

Prevalência dos genes *stx1* e *stx2* de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em queijos de leite cru.

Mariana Frade Tavares

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Mentora: Dra. Carla Raquel Mendes

Jurí:

Presidente: Professor Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor associado com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel, Professora auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Gostaria aqui de expressar a minha gratidão a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Luísa Brito por ter aceitado a minha orientação durante todo o processo, com toda a sua sabedoria e incentivo, e por ter feito tudo o que estava ao seu alcance para que este estágio se concretizasse. O seu apoio foi essencial e, por ele, estou-lhe verdadeiramente grata.

Quero, de seguida, agradecer em particular à Engenheira Maria de Jesus Tavares que tornou possível o meu estágio no Laboratório de Microbiologia, e à Dra. Manuela Sol responsável por este Laboratório, por toda a sua ajuda e alegria.

Seria impossível não destacar nos agradecimentos a Dra. Raquel e a Dra. Márcia, que me acompanharam durante todo o estágio e todo o processo de desenvolvimento desta dissertação, sem nunca me deixarem desanimar. O vosso apoio, sabedoria e boa disposição foram peças chave neste trabalho. Sem vocês nada teria sido igual, estar-vos-ei para sempre grata.

A toda a equipa do Laboratório de Microbiologia da ASAE o meu muito obrigada. Todos vós contribuíram de alguma forma para o meu crescimento.

À ASAE, instituição acolhedora, o meu agradecimento.

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas de curso, que se foram tornando amigos. Tudo o que passámos juntos, ao longo dos últimos cinco anos ficará marcado na minha memória.

Ao Rafael, agradeço a sua paciência e carinho. Obrigada por tornares tudo mais fácil.

À minha família, o meu muito obrigada. Tudo o que tenho e sou a vós o devo.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a todos os Docentes do Instituto Superior de Agronomia, com quem tive o privilégio de me cruzar ao longo deste caminho e que me ensinaram tudo o que hoje sei sobre Engenharia Alimentar.

E agradeço ao Instituto Superior de Agronomia, que acabou por ser o meu lar nos últimos cinco anos.

A todos, o meu mais sincero Obrigada.

Resumo

O queijo é um dos alimentos mais antigos da humanidade. Portugal destaca-se como um dos países com maior tradição de produção e consumo deste alimento, especialmente queijos feitos com leite cru que, não sendo o leite submetido a um processo de tratamento térmico, apresentam maior risco em termos de segurança deste alimento.

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é uma bactéria patogénica de origem zoonótica, que pode contaminar o leite durante o processo de ordenha e, conseqüentemente, o queijo. Devido à sua dose infecciosa ser baixa (10-100 UFC) e à gravidade da doença que pode provocar, STEC representa um desafio significativo para a Segurança dos Alimentos.

Este estudo teve como objetivo verificar a prevalência dos genes *stx1* e/ou *stx2* de STEC em queijos de leite cru, fabricados em Portugal, aplicando o método descrito na norma em desenvolvimento ISO/DIS 13136-1:2025. Apesar da deteção destes genes em cinco das 22 amostras analisadas, não foi possível a confirmação dos resultados, devido à incapacidade de isolar o microrganismo alvo, evidenciando-se assim a necessidade de otimização deste método.

Os resultados mostraram que os meios de cultura utilizados para o isolamento de colónias não foram eficazes. O meio cromogénico CHROMagar™ STEC, dito seletivo, permitiu o crescimento de colónias com aspeto característico de STEC, mas que não se confirmaram como tal. Enquanto o meio TBX, por não ser seletivo para STEC, não permitiu fazer a distinção entre o microrganismo alvo e outros tipos de *E. coli*.

A presença de *E. coli* não-STEC e de outras enterobactérias nos queijos analisados gerou competição por nutrientes durante o enriquecimento, dificultando a recuperação de STEC e, conseqüentemente, impedindo a obtenção de colónias isoladas.

A inclusão de etapas com recurso a técnicas como a separação imunomagnética e o desenvolvimento de meios de cultura mais seletivos podem apresentar-se como solução às limitações evidenciadas.

Palavras-Chave: STEC, queijos de leite cru, Multiplex PCR, CHROMagar™ STEC, Segurança dos Alimentos (*Food safety*).

Abstract

Cheese is considered one of the oldest foods in human history. Portugal stands out as one of the countries with the longest tradition of producing and consuming this food, particularly raw milk cheeses, which, because they are not subjected to a heat treatment process, present a greater risk in terms of food safety.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a pathogenic microorganism of zoonotic origin that can contaminate milk during the milking process and, consequently, cheese. Due to its very low infectious dose (10-100 CFU) and the severity of the disease it can cause, STEC represents a significant challenge to food safety.

This study aimed to verify the prevalence of the STEC *stx1* and/or *stx2* genes in raw milk cheeses produced in Portugal, applying the method described in the ISO/DIS 13136-1:2025 standard under development. Despite the detection of these genes in five of the 22 analyzed samples, confirmation of the results was not possible due to the inability to adequately isolate the target microorganism, emphasizing the need for further optimization of the method.

These findings demonstrated that the culture media used for colony isolation are not very effective. CHROMagar™ STEC medium, although selective and chromogenic, allows the growth of colonies with the same characteristic appearance as STEC, but which are confirmed not to be STEC. TBX medium, because it is not selective for STEC, does not allow for the distinction between this target microorganism and other types of *E. coli*.

The presence of non-STEC *E. coli* and other enterobacteriaceae in the analyzed cheeses creates competition for nutrients during enrichment, hindering STEC recovery and, consequently, preventing the obtaining of isolated colonies.

The inclusion of steps using techniques such as immunomagnetic separation and the development of more selective culture media may offer solutions to the limitations identified.

Keywords: STEC, raw milk cheeses, Multiplex PCR, CHROMagar™ STEC, Food safety.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	IX
Lista de abreviaturas	XI
1. Enquadramento teórico	1
1.1. O Queijo	1
1.1.1. Origem	1
1.1.2. Processo de fabrico	1
1.1.3. Relevância na gastronomia e economia	2
1.1.4. Microbiota específica	3
1.1.5. Microrganismos contaminantes e vias de contaminação	4
1.2. Segurança dos Alimentos e Regulamentação	5
1.3. Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC)	7
1.3.1. Virulência	9
1.3.2. Patogenicidade e Epidemiologia	10
1.3.3. Alertas relativos à deteção de STEC em queijos de leite cru	11
1.3.4. Surtos por STEC na Europa e no Mundo	14
1.4. Métodos de deteção e identificação	15
1.4.1. Convencionais	15
1.4.2. Imunoenzimáticos	16
1.4.3. Moleculares	16
1.4.4. Novos Métodos	20
1.5. Objetivos do trabalho	22
2. Materiais e Métodos	22
2.1. Meios de cultura e reagentes	22
2.1.1. Água Peptonada Tamponada	22
2.1.2. Triptona Sal	23
2.1.3. CHROMagar TM STEC	23
2.1.4. Tryptone-Bile-X-Glucuronate Agar	23

2.1.5. Agar Nutritivo	24
2.1.6. <i>Trypto Casein-Soy Agar</i>	24
2.1.7. Galerias API® 20 E	25
2.1.8. Teste da oxidase	25
2.2. Ensaios de controlo.....	26
2.2.1. Controlo de qualidade dos meios de cultura	26
2.2.2. Verificação do método de referência para implementação no Laboratório	27
2.3. Determinação do nível de contaminação de <i>E. coli</i> em TBX.....	29
2.4. Detecção de STEC em queijos de leite cru	29
2.4.1. Amostras analisadas	29
2.4.2. Método utilizado: Norma ISO/DIS 13136-1:2025	32
3. Resultados e Discussão	37
3.1. Ensaios de Controlo.....	37
3.1.1. Avaliação do desempenho dos meios de cultura	37
3.1.2. Implementação do método de referência no Laboratório.....	39
3.2. Caracterização das amostras analisadas.....	42
3.3. Análise de amostras de queijos feitos com leite cru	43
3.3.1. <i>Contagem de E. coli em TBX</i>	43
3.3.2. <i>Detecção de STEC de acordo com o método ISO/DIS 13136-1:2025</i>	45
3.3.2.1. Etapa de rastreio (screening): PCR 1 - Detecção de genes <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i> no caldo de enriquecimento	45
3.3.2.2. Etapa de isolamento de colónias suspeitas de STEC	52
3.3.2.3. PCR 2: deteção de genes <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i> em colónias isoladas	54
3.3.2.4. Etapa de confirmação.....	56
3.3.3. Identificação dos vários tipos de colónias isoladas de CA-STECS e TBX	57
3.3.3.1. Identificação de colónias suspeitas de STEC.....	57
3.3.3.2. Identificação de colónias não suspeitas de STEC.....	58
3.4. Constrangimentos à implementação do método de Detecção de STEC ISO/DIS 13136-1:2025.....	60
3.4.1. Determinação da eLOD ₅₀	60
3.4.2. Competição da microbiota presente no queijo na etapa de enriquecimento.....	60
3.4.3. Presença de <i>E. coli</i> não STEC nas amostras e seletividade dos meios utilizados ...	61
3.4.4. Expressão dos resultados: eliminação da possibilidade de deteção presuntiva de STEC	62

3.5. Possíveis estratégias de mitigação para os constrangimentos e as limitações sentidas.....	63
3.5.1. Adição de agentes seletivos ao caldo de enriquecimento e/ou de um meio de enriquecimento verdadeiramente seletivo.....	63
3.5.2. Inclusão de uma etapa de concentração específica de STEC.....	63
3.5.3. Desenvolvimento de meios de cultura com maior seletividade para STEC.....	64
4. Conclusões finais e perspectivas futuras	64
5. Referências bibliográficas.....	i
6. Anexos	xii
Anexo I - Tabela C. 1 da norma ISO 16140-3:2021.....	xii
Anexo II - Tabela 6 da norma ISO 16140-3:2021.....	xiv
Anexo III - Relatório PCR amostras Q1 a Q5.....	xv
Anexo IV – Relatório PCR amostras Q6 a Q10	xviii
Anexo V – Relatório PCR amostras Q11 a Q15	xxi
Anexo VI – Relatório PCR resultados amostras Q16 a Q22.....	xxiv
Anexo VII – Placas de CA-STECC e TBX obtidas a partir da inoculação das amostras cujo resultado PCR foi positivo (Q8, Q9, Q10, Q21 e Q22).....	xxvii

