantados de órgãos que tomam drogas imunossupressoras; pessoas com leucemia, SIDA ou outras doenças	Sistema imunitário inadequado para prevenir infeção

IFT: *Institute of Food Technologists*

Entre esses fatores podemos nomear: mudanças na produção e distribuição dos géneros alimentícios, alterações demográficas e de comportamento humano, mudanças na população nomeadamente o aumento de idosos e imunocomprometidos, adaptação dos microrganismos e modificações na ecologia microbiana e desenvolvimento das

tecnologias laboratoriais (IFT, 2002; Veiga *et al.*, 2009; Harris, Uesugi, Abd & McCarthy, 2012).

Embora as DOA ocorram diariamente quer em países desenvolvidos quer em países em vias de desenvolvimento, a verdadeira incidência não é conhecida visto que a maioria dos casos não é reportada. Apesar de todos os esforços de concertação estratégica à escala mundial para implementação de soluções efetivas, verifica-se que estas se têm apresentado ineficazes (WHO, 2013b). Já em 2000, a OMS, na sua 53<sup>a</sup> Assembleia Mundial de Saúde, tomou a resolução dos seus membros considerarem a segurança alimentar uma prioridade essencial em saúde pública e de providenciar ações para promover uma estratégia a nível global no sentido de minimizar os efeitos das DOA. O objetivo era reduzir o fardo que estas situações representam para a saúde e a sociedade (WHO, 2002). Em 2006 através do *Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases* (FOS) promoveu um encontro de peritos no sentido de se estimar o peso das DOA, a incidência e prevalência da morbilidade e mortalidade associadas com doenças crónicas e agudas transmitidas pelos alimentos (WHO, 2007). O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) é um dos parceiros da OMS nesta iniciativa, tendo promovido em 2009, um estudo que cobre 30 países e mais de 49 doenças infecciosas das quais pelo menos 18 são transmitidas por alimentos e que deverá estar concluído em 4 anos (Kuchenmuller *et al.* 2009).

Apenas um pequeno número de casos de DOA chegam ao conhecimento das autoridades de saúde dado que os sintomas apresentados são muitas vezes ligeiros e autolimitantes e a pessoa infetada não procura auxílio médico ou, mesmo quando se recorre ao médico, muitas vezes quer o doente quer o próprio médico não estão sensibilizados para a investigação do agente etiológico e do alimento envolvido (Pedroso, 2005; Adams & Moss, 2008; Forsythe, 2010).

As estimativas de DOA podem ser utilizadas para dirigir uma política de segurança alimentar e assim são úteis para a alocação de recursos e a priorização das intervenções. Nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que ocorram 47,8 milhões de casos de DOA anualmente sendo que 9,4 milhões são provocados por agentes patogénicos conhecidos (31 agentes) dos quais 5,5 milhões são causados por vírus, 3,6 por bactérias e 0,2 por parasitas (Tabela 2). Os patogénicos mais frequentemente implicados são norovirus (58%) seguido por *Salmonella* spp. (11%). A principal causa de morte é *Salmonella* spp (28%), *Listeria monocytogenes* (19%) e

norovirus (11%). Os agentes desconhecidos, estima-se que estão na origem de 38,4 milhões de casos (Scallan *et al.*, 2011a; Scallan *et al.*, 2011a e 2011b).

Tabela 2 - Número estimado anual de casos de doenças de origem alimentar, hospitalizações e mortes causados por 31 patogénicos e agentes desconhecidos nos Estados Unidos da América (Fonte: Scallan *et al.*, 2011b)

<b>Causa</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Hospitalizados</b>	<b>Mortes</b>
Agentes patogénicos conhecidos (31)*	9 388 075	55 961	1 351
Agentes patogénicos desconhecidos**	38 392 704	71 878	1 686
Total	47 780 779	127 839	3 037

\*Os 31 patogénicos conhecidos são astrovirus, *Bacillus cereus*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *E. coli* (ETEC), *E. coli* (STEC) O157, STEC non-O157, *E. coli* outros não STEC e ETEC, *Giardia intestinalis*, virus da hepatitis A, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, norovirus, rotavirus, sapovirus, *Salmonella* spp., *S. enterica* serotype Typhi, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. grupo A, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella* spp., *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, outros *Vibrio* spp., e *Yersinia* spp.

\*\* Patogénicos desconhecidos são agentes que causam gastroenterite e não estão incluídos nos 31 principais agentes conhecidos listados acima. Incluem agentes conhecidos com dados insuficientes para estimar o caso de doença como provocado por agente conhecido, microrganismos que ainda não foram reconhecidos como agentes de DOA, químicos e outras substâncias que se sabe estarem presentes nos alimentos mas cuja patogenicidade não está provada e o agente não foi ainda descrito.

Na Austrália, Inglaterra e País de Gales o principal agente de DOA é *Salmonella* spp. (Scallan *et al.*, 2011a).

Durante o período de 2009-2010, foram registados, nos EUA, 1 527 surtos de DOA que originaram 29 444 casos de doença, 1 184 hospitalizações e 23 mortes. Os surtos confirmados laboratorialmente e que tiveram na sua origem um único agente foram 790 e norovirus foi o agente mais frequente contribuindo para 42% desses surtos. *Salmonella* spp. foi o segundo agente sendo responsável por 31% dos surtos. (Gould *et al.*, 2013).

Ao nível da Europa, segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), na UE estima-se que são reportados cerca de 320 000 casos de DOA a cada ano, no entanto o número real é muito superior. (EFSA, 2014a).

Os surtos DOA nos últimos anos ganharam dimensão internacional sendo, muitas vezes, associados aos períodos de férias, uma vez que muitos dos destinos

escolhidos são países tropicais com estatutos sanitários mais deficientes. Também a importação de géneros alimentícios conduz ao aumento de DOA e disseminação de estirpes por regiões do mundo onde eram pouco habituais. Embora nas últimas décadas tenham ocorrido grandes desenvolvimentos quer ao nível da tecnologia quer ao nível da higiene alimentar e tenham sido implementadas medidas legislativas para o controlo e segurança dos géneros alimentícios, a verdade é a incidência das DOA reportadas tem vindo a aumentar em muitos países (Clark, Sharp & Reilly, 2000). Muitas destas doenças são devidas aos denominados microrganismos patogénicos emergentes que têm vindo a surgir devido às profundas alterações ocorridas na sociedade atual, nomeadamente práticas agrícolas intensivas, globalização do comércio a nível mundial, aumento da população mais suscetível como idosos e doentes crónicos, evolução dos próprios microrganismos e desenvolvimento das tecnologias laboratoriais (Tauxe, 1997; Santos & Campos, 2007).

### **1.3 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR NA EUROPA**

Anualmente a EFSA e o ECDC publicam um relatório sobre a ocorrência de zoonoses e DOA na Europa, através da compilação e análise dos dados enviados pelos Estados Membros (EM). Um dos principais objetivos da EFSA é contribuir para a avaliação do risco e prevenir a incidência de DOA, através da identificação dos géneros alimentícios responsáveis, assim como dos fatores que contribuem para a ocorrência destas situações (EFSA, 2014b).

Os surtos de DOA são qualificados de “evidência forte” quando existe evidência inequívoca da responsabilização de um determinado alimento como por exemplo a deteção do agente causal nesse alimento combinada com a deteção nos caso humanos ou sintomatologia compatível e “evidência fraca” quando nenhum alimento em particular é suspeito e as evidências para implicar um determinado alimento são fracas. As evidências podem ser epidemiológicas ou microbiológicas / laboratoriais (EFSA, 2011a).

Em 2012 ocorreram 5 363 surtos tendo havido um decréscimo de 5,0% relativamente a 2011. Os surtos de “evidência forte” foram 763 enquanto os de “evidência fraca” foram 4 600. Foram reportados 55 453 casos humanos relativos ao total de surtos, 5 118 hospitalizações e 41 mortes (EFSA, 2014b).

O primeiro agente responsável por DOA continuou a ser *Salmonella* spp. (28,6%), tendo ocorrido um ligeiro aumento relativamente a 2011, após um decréscimo progressivo de 2008 a 2011. Tal como no ano anterior o segundo agente mais frequente foram toxinas bacterianas (14,5%), seguidas por vírus (14,1%) e *Campylobacter* (9,3%). O número de surtos em que não foi detetado o agente responsável foi bastante elevado de 1 478 (27,6%), valor comparável com o do ano anterior.

Os principais alimentos implicados, como tem vindo a ser habitual, foram ovos e produtos à base de ovos, responsáveis por 168 surtos (22,0%), seguidos das refeições mistas (15,6 %), peixe e produtos à base de peixe (9,2 %). Relativamente aos locais de ocorrência, foram as casa particulares (39,7%) os locais mais frequentes, seguidas por restaurantes/cafés/pubs/bares/hotéis.

### **1.3.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR NA EUROPA ATRIBUÍDAS A *SALMONELLA***

Relativamente ao agente *Salmonella* verificou-se que foram 1 533 os surtos atribuídos a este agente, que originaram 11 895 casos humanos dos quais resultaram 2 283 hospitalizações e 10 casos mortais. Tal como em anos anteriores *S. Enteritidis* foi o serovar mais frequente sendo responsável por 179 surtos (51,6 % de todos os surtos de “evidência forte” por *Salmonella* ) e 2 177 casos humanos (37,6 % de todos os casos nos surtos por *Salmonella*). O serovar *S. Typhimurium* foi associado a 49 surtos (14,1 % de todos os surtos de “evidência forte” por *Salmonella*) e 792 casos humanos (13,7 % de todos os casos por *Salmonella*). O serovar foi desconhecido ou não reportado em 97 surtos de “evidência forte” (EFSA, 2014b).

No que respeita aos alimentos implicados nos surtos de “evidência forte” verificou-se, tal como em anos anteriores, que ovos e produtos derivados foram o tipo de alimento mais frequentemente implicado, 45,2 % dos surtos. Esta percentagem foi mais baixa de que em 2011 (50,5 %) mas semelhante a 2010 (43,7 %) e anos anteriores. O segundo tipo de alimento mais frequentemente implicado foi queijo (7,8% dos surtos de “evidência forte”), seguido por refeições mistas (7,2 %) (EFSA, 2014b).

Acresce ainda referir que foram 179 os surtos de “evidência forte” originados por *S. Enteritidis*, a maioria dos quais foram atribuídos a ovos e produtos derivados. Deste modo, verificou-se que 66,7% os surtos associados com ovos e produtos derivados foram originados por *Salmonella* Enteritidis, 6,5% por *Salmonella*

Typhimurium e 20,2% por outros serovares. Nas refeições mistas este género foi responsável por 21,0% dos surtos, no peixe e derivados 11,4%, 8,6% nos crustáceos, moluscos, marisco e derivados, 23,1% em vegetais e 29,3%, em produtos de origem não animal (EFSA, 2014b).

A figura 1 mostra a evolução do número de surtos atribuídos a *Salmonella* spp. no período de 2008-2012, enquanto a figura 2 representa a evolução dos casos ligados a estes surtos no mesmo período.

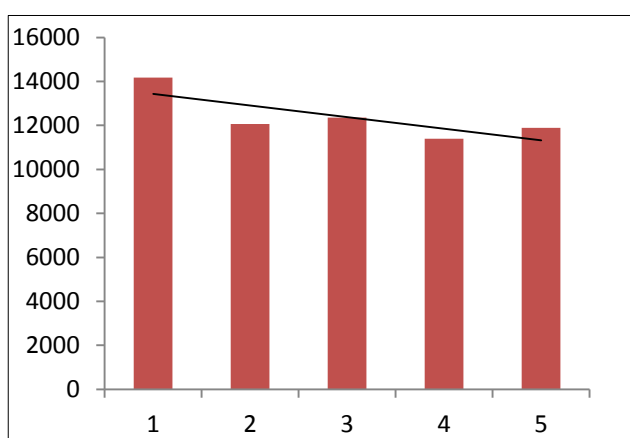


Figura 1 Número de surtos de *Salmonella* spp. no período de 2008-2012 (Fonte: EFSA2010-2014)

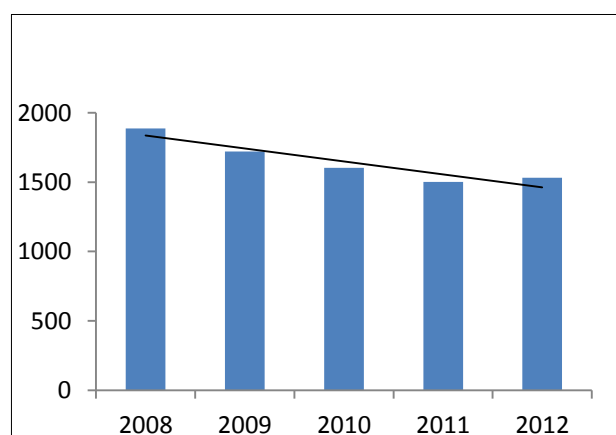


Figura 2 Evolução dos casos humanos ligados aos surtos (Fonte: EFSA2010-2014)

### 1.3.2 CASOS HUMANOS DE SALMONELOSE A NÍVEL DA UNIÃO EUROPEIA

A análise dos relatórios permite verificar que a campilobacteriose é a zoonose mais frequente a nível da UE, seguida da salmonelose. Em 2012 o número de casos humanos de salmonelose diminuiu em 4,75% relativamente a 2011, tendo-se verificado a ocorrência de 91 034 casos. Têm-se vindo a observar um decréscimo estatisticamente significativo dos casos atribuídos a *Salmonella* spp. desde 2008. Este decréscimo do número de casos está relacionado com o sucesso dos programas de controlo implementados para reduzir a prevalência de contaminação a nível das aves. A figura 3 mostra o número de casos de salmoneloses ocorridos na UE de 2008 a 2012 permitindo observar a tendência decrescente (EFSA, 2010; EFSA, 2011a; EFSA, 2012b; EFSA, 2013; EFSA, 2014b).