Lista de tabelas

Tabela 1: Combinações de genes mais associados ao desenvolvimento de doença grave e descrição dos potenciais quadros de doença.	11
Tabela 2: Notificações da presença de STEC em queijos de leite cru emitidas pelo RASFF (Janeiro 2023-Agosto 2025).....	12
Tabela 3: Surtos mundiais relacionados com a presença de STEC em queijos de leite cru.....	15
Tabela 4: Estirpes utilizadas para os testes de avaliação de desempenho ao nível da produtividade (P) e da seletividade (S) de cada meio de cultura.....	27
Tabela 5: Listagem de amostras analisadas e sua descrição.	30
Tabela 6: Kit PCR em tempo real, fluoróforos utilizados e correspondentes genes visados.....	36
Tabela 7: Protocolo utilizador no termociclador.	36
Tabela 8: Resultados das contagens em TSA de cada microrganismo a utilizar, para verificação da sua concentração.....	37
Tabela 9: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade do meio AN, tendo em conta cada estirpe e inoculação.....	37
Tabela 10: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade do meio AP, tendo em conta cada estirpe e inoculação.....	38
Tabela 11: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade do meio TBX, tendo em conta cada estirpe e inoculação.....	38
Tabela 12: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade e seletividade do meio CA-STEC, tendo em conta cada estirpe e inoculação.....	39
Tabela 13: Resultados NMP, tendo em conta o número de tubos com resultado positivo (turvação) em cada diluição e LIL correspondente.	40
Tabela 14: Resultados PCR 1 – número de amostras positivas por nível de contaminação e correspondente eLOD ₅₀	41
Tabela 15: Resultados da etapa de isolamento – número de amostras positivas por nível de contaminação e correspondente eLOD ₅₀	41
Tabela 16: Resultados das contagens de colónias correspondentes a <i>E. coli</i> em TBX (colónias azuis) realizada antes do início do protocolo para a deteção de STEC em todas as amostras analisadas.	44
Tabela 17: Resultados PCR obtidos para a deteção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> a partir do caldo de enriquecimento.....	46
Tabela 18: Valores de C _q e caracterização do tipo de curva de amplificação (típica ou não típica) das amostras em que foram detetados os genes <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i>	47
Tabela 19: Resultados das contagens de <i>E. coli</i> e PCR1, com correspondente tipo de curva de amplificação obtida.	51

Tabela 20: Aspeto das colónias obtidas em CA-STEC e TBX a partir do caldo de enriquecimento das diferentes amostras cujo resultado do PCR1 foi positivo. E consequente resultado da tentativa de isolamento em AN.	52
Tabela 21: Resultados PCR obtidos para a deteção de <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i> a partir de colónias suspeitas de CA-STEC e TBX isoladas em AN.	54
Tabela 22: Origem, resultado da identificação por API® 20 E, e respetiva aparência em meio complementar de diferentes tipos de colónias isoladas suspeitas de serem STEC, mas cujo resultado PCR 2 para deteção de genes <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i> foi negativo.	57
Tabela 23: Origem, resultado da identificação por API® 20 E e respetiva aparência em TBX de diferentes tipos de colónias roxas e colónias cinzentas provenientes de CA-STEC.	59

Lista de figuras

Figura 1: Curvas de amplificação típicas de um resultado de uma análise PCR, identificação dos valores de Threshold e Cq.	18
Figura 2: Esquema exemplificativo do protocolo a seguir para a determinação da eLOD50, com base no anexo F (protocolo 1) da norma ISO 16140-3:2021.....	28
Figura 3: Esquema exemplificativo do protocolo seguido para a realização de contagem do microrganismo <i>E. coli</i> ATCC 35150 pelo método NMP, para cálculo do LIL utilizado no ensaio (ISO 16140-3:2021).	29
Figura 4: Procedimento para a deteção e isolamento de STEC. Adaptado da norma ISO/DIS 13136-1:2025.	33
Figura 5: Método de extração de DNA de bactérias gram-negativas.	34
Figura 6: Resultados NMP, em que cada tudo com turvação corresponde a um resultado positivo	40
Figura 7: Distribuição percentual das amostras analisadas, consoante o tipo de leite utilizado na produção.	42
Figura 8: Distribuição percentual das amostras analisadas, consoante a origem geográfica do leite utilizado na produção.	43
Figura 9: Distribuição percentual das amostras analisadas, consoante a utilização de conservantes.....	43
Figura 10: Percentagem de amostras em cada nível de aceitabilidade, se se tratasse de queijo feito com leite tratado termicamente, tendo em conta os resultados da análise para contagem de <i>E. coli</i> em queijo de leite cru.	45
Figura 11: Exemplo de duas curvas de amplificação PCR típicas. Resultado Q21 para <i>stx1</i> (azul) e <i>stx2</i> (vermelho).	48
Figura 12: Exemplo de curva de amplificação PCR atípica. Resultado Q8 para <i>stx1</i>	48
Figura 13: Número total e número de amostras positivas para STEC, tendo em conta o tipo de leite utilizado no fabrico.....	49
Figura 14: Número total e número de amostras positivas, tendo em conta a origem geográfica do leite utilizado no fabrico.....	49
Figura 15: Número total e número de amostras positivas, tendo em conta a presença de conservantes.....	50
Figura 16: Exemplo ilustrativo em CA-STECC, de colónias azuis (CA) à esquerda, roxas (CR) ao centro e cinzentas (CC) e malva (CM) à direita.	53
Figura 17: Exemplo ilustrativo de colónias em TBX, CA à esquerda, CB ao centro e CAB à direita.	53

Figura 18: Exemplos da aparência de colónias negativas para STEC (esquerda), em comparação com aparência da estirpe utilizada como controlo positivo (direita).....	55
Figura 19: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a <i>Escherichia coli</i> (CM2). 58	
Figura 20: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a <i>Hafnia alvei</i> (CB)	58
Figura 21: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a <i>Proteus vulgaris</i> (CC1). 59	
Figura 22: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a <i>Morganella morganii</i> (CC2).....	59
Figura 23: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a <i>Citrobacter freundii</i> (Identificação CR).	59
Figura 24: Exemplo de placas TBX com elevada carga microbiana, correspondentes à inoculação de 0,1 mL da diluição 10 ⁻² da amostra Q21 (esquerda) e da diluição 10 ⁻¹ da amostra Q22 (direita)	61
Figura I: Resultados placas CA-STECC (cima) e TBX (baixo) da amostra Q8.	xxvii
Figura II: Resultado placas CA-STECC (esquerda e centro) e TBX (direita) da amostra Q9.	xxvii
Figura III: Resultado placas CA-STECC (esquerda) e TBX (direita) da amostra Q10.	xxvii
Figura IV: Resultado placas CA-STECC e TBX da amostra Q21.	xxviii
Figura V: Resultados placas CA-STECC e TBX da amostra Q22.....	xxviii

Lista de abreviaturas

AN	Agar Nutritivo (<i>Nutrient Agar</i>)
AP	Água peptonada tamponada
a_w	Atividade da água
BAL	Bactérias Ácido-Láticas
CA	Colónias azuis
CA-STECC	CHROMagar™ STEC
CAB	Colónias brancas com centro azul
CB	Colónias brancas
CC	Colónias cinzentas
CE	Comunidade Europeia
CM	Colónias malva
Cq	Ciclo de quantificação (<i>Quantification Cycle</i>)
CR	Colónias Roxas
D	Diarreia
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa
DEC	<i>E. coli</i> diarreiogénica
DOP	Denominação de Origem Protegida
DS	Diarreia Sanguinolenta
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EEE	Espaço Económico Europeu
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ELFA	Ensaio de Fluorescência Enzimática (<i>Enzyme-Linked Fluorescent Assay</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
eLOD₅₀	Estimativa do LOD ₅₀
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxinogénica
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GB3	Globotriaosilceramida
HACCP	Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos
IAC	Controlo de Amplificação Interno
IMS	Separação imunomagnética

ISO	Organização Internacional de Normalização (<i>International Organization for Standardization</i>)
LIL	Nível mais baixo de inoculação (<i>Low Inoculation Level</i>)
LOD₅₀	Limite de Detecção a 50%
MALDI-TOF	Espectrometria de Massa por Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Tempo de Voo (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>)
NGS	Sequenciação de Nova Geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NMP	Número Mais Provável
P	Produtividade
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos para Consumo Humano e Animal (<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>)
S	Seletividade
SHU	Síndrome hemolítico-urémico
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina produzida pela <i>Shigella dysenteriae</i>
stx	Genes responsáveis pela produção de toxina Shiga
TBX	Agar cromogénico TBX (<i>Tryptone-Bile-X-Glucuronate Agar</i>)
TS	Triptona Sal (<i>Tryptone-Salt Broth</i>)
TSA	Agar Triptona Soja (<i>Tryptone Soy Agar</i>)
ufc	Unidades formadoras de colónia
UE	União Europeia
USD	Dólares americanos
VTEC	<i>E. coli</i> produtora de verotoxina
VTX	Toxina com citotoxicidade para células VERO
WGS	Sequenciação Completa do Genoma (<i>Whole Genome Sequencing</i>)

1. Enquadramento teórico

1.1. O Queijo

1.1.1. Origem

O queijo é considerado um dos alimentos mais antigos da humanidade [1]. Embora não se saiba ao certo quando surgiu, pensa-se que tal remontará aos primórdios da civilização, aquando do início da domesticação de animais, que possibilitou não só o início do consumo de leite, mas também a necessidade de, de alguma forma, o preservar, uma vez que é um alimento bastante perecível [1].

Pensa-se que a primeira das civilizações a criar gado e utilizar o seu leite para fabricar queijo foi a civilização egípcia. Relativamente ao continente europeu, foram os gregos os primeiros a fabricar queijo [1]. Mais tarde, o queijo chegou aos romanos que, com a criação e expansão do seu império, o levaram para o resto do mundo [1].

O processo de diversificação do queijo começa com o fim do Império Romano [1]. Este acontecimento contribuiu para a diminuição do comércio de longa distância e levou cada população a fazer e a desenvolver os seus próprios queijos [1].

Apesar da sua longa existência, o queijo tal como o conhecemos só veio a ser fabricado mais tarde, aquando do desenvolvimento de conhecimentos acerca de processos fermentativos, sendo o seu ancestral o leite coalhado [1].

O processo de pasteurização apenas foi inventado no ano de 1864, pelo químico francês Louis Pasteur. Todo o queijo consumido até esta altura era produzido com leite cru [2].

1.1.2. Processo de fabrico

A produção de queijos inclui várias etapas: a coagulação, o dessoramento, a salga e, finalmente, a cura.

É a adição de coalho de origem animal, vegetal e/ou microbiano que permite a coagulação do leite e a sua consequente divisão em duas partes: soro (parte líquida) e coalhada (parte sólida, a partir da qual se originará o queijo) [3], [4]. À etapa de separação destas duas partes dá-se o nome de dessoramento [4].

A coalhada é, essencialmente, constituída por caseína, gordura, água, vestígios de lactose e sais minerais, encontrando-se os restantes constituintes do leite presentes no soro [3]. A sua formação acontece devido à ação das enzimas, que levam à desnaturação da caseína [3], [4]. Posteriormente o queijo é prensado, para eliminação de soro que esteja em excesso, e moldado, processo onde a massa da coalhada é depositada em moldes para que o queijo obtenha o seu formato final [3]. A etapa de prensagem pode não ser aplicada a determinados tipos de queijo, como é o caso do queijo fresco e do requeijão [3].

As características organolépticas finais do queijo são obtidas durante o processo de cura [3].

Nesta etapa, os queijos ficam em repouso sob condições de temperatura e humidade controladas, que vão sendo alteradas durante o processo, para favorecer a secagem do queijo, de modo que a temperatura vai sofrendo ligeiros aumentos e a humidade relativa vai diminuindo. Para além disso, é importante que durante esta etapa os queijos sejam virados e lavados regularmente [3], [5].

O tempo de cura é variável e depende do tipo de queijo que se pretende obter, sendo que quanto menor o tempo de cura mais amanteigado será o queijo [3], [5]. No caso de queijos de leite pasteurizado, o processo de produção inclui ainda a pasteurização do leite, para eliminação de microrganismos patogénicos e redução da carga microbiana [3], [4]. Nestes casos, posteriormente, o leite é arrefecido à temperatura a que vão ocorrer as etapas seguintes (coagulação e fermentação), sendo que esta temperatura é variável e depende do tipo de queijo [4].

Apesar de o leite cru estar regulamentado na União Europeia (UE), muitos governos desaconselham o seu consumo devido aos potenciais riscos que apresenta para a saúde [6], [7]. Da mesma forma, é aconselhado o consumo de queijo feito a partir de leite pasteurizado.

1.1.3. Relevância na gastronomia e economia

Apesar de se recomendar o consumo de queijo feito a partir de leite pasteurizado, em detrimento do queijo produzido a partir de leite cru, em diversos países, especialmente naqueles com uma maior tradição, como é o caso de, por exemplo, Portugal e França, continua a ser o queijo de leite cru aquele que os consumidores e apreciadores preferem [8]. Embora se tente mimetizar o fabrico de queijos tradicionais, a utilização de leite pasteurizado em vez de leite cru, não consegue reproduzir os mesmos resultados organoléticos. Isto acontece, pois, é o facto de se utilizar leite cru, com uma microbiota muito diversificada, que confere ao queijo os aromas e sabores mais apreciados pelos consumidores [6].

Desta forma, considera-se que a utilização de leite cru como matéria-prima para o fabrico do queijo é uma das razões pelas quais este alimento tem um papel tão importante não só na gastronomia de diversos países como também na economia.

A indústria do queijo é um dos setores de produção alimentar mais importantes na Europa e Reino Unido, sendo que cerca de 36% do leite produzido na UE é utilizado para o fabrico de queijo [9], [10]. No ano de 2024 esta indústria apresentava uma dimensão de mercado correspondente a 73,97 mil milhões de dólares americanos (USD) e as perspetivas apontam para ultrapassar, em 2029, o marco dos 100,5 mil milhões USD [11].

Um estudo realizado em 2019 concluiu que, em média, na UE e Reino Unido eram consumidos 15 kg de queijo por pessoa por ano, num total de 9 milhões de toneladas ao ano [9]. Este estudo previa ainda um aumento deste consumo para 16 kg de queijo por pessoa por ano, no final de 2025 [9].

O queijo também desempenha um papel significativo na cultura e tradições europeias. Em Portugal, a Região Autónoma dos Açores é uma das que mais contribui para a tradição gastronómica e mercado do queijo. Anualmente, são produzidas nesta região 32 mil toneladas de queijo, o que contribui amplamente para a sustentabilidade da economia, a valorização dos produtos e o turismo gastronómico [12]. Outro exemplo, em Portugal continental, de um tipo de queijo que contribuiu para o desenvolvimento da região e o crescimento da atividade turística é o queijo Serra da Estrela com Denominação de Origem Protegida (DOP), cuja produção anual está entre 160 e 180 toneladas [13]. Destaca-se ainda o queijo de ovelha amanteigado, produzido na Quinta do Pomar, na Soalheira, Fundão, que foi considerado pelo *World Cheese Awards 2024* o melhor queijo do mundo. Esta distinção levou à elevada procura deste queijo e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da empresa e crescimento da economia local [14].

Noutros pontos do globo, o queijo não deixa de ter um lugar central na identidade cultural. Destaca-se, como exemplo, o Queijo Mineiro, de Minas Gerais, no Brasil, cuja produção é vista como fundamental para o desenvolvimento e economia locais, já que, só no ano de 2022, a comercialização destes queijos artesanais gerou uma receita superior a 6 mil milhões de reais brasileiros, o que corresponde a mais de 946 milhões de euros [15].

1.1.4. Microbiota específica

Os queijos produzidos a partir de leite cru são caracterizados pelo seu sabor e cheiro mais intensos, quando comparados com queijos feitos com leite pasteurizado. Esta diferença, que lhes é característica, deve-se sobretudo à maior diversidade de microrganismos que estão presentes no leite cru [16].

Tal como o nome indica, contrariamente ao que acontece com o leite pasteurizado, o leite cru não passa por um tratamento térmico capaz de eliminar os microrganismos nele presentes. A microbiota presente no leite cru é uma componente essencial de todos os queijos curados, já que, devido ao papel que desempenha durante todo o processo de maturação, determina as características organoléticas e físico-químicas do produto final [16].

As bactérias ácido-láticas (BAL), que desde há muito estão associadas à fermentação e conservação de alimentos, desempenham um importante papel na produção de queijo durante todo o processo, começando por impulsionar a fermentação espontânea do leite cru [16].

Assim, numa fase inicial, as BAL contribuem para a acidificação do leite, devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido láctico através da metabolização da lactose [16].

Por ser o principal responsável pela diminuição do pH, o ácido láctico apresenta diferentes funções de elevada importância no processo de produção de queijo, já que a acidificação auxilia a coagulação do leite, e, entre outros, controla o crescimento de microrganismos indesejáveis, como por exemplo, microrganismos patogénicos [17]. Tal é possível, pois,

algumas BAL têm a capacidade de produzir metabolitos com atividade antagónica e/ ou antibacteriana específica, como por exemplo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas, que têm elevado potencial contra diversos tipos de microrganismos [16].

Esta é considerada uma característica fundamental e de grande importância tecnológica das BAL, já que a produção de ácido no momento e quantidades certas constituem um fator crucial para que se consigam produzir queijos de elevada qualidade [16].

Para além de serem responsáveis pela acidificação do meio, durante o processo de fermentação, as BAL também originam diversos metabolitos, resultantes de processos de proteólise, lipólise e conversão de aminoácidos, que vão contribuir para a maturação e sabor final do queijo [16].

A microbiota do leite cru inclui diversos microrganismos. As BAL cuja presença neste alimento é mais comum são *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp. [17]. Para além destas, podem ainda ser encontrados microrganismos de outros géneros, tais como *Staphylococcus* spp., *Arthrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Acinetobacter* spp.[16].

No queijo fabricado a partir de leite cru, as BAL dominantes pertencem aos géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. As diferenças de microbiota presente nos diferentes tempos de cura devem-se ao facto de nem todas as populações microbianas terem a capacidade de se adaptarem às condições ambientais específicas do queijo [16].

Dependendo do tipo de queijo em análise, mesmo utilizando leite cru, os níveis de organismos com relevância tecnológica, tais como *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* podem variar [18]. Num estudo realizado acerca da metagenómica do microbioma bacteriano em queijos Serra da Estrela DOP e similares não DOP, os níveis de *Lactococcus* oscilam entre 6,4 a 8,4 Log ufc/g em queijos DOP e 3,3 e 4,4 Log ufc/g em queijos não DOP, para *Enterococcus* as contagens variaram de 6,8 a 8,9 Log ufc/g em queijos DOP e de 4,1 a 6,9 Log ufc/g em queijos não DOP [18].

1.1.5. Microrganismos contaminantes e vias de contaminação

Os microrganismos patogénicos representam menos de 15% dos casos de contaminação do leite [19]. Esta contaminação pode ter diversas origens, entre as quais o teto do animal e o úbere, mastites ou o próprio equipamento utilizado para a ordenha [19].

Os microrganismos que contaminam o leite diferem relativamente à fonte de contaminação, estando a presença de *Corynebacteria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Micrococcus* mais associada a contaminações com origem no úbere, *Staphylococcus* e *Streptococcus* a mastites e *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e certas bactérias lácticas ao equipamento de ordenha [19].

Apesar de não constar dos microrganismos patogénicos mais frequentemente associados a contaminações do leite, a contaminação de leite com *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) não deixa de ser um problema ao qual se deve dar muita atenção, já que é sabido que os animais leiteiros, como bovinos, ovinos e caprinos, embora portadores saudáveis, são o principal reservatório deste microrganismo [20]. Estes animais albergam STEC no seu trato gastrointestinal, pelo que o patogénico será eliminado em conjunto com as suas excreções [21].

A principal via de contaminação do leite cru com STEC é exatamente a contaminação fecal do leite, via direta ou indireta. Quando, de alguma forma, o úbere entra em contacto com as fezes, há o risco de ocorrer contaminação do canal do teto, o que, conseqüentemente, resultará na contaminação do leite [20], [22].

Apesar da contaminação fecal se demonstrar como a principal fonte de contaminação de STEC em leite cru, não deve ser descartado o facto de esta também poder ocorrer por via intramamária, através do desenvolvimento de mastite subclínica [22].

A mastite consiste numa infeção da glândula mamária do animal, que pode ser causada por diversos microrganismos, entre os quais STEC [23]. A mastite subclínica consiste num tipo de mastite em que o animal não apresenta quaisquer sintomas e o leite permanece inalterado, pelo que a ordenha do animal continua a ser feita [24], [25]. Desta forma, a infeção causada permite que haja excreção do microrganismo que a originou, o que, conseqüentemente, irá conduzir à contaminação do leite [22], [26].

A possibilidade da contaminação do queijo ocorrer em fábrica é reduzida, pelo que a origem da STEC encontrada em queijos de leite cru está maioritariamente associada à produção primária, mais concretamente, à contaminação do leite durante o processo de ordenha [22]. Desta forma, e tendo em conta que os produtos lácteos proporcionam condições favoráveis ao crescimento deste microrganismo, o leite e derivados, como o queijo, podem constituir uma potencial fonte de STEC [22].

1.2. Segurança dos Alimentos e Regulamentação

Segundo a FAO, a Segurança dos Alimentos (*Food Safety*) consiste num conjunto de processos e ações que têm em vista impedir que os alimentos contenham substâncias que possam prejudicar a saúde de quem os consumir [27].

Desta forma, considera-se que um alimento é seguro se a sua ingestão não causar qualquer tipo de dano ao consumidor. Para que tal seja garantido, o setor alimentar encontra-se fortemente regulamentado [28]. O *Codex Alimentarius* consiste num conjunto de normas, códigos, diretivas e outras recomendações com reconhecimento internacional que descreve os princípios gerais a aplicar ao longo de todas as fases da cadeia alimentar para promover a segurança sanitária dos alimentos, a proteção dos consumidores e garantir práticas justas

no comércio de alimentos [29]. Neste documento, que se baseia na prevenção, são definidas as condições de higiene necessárias à produção de alimentos seguros para consumo e a metodologia de Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos (HACCP), em conjunto com as correspondentes orientações para a sua aplicação.

A política de Segurança dos Alimentos da União Europeia é, sobretudo, regida por dois artigos do Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia: 168º, relativo à saúde pública, e 169º, relativo à defesa dos consumidores [30]. Esta política tem como objetivo a proteção dos consumidores e a garantia do bom funcionamento do mercado, abrangendo, de forma integrada, toda a cadeia alimentar, “*do prado ao prato*” [30].

A legislação em vigor incide em diversos aspetos relacionados com a segurança, abrangendo produção primária, condições de higiene na transformação, embalagem, rotulagem e os controlos oficiais relativos ao cumprimento das normas de segurança dos alimentos [30].