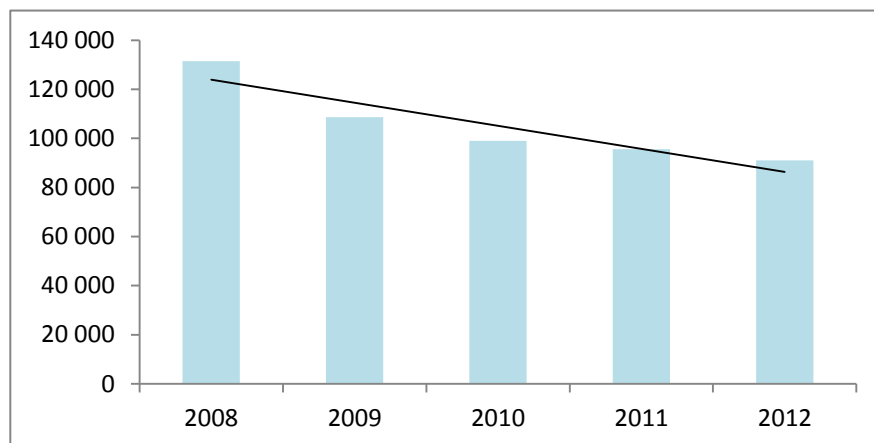


Figura 3 Número de casos de salmonelose ocorridos na União Europeia no período 2008-2012

### 1.3 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR EM PORTUGAL

Em Portugal não existe um sistema de vigilância epidemiológica implementado e, por consequência, os dados existentes relativos a DOA são muito escassos, não revelando a verdadeira dimensão do problema no país. Os dados que têm sido publicados internacionalmente nos relatórios da EFSA e anteriormente nos relatórios da OMS, foram apenas os que chegaram ao conhecimento dos laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, I.P.) (Lisboa e Porto). Nos 7º e 8º Relatórios do *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe* foram publicados os dados relativos ao período de 1993 a 2000 (WHO, 2001; WHO, 2003). Relativamente aos anos 2001 a 2003 não existem dados publicados mas a partir 2004 todos os dados que chegam ao INSA são publicados nos relatórios da EFSA. A análise desses dados permitem concluir que entre 2004 e 2012 ocorreram 101 surtos que afetaram 1 206 pessoas das quais 289 foram hospitalizadas.

Em 2013 e 2014 o INSA publicou uma compilação de dados relativos ao período 2008-2013, os quais se encontram compilados na tabela 3 (Correia *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014).



Tabela 3 - Surtos investigados pelo INSA nos quais foi identificado o agente causal, 2008 -2013 (Fonte: adaptado de Correia et al, 2013 e Viegas *et al.*, 2014)

	Ano						Total
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Surtos	14	11	4	8	7	10	<b>54</b>
Casos	139	251	56	101	135	183	<b>865</b>
Hospitalizados	92	90	0	1	1	17	<b>201</b>
Óbitos	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

O número de surtos nos quais não se detetou o agente foi de 4,6% no período de 2008 a 2011 enquanto em 2013 foi de 10,0%. No mesmo ano na UE o número de desconhecidos correspondeu a 27,6%. O agente mais frequentemente isolado foi enterotoxina estafilocócica e/ou estafilococos coagulase positiva seguido de *C. botulinum*. Em 2013, pela primeira vez, ocorreram dois surtos atribuídos a Norovírus. Relativamente aos produtos onde foi mais frequentemente identificado o agente foram as refeições mistas seguidas dos bolos de pastelaria. No que respeita aos locais de ocorrência dos surtos, verificou-se que no período de 2008 a 2011 foram as casas particulares o local mais frequente (30,0%). No ano de 2013 o local mais frequente correspondeu a cantinas (35%) (Correia *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014).

### 1.3.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR EM PORTUGAL ATRIBUÍDAS A *SALMONELLA*

No período de 2008-2011, os surtos nos quais se detetou o agente *Salmonella* spp. foram seis. Em 2012 e 2013 não foi detetado este agente em nenhum dos surtos investigados (Correia *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014). Os relatórios da EFSA permitem-nos verificar que destes seis surtos, dois ocorreram em 2008, os quais envolveram 45 casos com cinco hospitalizações, em 2009 três que envolveram 45 casos com 35 hospitalizações e em 2010 1 surto com 6 casos sem hospitalizações (EFSA,

2010; EFSA, 2011b; EFSA, 2012b). Entre 2004 e 2007 o formato dos relatórios não permite retirar a informação dos surtos atribuídos a *Salmonella* spp. por país (EFSA, 2006; EFSA, 2007a; EFSA, 2007b; EFSA, 2009). Contudo em 2005 o relatório faz referência a um surto ocorrido em Portugal, num jardim infantil, que envolveu 140 casos 20 dos quais foram hospitalizados. Foi isolada *S. Enteritidis* numa refeição cozinhada de peixe sendo a contaminação originada por deficiente manipulação na preparação da refeição (EFSA, 2007a).

Acresce ainda referir que Santos (2009a), refere que no período de 2004 a 2007 ocorrerem 20 surtos por *Salmonella* Enteritidis isoladamente mais dois por *Salmonella* Enteritidis associada a outros agentes e um com *Salmonella* spp. com outros agentes perfazendo um total de 23 surtos.

Se nos debruçarmos sobre anos anteriores, pela análise dos 7º e 8º Relatórios do *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe* encontramos os dados que se encontram explicitados na tabela 4.

Tabela 4 – Surtos por *Salmonella* spp no período de 1993-2000 (Fonte: adaptado de 7º e 8º relatórios da WHO\*)

Agente	Ano								Total
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	
<i>S. Enteritidis</i>	6	5	3	6	12	5	12	4	53
<i>Salmonella</i> spp	2	-	-	-	1	-	4	2	9
<i>S. Enteritidis</i> e outros agentes	-	-	-	-	-	2	-	-	2
Total	8	5	3	6	13	7	16	6	<b>64</b>

\* *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe*

### 1.3.2 CASOS HUMANOS DE SALMONELOSE EM PORTUGAL

Segundo os relatórios da EFSA os casos confirmados de salmonelose ocorridos em Portugal no período 2007-2012 foram 2 353. A evolução ao longo dos anos pode ser observada na figura 4. Pela observação da figura verificamos que existe uma tendência decrescente dos casos humanos de salmoneloses, o que é comum a nível da UE (EFSA, 2009; EFSA, 2010; EFSA, 2011b; EFSA, 2012b; EFSA, 2013; EFSA, 2014b).

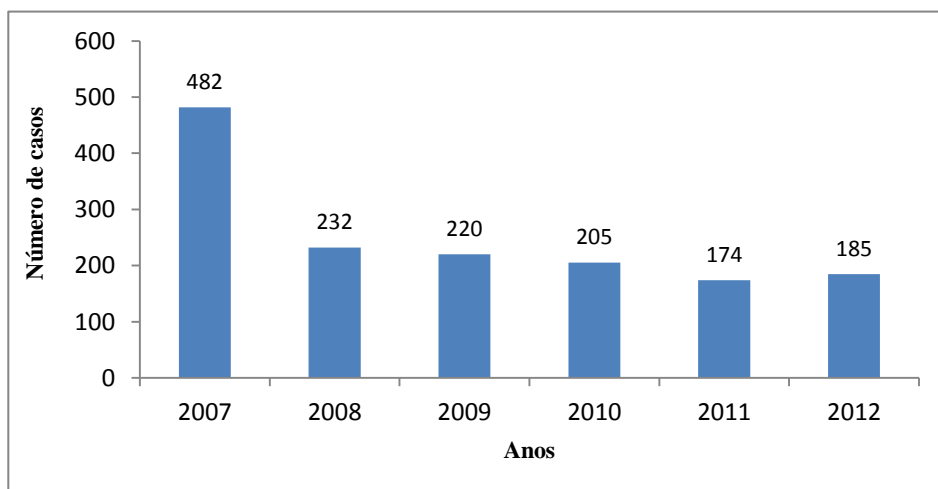


Figura 4 – Número de casos confirmados de salmonelose atribuídos a *Salmonella* spp. em Portugal no período 2007-2012 (Fonte: adaptado de EFSA 2009-2014)

#### 1.4 CONTROLO DE *SALMONELLA* SPP.

A legislação comunitária em vigor, em matéria de higiene e controlo de zoonoses inclui uma série de disposições que visam controlar e prevenir a contaminação de alimentos por *Salmonella*. Tal como em anos anteriores, em 2012 os surtos provocados por *Salmonella* na UE foram associados a diferentes produtos, com destaque para ovos e derivados. Assim a percentagem observada foi: 1) ovos e ovoprodutos (45,2%); 2) queijo (7,8%); 3) refeições mistas (7,2%) (EFSA, 2014b). Os dados recolhidos ao longo dos anos permitiram concluir que os produtos maioritária e sistematicamente implicados nos surtos por *Salmonella* foram ovos e produtos derivados.

Esta conclusão levou à implementação de programas de controlo de *Salmonella* ao nível da produção primária com o objetivo de diminuir os casos humanos e surtos de DOA, por *Salmonella*.

Os Regulamentos Comunitários (CE) N.º 2160/2003, (CE) N.º 1168/2006 e (CE) N.º 1177/2006 serviram de base para a construção do Plano Nacional de Vigilância e Controlo de Salmonelas em galinhas poedeiras e reprodutoras, com o objetivo de reduzir a prevalência de salmonelas em bandos de galinhas poedeiras e reprodutoras.

Para esta redução foram adotadas medidas ao nível sanitário, tais como, o uso de água potável, aplicação de controlo de pragas, utilização de desinfetantes de uso

veterinário, recolha de aves mortas duas vezes ao dia, armazenamento de alimentos e material de cama da aves em espaços fechados, manutenção de registos completos e atualizados sobre Parâmetros Sanitários e Zootécnicos efetuados nas explorações, garantir o estado de saúde e formação do pessoal (DGV, s.d.).

Assim, para assegurar o cumprimento da redução de salmonelose em Portugal foi criado o Plano de Inspeção de Géneros Alimentícios (PIGA), que é um plano de controlo oficial para verificação do cumprimento da legislação relativa aos critérios microbiológicos dos géneros alimentícios e aos agentes zoonóticos, garantido assim a proteção dos consumidores, em matéria de segurança alimentar.

Como consequência da intervenção ao nível da produção primária, ao longo dos anos tem-se verificado uma redução de salmoneloses em humanos, assim como dos surtos provocados por este agente. Verifica-se assim que o controlo e vigilância de salmonelas, embora importante em todas as fases, desde a produção, transformação e distribuição, é da máxima relevância a sua deteção e controlo ao nível da produção primária.

### 1.5 INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE SEGURANÇA ALIMENTAR

A maioria dos agentes patogénicos causadores de DOA pode ser contraída através da via fecal-oral. Estes microrganismos podem ser transmitidos através de manipulação humana com hábitos de higiene deficitários, por insetos e pela água contaminada. A via fecal-oral é muito comum no caso de viroses alimentares. (Anónimo, 2011).