Na UE, a legislação aplicada na área da segurança dos alimentos é uma das mais abrangentes. O seu fundamento é o Regulamento (CE) nº 178/2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA – *European Food Safety Authority*) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios [31]. O seu principal objetivo é garantir um elevado nível de segurança em saúde pública pela segurança dos géneros alimentícios e alimentos para animais, sendo que, segundo este regulamento, os géneros alimentícios não serão considerados seguros se se entender que são prejudiciais para a saúde e/ ou impróprios para consumo humano [31]. Portugal, como membro da UE, adotou a legislação implementada na comunidade, mas também possui os seus regulamentos específicos [32].

O Regulamento (CE) nº 852/2004, que se refere à higiene dos géneros alimentícios, e, em conjunto com os seus anexos, estabelece um conjunto de requisitos que as empresas do setor alimentar devem cumprir para que se garanta a segurança dos géneros alimentícios que produzem e, conseqüentemente, a segurança do consumidor [33]. Tal é conseguido através de boas práticas de higiene e processos baseados nos princípios HACCP [33].

As boas práticas de higiene estabelecidas neste regulamento são aplicáveis durante a produção primária (agricultura, caça e pesca) e seguintes (matadouros, unidades de transformação, retalho, entre outros), transporte, manuseamento e armazenamento dos produtos primários, bem como o transporte de animais vivos [33]. Estas práticas são referentes a diferentes domínios, entre os quais instalações e equipamentos, condições de transporte, gestão de resíduos alimentares, higiene pessoal e formação dos trabalhadores do setor alimentar, acondicionamento e embalagem e processos de tratamento térmico [33].

O Regulamento (CE) nº 853/2004 complementa o Regulamento (CE) nº 852/2004, estabelecendo regras específicas para operadores que trabalhem com géneros alimentícios

de origem animal, como carne, produtos de pesca e produtos lácteos [7]. O princípio fundamental de ambos os regulamentos acima mencionados é o de que todos os operadores do setor alimentar devem assegurar que os géneros alimentícios são tratados seguindo regras de higiene e segurança, estando isentos de contaminação por perigos de origem alimentar, em todas as fases do processo de produção [7], [33].

Invisíveis aos olhos do Homem, os perigos microbiológicos são, entre os três tipos de perigos (microbiológicos, físicos e químicos), aquele que maior risco representa para a segurança dos alimentos [34]. De forma a prevenir e evitar surtos e casos de doença causados pela presença de microrganismos patogénicos nos alimentos, o Regulamento (CE) nº 2073/2005 estabelece os critérios microbiológicos para determinados microrganismos [35]. Neste regulamento são estabelecidos dois tipos distintos de critérios, os Critérios de Segurança Alimentar e os Critérios de Higiene do Processamento [35]. Os primeiros são aplicáveis e devem ser cumpridos ao longo de todo o prazo de validade do produto, já os segundos referem-se aos limites que devem ser cumpridos antes de deixarem de estar sob o controlo imediato do produtor [35]. Para cada uma das diferentes categorias de géneros alimentícios, o regulamento e o respetivo anexo especificam os microrganismos para os quais a amostra tem de ser testada, o plano de amostragem, os limites para cada uma das unidades de amostra testada, o método de análise de referência a ser usado, a fase do processo em que o critério se aplica e as ações que devem ser tomadas em caso de se obterem resultados não satisfatórios [35].

Desta forma, para cumprirem com o estipulado neste regulamento, as empresas do setor alimentar têm de se certificar que os géneros alimentícios que manuseiam e processam estão de acordo com estes critérios.

Para além dos regulamentos existem também normas para sistemas de gestão da segurança dos alimentos, como é o caso das normas ISO (*International Organization for Standardization*). Apesar de o seu âmbito não ser de carácter obrigatório, a aplicação de certas normas ISO facilita o cumprimento dos requisitos legais e regulamentares.

Uma destas normas é a ISO 22000, que tem por base os princípios HACCP do *Codex Alimentarius* e requer a implementação de um sistema de gestão de segurança dos alimentos [36].

1.3. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

Escherichia coli (*E. coli*) foi descoberta em 1885 pelo pediatra alemão Theodor von Escherich, que, na época, a denominou de *Bacterium coli commune*. Apenas em 1919 a bactéria foi renomeada, em honra ao seu descobridor – Escherich, passando a ter o nome de *Escherichia coli* [37].

Taxonomicamente, a espécie *E. coli* pertence ao Domínio *Bacteria*, Filo *Pseudomonadota*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Enterobacterales*, Família *Enterobacteriaceae* e Gênero *Escherichia* [38]. Trata-se de uma bactéria gram-negativa, em forma de bastonete e que pode ser tanto imóvel como móvel por flagelos. É anaeróbia facultativa, o que significa que consegue sobreviver em ambientes com presença ou ausência de oxigênio e a sua temperatura ótima de crescimento é entre os 35 °C e os 40 °C, embora se consiga desenvolver num intervalo de temperaturas entre os 7 °C e os 46 °C [39].

Quanto à atividade da água (a_w), o valor mínimo que permite o crescimento de *E. coli* é 0,95. Este valor de a_w pode ocorrer em meios com concentrações de sal (NaCl) de 6,5%, sendo o crescimento inibido para valores superiores a 8,5% [39].

A radiação é um fator letal para a *E. coli*. O seu efeito é máximo a temperaturas entre os 45 e os 55 °C e é potenciado pela presença de oxigênio [39].

Tal como todas as enterobactérias, *E. coli* tem uma distribuição ubíqua, encontrando-se, por isso, em diversos tipos de ambientes, entre os quais animais de sangue quente, solo, plantas e água. É de salientar que esta é uma bactéria com capacidade de formar biofilmes em várias superfícies bióticas e abióticas [40].

Embora a maioria das estirpes de *E. coli* habite o cólon como comensais, e raramente se apresentem como causa de doença em indivíduos saudáveis, existem várias estirpes patogénicas que podem causar doença, tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos imunocomprometidos [41].

As estirpes de *E. coli* envolvidas em doença diarreica são uma das maiores e mais importantes causas deste tipo de doença, que constitui um grave problema de saúde pública e que se apresenta como uma das principais causas de mortalidade em bebés e crianças, especialmente em locais onde as condições de vida são mais precárias [41].

Através da transferência horizontal de genes, as estirpes de *E. coli* evoluíram por aquisição de um conjunto particular de características que persistiram com sucesso [41]. Existem seis patótipos de *E. coli* diarreogénicas (DEC), que se diferenciam tendo em conta os mecanismos de virulência adquiridos, o local preferencial de colonização do hospedeiro, sintomas clínicos e consequências subsequentes à infeção. Estes seis patótipos incluem: *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) [42].

Destes seis patótipos destaca-se o patótipo STEC (devido à semelhança da toxina produzida (Shiga - Stx) com a produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae*), patótipo este também denominado por VTEC (*E. coli* produtora de verotoxina - Vtx - pela sua citotoxicidade em células Vero) [43].

As STEC podem, por sua vez, ser divididas em serogrupos (O) ou serótipos (O:H), consoante o tipo de antígenos somáticos (O) e/ ou flagelares (H) que apresentam, sendo que é o serótipo O157:H7 e os serogrupos denominados por “não-O157” aqueles que mais estão associados a casos de doença humana grave [43]. Enquanto na Europa os serogrupos “não-O157” mais comumente associados a doença humana são O26, O103, O91, O146 e O145, nos Estados Unidos da América estes incluem O26, O45, O103, O111, O121 e O145 [44].

1.3.1. Virulência

As toxinas Stx são os principais fatores de virulência das STEC [45]. São estas toxinas, codificadas pelos genes *stx*, os agentes responsáveis por muitos sintomas e mesmo pela morte em doentes infetados com este microrganismo [46].

Para além dos genes *stx*, as STEC podem possuir outro tipo de genes de virulência, como é o caso dos genes de aderência, que, tal como o nome indica, favorecem a aderência da bactéria às células hospedeiras [47].

O gene *eae*, responsável pela produção de intimina, é um exemplo de gene de aderência que pode estar presente nas STEC. A intimina é uma proteína de superfície que promove a aderência das STEC às células dos mamíferos e, conseqüentemente, promove a ocorrência de lesões em células intestinais [47]. Apesar de funcionar como mecanismo de aderência, esta proteína não constitui um requisito obrigatório para a ocorrência de casos graves da doença, o que sugere a existência de mecanismos alternativos, como é o caso da aderência via adesinas reguladas pelo gene *aggR* [48].

Atualmente, *eae* e *aggR* são os dois genes de aderência geralmente envolvidos nas infeções por STEC, sendo indicada a verificação da sua presença nos isolados de STEC na parte 2 da norma ISO/DIS 13136-2:2025, a partir do seu isolamento pela aplicação da parte 1 da referida norma (ISO/DIS 13136-1:2025) [48], [49].

Estão descritos na bibliografia dois tipos de toxinas Stx: Stx1, que é idêntica à Stx produzida por *Shigella dysenteriae* e Stx2, cuja percentagem de aminoácidos idênticos a Stx1 está entre 50 e 60 [50].

Os tipos de Stx (Stx1 e Stx2) encontram-se, por sua vez, subdivididos em quatro (*stx*_{1a}, *stx*_{1c}, *stx*_{1d}, *stx*_{1e}) e quinze (*stx*_{2a}, *stx*_{2b}, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f}, *stx*_{2g}, *stx*_{2h}, *stx*_{2i}, *stx*_{2j}, *stx*_{2k}, *stx*_{2l}, *stx*_{2m}, *stx*_{2n} e *stx*_{2o}) subtipos, respetivamente [51]. Esta classificação foi estabelecida tendo por base a variação na sequência de aminoácidos [50], [52]. Na ISO/DIS 13136-2:2025 procede-se à subtipagem dos genes *stx* e à determinação dos serogrupos O157, O26, O103, O145, O111, O45 e O121 por amplificação por PCR em tempo real (*real-time PCR*, ou qPCR) [49].

Todas as toxinas Stx têm seis proteínas, organizadas numa configuração A₁B₅: complexo que é composto por uma subunidade A ligado através de ligação não covalente a um pentâmero de subunidades B [50].

A subunidade A é constituída por inibidores de síntese proteica que apenas atuam na clivagem do componente 28S rRNA dos ribossomas eucarióticos [45]. Já cada subunidade B é composta por três locais de ligação capazes de se ligarem ao glicoesfingolípido neutro globotriaosilceramida (Gb3), que se localiza na superfície das células hospedeiras [45].

O facto das subunidades B permitirem a ligação ao Gb3 é essencial na atividade citotóxica da toxina Shiga, já que é esta ligação que permite a internalização da toxina, que é feita através do aparelho de Golgi para o retículo endoplasmático, num processo denominado por transporte retrógrado. Para além disso, estas subunidades também induzem invaginações na membrana e o desenvolvimento de ligações tubulares que são importantes no processo de absorção celular da toxina [45]. Durante o seu fluxo no interior da célula, as subunidades A sofrem clivagem na rede trans-Golgi, originando-se dois fragmentos, A1 e A2, que só posteriormente, no retículo endoplasmático, se separam. Após separação o fragmento A1 é translocado através da membrana do retículo endoplasmático para o citoplasma [45]. Segundo Lee M. *et al.* (2010) apenas este fragmento da toxina atinge o citoplasma.