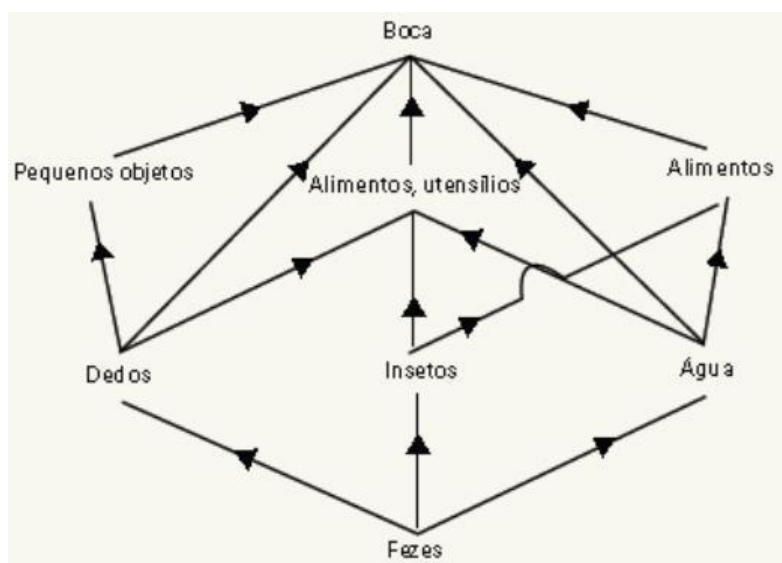


Figura 5- Transmissão dos microrganismos por Via fecal-oral (Fonte: Anónimo, 2011)

Historicamente, a presença de bactérias de origem fecal, incluindo os coliformes fecais e enterococos têm sido utilizados como ferramenta de acompanhamento para a deterioração microbiológica e para a previsão da presença de microrganismos patogênicos entéricos. Estes microrganismos são originários de mamíferos superiores e aves, e a sua presença em alimentos pode indicar contaminação fecal e possível associação com agentes patogênicos entéricos.

Os indicadores microbiológicos são normalmente utilizados para demonstrar a presença ou ausência de agentes patogênicos, podendo deste modo refletir a potencial segurança microbiológica dos alimentos. Sugerem a possibilidade de risco de exposição a microrganismos patogênicos. Um bom indicador de segurança alimentar deverá idealmente satisfazer entre outros os seguintes requisitos: 1) Ser fácil e rapidamente detetado; 2) Ser fácil de distinguir dos outros membros da microbiota dos alimentos; 3) Ter uma história de constante associação com o patogénico cuja presença estão a indicar; 4) Estar sempre presente quando o patogénico alvo está presente; 5) Ser um microrganismo cujo número deve correlacionar-se com o número do patogénico alvo; 6) Possuir exigências nutricionais e ritmos de crescimento idênticos aos do patogénico; 7) Ter um ritmo de morte paralelo ao do patogénico, embora o ideal seja persistir um pouco mais (figura 6) (Jay *et al.*, 2005).

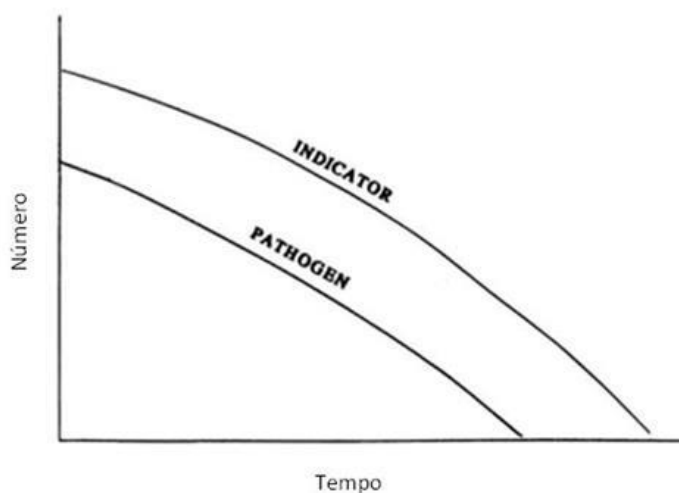


Figura 6- Relação ideal entre um microrganismo indicador e o patogénico associado; o indicador deve existir em níveis mais elevados do que o patogénico durante a existência deste (Fonte: Jay *et al.*, 2005)

A grande vantagem do uso de indicadores é que a fonte de contaminação fecal e os agentes patogênicos podem ser identificados rapidamente porque a complexidade e o

tempo de detecção são inferiores ao necessário para os patogénicos (Savichtcheva & Okabe, 2006).

O melhor indicador de contaminação fecal, e o primeiro a ser utilizado na água em 1895, foi *Escherichia coli* (Jay *et al.*, 2005), comensal do intestino do Homem e dos animais de sangue quente, sendo que está legislado nos Regulamentos (CE) N.º 2073/2005 e (CE) N.º 1441/2007 como indicador fecal em carne (2.1.6 Carne picada, 2.1.7 Carne separada mecanicamente, 2.1.8 Preparados de carne) e produtos da pesca (2.4.1 Produtos descascados e sem concha à base de crustáceos e moluscos cozidos). Neste último produto é indicador da possível presença de vírus patogénicos.

Entretanto foram propostos outros indicadores que a seguir estão descritos.

### **1.5.1. GRUPO COLIFORMES TOTAIS**

Coliformes são um grupo dentro da família *Enterobacteriaceae* com a capacidade de fermentar a lactose em 48 h. Os microrganismos desta família caracterizam-se por serem bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e fermentadoras da glucose, quando incubados a 35 – 37 °C, com produção de ácido e gás, embora algumas estirpes possam ser anaerogénicas.

A medição do número de coliformes é um dos métodos mais usados para estabelecer a qualidade nas águas. Este grupo inclui vários géneros nomeadamente *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia* e *Enterobacter* (Jay *et al.*, 2005). Embora a contagem de coliformes seja largamente utilizada, não apresenta grande especificidade (Baylis & Petit, 1997). Por consequência, este parâmetro tem sido questionado como indicador fecal, devido ao facto de muitos destes microrganismos serem de origem ambiental, podendo ser encontrados nas plantas e no solo, e não fecal (Gava, Silva & Frias, 2008). Nos alimentos a presença de um número elevado de coliformes totais pode ser indicativo de um processamento inadequado ou de recontaminação após este. A não existência de coliformes totais quase anula a hipótese de contaminação fecal, contudo a sua presença não é indicativa de contaminação fecal. Nos alimentos crus e no equipamento utilizado na preparação de alimentos, alguns coliformes persistem mais tempo do que *E. coli*. Este é um dos fatores de interesse na determinação dos coliformes totais independentemente da pesquisa de *E. coli*.

Ultimamente tem sido indicada a utilização de *Enterobacteriaceae* para substituir os coliformes totais como indicador de um processamento inadequado, incumprimento das boas práticas de fabrico ou ocorrência de contaminações cruzadas.

### **1.5.2 GRUPO COLIFORMES FECAIS**

Os coliformes fecais são definidos como os coliformes capazes de se multiplicarem e fermentarem a lactose a temperatura de 44 – 45 °C em 48 horas. Mais corretamente deveriam ser denominados coliformes termotolerantes visto que alguns coliformes não fecais conseguem multiplicar-se a esta temperatura e a sua ecologia fecal não é determinada pelo método de pesquisa mas sim a sua termo resistência (Baylis & Petit, 1997). Por se desenvolverem a elevadas temperaturas (temperatura do interior do intestino) podem ser associados a contaminação de origem fecal recente e revelarem a possibilidade da presença de patogénicos de origem fecal (Gava, Silva & Frias, 2008).

Contudo, alguns estudos demonstram que não existe correlação entre vírus entéricos e bactérias patogénicas com os níveis de coliformes fecais. Deste modo, o uso de coliformes fecais, como indicadores de segurança é questionado. Como consequência, *E. coli* foi sugerido como um indicador válido para avaliação da qualidade da água (Hood, Ness & Blake, 1983).

O uso de testes de pesquisa/contagem de *E. coli* são mais específicos mas foram preteridos pelo facto serem laborioso e apresentarem um tempo de resposta longo sendo o teste de coliformes mais rápido e simples. Os avanços técnicos entretanto ocorridos nos testes de deteção de *E. coli*, tornam este parâmetro mais frequentemente utilizado (Doyle & Erickson, 2006).

### **1.5.3 *ESCHERICHIA COLI***

As bactérias da espécie *E. coli* pertencem à família *Enterobacteriaceae* tal como os coliformes, grupo em que este microrganismo se enquadra. As bactérias pertencentes ao género *E. coli* fazem parte da microbiota normal do trato intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente. Coloniza o intestino grosso algumas horas após o nascimento, tornando-se o microrganismo mais abundante com várias funções fisiológicas importantes como síntese de vitaminas do complexo B e vitamina K, para além de inibir o crescimento de microrganismos patogénicos. Visto que o *habitat* nativo

deste microrganismo é o trato entérico do Homem e dos animais, a sua presença indica geralmente contaminação direta e/ou indireta de origem fecal. Consequentemente é um indicador clássico da possível presença de patogénicos entéricos nos alimentos. O número de *E. coli* nos alimentos, ao contrário da sua presença na água, não indica a extensão da contaminação visto que outros fatores, como a multiplicação posterior, podem interferir neste número. Não obstante, um elevado número de *E. coli* sugere uma qualidade higiénica deficiente. Assim a presença de *E. coli* não se relaciona diretamente com a presença de patogénicos no alimento no entanto indica um certo risco de estarem presentes. É considerado o melhor indicador de contaminação fecal, embora apresente algumas limitações (Baylis & Petit, 1997).

A excessiva e imprudente utilização de indicadores microbiológicos poderá levar a que alimentos seguros sejam rejeitados e por outro lado pode conduzir à aprovação de alimentos não seguros. Quer num caso quer noutra, estamos perante cenários que do ponto de vista económico são preocupantes e o segundo caso é igualmente preocupante em termos de saúde pública. No entanto, continua a ser universalmente aceite que existe uma relação entre a presença de *Salmonella* spp. em alimentos e os indicadores fecais.

Nos últimos anos têm surgido algumas estirpes de *E. coli* patogénicas que se podem agrupar, segundo os fatores de patogenicidade que possuem nos seguintes grupos:

*E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC) nas quais se incluem as estirpes enterohemorrágicas (EHEC) como *E. coli* 0157:H7 (Willshaw, Cheasty & Smith, 2000;; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2003; Jay *et al*, 2005; Meng, Doyle, Zhaot, & Zhaot, 2007; Forsythe, 2010; Federal Institute for Risk Assessment (BFR), 2014).

#### **1.5.4 Família *Enterobacteriaceae***

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, encontram-se amplamente disseminadas no meio ambiente, nomeadamente na água, no solo, e nas plantas, fazendo igualmente parte da microbiota do intestino de humanos e animais (Santos, 2009b). A contagem das bactérias desta família, indica a qualidade geral de um género alimentício bem como as condições de higiene presentes durante o



processamento dos alimentos e/ou recontaminação pós-processamento. Hoje em dia, a avaliação do nível de *Enterobacteriaceae* nos produtos alimentares, é utilizada em substituição dos coliformes anteriormente avaliados, visto que apresenta o mesmo significado como indicador de higiene, e estes não correspondem a um grupo taxonómico definido e os níveis encontrados variam consoante o método utilizado.

#### 1.5.5 SALMONELLA SPP.

O género *Salmonella*, é constituído por um grupo de bactérias entéricas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, Gram negativas em forma de pequenos bastonetes, não esporulados, capazes de crescer em diversos meios de cultura, formando colónias visíveis às 24 horas de incubação a 37 °C, fermentando a glucose com produção de gás. A fermentação da lactose não é comum para estes microrganismos, porém alguns serovares podem utilizar este açúcar. Todos os serovares são considerados patogénicas para os humanos. O género *Salmonella* compreende 2 espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* mas existem mais de 2500 serovares de *Salmonella* (Jay et al., 2005; Viegas, 2009).

São bactérias amplamente distribuídas na natureza, tendo como principais hospedeiros o Homem e os animais. Encontram-se primariamente ao nível do trato intestinal, mas também podem ser encontradas, ocasionalmente, noutras partes do corpo. Tratando-se de uma bactéria que é excretada nas fezes dos animais podendo contaminar alimentos diversos, é facilmente disseminada ao nível internacional, originando DOA e os consequentes problemas originados por essa situação. Embora o *habitat* primário seja o trato intestinal, a verdade é que atualmente esta bactéria é ubiqüitária encontrando-se disseminada no meio ambiente, sendo que esta característica faz com que seja encontrada nos animais destinados ao consumo humano e no ambiente das indústrias que processam ou manipulam géneros alimentícios (Jay et al., 2005).

Nas últimas décadas *Salmonella* spp., têm estado na origem da maioria dos casos de infeções alimentares, geralmente resultantes da ingestão de ovos, aves e outras carnes, leite cru e chocolate. Os grupos mais suscetíveis a esta infeção são os denominados YOPI (*Young, Old, Pregnant and Immunocompromised*).

A bactéria *Salmonella* consegue desenvolver-se e sobreviver em condições adversas, havendo estirpes capazes de crescer a temperaturas elevadas, a 48 °C,

enquanto outras apresentam capacidade de se desenvolverem a 7 °C. Crescem em ambientes com valores de pH entre 4,5 e 9,3. O limite mínimo de  $a_w$ , que permite o crescimento desta bactéria é de 0,93. Por sua vez, o crescimento de *Salmonella* é inibido por meios/alimentos com uma concentração de cloreto de sódio entre 3 a 4% (Haddenwrcel & Judith Regina, 1998).

O controlo da contaminação por este microrganismo, passa por uma vigilância desde a produção até à distribuição de géneros alimentícios, devendo ser adotadas medidas que assegurem o estado sanitário dos animais, fazendo igualmente o despiste de *Salmonella* nas rações, e o cumprimento das BPH na produção e processamento animal, de modo a evitar quaisquer tipos de contaminação cruzada.

A salmonelose é o termo utilizado para descrever a doença que resulta da ingestão da bactéria *Salmonella* e consequentemente a infeção, adquirida pelo consumo de alimentos contaminados. Este microrganismo entra no sistema digestivo, multiplica-se no intestino causando uma inflamação que resulta em gastroenterite. Os sintomas mais comuns são dores abdominais, diarreias, náuseas, vômitos, febre, podendo também ocorrer, ocasionalmente, desidratação, dor de cabeça e fadiga. O período de incubação é de 5 a 72 horas após a ingestão de alimentos contaminados e a duração da doença é de 2 a 6 dias. A situação pode tornar-se mais severa, progredindo para infeções sistémicas, podendo precipitar várias condições crónicas como artrite reativa e a síndrome de Reiter (Jay et al., 2005;).

## 1.6 OBJETIVOS

É neste enquadramento que a presente Dissertação de Mestrado, em Segurança Alimentar e Saúde Pública, se vai desenvolver. Havendo conhecimento de que a presença de *Salmonella* spp., pode estar associada à presença de *E. coli*, Coliformes totais e Coliformes fecais, reveste-se de todo o interesse, verificar se este pressuposto é verdadeiro no que se refere aos dados existentes no nosso país, relativos a amostras que estiveram na origem de DOA e que revelaram a presença de *Salmonella* spp. e amostras provenientes de alimentos que não estiveram na origem de toxinfecção alimentar, obtidos no INSA.

Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi:

Averiguar qual a relação entre a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e coliformes fecais e totais em alimentos prontos a comer.

Foi objetivo específico deste trabalho:

Contribuir para avaliar se a detecção de *E. coli* e Coliformes totais e fecais serão indicadores microbiológicos adequados da presença de *Salmonella* spp. em alimentos prontos a comer.

## II- MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, foram disponibilizados e tratados os resultados obtidos no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Delegação do Porto, no âmbito da investigação epidemiológica e laboratorial de casos e surtos de doença de origem alimentar (DOA) no período compreendido entre 1994 e 2012. Foram analisadas 163 amostras para pesquisa de *Salmonella* spp. e pesquisa ou contagem de coliformes e *E. coli*.

### 2.1 Pesquisa de Bactérias Coliformes

Para esta pesquisa foi utilizado um pré enriquecimento em Mac Conkey seguido do meio selectivo Caldo Verde Brilhante (VB) (Oxoid™, Basingstoke, Hampshire, UK) que contém verde brilhante e bÍlis como inibidores de microrganismos Gram positivos, sendo a presença de os coliformes reconhecidos detetada pela fermentação da lactose com produção de gás visualizada no tubo de Durham.

Semearam-se 10 mL da suspensão-mãe, num tubo com meio seletivo de concentração dupla, e 1 mL da mesma suspensão num tubo de meio seletivo com concentração simples.

De seguida, semeou-se 1 mL de cada diluição decimal num tubo de meio seletivo de concentração simples misturou-se bem o inóculo e o meio de cultura, evitando a inclusão de bolhas de ar.

Os tubos semeados foram a incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 48 h.

Após o período de incubação, foram considerados positivos os tubos em que se verificou turvação e formação de gás no tubo de Durham, com pelo menos 1/10 da altura do tubo.

### 2.2 CONTAGEM DE *ENTEROBACTERIACEAE*

Para a contagem em placa das bactérias da família *Enterobacteriaceae* foi utilizado o meio de cultura *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG) (Oxoid™, Basingstoke, Hampshire, UK). Este meio de cultura é composto por sais biliares e cristal violeta que inibem as bactérias Gram positivas, e por glucose e vermelho neutro, que permite a deteção da fermentação deste nutriente pelos microrganismos. Para a identificação foi usado o meio de *Agar Nutritivo* (NA) (Oxoid™, Basingstoke,

Hampshire, UK), Agar Glucosado (AG) (Oxoid™, Basingstoke, Hampshire, UK) e o teste da oxidase.

Foi seguida a metodologia da norma NP 4137 (NP, 1991. que preconiza a utilização do meio VRBG, semeado por incorporação com 1 mL de inóculo e com camada dupla, incubando a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Terminado o período de incubação procedeu-se à contagem das placas que não continham mais 150 colónias características e/ou não características. São consideradas colónias suspeitas de *Enterobacteriaceae* as que apresentarem cor violácea, com ou sem halo de precipitação, com um diâmetro igual ou superior a 0,5 mm.

Foram selecionadas 5 colónias para confirmação, e efetuou-se a repicagem em NA, por estria, a fim de se proceder aos testes bioquímicos. Incubaram-se as placas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h.

Para a pesquisa de oxidase, com uma pipeta Pasteur, retirou-se uma pequena porção de cada uma das colónias isoladas em NA e fizeram-se estrias num papel de filtro previamente humedecido com o reagente para o ensaio de oxidase. A pesquisa é negativa se a cor não mudar para violeta-escuro (púrpura) em 10s.

O teste da oxidase baseia-se na produção bacteriana de uma enzima, a oxidase intracelular. Na presença de oxigénio atmosférico e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente contendo fenilenodiamina, para formar um composto violeta, o indofenol (www.biomerieux.pt). Desta forma, o aparecimento de uma coloração violeta na colónia testada indica a presença desta enzima e considera-se oxidase positiva.

Para o ensaio de fermentação, com o auxílio de um fio reto, repicaram-se as colónias anteriormente selecionadas para tubos de ensaio contendo o meio AG, que foram a incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h. A reação é considerada positiva se houver desenvolvimento de cor amarela na totalidade do tubo.

A prova da glucose foi utilizada como método de confirmação das colónias presuntivas da família *Enterobacteriaceae*. As bactérias pertencentes a esta família caracterizam-se por serem todas fermentadoras de glucose (Brenner, 1984).

Para a técnica do número mais provável (NMP), transferiu-se para cada um dos três tubos contendo meio de cultura de concentração dupla,  $10\text{ cm}^3$  da amostra.

Transferiu-se  $1\text{ cm}^3$  de suspensão para os tubos contendo meio de cultura de concentração simples, procedeu-se de igual modo para as diluições decimais seguintes.

Incubou-se os tubos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h.

Com uma ansa, retirou-se o inóculo de cada um dos nove tubos incubados, e semeou-se, por estria, placas contendo o meio de bÍlis. Incubaram-se as placas a 37 °C  $\pm$  1 °C, durante 24 h.

### 2.3 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi seguida a metodologia descrita na norma NP 1993-1982. Assim, foi efetuado um pré-enriquecimento de 25 g de amostra, na proporção de 1/10, em água peptonada tamponada (APT) (Oxoid™, Basingstoke, Hampshire, UK) que foi a incubar a 37 °C  $\pm$  1 °C durante 16-24 h. Este meio de cultura é um meio não seletivo que permite que as células de *Salmonella* spp., que possam estar presentes em baixo número e/ou lesadas, possam recuperar e/ou multiplicar-se antes de serem introduzidas num meio seletivo, aumentando assim as hipóteses da sua deteção nas amostras. Posteriormente, foi feito um enriquecimento seletivo, inoculando-se 10 mL em meio de Tetratrionato incubado a 43 °C  $\pm$  1°C durante 48 h e Selenito-Cistina incubado a 37 °C  $\pm$  1°C igualmente durante 48 h (ambos produtos Oxoid™, Basingstoke, Hampshire, UK). O meio de tetratrionato, para além das fontes de carbono e compostos azotados, contém uma combinação de tiosulfato de sódio e tetratrionato, formado no meio após adição de iodo e iodeto de potássio. a qual inibe o desenvolvimento dos coliformes. Os microrganismos que possuem a enzima nitrato-reductase, como é o caso de *Salmonella* spp. e *Proteus* spp., crescem neste meio. Os sais biliares inibem a flora Gram positiva. O meio de Selenito-Cistina contém selenito, potente agente tóxico cujo mecanismo de toxicidade não é totalmente conhecido. O efeito da cistina irá reduzir a toxicidade do selenito para os microrganismos (OXOID).

Ao fim de 18 ou 24 h de incubação, semeou-se com uma ansa, por estrias, a partir de cada um dos tubos a superfície de uma placa de meio de cultura Verde Brilhante e de uma placa com outro meio seletivo, qual de modo a permitir o desenvolvimento de colónias bem isoladas. Incubaram-se as placas a 37 °C  $\pm$  1°C, durante 20 a 24 h. Este meio de cultura apresenta elevada concentração de verde brilhante que inibe o crescimento da maioria das bactérias. A presença de lactose e sacarose permite a distinção entre bactérias do género *Salmonella* que apresentam colónias rosa com halo vermelho à volta das colónias da flora competitiva que apresenta colónias amarelas ou esverdeadas (Scharlab).

Findo o período de incubação total dos tubos, 48 h, repete-se a operação descrita anteriormente.

Para confirmação escolheram-se 5 colónias consideradas suspeitas ou típicas de cada uma das placas dos meios seletivos. Se uma placa apresentar menos de 5 colónias suspeitas repicam-se todas.

Para confirmação, repicam-se as colónias suspeitas para placas de NA de modo a permitir o desenvolvimento de colónias bem isoladas. Incubaram-se as placas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 20 a 24 h. Como meio de diagnóstico foi utilizado o agar de *Kligler* (Oxoid<sup>TM</sup>, Basingstoke, Hampshire, UK). Trata-se de um meio em rampa que permite verificar a fermentação (ou não) de dois açúcares, com ou sem produção de gás, e produção de H<sub>2</sub>S.

As culturas típicas de *Salmonella*, uma vez que fermentam a glucose e não a lactose, apresentam rampa vermelha (alcalina) e o fundo amarelo (ácido), com formação de sulfureto de hidrogénio, ou seja, existe um enegrecimento do ágar. Em 10% dos casos não é formado o sulfureto de hidrogénio.

Quando é isolada uma estirpe de *Salmonella* lactose +, a rampa do meio de *Kligler* é amarela. Nestes casos, uma confirmação preliminar de culturas de *Salmonella* não deve ser baseada unicamente nos resultados obtidos a partir deste meio de cultura.

Para a identificação bioquímica, a partir das culturas que satisfazem o critério no meio de *Kligler*, recorreu-se ao *Analytical profile index*, API 20E que é um sistema de identificação bioquímica miniaturizado, padronizado para géneros da família *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas. Os diferentes testes na galeria apresentam-se na forma desidratada, compreendendo 20 testes. A leitura é realizada através de um quadro de leitura (Anexo 6) e a identificação obtém-se consultando o sistema de identificação on-line.

As culturas identificadas como *Salmonella* spp. foram sujeitas a confirmação serológica, tendo sido enviadas à Unidade de *Enterobacteriaceae* do INSA, para identificação definitiva.

- A partir de 2002 a metodologia utilizada para a deteção de *Salmonella* spp foi a preconizada na norma ISO 6579: 2002

A etapa do pré-enriquecimento á é igual ao descrito, excepto no que respeita ao período de incubação que foi de 16 a 20 h. Para o enriquecimento seletivo, após este período de incubação, inocularam-se 0,1mL em caldo *Rappaport Vassiliadis Soja* (RVS-T) e 1 mL em caldo *Muller-Kauffmann* com tetracionato e novobiocina (MKTTn-

T) (ambos produtos OXOID...), os quais foram incubados, respetivamente, a  $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  e  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , durante 16-20 h.

O caldo RVS-T contém, para além de fontes de carbono e compostos azotados, cloreto de magnésio (que aumenta a pressão osmótica do meio) e verde de malaquite (agente inibidor da maioria das bactérias, com exceção de *Salmonellae*) que associados a um pH baixo, proporcionam a seletividade. O caldo MKTTn-T apresenta fontes de carbono, azoto, vitaminas e sais minerais. É constituído também por tetrionato que inibe bactérias que não possuam tetrionato-redutase. A inibição de *Proteus* é efectuada pela adição de novobiocina, e a das bactérias Gram positivas é conseguida pela acção do verde brilhante e de sais biliares.