1.3.2. Patogenicidade e Epidemiologia

Todas as STEC conhecidas são patogénicas para os humanos. A doença causada por estas bactérias tem um período de incubação que pode ser de apenas algumas horas (2 a 9 horas) até 10 dias após a ingestão de um alimento ou água contaminados sendo, em média, de 3 a 4 dias [53].

Após exposição, a probabilidade de infeção depende, entre outros fatores, do número de células de STEC ingeridas. A dose infecciosa necessária para causar doença é tão baixa que a presença de apenas 1-100 células viáveis (unidades formadoras de colónias – ufc) pode ser suficiente, tendo já sido reportados casos de doença, por consumo queijo de leite cru, nos quais foi estimado que a concentração de STEC no alimento era de apenas 5 -10 ufc/g [43], [44]. Devido à dose infecciosa deste microrganismo ser tão baixa, a sua presença em alimentos torna-os, à vista do Regulamento (CE) nº 178/2002, alimentos não seguros, já que o seu consumo é prejudicial para a saúde [31].

Este é o único patótipo diarréiogénico de *E. coli* com origem comprovadamente zoonótica, sendo os animais de carne e de leite o seu reservatório natural. Assim, a doença causada por STEC está muitas vezes associada a alimentos como o leite, principalmente não pasteurizado, e a carne, principalmente bovina. Apesar disto, importa referir que a infeção por STEC também pode ser transmitida de pessoa para pessoa, através de contacto próximo com uma pessoa infetada, ou até mesmo através da transmissão direta do animal para o Homem [54]. Por sua vez, o grau de severidade da doença também é variável e pode depender de fatores como o serogrupo responsável pela infeção. Os serogrupos de STEC mais associados a infeções severas, caracterizadas por necessidade de hospitalização, desenvolvimento de diarreia (D), diarreia sanguinolenta (DS) e/ou síndrome hemolítico-urémico (SHU), são O157

e O26 [44]. Seguidos destes serogrupos, aqueles que estão entre os cinco mais associados a necessidade de hospitalização são O145, O103 e O111, associados a SHU são O111, O80 e O45 e a diarreia sanguinolenta O103, O145 e O91 [44].

Outro fator que influencia o grau de severidade da doença é o tipo de genes de virulência e/ou de aderência presentes na bactéria [48]. A Tabela 1, adaptada do relatório de 2018 da FAO acerca da atribuição, caracterização e monitorização de STEC, apresenta as combinações de genes que estão mais associados a doença grave [48].

Tabela 1: Combinações de genes mais associados ao desenvolvimento de doença grave e descrição dos potenciais quadros de doença.

GENES	POTENCIAIS QUADROS DE DOENÇA
<i>stx2a + eae</i> ou <i>aggr</i>	D/ DS/ SHU
<i>stx2d</i>	D/ DS/ SHU
<i>stx2c + eae</i>	D/ DS
<i>stx1a + eae</i>	D/ DS
Outros subtipos de <i>stx</i>	D

Em 2018, a FAO concluiu que a presença de *stx2a* em conjunto com genes de aderência (*eae* ou *aggR*) está fortemente associada a quadros de doença mais severos [48].

Para além das características da respetiva estirpe de STEC, existem outros fatores que influenciam a ocorrência e a gravidade da infeção como, por exemplo, a idade e o género do hospedeiro. Indivíduos com idade inferior a 5 anos ou superior a 65 anos são considerados grupos de risco, já que devido ao seu sistema imunitário mais frágil são mais propícios a desenvolver quadros de doença severa ou SHU [55]. Já um estudo realizado no Japão, em 2016, evidenciou que, entre homens e mulheres com idade superior a 20 anos, eram as mulheres quem apresentava um maior risco para o desenvolvimento de SHU [56].

O tratamento da doença depende da forma como cada paciente é afetado, mas, em casos menos severos, passa por manter o doente hidratado. Isto porque em caso de vômitos e diarreia ocorre elevada perda de líquidos. O uso de antibióticos não constitui uma hipótese nestes casos, visto que pode desencadear doenças mais graves [53].

1.3.3. Alertas relativos à deteção de STEC em queijos de leite cru

Os processos de tratamento térmico, entre os quais a pasteurização, constituem tratamentos eficazes para a eliminação de microrganismos patogénicos que possam estar presentes nos alimentos e bebidas. Sem a aplicação de nenhum destes processos existe sempre um maior risco de presença de agentes patogénicos na matriz alimentar [57]

Os queijos de leite cru são fabricados à base de leite que não passa por nenhum tipo de tratamento térmico, já tendo sido reportados diversos casos de deteção de microrganismos patogénicos, incluindo STEC, no produto final disponível no mercado.

O RASFF, Sistema de Alerta Rápido para Alimentos para Consumo Humano e Animal (*Rapid Alert System for Food and Feed*), é uma ferramenta de segurança dos alimentos utilizada na UE, que garante a troca de informação entre países membros [58].

Desde 2020, foram emitidas pelo RASFF 44 notificações relativas à deteção de STEC em queijos de leite cru, tendo todas elas levado à retirada do produto dos mercados pelos quais foi distribuído e/ ou à emissão de um alerta ao consumidor.

Os detalhes relativos às notificações mais recentes, desde janeiro 2023 a agosto de 2025, encontram-se na Tabela 2 [59].

Tabela 2: Notificações da presença de STEC em queijos de leite cru emitidas pelo RASFF (Janeiro 2023-Agosto 2025).

DATA DE NOTIFICAÇÃO	PRODUTO	ORIGEM DO PRODUTO	PAÍS NOTIFICADOR	INFORMAÇÕES DE ESTIRPE
Março 2023	Queijo Camembert	França	Bélgica	NE*
Junho 2023	Queijo de cabra	Roménia	República Checa	NE
Julho 2023	Queijo Feta	Grécia	Alemanha	NE
Julho 2023	Queijo Malga	Itália	Itália	O26
Agosto 2023	Queijo de cabra	França	Alemanha	NE
Agosto 2023	Queijo de cabra	França	Alemanha	NE
Outubro 2023	Queijo Morbier	França	Países Baixos	NE
Outubro 2023	Queijo de cabra de pasta mole	França	Itália	NE
Novembro 2023	Queijo de cabra de pasta mole	França	Itália	NE
Dezembro 2023	Queijo de cabra de pasta mole	França	Itália	NE
Dezembro 2023	Queijo Morbier	França	França	NE
Março 2024	NE	Itália	Itália	stx1 positiva

DATA DE NOTIFICAÇÃO	PRODUTO	ORIGEM DO PRODUTO	PAÍS NOTIFICADOR	INFORMAÇÕES DE ESTIRPE
Março 2024	Queijo Brie de Meaux	França	França	NE
Março 2024	Queijo de cabra	França	Itália	NE
Junho 2024	Queijo de cabra	Irlanda	Irlanda	O103
Junho 2024	Queijo Crottin de Chavignol Aop	França	França	NE
Julho 2024	NE	França	França	NE
Julho 2024	Queijo Cantal	França	França	O26:H11
Setembro 2024	NE	França	Países Baixos	NE
Outubro 2024	Queijo Bio Comté AOP	França	Bélgica	NE
Outubro 2024	Queijo Valençay	França	França	NE
Outubro 2024	Queijo Crottin De Chavignol	França	França	NE
Novembro 2024	NE	França	Suíça	NE
Dezembro 2024	NE	Itália	Itália	NE
Dezembro 2024	NE	França	Bélgica	NE
Março 2025	Conjunto de três queijos Raclette	França	França	O26:H11
Abril 2025	Queijo de Cabra	França	Países Baixos	NE
Julho 2025	NE	Espanha	Alemanha	NE
Agosto 2025	Queijos de cabra	França	França	O26:H11
Agosto 2025	Queijo de cabra	França	França	NE
Agosto 2025	Queijo Camembert	França	França	NE
Agosto 2025	Queijo de cabra	França	França	O145

* NE - Não especificado

Como se pode observar, a origem dos produtos de gerou notificações de alerta é maioritariamente francesa. Tal poderá estar relacionado com o facto de, como já referido, a

França ser um país com grande tradição de consumo e produção de queijos feitos com leite cru, bem como um elevado volume de exportação dos mesmos para outros países europeus.

1.3.4. Surtos por STEC na Europa e no Mundo

Segundo os relatórios epidemiológicos efetuados pelo ECDC, em 2022, 25 entre 29 países da UE comunicaram um total de 8 565 casos confirmados de infeção por STEC. Tal correspondeu a uma taxa de notificação de 2,5 casos por cada 100 000 habitantes, o que representou um aumento de 25% em comparação com o ano de 2021 [60].

Este aumento deveu-se sobretudo à subida de casos notificados pela Dinamarca, país que comunicou o maior número de casos confirmados em 2022, seguido pela Alemanha e pela Irlanda. Juntos, estes três países representaram 47,8% de todos os casos notificados na UE e Espaço Económico Europeu (EEE) [60]. Sabe-se que, de 3 462 casos de STEC com informação conhecida, 37% conduziram a hospitalizações e que 28 de 6 044 casos com desfecho conhecido resultaram em óbitos, o que se traduz numa letalidade de 0,5%. A maioria dos doentes falecidos tinha mais de 60 anos (54%) e a maioria deles (71%) tinha SHU [60].

Os dados de 2023 evidenciam que os casos de infeção por STEC continuam a aumentar. Nesse ano, registaram-se 10 217 casos de doença, o que corresponde a uma taxa de notificação de 3,1 casos por cada 100 000 habitantes [61]. Sabe-se que dos casos registados 7 192 foram adquiridos na UE e 895 foram adquiridos fora da UE [61]. Parte dos casos de doença tiveram origem alimentar, tendo sido confirmados 66 surtos com esta origem, seis dos quais com fortes evidências [61]. Os alimentos associados a estes seis surtos foram queijo (2), outros produtos lácteos (3) e carne bovina e/ou similares (1) [61].

No total de casos confirmados em 2023, 37,6% dos pacientes precisaram de ser hospitalizados e 0,40% faleceram devido à doença [61].

Nos Estados Unidos da América, entre os anos de 2021 e 2024, foram reportados anualmente entre 33 e 38 surtos de infeção por STEC. Alguns dos casos mais recentes foram associados a produtos hortofrutícolas, como cenouras, cebolas, nozes, mas também a queijo produzido com leite cru. A estes surtos, ocorridos entre março e dezembro de 2024, estão associados 176 casos de infeção que resultaram em 66 hospitalizações e 2 mortes [62], [63], [64], [65].

Na tabela abaixo (Tabela 3) destacam-se alguns dos surtos que ocorreram pelo mundo e ao longo dos anos, devido à presença de STEC em queijos fabricados a partir de leite cru [65], [66], [67], [68], [69].

Os dados recolhidos a partir da análise dos casos mencionados totalizam 37 hospitalizações e uma morte, causada pelo desenvolvimento de SHU, o que corresponde, respetivamente, a 28% e 0,8% dos casos de doença [65], [66], [67], [68], [70].

Tabela 3: Surtos mundiais relacionados com a presença de STEC em queijos de leite cru.