Após a incubação dos meios de enriquecimento RVS-T e MKTTn-T, procedeu-se à etapa de isolamento, retirando-se de cada um dos meios uma alíquota com o auxílio de uma ansa e inoculando-se, pelo método das estrias, na superfície dos meios de cultura seletivos, *Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar* (XLD) (OXOID) e *Gélose chromID™ Salmonella* (SMID) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França), que foram a incubar a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $24 \pm 3$  horas. Voltaram a incubar-se os meios de enriquecimento RVS-T e MKTTn-T, respetivamente a  $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  e  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , por mais 16-20 horas. Findo este período, repetiu-se o processo de isolamento. A diferenciação das bactérias no meio XLD fundamenta-se na fermentação da xilose, descarboxilação da lisina e produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , reações que permitem efetuar uma diferenciação primária de *Shigellae* e *Salmonellae* de outras bactérias não patogénicas. A concentração de desoxicolato, agente inibidor, permite a inibição de coliformes sem interferir com o desenvolvimento de *Salmonellae* e *Shigellae*. As colónias apresentam-se vermelhas com centro negro. O meio SMID é constituído por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas promovendo assim o crescimento do conjunto de todas as estirpes de *Salmonella*, e por três substratos cromogénicos que permitem a revelação das actividades enzimáticas correspondentes. A diferenciação de *Salmonellae* (incluindo estirpes lactose +) baseia-se na produção da enzima esterase que confere uma coloração rosa pálida a roxo às colónias desta bactéria (biomerieux). A identificação foi efetuada tal como descrito anteriormente.



## 2.4 TRATAMENTO DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada, utilizando o *software* SPSS (versão 18.0, 2009, SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

Pretende-se com este trabalho de investigação verificar se a presença de *Salmonella spp* é indicada pela presença de Coliformes totais (ou *Enterobacteriaceae*), *E. coli* e Coliformes fecais. Para tal, foi estudada a dependência estatística entre a presença de cada um dos microrganismos indicadores e a presença de *Salmonella spp.* em amostras provenientes de alimentos que estiveram na origem de toxinfecção alimentar e amostras provenientes de alimentos que não estiveram na origem de toxinfecção alimentar.

Os dados obtidos para *Salmonella spp.* são de natureza qualitativa o que torna impossível uma análise estatística descritiva ou a utilização de testes estatísticos que utilizem parâmetros descritivos. Como tal, para aferir uma possível relação entre as variáveis em estudo, recorreu-se a uma tabela de contingência e elaborou-se um teste do Qui-Quadrado de independência. Este teste estatístico apresenta exigências mínimas que devem ser cumpridas para que os resultados obtidos sejam válidos:

- a) Não mais de 20% das células tenham frequência esperada estimada inferior a 5;
- b) Não exista qualquer célula com valor esperado inferior a 1. (Reis, Melo, Andrade, & Calapez, 1999).

Pelos motivos apontados, neste caso particular, a sua aplicação não é possível, tendo sido aplicado o Teste Exato de Fisher. O Teste Exato de Fisher é um teste de significância estatística utilizado na análise de tabelas de contingência. Este teste é válido para todos os tamanhos de amostra e pertence à classe de testes exatos, assim chamado porque o significado do desvio de uma hipótese nula (por exemplo: *P-value*) pode ser calculado exatamente, ao invés de depender de uma aproximação que se torna exata no limite, quando o tamanho da amostra tende para infinito, como acontece com muitos testes estatísticos.

Nas amostras de alimentos que não estiveram na origem de toxinfecção alimentar apenas foi pesquisada a presença de *Enterobacteriaceae*, que é analisada estatisticamente como pertencendo ao grupo dos Coliformes totais, visto que tem o mesmo significado higiénico como referido anteriormente, e de *E. coli*. Não tendo sido pesquisada a presença de Coliformes fecais, não é possível a aplicação de um teste estatístico de independência a este indicador, uma vez que *Salmonella spp.* apresenta-se

como uma constante (encontra-se presente em todas as amostras) e não como uma variável. Neste caso procedeu-se a uma análise intuitiva de frequências.

Para o Teste Exato de Fisher foram utilizadas as hipóteses:

$H_0$ : As variáveis são independentes;

$H_1$ : As variáveis não são independentes.

Foi calculado o *p-value*, que é uma probabilidade que mede até que ponto os dados da amostra sugerem a rejeição da hipótese nula verdadeira. Quanto menor for o valor do *p-value*, maior será o grau que a hipótese nula é contradita. Se o *p-value* for superior a 0,05 o resultado do teste não é significativo, isto é, as variáveis em estudo são independentes e se o *p-value* for inferior a 0,05 o resultado do teste é significativo (rejeita-se a hipótese nula, ou seja, as variáveis em estudo são dependentes).

Para obter uma indicação da força de uma associação entre as variáveis independentes e dependentes utilizou-se o parâmetro Lambda,  $\lambda$ . Trata-se de uma medida assimétrica de associação apropriada no tratamento de variáveis nominais que pode variar de 0,0 a 1,0. Um valor baixo de  $\lambda$  representa uma associação mais fraca, enquanto um valor mais elevado é indicativo de uma associação mais forte. Usando o guia interpretativo para medidas de associação:

**Tabela 5 Força da associação entre as variáveis**

$\lambda$	Força da associação
0,0	Nenhuma relação
$\pm 0,0$ a $\pm 0,2$	Muito fraca
$\pm 0,2$ a $\pm 0,4$	Fraca
$\pm 0,4$ a $\pm 0,6$	Moderada
$\pm 0,6$ a $\pm 0,8$	Forte
$\pm 0,8$ a $\pm 1,0$	Muito forte
$\pm 1,0$	Relacionamento perfeito

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No Anexo 1 encontram-se as tabelas com os valores das contagens dos microrganismos indicadores e a pesquisa de *Salmonella* spp. em cada uma das amostras analisadas.

A Tabela 6, contém a estatística descritiva para cada um dos indicadores microbiológicos, para os quais foram efetuadas contagens. As contagens de *E. coli* e de Coliformes fecais variam entre 0,00 e 7,00 log ufc/g e as de Coliformes totais variam entre 0,00 e 8,00 log ufc/g.

Tabela 6 Resumo dos valores obtidos pela Estatística Descritiva dos Indicadores Fecais

	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	Coliformes fecais
Média (Log ufc/g)	2,47	0,77	1,59
Mediana (Log ufc/g)	2,43	0,00	1,00
Desvio-Padrão (Log ufc/g)	2,15	1,43	1,94
Variância (Log ufc/g)	4,63	2,06	3,77
Mínimo (Log ufc/g)	0,00	0,00	0,00
Máximo (Log ufc/g)	8,00	7,00	7,00
N	185	234	94

Os gráficos de barras explicitados na figura 7, apresentam a frequência dos resultados globais de todas as amostras para *E. coli*, Coliformes totais e Coliformes fecais e permitem observar que a média total para *E. coli* foi de 0,77 ( $\pm 1,44$ ) log ufc/g, para Coliformes totais se situou em 2,47 ( $\pm 2,15$ ) log ufc/g e para Coliformes fecais apresentou o valor de 1,59 ( $\pm 1,94$ ) log ufc/g.

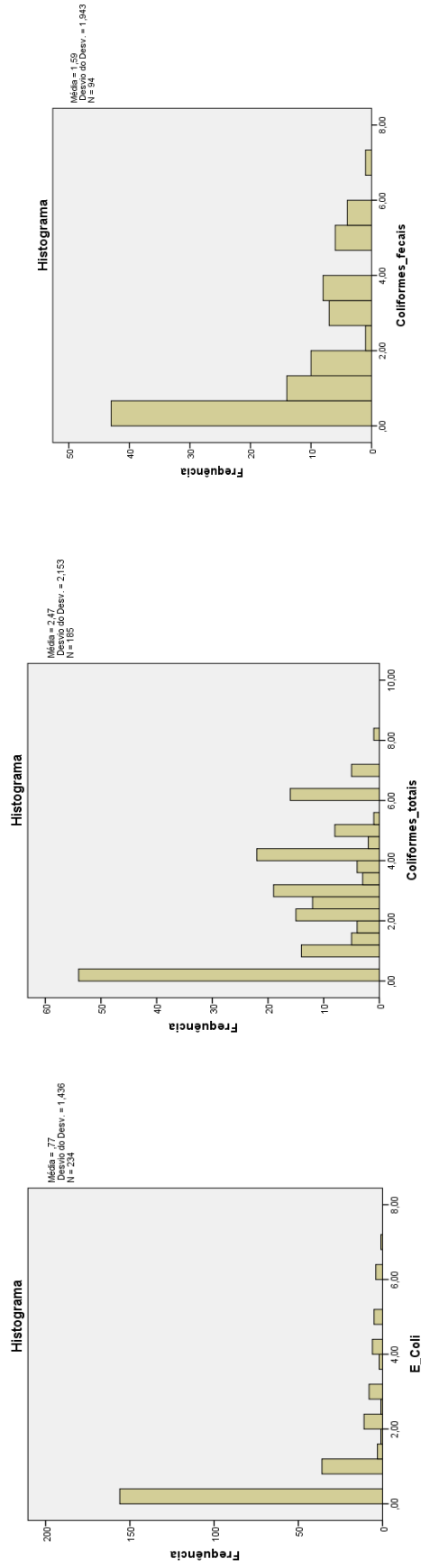


Figura 7 Frequência dos Resultados globais de todas as amostras para *E. coli*, Coliformes totais e Coliformes fecais

Aplicando o teste exato de Fisher obtêm-se para *E. coli* um  $P - value < 0.001$  pelo que se deve rejeitar a hipótese nula, ou seja, as variáveis são dependentes, isto é, a presença de *E. coli* e de *Salmonella* spp., nas amostras, são dependentes.

Para testar a força desta associação determinou-se o parâmetro  $\lambda$  que apresenta o valor 0,167 com erro padrão associado de 0,117, o que indica uma associação muito fraca a fraca.

Observando o gráfico de barras (figura 8) onde está representada frequência de *Salmonella* spp. e *E. coli* verifica-se que em 68 amostras nas quais não se detetou *E. coli* (contagens  $< 10^1$ ) detetou-se presença de *Salmonella* spp. (equivalente a 47,2% de amostras com *Salmonella* spp. positiva). Por outro lado, para contagens positivas de *E. coli* apenas 2 casos apresentaram ausência de *Salmonella* spp., correspondentes a 2,2 % das amostras em que não foi detetada *Salmonella* spp. As amostras positivas de *E. coli* em que não foi detetada *Salmonella* spp. apresentaram contagens de *E. coli* na ordem de 1,00 Log ufc/g.

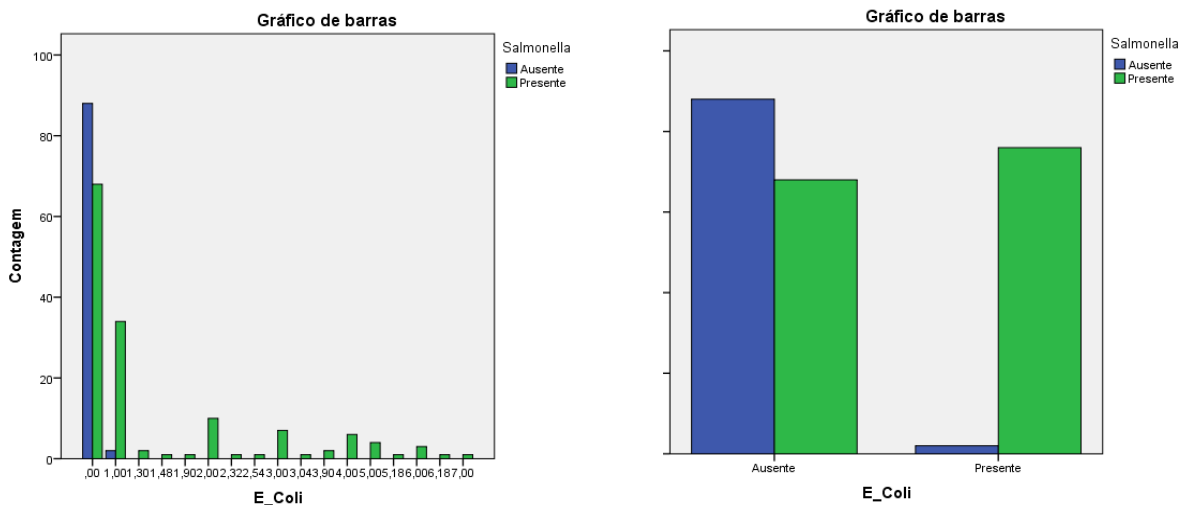


Figura 8 Frequência dos resultados de *Salmonella* spp. e *E. coli*

Williams & Ebel (2014), num trabalho em carcaças verificaram igualmente que a correlação entre *E. coli* e *Salmonella* não foi alta e, como consequência, *E. coli* não foi considerado um indicador particularmente fiável da *Salmonella*, o que está de acordo com os resultados por nós obtidos neste trabalho.