ANO	PAÍS	PRODUTO	TIPO DE LEITE	Nº DE CASOS	INFORMAÇÕES DE ESTIRPE
2010	Estados Unidos da América	Queijo Gouda	Leite de vaca cru	41	O157:H7
2013	Canadá	Queijo Gouda		29	O157:H7
2018	Canadá	Queijo Gouda		7	O121
2023	Reino Unido	Queijo Lancashire		44	O145:H28
2024	Estados Unidos da América	Queijo Cheddar		11	O157:H7

1.4. Métodos de deteção e identificação

A análise de alimentos para a deteção de microrganismos é essencial para que haja maior segurança dos mesmos, já que é possível proceder à deteção de microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, evitar que um produto contaminado alcance o mercado e cause problemas de saúde pública [71].

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a deteção e identificação de STEC em alimentos. Estes métodos incluem diferentes técnicas de deteção entre as quais técnicas culturo-dependentes, culturo-independentes, baseadas na sequenciação de ácidos nucleicos, imunoenzimáticas, entre outras [72].

1.4.1. Convencionais

Os métodos microbiológicos convencionais são essencialmente métodos culturo-dependentes que, comparativamente aos restantes métodos, exigem mais trabalho e mais tempo para se obter a resposta [72].

Dentro dos métodos convencionais, os métodos de deteção permitem verificar a presença ou ausência de microrganismos em determinada quantidade de género alimentício [73]. Estes métodos incluem, normalmente, um passo de enriquecimento seguido de cultura em meios seletivos, sendo que as colónias obtidas são, posteriormente, identificadas através de testes bioquímicos e/ou serológicos [72]. Por outro lado, nos métodos de contagem de microrganismos, o processo de cultura das células passa por um procedimento relativamente extenso, que inclui a diluição sucessiva das amostras e a sua posterior inoculação, em placas

contendo meios específicos e seletivos para cada microrganismo ou grupo de microrganismos [72], [74].

Ambos os métodos incluem uma etapa de incubação, que pode prolongar-se até 72 horas, o que os torna métodos demorados [72], [74]. Para a detecção de STEC alguns dos meios tradicionalmente utilizados são *MacConkey* ou *Eosin Methylene Blue* [75], [76].

1.4.2. Imunoenzimáticos

Os métodos de detecção imunoenzimáticos baseiam-se em técnicas que utilizam enzimas capazes de se ligar a anticorpos específicos para detetar e quantificar antigénios nas amostras [77]. Existem diversos métodos deste tipo que são utilizados na detecção rápida de microrganismos patogénicos em géneros alimentícios. De entre estes destacam-se o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA) e o Ensaio de Fluorescência Enzimática (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay* – ELFA).

No método ELISA os antigénios são fixados seletivamente por anticorpos adsorvidos a uma superfície sólida, sendo a presença destes detetada pela atividade de uma enzima, que está ligada ao anticorpo, sobre um substrato o que dá origem a um produto final corado [78]. O ELFA é um método muito semelhante ao ELISA, sendo que a diferença entre ambos reside no facto de o teste ELFA originar um produto final fluorescente [79].

O método ELISA foi testado, em carne de vaca, quanto à sua capacidade de detecção dos serogrupos de STEC não O157:H7 mais comumente associados a doença humana nos Estados Unidos da América (O26, O45, O103, O111, O121 e O145) [80]. Neste ensaio foi possível concluir que, de entre as amostras artificialmente contaminadas com as diferentes estirpes, ocorreu uma especificidade de 100% na detecção dos serogrupos O103, O111 e O121, de 99,14% na detecção do serogrupo O145 e de 98,2% para os serogrupos O26, e O45 [80].

Ensaio para a detecção de *E. coli* O157:H7 em queijos artificialmente contaminados, realizados com recurso ao método ELFA, mostraram que, para um nível de inoculação considerado elevado (7-10 ufc/ 25 g), o método é 100% eficaz, tendo sido detetado o microrganismo em todas as amostras contaminadas [81]. Já para níveis de contaminação mais baixos (2-4 ufc/ 25 g), o mesmo método apresentou uma eficácia de 92,3%, não tendo sido capaz de detetar a presença de *E. coli* O157:H7 em 7,7% das amostras [81].

1.4.3. Moleculares

Os métodos de detecção moleculares mais utilizados têm por base uma técnica denominada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) que se pode traduzir como Reação da Polimerase em Cadeia [82]. Esta é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que gera cópias de uma região em particular de uma molécula de DNA [82].

Para que seja possível proceder-se à realização da PCR há alguns constituintes essenciais, tais como a enzima Taq DNA polimerase, primers, DNA alvo e nucleótidos, que se encontram disponíveis no meio onde ocorre a reação [83], [84]. A Taq DNA polimerase é essencial para a síntese de novas cadeias de DNA, já os primers são uma pequena sequência de nucleótidos que proporcionam à polimerase um ponto de início de síntese do DNA [83], [84]. Habitualmente, em cada reação PCR são utilizados, pelo menos, dois primers específicos para a região que se deseja amplificar. Isto é, cada um possui a sequência complementar à extremidade de DNA à qual se irá ligar [82]. A PCR tem três etapas que se repetem em ciclos: Desnaturação, *Annealing* ou Hibridação, e Alongamento ou Amplificação [82], [83].

Durante a etapa de desnaturação, ocorre o aquecimento da solução de DNA até cerca de 95 °C, de forma que haja dissociação das pontes de hidrogénio que estabelecem a ligação entre as duas cadeias do DNA [82]. Com esta separação, originam-se duas cadeias simples de DNA, que vão funcionar como cadeias molde na etapa seguinte [84]. Após a desnaturação, a descida de temperatura permite a renaturação do DNA, através do restabelecimento das pontes de hidrogénio, entre as cadeias de DNA e sequências complementares existentes no meio, os primers [82], [84]. Esta etapa é denominada por *Annealing* ou Hibridação [82].

A ligação dos primers aos seus locais complementares no DNA de cadeia simples gera duas moléculas de DNA, em parte, com cadeia dupla, cuja existência é essencial para que a Taq DNA Polimerase se consiga ligar e sintetizar novas cadeias de DNA, sempre no sentido 5' para 3', idênticas às cadeias molde [82], [84]. Esta etapa tem o nome de Alongamento ou Amplificação [82].

Este processo é repetido várias vezes num termociclador, um aparelho que controla o tempo e a temperatura de cada ciclo e as suas respetivas etapas [82]. A cada ciclo são geradas novas cadeias de DNA que irão servir como molde no ciclo seguinte [83], [84]. Desta forma, no final do processo, resultam milhões de cópias do segmento de DNA alvo [82], [84].

O resultado da PCR pode ser visualizado de diferentes formas, através de análise de fotografia de gel de eletroforese ou através de PCR em tempo real [82].

A eletroforese em gel é uma técnica que consiste na movimentação dos fragmentos de DNA numa matriz em gel por ação da corrente elétrica [84]. Os fragmentos de DNA são colocados em poços no topo do gel correspondente ao polo negativo e, pela ação da corrente elétrica, conduzida por uma solução tampão, migram para o polo positivo [85].

Os fragmentos de maior dimensão percorrem uma distância inferior aos de menor dimensão, no entanto, para se ter maior noção do tamanho dos fragmentos, é colocado num dos poços do gel um marcador de molecular [84], [85]. Fragmentos da mesma dimensão formam bandas no gel e são estas bandas que, posteriormente, podem ser observadas, sob luz ultravioleta [84]. É nesta ótica que se reflete a importância da PCR, já que são necessários vários milhões de cópias de DNA alvo para que seja possível a formação de uma banda visível [84]. A

utilização desta está descrita na bibliografia para, entre outros, a caracterização de isolados de *E. coli* a partir de água e *street food* [86].

Na PCR em tempo real os resultados podem, tal como nome indica, ser acompanhados à medida que as reações ocorrem no termociclador [87], [88]. Desta forma, são eliminadas etapas de manuseamento e procedimentos pós-PCR convencional, como a eletroforese [82], [88]. Isto é possível devido ao uso de fluoróforos em cada poço de reação, que possibilitam a leitura da fluorescência emitida em cada ciclo, sendo esta proporcional à quantidade de DNA alvo [87], [88]. Os termocicladores utilizados neste tipo de PCR têm de estar capacitados para monitorizar o sinal de fluorescência à medida que ocorre a amplificação [87].

A emissão de fluorescência é possível devido à utilização de primers e sondas específicos, que possuem fluoróforos. Define-se como fluoróforo uma molécula fluorescente que absorve energia luminosa num comprimento de onda específico e depois reemite luz num comprimento de onda maior [88]. Tendo em conta a fluorescência emitida em cada ciclo, é desenhada, por um *software* específico para o efeito, a curva de amplificação dos fragmentos de DNA alvo em cada amostra [88]. Para além disso, é ainda calculado, por esse mesmo *software*, um valor *Threshold* (limite), aplicável a todas as reações e um valor de Cq (Ciclo de Quantificação – *Quantification Cycle*, em inglês) para cada poço onde ocorre reação.

O valor *Threshold*, representado por uma linha horizontal no gráfico de amplificação da PCR (Figura 1), define o limiar a partir do qual existe quantidade suficiente de DNA alvo amplificada para a amostra ser considerada positiva para o gene em questão, o valor de Cq corresponde ao ciclo de PCR no qual a fluorescência ultrapassa o valor definido pelo *Threshold* (Figura 1), ou seja, o ciclo a partir do qual a amostra passa a ser considerada positiva para o gene em questão [87], [89]. Numa amostra positiva, o gráfico de amplificação da PCR é caracterizado por descrever um aspeto típico, correspondente a uma curva sigmoide (Figura 1) [90].

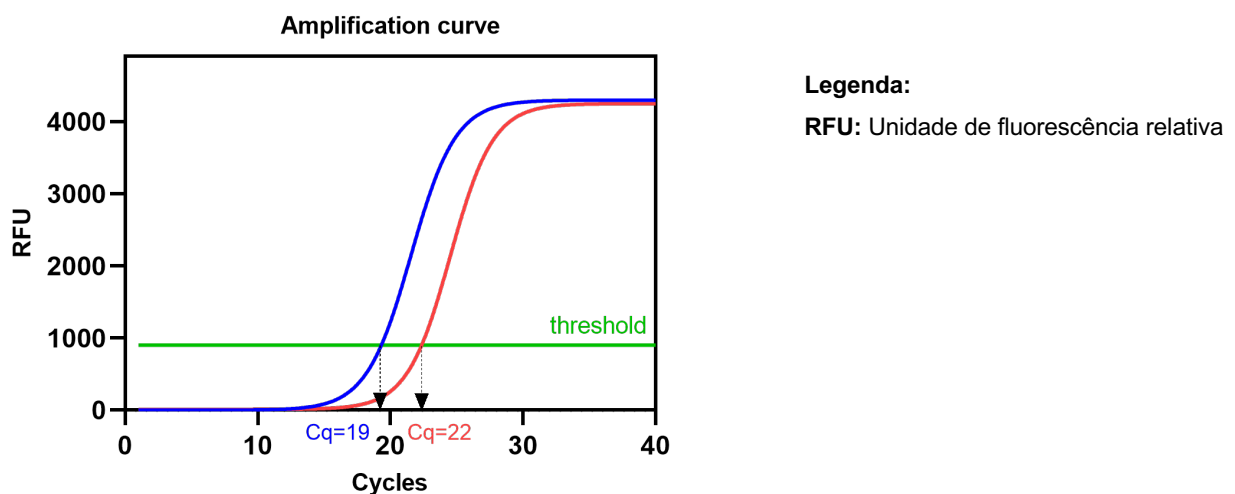


Figura 1: Curvas de amplificação típicas de um resultado de uma análise PCR, identificação dos valores de Threshold e Cq.

Fonte: <https://www.oncolines.com/mechanistic-cell-biology/quantitative-polymerase-chain-reaction-qpcr/>

Nas análises PCR em tempo real existem ainda diversos tipos de controlos, entre os quais o controlo de amplificação interno (IAC), os controlos do processo e os controlos da PCR. Todos estes são cruciais, já que validam os resultados obtidos experimentalmente [90], [91].

O IAC é de elevada importância para a interpretação correta dos resultados. Este controlo é verificado em cada corrida de PCR, e a amplificação do gene de controlo valida que a reação PCR ocorreu de forma correta em cada poço. É um indicador do estado de purificação dos ácidos nucleicos e permite a supervisão da inibição das reações PCR. Este tipo de controlo é amplificado juntamente com a sequência alvo durante a mesma reação de PCR, pelo que é essencial que não entre em competição com a região alvo do DNA [91].

Como controlo de processo positivo é utilizada uma amostra contaminada com o microrganismo alvo, que será processada como as amostras de teste para determinar se todo o processo, desde as etapas iniciais de tratamento da amostra até ao final da reação PCR, foi realizado corretamente [90]. Já como controlo negativo do processo é realizado um ensaio em branco, isto é, um ensaio isento do DNA alvo que é processado em conjunto com as amostras de teste durante todo o procedimento, com o objetivo de se determinar se existe a possibilidade de ter ocorrido contaminação das amostras com DNA estranho ao ensaio durante alguma das etapas [90]. O controlo positivo da PCR inclui fragmentos do DNA alvo e deve amplificar durante a corrida PCR, sendo utilizado para verificar que todos os reagentes da PCR (*master mix*) estão a funcionar corretamente, se não existem substâncias que possam causar inibição de reações e se os tempos e temperaturas de cada etapa da PCR estão corretas e são suficientes [90], [91]. Por sua vez, o controlo negativo da PCR corresponde a uma reação onde não deve ser observada amplificação, verificando se há algum tipo de contaminação na *master mix* e se não há formação de dímeros de primers [90], [91].

A presença de STEC em amostras alimentares é muitas vezes analisada com recurso a PCR em tempo real, sendo que nestes casos se realizam *Multiplex* PCR em tempo real, isto é, analisa-se a presença/ausência de diferentes genes em simultâneo em cada amostra [92]. Para a deteção de STEC os genes visados são, normalmente, *stx1* e *stx2*, por serem os genes mais associados a casos de doença em humanos [93], [94].

A norma ISO/TS 13136:2012, que estabelece o método de referência para a deteção, isolamento e caracterização de STEC, inclui uma etapa de rastreio (*screening*), que recorre à utilização do método PCR em tempo real [95]. Já a norma ISO 16654:2001 estabelece o método para a deteção específico para *Escherichia coli* O157 [96].

Na literatura existem vários exemplos que descrevem a utilização de PCR em tempo real para a deteção de STEC, entre os quais, para deteção de STEC em queijos de leite cru [97], [98]. Um outro tipo de PCR é o PCR digital, método este que possui uma sensibilidade superior à do PCR em tempo real [99]. Tal deve-se ao facto de ter a capacidade de minimizar os efeitos da competição entre alvos [99]. Desta forma, a PCR digital supera as dificuldades inerentes à

amplificação de sequências raras e permite uma quantificação absoluta e precisa de ácidos nucleicos [99]. Uma etapa crítica na PCR digital é a partição da amostra, isto é, a divisão de cada amostra em subunidades discretas antes da amplificação por PCR [99]. A amostra deve ser preparada de forma a estar separada em milhares de partições, cada uma destas contendo, idealmente, zero ou uma molécula de DNA alvo [99]. A utilização deste método para a deteção de STEC, por exemplo, em amostras fecais de gado bovino já foi descrita na literatura [100].

Existe também, já disponível no mercado, um kit PCR digital que se encontra validado para a deteção de STEC [101].

1.4.4. Novos Métodos

O desenvolvimento da ciência e da tecnologia tem permitido o surgimento de novos métodos de identificação de microrganismos.

Entre os métodos emergentes destacam-se Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR), Espectrometria de Massa por Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Tempo de Voo (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* – MALDI-TOF) e Sequenciação de Genoma Completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS).

A técnica FTIR recorre à radiação infravermelha, enviando-a através de uma amostra [102]. Alguma da radiação aplicada é absorvida e a restante atravessa a amostra, sendo que aquela que é absorvida é convertida em energia rotacional e/ou vibracional pelas moléculas da amostra [102]. O sinal resultante deste processo apresenta-se como um espectro que funciona como impressão digital da amostra, isto é, cada molécula ou estrutura química origina um espectro único, cuja comparação com os espectros existentes na base de dados permite a identificação [102]. Apesar de ser fácil de utilizar e de ter custos operacionais mínimos, esta técnica também apresenta certas desvantagens, entre as quais a necessidade de a preparação das amostras ser feita de acordo com um protocolo rigoroso [103].

Por sua vez a técnica de MALDI-TOF é uma técnica espectral analítica na qual as partículas são ionizadas, separadas de acordo com sua relação massa-carga e medidas, determinando o tempo que os iões demoram a viajar até um detetor no final de um *time-of-flight tube* [104], [105].

À semelhança do que acontece no FTIR é originado um espectro que funciona como impressão digital cuja comparação com os espectros existentes na base de dados permite a identificação [104]. Neste caso o espectro mostra a relação de massa-carga (eixo x) e intensidade (eixo y) e a partir daqui é possível identificar a espécie e, em alguns casos, até mesmo a linhagem do microrganismo em questão [105], [106]. Esta é uma ferramenta que já tem vindo a ser utilizada, com sucesso, em testes de identificação rápida em vários ramos da microbiologia, entre os quais microbiologia alimentar [106].

A técnica MALDI-TOF é mais rápida, possui uma maior capacidade de discriminação entre microrganismos e tem custos de operação mais reduzidos, quando comparada a técnicas tradicionais [105]. Apesar disso, também apresenta certas limitações, já que possui dificuldades na discriminação de certas espécies, apresentando, nestes casos, resultados de identificação apenas ao nível de grupo, complexo ou género [105].

O WGS é considerado um dos métodos de tipagem molecular mais avançados, constituindo uma tecnologia revolucionária que pode ser utilizada para determinar a sequência completa de ácidos nucleicos de um determinado organismo [107], [108]. Esta técnica revela a composição completa do DNA de um organismo, permitindo perceber melhor as variações no genoma de organismos da mesma ou de diferentes espécies. Isto faz com que seja possível realizar a diferenciação de organismos com uma precisão muito superior à de todas as outras técnicas [109]. Este é um método que utiliza tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* – NGS), na qual o DNA é fragmentado e os dados de sequenciação são gerados para todo o genoma [110].

A nível da Segurança dos Alimentos (*Food Safety*), esta tecnologia veio revolucionar o campo da investigação de surtos de origem alimentar [111]. Sendo uma das suas principais aplicações a identificação de microrganismos patogénicos, isolados a partir de alimentos ou amostras ambientais, foi possível melhorar significativamente a capacidade de deteção de *clusters*, confirmar as fontes de alimentos responsáveis pelas infeções e entender a composição genética dos microrganismos causadores da doença [108], [109].

Após a sequenciação do genoma do microrganismo, pode proceder-se à análise e comparação dos perfis genómicos de bactérias presentes nos alimentos contaminados e indivíduos infetados [108]. Posteriormente, podem identificar-se correlações entre as fontes de infeção e casos de doença em humanos, já que se os agentes patogénicos encontrados em alimentos ou ambiente de produção de alimentos corresponderem aos patógenos dos pacientes doentes, uma ligação confiável entre os dois pode ser feita [108], [109]. O WGS diferencia-se de outros métodos por conseguir distinguir praticamente todas as estirpes de patógenos transmitidos por alimentos, independentemente da espécie. Esta sua capacidade de diferenciar, até mesmo entre organismos intimamente relacionados, permite que surtos sejam detetados, mesmo que com a ocorrência de menos casos clínicos, e oferece a oportunidade de interromper surtos mais cedo e evitar doenças adicionais, já que fornece a base para intervenções de saúde pública mais eficazes [108], [109]. A utilização do WGS virá a constituir um método de referência para a caracterização de isolados de STEC, de acordo com a parte dois da norma ISO/DIS 13136:2025 [49]. No entanto, apesar de apresentar o maior poder discriminatório, esta é uma técnica bastante dispendiosa, que necessita de uma estrutura de tecnologia informática bastante robusta para armazenamento e processamento de dados [112].

Todos os métodos cuja obtenção de resultados está dependente de bases de dados têm ainda uma limitação comum, relacionada com a extensão destas mesmas bases. Muitas bases de dados ainda não abrangem a diversidade total de microrganismos ou variantes genéticas existentes, o que significa que, no início da implementação do método, certas amostras podem ser analisadas, mas os seus resultados corresponderem a identificações incorretas ou inconclusivas [103], [105], [113].

1.5. Objetivos do trabalho

O presente trabalho teve como principal objetivo a deteção de STEC em amostras de queijo feito com leite cru de cabra, ovelha, vaca e mistura (leite de ovelha com leite de cabra e leite de ovelha com leite de vaca) produzido a nível nacional, através da aplicação de técnicas de biologia molecular, nomeadamente PCR em tempo real. Pretendeu-se averiguar a prevalência dos genes *stx1* e *stx2*, responsáveis pela produção de toxina Shiga, em tomas de amostras de 25 g previamente sujeitas a enriquecimento.

Os dados aqui obtidos poderão revelar-se de particular interesse para alertar para a eventual necessidade de reforço de medidas de controlo sanitário no ambiente de ordenha e produção, e ainda para evidenciar os desafios à implementação do método de deteção e isolamento de STEC em alimentos, descrito na Norma ISO/DIS 13136-1:2025 e, especificamente, em queijos de leite cru.

2. Materiais e Métodos

Para avaliar a prevalência dos genes *stx1* e/ou *stx2* nos queijos de leite cru foi então utilizado o método referido na Norma ISO/DIS 13136-1:2025 que pressupõe a utilização de meios de cultura e reagentes específicos, bem como a realização de ensaios de controlo que se encontram listados nos pontos seguintes.

2.1. Meios de cultura e reagentes

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados diversos meios de cultura e reagentes. Cada um destes encontra-se abaixo identificado, bem como descrita a sua forma de utilização.

2.1.1. Água Peptonada Tamponada

Água peptonada tamponada (AP) é um meio de uso geral destinado a diversas utilizações, entre elas a preparação da suspensão inicial da amostra a analisar e a realização de diluições sucessivas [114].