No caso dos Coliformes totais, aplicando o Teste Exato de Fisher, obtêm-se igualmente um  $P - value < 0.001$ , indicativo da existência de dependência entre as duas variáveis em estudo, isto é, presença de coliformes e de *Salmonella* spp. nas

amostras são dependentes. Para testar a força desta associação determinou-se o parâmetro  $\lambda$  que apresenta o valor 0,194 com erro padrão associado de 0,041, o que indica uma associação muito fraca a fraca (figura 9).

Observando o gráfico de barras onde está representada a frequência de *Salmonella* spp. e Coliformes totais constata-se que foi detetada *Salmonella* spp. em 13 amostras em que não houve contagens positivas de Coliformes totais, correspondente a 13,7% das amostras com resultado *Salmonella* spp. positiva. Em 49 amostras (54,4% das amostras em que não foi detetada *Salmonella* spp.) as contagens de Coliformes totais foram positivas sem no entanto ter sido detetada *Salmonella* spp.

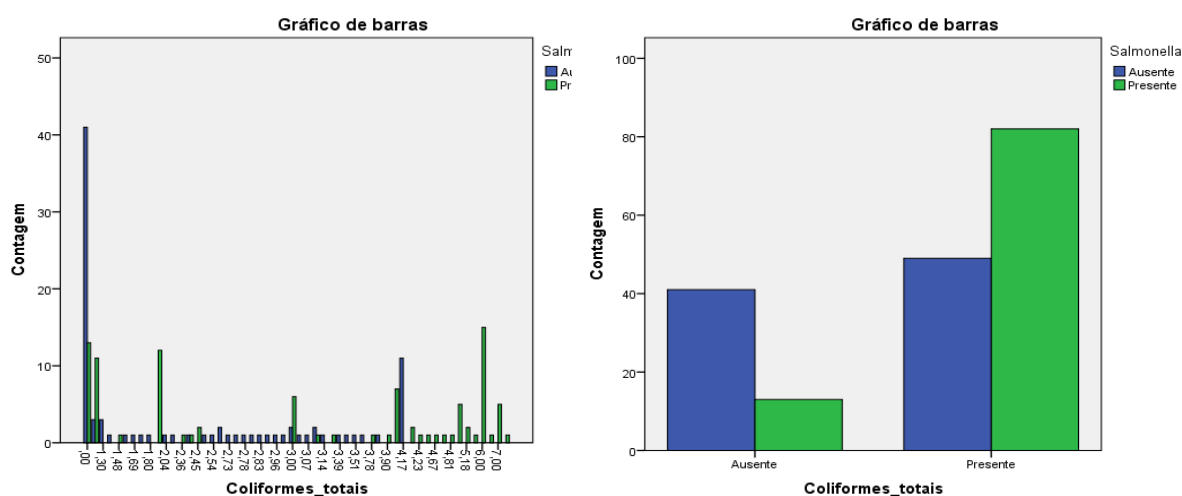


Figura 9 Frequência dos resultados de *Salmonella* spp. e Coliformes fecais

Hood, Ness & Blake (1983), num trabalho realizado em marisco concluíram que níveis baixos de coliformes fecais são excelentes indicadores de ausência de *Salmonella* spp., contudo níveis elevados não apresentam consistência com a presença de *Salmonella*. Neste trabalho, verificou-se uma tendência inversa, ou seja apenas a partir de valores de ordem de grandeza de  $10^4$  ufc/g é que os coliformes totais funcionaram como um bom indicador, não havendo nenhuma amostra com *Salmonella* spp. ausente (figura 9). Segundo Buchanan & Oni (2012), em alimentos não cozinhados, os coliformes fecais são considerados indicadores efetivos de contaminação fecal mas não são considerados bons indicadores da presença de *Salmonella*, embora todos sejam associados com contaminação de origem fecal. Já nos alimentos cozinhados, são considerados indicadores de contaminação pós-processamento e/ou manutenção a uma incorreta temperatura de armazenagem. Na água, habitualmente, os coliformes

apresentam uma fraca correlação com patogênicos, o que pode ser explicado pelas diferentes capacidades de sobrevivência e persistência que estes dois grupos apresentam em diferentes ambientes aquáticos (Savichtcheva & Okabe, 2006).

Não tendo sido pesquisada a presença de Coliformes fecais nas amostras provenientes de alimentos que não deram origem a toxinfecção, todas as amostras analisadas para este indicador apresentam ausência de *Salmonella* spp., pelo que não é possível aplicar testes estatísticos para determinar a dependência entre a presença deste indicador e de *Salmonella* spp. Pode-se, no entanto, proceder a uma análise de frequências e, intuitivamente, determinar a existência, ou não, de dependência.

Analisando os dados verifica-se que em todas as amostras foi detetada *Salmonella* spp., mesmo havendo, 43 amostras (45,7%) sem contagem de Coliformes fecais e 51 (54,3%) com contagem, valores muito semelhantes, o que parece indicar que não há dependência entre as variáveis. Lemarchand & Lebaron (2006), encontraram resultados de acordo este trabalho. Em águas costeiras, com níveis bastante mais elevados ( $>10^8$  ufc/dia), verificaram que não existia correlação entre coliformes fecais e *Salmonella* spp., pelo que estes autores concluem que os coliformes fecais não são bons indicadores da presença de *Salmonella* spp.

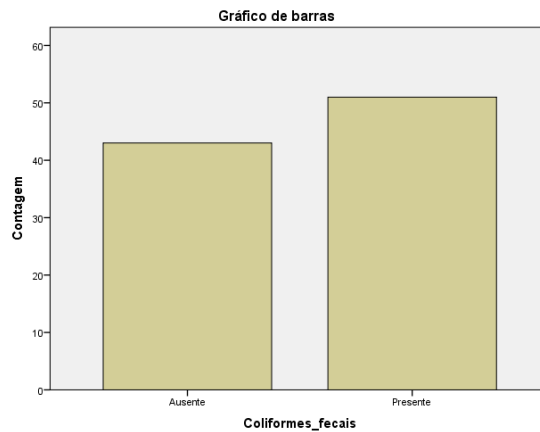


Figura 10 Frequência das amostras que apresentaram presença ou ausência de Coliformes fecais

#### IV. Conclusão

O presente estudo pretendia averiguar qual a relação entre a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e coliformes fecais e totais em alimentos prontos a consumir. Existem muitas evidências na literatura científica indicando o uso de coliformes fecais e *E. coli* e como indicadores de contaminação fecal em águas e alimentos, embora o grupo de coliformes fecais inclua géneros que não são de origem fecal, nomeadamente *Klebsiella*, *Enterobacter*, e *Citrobacter*, retirando valor a este grupo como indicador fecal (Doyle & Erickson, 2006). Por outro lado, outros estudos têm demonstrado uma correlação fraca com vários microrganismos patogénicos (Savichtcheva & Okabe, 2006; Buchanan & Oni, 2012) o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Deste modo, e tendo em conta os resultados deste trabalho, verificou-se que relativamente à correlação entre Coliformes fecais e *Salmonella* spp. nada se pode concluir estatisticamente. Salienta-se no entanto, que empiricamente, dado que o número de amostras positivas (54,3%) e negativas (45,7%) para Coliformes fecais é muito semelhante e se verificou a presença de *Salmonella* spp em todas as amostras, parece não existir relação entre estes dois parâmetros, não sendo os coliformes fecais indicadores de *Salmonella* spp..

Pela análise estatística conclui-se que a presença dos indicadores microbiológicos Coliformes Totais e *E. coli* apresenta dependência, embora fraca, com a presença de *Salmonella* spp. No entanto, não está claro até que ponto as concentrações de microrganismos indicadores estão relacionadas com o patogénico, com base numa amostra a amostra. No caso de existir uma forte correlação entre as concentrações de microrganismos diferentes, o controlo de microrganismos indicadores seria um substituto eficaz, em alguns géneros alimentícios, em termos de custos para a medição de microrganismos patogénicos, pelo que seria importante em estudos futuros quantificar a presença de *Salmonella* spp. de modo a poderem realizar-se testes paramétricos e quantificar-se a relação de dependência entre as variáveis, pela determinação do vetor paramétrico  $\hat{\theta} = (\hat{\mu}_x, \hat{\sigma}_x^2, \hat{\mu}_y, \hat{\sigma}_y^2, \hat{\sigma}_{xy})$  (Williams & Ebel, 2014).

Conclui-se assim que é necessário uma amostra maior e com *Salmonella* spp. quantificada de modo a confirmar se a deteção de *E. coli* e Coliformes totais e fecais



são indicadores microbiológicos adequados da presença de *Salmonella* spp. em alimentos prontos a consumir.

O uso abusivo de indicadores fecais pode conduzir a interpretações incorretas. Salienta-se o ocorrido em 1995, com o aparecimento de uma notícia referindo que o “chá gelado” estava contaminado com fezes. Os géneros identificados foram *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. não tendo sido detetado *E. coli*. E embora houvesse evidência de 64% das amostras de “chá gelado” servidas em restaurantes estivessem contaminadas com coliformes fecais, a verdade é que não tem havido histórias de DOA atribuídas a este alimento (Doyle & Erickson, 2006).

Dado que os resultados estatísticos obtidos neste trabalho apontam para uma correlação fraca a muito fraca, podemos concluir que os indicadores fecais em estudo não são bons indicadores da presença de *Salmonella* spp. pois só poderia ser tirada esta conclusão se tivesse sido encontrada uma forte correlação entre as variáveis.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Anónimo (s.d). A Segurança Sanitária dos Alimentos, *Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção Geral de Veterinária*. [Consultado em 07/06/2013]. Disponível em: [http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/seguranca\\_sanitaria\\_alimentos.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/seguranca_sanitaria_alimentos.pdf)
- Anónimo, (2011). Microrganismos causadores de doenças de origem Alimentar, *Food Ingredients Brasil*, 19, 51-59 [Consultado em 25/08/2013]. Disponível em: [http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&sqi=2&ved=0CEQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.revista-fi.com%2Fmaterias%2F198.pdf&ei=zwaUr6JCcLN7AawuYC4Cw&usq=AFQjCNGCI72NG99wcUWQsBsRI5mZ9TjfAg&sig2=27dvo3fQgspPF0Srysp\\_Hw&bvm=bv.51156542,d.d2k](http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&sqi=2&ved=0CEQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.revista-fi.com%2Fmaterias%2F198.pdf&ei=zwaUr6JCcLN7AawuYC4Cw&usq=AFQjCNGCI72NG99wcUWQsBsRI5mZ9TjfAg&sig2=27dvo3fQgspPF0Srysp_Hw&bvm=bv.51156542,d.d2k)
- Baylis, C.L. & Pettitt, S.B. (1997). The Significance of Coliforms *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* in Raw and Processed Food. In D. Kay & C. Fricker (Eds), *Coliforms and E. coli: problems or solutions?*(pp 49-53). Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- BFR (s.d.). National Reference Laboratory for *Escherichia coli* (NRL E. Coli). [Consultado em: 11/11/2014] disponível em: [http://www.bfr.bund.de/en/national\\_reference\\_laboratory\\_for\\_escherichia\\_coli\\_\\_nrl\\_e\\_\\_coli\\_-10496.html#ssing](http://www.bfr.bund.de/en/national_reference_laboratory_for_escherichia_coli__nrl_e__coli_-10496.html#ssing)
- Buchaman, R. & Oni, R. (2012). Use of Microbiological Indicators for Assessment Hygiene Controls for the Manufacture of Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 75(5), 989-997. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-532
- CAC - Codex Alimentarius Commission (2003). *Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene*. CAC/RCP 1.
- Clark, J., Sharp, M. & Reilly, W. (2000). Surveillance of foodborne Disease. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker e G. W. Gould (Eds), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 975-1010). Gaithersburg, Maryland, EUA: Aspen Publishers, Inc.
- Correia, C. B., Cunha, I. C., Coelho, A.S., Maia, C., Pena, C., Bonito, C. C., ... Calhau, M. A. (2013). Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares. *Boletim*

- Epidemiológica Observações*, Vol 2, No 6, Edições INSA. [Consultado em 20/11/2014]. Disponível em:[http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observacoesN6\\_outubro-dezembro\\_2013.pdf](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observacoesN6_outubro-dezembro_2013.pdf)
- Doyle, P. & Erickson, M. C. (2006). The fecal coliform assay, the results of which have led to numerous misinterpretations over the years, may have outlived its usefulness. *Microbe*, 1 (4), 262-263.
- DGV – Direção Geral de Veterinária (s.d.).Plano de Ação Redução da Prevalência de Salmonelas em Frangos. [Consultado em 09/11/2014] disponível em: [http://www.vetbiblios.pt/AVICULTURA/AVI\\_docs/Manual\\_procedimentos\\_implementation\\_PVC\\_Salmonelas\\_poedeiras.pdf](http://www.vetbiblios.pt/AVICULTURA/AVI_docs/Manual_procedimentos_implementation_PVC_Salmonelas_poedeiras.pdf)
- EFSA, (2006). European Food Safety Authority (2006). Trends and Sources of Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union 2004, [Consultado em 20/08/2013]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/310ar.pdf>
- EFSA (2007a). European Food Safety Authority (2007a). Trends and Sources of Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union 2005. *EFSA Journal*, 206 (94), 6-352. doi:10.2903/j.efsa.2006.94r
- EFSA (2007b). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA Journal* 2007, (130), 2-352. doi:10.2903/j.efsa.2007.130r.
- EFSA (2009). The Community Summary Report Food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *EFSA Journal: 2009*, 271. doi:10.2903/j.efsa.2009.271r.
- EFSA (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal; 2010*, 8(1),1496. doi:10.2903/j.efsa.2010.1496.
- EFSA (2011a). Updated technical specifications for harmonized reporting of foodborne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC1. *EFSA Journal: 2011*, 9 (4), 2101.
- EFSA (2011b). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011, 9(3), 2090. doi10.2903/j.efsa.2011.2090.

- EFSA, 2012a. Chemical contaminants in the food chain. [consultado em 20/11/2014]. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=CRZSsQt4tRY&feature=player\\_embedded](https://www.youtube.com/watch?v=CRZSsQt4tRY&feature=player_embedded)
- EFSA (2012b). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012, 10 (3), 2597. doi:10.2903/j.efsa.2012.259.
- EFSA (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013, 11(4):3129. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- EFSA, (2014a). European Food Safety Authority *Food born zoonotic diseases*. [consultado em 19-06-2014] disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodbornezoonoticdiseases.htm>
- EFSA(2014b). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014;12 (2):3547. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547.
- Fernandes, E., Silva, M. & Ramalhosa, E. (2012). *Sistema de Gestão da Segurança Alimentar- Guia para a sua implementação em unidades de Restauração*. Eds. Edições Sílabo
- Forsythe, S. J. (2010) *The Microbiology of Safe Food*. Nova Iorque, EUA: Wiley-Blackwell.
- Gava, A.J., Silva, C.A. & Frias, J. (2008). *Tecnologias de alimentos Princípios e Aplicações*. In Gava, A.J., Silva, C.A. & Frias, J (Eds) (pp.85-112), São Paulo, Brasil: Nobel.
- Gould, L.H., Mungai, E.A., Johnson, S.D., Richardson, L.C., Williams, I.T., Griffin, P.M. & Cole, D.J. (2013). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009-2010, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **62** (3), 41-7.
- Hood, M., Ness, G.E. & Blake, N.J., (1983). Relationship Among Fecal Coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in Shellfish, *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (1), 122-126.
- Haddenwrcel, Judith Regina. (1998). Atlas da Microbiologia dos Alimentos. volume I, São Paulo, Brasil
- Harris, I.J., Uesugi, A.R., Abd, S.J. & McCarthy, K.L. (2012). Survival of *Salmonella* Enteritidis PT 30 on inoculated almond kernels in hot water treatments, *Food Research International*, **45** (2), 1093-98.

- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2003). *Microorganisms in Foods, vol 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens* (pp. 20-180). Londres, Reino Unido: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- IFT - Institute of Food Technologists (2002). Emerging Microbiological Food Safety Issues, Implications for Control in the 21st Century, *Expert Report*, Chicago, EUA: Institute of Food Technologists. [consultado em 30/05/2013]
- Disponível em:  
<http://www.ift.org/Knowledge-Center/Read-IFT-Publications/Science-Reports/Expert-Reports/~media/Knowledge%20Center/Science%20Reports/Expert%20Reports/Emerging%20Microbiological/Emerging%20Micro.pdf>
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A., (2005). *Modern Food Microbiology*, New York, EUA: Springer.
- Kennedy, S.P. & Busta, F.F., (2007). Biosecurity: Food Protection and Defense. In Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp 87-102), Washington, EUA: ASM Press.
- Kent-Smith, L., (2013). Viva Bem News – 1º Aniversário [consultado em 21 de Abril de 2013].
- Disponível em: [http://www.vivabem.pt/nm\\_quemsomos.php?id=240](http://www.vivabem.pt/nm_quemsomos.php?id=240)
- Kuchenmuller T., Hird S., Stein C., Kramarz P., Nanda A. & Havelaar A.H., (2009). Estimating the global burden of foodborne diseases—a collaborative effort. *Euro Surveillance*, 14 (18), 1-4.
- Lemarchand, K. & Lebaron, P. (2003). Occurrence of *Salmonella* spp. and cryptosporidium spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicator. *FEMS Microbiology Letters*, 218 (1), 203-209. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11519.x
- Lindsay, J.A., (1997). Chronic Sequelae of Foodborne Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (4), 443-52.
- McDowell, R.M. & McElvaine, M.D., (1997). Long-term sequelae to foodborne disease, *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics*, 16 (2), 337-41.
- Mendes, S., (2004). Segurança Alimentar. Abordagem Global e Integrada. [consultado em 20 de Abril de 2013].

- Meng, J., Doyle, M.P., Zhaot, T. & Zhaot, S. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 249-269). Washington, EUA: ASM Press.
- Moreira, P.A. & Padrão, P.D., (2004). Educational and economic determinants of food intake in Portuguese adults: a cross-sectional survey. *BMC Public Health*, 4 (58). doi:10.1186/1471-2458-4-58.
- Nishida, C., Uauy, R., Kumanyika, S. & Shetty, P., (2004). The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutrition* 7(1<sup>a</sup>), 245-250. DOI: 10.1079/PHN2003592
- OMS (2006). Cinco Chaves para uma Alimentação Mais Segura. [Consultado em: 20/04/2013].  
Disponível em:  
[http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual\\_keys\\_portuguese.pdf](http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf)
- Panisello, P.J., Rooney, R, Quantick, P. C. & Stanwell-Smith, R. (2000). Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology*, 59 (3), 221-234.
- Pedroso, L. (2005). Segurança Alimentar e Saúde Pública. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 2 (1), 15-25.
- Pedroso, Laurentina (2009). Manual de HACCP, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Reis, E., Melo, P., Andrade, R., & Calapez, T. (1999). *Estatística Aplicada*. Lisboa: Sílabo
- Raymundo, G.P. (2013). Hábitos Alimentares nos Tempos Modernos. *Aprende Brasil, Com a palavra a nutricionista*, última atualização em 2013. [Consultado em 06/06/2013].  
Disponível em:  
[http://www.aprendebrasil.com.br/falecom/nutricionista\\_bd.asp?codtexto=388](http://www.aprendebrasil.com.br/falecom/nutricionista_bd.asp?codtexto=388)
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L322/12, Comissão Europeia, Bruxelas.

- Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 Novembro relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L338/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 2160/2003 de 17 de Novembro relativo ao control de salmonelas e outros agentes zoonóticos específicos de origem alimentar, Jornal Oficial da União Europeia, L 325/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 1177/2006 de 2 Agosto do Parlamento Europeu e do Conselho relativamente à utilização de métodos específicos de control no âmbito dos programas nacionais de control de salmonelas nas aves de capoeira, Jornal Oficial da União Europeia, L 212/3, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Rocourt, J., Moy, G., Vierk, K. & Schlundt, J. (2003). *The Present State of Food Borne Disease in OECD Countries*. Geneve, Switzerland: Food Safety Department. World Health Organization. [Consultado em: 20/04/2014]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/oecd\\_fbd.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/oecd_fbd.pdf)
- Santos, M.I. & Campos Cunha, M.I. (2007). Patogénicos emergentes em alimentos. *Segurança e Qualidade Alimentar*, I (2), 10-3.
- Santos, M.I. (2009a). Toxinfeções Alimentares. Dados Epidemiológicos. Comunicação apresentada na Escola Superior de Tecnologias da Saúde, Lisboa.
- Santos, M.I. (2009b). *Estimativa da flora microbiana e eventuais patogénicos em saladas minimamente processadas (MP) prontas para consumo* (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M., Roy, S.L., Jones, J.L. & Griffi, P.M. (2011a). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (1), 7-15.
- Scallan, E., Griffi, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V. & Hoekstra, R.M. (2011b). Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (1), 16-22.
- Schmidhuber, J. & Shetty, P. (2005). The nutrition transition to 2030. Why developing countries are likely to bear the major burden. *Acta Agriculturae Scand Section C*, 2, 150-66.
- Savichtcheva, O. & Okabe, S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct monitoring and future application perspectives. *Water Research*, 40 (13), 2463-2476.

- Surak, J., (2009). The Evolution of HACCP – A perspective on today’s most effective food safety system. *Food Quality & Safety magazine*. [consultado em: 20-05-2013]  
Disponível em:  
[http://www.foodquality.com/details/article/807887/The\\_Evolution\\_of\\_HACCP.html?tzcheck=1](http://www.foodquality.com/details/article/807887/The_Evolution_of_HACCP.html?tzcheck=1)
- Tauxe, R.V. (1997). Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (4), 424-434.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S. (2009). *Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal*, Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. [Consultado em 10-04-2013]
- Viana, V., Santos, P. L. & Guimarães, M. J. (2008). Comportamento e hábitos alimentares em crianças e jovens: Uma revisão da literatura. *Psicologia, Saúde & Doenças*, 9 (2), 209-31.
- Viegas, S. (2009). *Alterações do estado de saúde associadas à alimentação*. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. [Consultado em 30.05.2012]. Disponível em:<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/AlteracoesSaudeAlimentacao.aspx>
- Viegas, S., Cunha, I., Correia, C., Coelho, A., Maia, C., Pena, C.,...Saraiva, M. (2014). Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares, 2013. *Boletim Epidemiológica Observações*, Vol 2, No 7, Edições INSA. [Consultado em 20/05/2014]. Disponível em:  
[http://repositorio.insa.pt/retrieve/6660/observacoes\\_7\\_2014\\_artigo1.pdf](http://repositorio.insa.pt/retrieve/6660/observacoes_7_2014_artigo1.pdf)
- Williams, M. S., & Ebel, E. D. (2014). Estimating the correlation between concentrations of two species of bacteria with censored microbial testing data. *International Journal of Food Microbiology*, 1-5
- Willshaw, G.A., Cheasty, T. & Smith, H.R. (2000). *Escherichia coli*. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, & G.W. Gould, (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 1136-1177), Gaithersburg, EUA: Aspen Publication.
- Wisner, B. & Adams, J.(2002). Environmental Health in Emergencies and Disasters: A Practical Guide. In B. Wisner & J. Adams (Eds.), *Food Safety* (pp. 148-157), Geneva, Suíça: WHO.



- WHO (2001). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 7<sup>th</sup> Report (1993-1998), Country Reports: Portugal.
- WHO (2003). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8<sup>th</sup> Report (1999-2000), Country Reports: Portugal.
- WHO (2002). *Global Strategy for Food Safety: Safer Food for Better Health, Food Safety Issues*.  
Geneva, Switzerland: WHO.
- WHO (2007). *WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases*.  
[consultado em: 08/11/2014]  
Disponível em:  
[http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/Summary\\_Doc.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/Summary_Doc.pdf?ua=1)
- WHO (2009). 10 facts on food safety. World Health Organization, última atualização em 2013. [Consultado em: 06/06/2013].  
Disponível em: [http://www.who.int/features/factfiles/food\\_safety/en/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/en/index.html)
- WHO (2013a). Foodborne Diseases, World Health Organization, última atualização em 2013. [Consultado em: 06/06/2013].  
Disponível em: [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/)
- WHO (2013b). General information related to foodborne disease, World Health Organization, última atualização em 2013. [Consultado em: 06/06/2013].
- WHO (2014). Food Safety. *Fact sheet*, nº399. [consultado em: 20/11/2014]  
Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en>

## VI. ANEXOS

Tabela 7 Alimentos que estiveram na origem de toxinfecções alimentares

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Coliformes Totais</b>	<b>Log(Coliformes Totais)</b>	<b>E. Coli</b>	<b>Log(E. coli)</b>	<b>Coliformes Fecais</b>	<b>Log(coliformes Fecais)</b>	<b>Salmonella</b>
1	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
2	1	1,00E+04	4,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
3	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
4	1	1,00E+05	5,00	1,00E+03	3,00	1,00E+03	3,00	Presente
5	1	1,80E+04	4,26	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	Presente
6	1	1,00E+03	3,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
7	1	<1,0E+01	0,00	1,00E+00	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
8	1	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	Presente
9	1	1,30E+03	3,11	3,00E+01	1,48	<1,0E+01	0,00	Presente
10	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
11	1	1,00E+06	6,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+04	4,00	Presente
12	1	3,00E+01	1,48	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
13	1	1,00E+06	6,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+05	5,00	Presente
14	1	1,00E+06	6,00	1,00E+02	2,00	1,00E+06	6,00	Presente
15	1	1,00E+06	6,00	1,00E+04	4,00	1,00E+05	5,00	Presente
16	1	1,00E+06	6,00	1,00E+05	5,00	1,00E+05	5,00	Presente
17	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
18	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+02	2,00	Presente
19	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
20	1	1,00E+07	7,00	1,00E+02	2,00	1,00E+04	4,00	Presente
21	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+02	2,00	Presente
22	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
23	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
24	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
25	1	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	Presente
26	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
27	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
28	1	3,00E+05	5,48	<1,0E+01	0,00	4,00E+01	1,60	Presente
29	1	2,70E+02	2,43	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
30	1	6,00E+03	3,78	<1,0E+01	0,00	8,20E+02	2,91	Presente
31	1	2,30E+02	2,36	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
32	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
33	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
34	1	1,00E+03	3,00	1,00E+01	1,00	1,00E+03	3,00	Presente
35	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente

Tabela 7 Alimentos que estiveram na origem de toxinfecções alimentares (Continuação)

Nº da Amostra	Grupo	Coliformes Totais	Log(Coliformes Totais)	<i>E. coli</i>	Log( <i>E. coli</i> )	Coliformes Fecais	Log(coliformes Fecais)	<i>Salmonella</i>
36	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
37	1	8,00E+03	3,90	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	Presente
38	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
39	1	1,00E+07	7,00	1,00E+07	7,00	1,00E+07	7,00	Presente
40	1	1,00E+06	6,00	1,00E+01	1,00	1,00E+04	4,00	Presente
41	1	1,50E+04	4,18	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
42	1	2,80E+02	2,45	<1,0E+01	0,00	1,00E+02	2,00	Presente
43	1	2,80E+02	2,45	<1,0E+01	0,00	1,00E+02	2,00	Presente
44	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
45	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
46	1	1,00E+03	3,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+03	3,00	Presente
47	1	1,00E+06	6,00	1,00E+04	4,00	1,00E+06	6,00	Presente
48	1	1,00E+05	5,00	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
49	1	1,00E+05	5,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
50	1	1,00E+03	3,00	1,00E+01	1,00	1,00E+02	2,00	Presente
51	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
52	1	1,00E+06	6,00	1,00E+05	5,00	1,00E+05	5,00	Presente
53	1	1,00E+03	3,00	1,00E+03	3,00	1,00E+03	3,00	Presente
54	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
55	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
56	1	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
57	1	1,00E+04	4,00	1,00E+04	4,00	1,00E+04	4,00	Presente
58	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
59	1	1,00E+07	7,00	1,00E+04	4,00	1,00E+05	5,00	Presente
60	1	1,70E+04	4,23	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	Presente
61	1	6,40E+04	4,81	8,00E+01	1,90	<1,0E+01	0,00	Presente
62	1	1,00E+06	6,00	1,00E+06	6,00	1,00E+06	6,00	Presente
63	1	1,00E+01	1,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
64	1	1,00E+08	8,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
65	1	<1,0E+01	0,00	1,00E+03	3,00	<1,0E+01	0,00	Presente
66	1	1,00E+07	7,00	1,00E+02	2,00	1,00E+03	3,00	Presente
67	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	Presente
68	1	1,00E+04	4,00	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
69	1	1,00E+05	5,00	1,00E+03	3,00	1,00E+03	3,00	Presente
70	1	1,50E+03	3,18	2,00E+01	1,30	<1,0E+01	0,00	Presente
71	1	1,50E+06	6,18	1,50E+06	6,18	<1,0E+01	0,00	Presente
72	1	1,50E+04	4,18	2,00E+01	1,30	<1,0E+01	0,00	Presente

Tabela 7 Alimentos que estiveram na origem de toxinfecções alimentares (Continuação)

Nº da Amostra	Grupo	Coliformes Totais	Log(Coliformes Totais)	<i>E. coli</i>	Log( <i>E. coli</i> )	Coliformes Fecais	Log(coliformes Fecais)	<i>Salmonella</i>
73	1	4,70E+04	4,67	1,00E+01	1,00	3,40E+02	2,53	Presente
74	1	1,00E+04	4,00	1,00E+04	4,00	1,00E+04	4,00	Presente
75	1	1,00E+06	6,00	1,00E+05	5,00	1,00E+06	6,00	Presente
76	1	1,00E+06	6,00	1,00E+01	1,00	1,00E+02	2,00	Presente
77	1	1,00E+05	5,00	1,00E+02	2,00	1,00E+02	2,00	Presente
78	1	1,00E+02	2,00	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	Presente
79	1	1,00E+04	4,00	1,00E+04	4,00	1,00E+04	4,00	Presente
80	1	1,00E+04	4,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+04	4,00	Presente
81	1	1,00E+01	1,00	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	Presente
82	1	1,00E+06	6,00	1,00E+05	5,00	1,00E+02	2,00	Presente
83	1	1,00E+06	6,00	<1,0E+01	0,00	1,00E+05	5,00	Presente
84	1	1,00E+03	3,00	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
85	1	<1,0E+01	0,00	1,00E+01	1,00	1,00E+02	2,00	Presente
86	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
87	1	<1,0E+01	0,00	0,00E+00	0,00	4,10E+03	3,61	Presente
88	1	1,50E+05	5,18	1,50E+05	5,18	<1,0E+01	0,00	Presente
89	1	1,50E+05	5,18	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
90	1	1,00E+04	4,00	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
91	1	1,00E+02	2,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
92	1	1,00E+07	7,00	<1,0E+01	0,00	<1,0E+01	0,00	Presente
93	1	5,60E+04	4,75	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
94	1	1,00E+06	6,00	1,00E+01	1,00	1,00E+01	1,00	Presente
95	1	1,00E+06	6,00	<1,0E+01	0,00			Presente
96	3			1,00E+01	1,00			Presente
97	3			<1,0E+01	0,00			Presente
98	3			<1,0E+01	0,00			Presente
99	3			<1,0E+01	0,00			Presente
100	3			1,00E+03	3,00			Presente
101	3			1,00E+01	1,00			Presente
102	3			<1,0E+01	0,00			Presente
103	3			<1,0E+01	0,00			Presente
104	3			<1,0E+01	0,00			Presente
105	3			<1,0E+01	0,00			Presente
106	3			1,00E+02	2,00			Presente
107	3			8,00E+03	3,90			Presente
108	3			2,10E+02	2,32			Presente
109	3			8,00E+03	3,90			Presente
110	3			<1,0E+01	0,00			Presente
111	3			1,00E+01	1,00			Presente

Tabela 7 Alimentos que estiveram na origem de toxinfecções alimentares (Continuação)

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Coliformes Totais</b>	<b>Log(Coliformes Totais)</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Log(<i>E. coli</i>)</b>	<b>Coliformes Fecais</b>	<b>Log(coliformes Fecais)</b>	<b><i>Salmonella</i></b>
112	3			1,00E+01	1,00			Presente
113	3			1,00E+02	2,00			Presente
114	3			<1,0E+01	0,00			Presente
115	3			<1,0E+01	0,00			Presente
116	3			1,00E+01	1,00			Presente
117	3			1,00E+01	1,00			Presente
118	3			3,50E+02	2,54			Presente
119	3			<1,0E+01	0,00			Presente
120	3			1,00E+01	1,00			Presente
121	3			1,00E+01	1,00			Presente
122	3			1,00E+01	1,00			Presente
123	3			1,00E+01	1,00			Presente
124	3			<1,0E+01	0,00			Presente
125	3			<1,0E+01	0,00			Presente
126	3			1,00E+03	3,00			Presente
127	3			<1,0E+01	0,00			Presente
128	3			<1,0E+01	0,00			Presente
129	3			<1,0E+01	0,00			Presente
130	3			<1,0E+01	0,00			Presente
131	3			<1,0E+01	0,00			Presente
132	3			1,00E+01	1,00			Presente
133	3			1,00E+01	1,00			Presente
134	3			1,00E+03	3,00			Presente
135	3			1,00E+06	6,00			Presente
136	3			1,00E+02	2,00			Presente
137	3			1,00E+06	6,00			Presente
138	3			<1,0E+01	0,00			Presente
139	3			1,00E+02	2,00			Presente
140	3			1,00E+01	1,00			Presente
141	3			1,00E+01	1,00			Presente
142	3			1,00E+01	1,00			Presente
143	3			1,00E+01	1,00			Presente
144	3			1,10E+03	3,04			Presente

Tabela 8 Alimentos que não estiveram na origem de toxinfecções Alimentares

Nº da Amostra	Grupo	Coliformes Totais	Log(Coliformes Totais)	<i>E. coli</i>	Log( <i>E. coli</i> )	Coliformes Fecais	Log(coliformes Fecais)	<i>Salmonella</i>
145	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
146	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
147	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
148	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
149	2	5,40E+02	2,73	< 1,0E+01	0,00			Ausente
150	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
151	2	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
152	2	2,00E+01	1,30	< 1,0E+01	0,00			Ausente
153	2	2,50E+03	3,39	< 1,0E+01	0,00			Ausente
154	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
155	2	1,30E+03	3,11	< 1,0E+01	0,00			Ausente
156	1	6,40E+01	1,80	< 1,0E+01	0,00			Ausente
157	2	4,00E+03	3,60	< 1,0E+01	0,00			Ausente
158	1	2,00E+01	1,30	< 1,0E+01	0,00			Ausente
159	2	3,30E+03	3,51	< 1,0E+01	0,00			Ausente
160	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
161	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
162	2	1,50E+04	4,17	1,00E+01	1,00			Ausente
163	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
164	2	1,20E+03	3,07	< 1,0E+01	0,00			Ausente
165	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
166	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
167	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
168	2	1,10E+03	3,04	< 1,0E+01	0,00			Ausente
169	2	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
170	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
171	2	1,50E+04	4,17	1,00E+01	1,00			Ausente
172	2	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
173	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
174	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
175	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
176	2	7,00E+02	2,84	< 1,0E+01	0,00			Ausente
177	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
178	2	5,80E+02	2,76	< 1,0E+01	0,00			Ausente
179	1	3,50E+02	2,54	< 1,0E+01	0,00			Ausente
180	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
181	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
182	1	4,00E+01	1,60	< 1,0E+01	0,00			Ausente
183	1	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
184	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
185	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
186	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
187	2	6,10E+02	2,78	< 1,0E+01	0,00			Ausente
188	2	4,90E+02	2,69	< 1,0E+01	0,00			Ausente
189	2	1,00E+03	3,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente

Tabela 8 Alimentos que não estiveram na origem de toxinfecções Alimentares

Nº da Amostra	Grupo	Coliformes Totais	Log(Coliformes Totais)	<i>E. coli</i>	Log( <i>E. coli</i> )	Coliformes Fecais	Log(coliformes Fecais)	<i>Salmonella</i>
190	2	1,40E+03	3,14	< 1,0E+01	0,00			Ausente
191	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
192	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
193	2	6,20E+02	2,79	< 1,0E+01	0,00			Ausente
194	2	6,80E+02	2,83	< 1,0E+01	0,00			Ausente
195	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
196	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
197	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
198	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
199	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
200	2	5,40E+01	1,73	< 1,0E+01	0,00			Ausente
201	2	6,20E+03	3,79	< 1,0E+01	0,00			Ausente
202	1	1,00E+01	1,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
203	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
204	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
205	2	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
206	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
207	2	9,20E+02	2,96	< 1,0E+01	0,00			Ausente
208	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
209	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
210	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
211	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
212	2	2,90E+03	3,46	< 1,0E+01	0,00			Ausente
213	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
214	2	3,40E+02	2,53	< 1,0E+01	0,00			Ausente
215	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
216	2	1,10E+02	2,04	< 1,0E+01	0,00			Ausente
217	2	1,30E+02	2,11	< 1,0E+01	0,00			Ausente
218	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
219	1	2,00E+01	1,30	< 1,0E+01	0,00			Ausente
220	2	2,70E+02	2,43	< 1,0E+01	0,00			Ausente
221	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
222	2	4,90E+02	2,69	< 1,0E+01	0,00			Ausente
223	1	3,00E+01	1,47	< 1,0E+01	0,00			Ausente
224	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0,00			Ausente
225	1	1,00E+01	1,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
226	2	5,00E+01	1,69	< 1,0E+01	0,00			Ausente
227	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
228	2	9,60E+02	2,98	< 1,0E+01	0,00			Ausente
229	1	1,00E+01	1,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
230	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
231	2	1,00E+03	3,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
232	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente
233	2	1,30E+03	3,11	< 1,0E+01	0,00			Ausente
234	1	< 1,0E+01	0,00	< 1,0E+01	0,00			Ausente