Este meio é utilizado como caldo de enriquecimento não seletivo e nutritivo para a reanimação e crescimento de uma ampla gama de microrganismos, entre os quais *Escherichia coli* [114].

No âmbito da norma ISO/DIS 13136-1:2025 a AP para a deteção de STEC deve ser incubada em aerobiose durante 18 a 24 horas a 41,5 °C±1 °C ou, no caso de se suspeitar da presença de células stressadas nas amostras, durante 15 a 21 horas a 37 °C±1 °C.

2.1.2. Triptona Sal

Triptona Sal (*Tryptone-Salt Broth* – TS) é um diluente usado quer para a preparação da suspensão inicial da amostra, a partir de, por exemplo, alimentos, quer para a realização de diluições em série [115]. A presença de triptona assegura a reanimação dos microrganismos, enquanto o sal (cloreto de sódio) fornece uma solução isotónica [115]. Devido às finalidades para que é utilizado este meio não é sujeito a incubação.

2.1.3. CHROMagar™ STEC

CHROMagar™ STEC (CA-STECC) é um meio de cultura cromogénico seletivo, comercializado pela CHROMagar™ (Paris, França), destinado a ser utilizado na deteção direta qualitativa, diferenciação e identificação presuntiva de STEC, podendo ser utilizado para a deteção deste microrganismo em produtos alimentares para consumo humano, alimentos para animais ou amostras ambientais [116].

Este meio foi preparado em assépsia através da adição de 30,8 g de CA-STECC por litro de água destilada, sendo posteriormente levado à ebulição e homogeneizado numa placa de aquecimento com agitador magnético. O meio foi arrefecido em banho de água termostaticado a 45 °C – 50 °C e, de seguida, adicionou-se o suplemento (10 mL por litro de meio).

Após homogeneização, o meio completo foi distribuído em caixas de *Petri* e armazenado a 2-8 °C, protegido da luz, durante um período máximo de 30 dias.

As colónias características de STEC apresentam cor malva, mas também podem crescer colónias azuis ou transparentes, que correspondem a outras enterobactérias [116].

Os resultados podem ser interpretados após 18 a 24 horas de incubação aeróbia a uma temperatura entre 35 °C e 37 °C [95], [116].

2.1.4. Tryptone-Bile-X-Glucuronate Agar

Agar cromogénico TBX (*Tryptone-Bile-X-Glucuronate Agar* – TBX) é um meio destinado à enumeração de *Escherichia coli* β-D-glucuronidase-positiva em produtos alimentares e amostras ambientais [117].

O meio utilizado é comercializado pela *Biokar Diagnostics* (Paris, França) e foi preparado através da adição de 30,6 g de meio desidratado por litro de água destilada. Posteriormente, o meio foi homogeneizado e, de seguida, foi esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Finalmente, o meio preparado foi distribuído em caixas de *Petri*, que foram armazenadas entre 2 – 8 °C, ao abrigo da luz e durante um período máximo de 15 dias.

Neste meio, as colónias características de *E. coli* apresentam cor azul, pelo facto de serem β-D-glucuronidase-positiva. No entanto, algumas estirpes de STEC, como é o caso de O157:H7

são β -D-glucuronidase-negativa, o que faz com que as colónias que crescem em TBX apresentem cor branca [117]. Desta forma, colónias características de STEC podem apresentar cor branca ou cor azul em TBX.

Apesar disto, não é certo que todas as colónias que apresentem estas características sejam STEC, uma vez que o meio possibilita o crescimento de outros tipos de *E. coli*, não sendo seletivo para STEC.

O resultado é obtido diretamente pela contagem de colónias características após 18 a 24 horas de incubação aeróbia à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a deteção de STEC, ou 18 a 24 horas a $44\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a contagem de *E. coli* [95].

2.1.5. Agar Nutritivo

Agar Nutritivo (*Nutrient Agar* – AN) é um meio de cultura não seletivo utilizado em análises microbiológicas de alimentos e águas, bem como em saúde animal, para a cultura de uma grande variedade de microrganismos [118]. Este meio de cultura é muito utilizado quando se pretendem isolar colónias de microrganismos provenientes de outros meios de cultura, uma etapa crítica nos protocolos de identificação [118].

O meio utilizado é comercializado pela *Biokar Diagnostics* (Paris, França) e foi preparado através da adição de 20 g de meio desidratado por litro de água destilada. O meio foi homogeneizado e depois esterilizado em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos. Após esterilização, foi distribuído por caixas de *Petri*, que foram armazenadas de $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante um período máximo de 30 dias.

Este meio é adequado para a cultura de bactérias que não têm requisitos nutricionais específicos e os resultados podem ser observados após incubação durante 18 a 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ [95], [118].

2.1.6. *Trypto Casein-Soy Agar*

Agar Triptona Soja (*Trypto Casein-Soy Agar* – TSA) é um meio nutritivo universal, podendo a sua utilização ser adequada para diversos usos, devido ao seu elevado valor nutricional. Algumas das suas utilizações compreendem o crescimento e isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas e o favorecimento do crescimento de microrganismos mais exigentes a nível nutricional [119].

O meio utilizado é comercializado pela *Biokar Diagnostics* (Paris, França) e foi preparado através da adição de 40 g de meio desidratado por litro de água destilada. Após homogeneização, foi levado a autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos e depois distribuído por caixas de *Petri*, que foram armazenadas a $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o período máximo de 30 dias.

Os resultados são obtidos após incubação, cujos parâmetros dependem do tipo de utilização como meio de referência, de acordo a norma ISO 11133:2014. Neste trabalho, os parâmetros de incubação utilizados foram: 18 a 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.7. Galerias API® 20 E

API® 20 E consiste num sistema qualitativo padronizado que permite identificar, com recurso a reações bioquímicas, *Enterobacteriaceae* e outros bastonetes Gram negativos não fastidiosos.

A galeria API® 20 E possibilita a realização de 20 testes bioquímicos, já que possui 20 microtubos, cada um correspondente a um teste diferente, que contêm substratos desidratados.

A sua inoculação com uma suspensão bacteriana possibilita a reconstituição do meio e, conseqüentemente, a ocorrência de reações bioquímicas, que se manifestam com alteração da cor do substrato, após incubação. A reação pode ocorrer de forma espontânea ou necessitar da adição de um reagente. O sistema de galerias usado, bem como os reagentes adicionados, são comercializados pela *Biomérieux* (Lyon, França).

Para a realização deste teste foi preparada uma suspensão do microrganismo a testar a partir de colónia, em água desmineralizada destilada, que depois foi inoculada nos vários microtubos, conforme as instruções do fabricante.

A galeria foi, posteriormente incubada, durante um período de 18 a 24 horas à temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. O resultado deste teste é obtido após incubação e adição dos reagentes necessários, de acordo com as indicações do fabricante, por observação das cores obtidas. Perante estes resultados é obtida uma chave numérica que, ao ser inserida num *software* específico (APIWEB®), permite a identificação do microrganismo em teste.

2.1.8. Teste da oxidase

As tiras de oxidase utilizadas são comercializadas pela *PanReac* (Barcelona, Espanha) e constituem um teste rápido e simples para averiguar se os microrganismos são oxidase positivos ou oxidase negativos, isto é, se possuem a enzima citocromo-oxidase.

Deve ser colocada, na parte da tira correspondente ao local de teste, um pouco de biomassa de uma colónia, que deve ser retirada da placa com recurso a uma ansa ou fio reto, e aguardar até 60 segundos.

Se se obtiver uma coloração azul o resultado é positivo, enquanto se não existir qualquer mudança de cor na tira o resultado é negativo. Adicionalmente à estirpe a testar, deve utilizar-se sempre uma estirpe de controlo positivo outra de controlo negativo, de forma a validar os resultados.

É recomendado que a colónia a testar esteja isolada em meios como AN, uma vez que estes não possuem corantes, indicadores ou inibidores.

2.2. Ensaio de controlo

2.2.1. Controlo de qualidade dos meios de cultura

A norma ISO 11133:2014, que se refere à preparação, produção, armazenamento e teste de desempenho de meios de cultura em microbiologia alimentar, alimentos para animais e águas, estabelece os requisitos que os meios de cultura devem cumprir para que qualquer trabalho microbiológico desenvolvido possa ser considerado fiável [120]. Isto acontece, pois, muitos procedimentos dependem da capacidade do meio de cultura para fornecer resultados consistentes e reprodutíveis.

A norma ISO 11133:2014 estabelece a forma como deve ser realizada a avaliação do desempenho dos meios de cultura, tendo este protocolo sido seguido para a realização da avaliação do desempenho de todos os meios de cultura utilizados (AN, AP, CA-STEC e TBX). Complementarmente, foi consultado o anexo B da norma ISO/DIS 13136-1:2025, acerca da deteção, isolamento e caracterização de STEC, onde se encontram as informações referentes, por exemplo, aos microrganismos a utilizar, tipo de ensaio a realizar, resultados esperados, tempos e temperaturas de incubação a utilizar para a realização da avaliação de desempenho dos meios referidos na norma (AN, AP e TBX).

A norma ISO/DIS 13136-1:2025 aconselha à utilização de, pelo menos, mais um meio seletivo, para além do TBX. Para o desenvolvimento deste trabalho, foi selecionado o meio CA-STEC, devido ao elevado potencial seletivo que evidencia a sua ficha técnica, pelo que para a realização da avaliação do seu desempenho foram tidas em conta as indicações presentes nas suas instruções de uso. Adicionalmente, foi também utilizada outra estirpe de STEC: *E. coli* ATCC 35150.

Na avaliação do desempenho dos meios de cultura, são efetuados ensaios de produtividade que visam averiguar se as estirpes bacterianas crescem de acordo com o esperado, e ensaios de seletividade para testar a capacidade seletiva do meio, ou seja, se o meio tem mesmo a capacidade de inibir o crescimento de certas espécies e estirpes.

Todos os meios acima mencionados foram testados ao nível da produtividade, tendo sido inoculados com concentrações de 10^3 a 10^4 ufc por volume de suspensão usada, no caso de meios sólidos seletivos e não seletivos para testes qualitativos, ou com uma concentração inferior a 100 ufc, no caso de meios líquidos não seletivos (pré-enriquecimento), tal como indica a norma ISO 11133:2014 [120].

O meio CA-STEC foi ainda testado quanto à sua seletividade, tendo-se procedido à sua inoculação com concentrações superiores a 10^4 ufc, como indica a norma ISO 11133:2014 [120]. As estirpes utilizadas para este ensaio foram aquelas cujo crescimento deve, segundo as instruções do fabricante, ser inibido.

Para verificar que a concentração de inóculo utilizada estava de acordo com a norma ISO 11133:2014, procedeu-se à inoculação de placas de TSA, com as diluições a utilizar, para realização de uma contagem, em paralelo com a realização da avaliação de desempenho dos meios de cultura.

Na Tabela 4 encontram-se listadas as estirpes que foram utilizadas para cada meio, tendo em conta o tipo de teste de avaliação de desempenho que se realizou (produtividade ou seletividade).

Tabela 4: Estirpes utilizadas para os testes de avaliação de desempenho ao nível da produtividade (P) e da seletividade (S) de cada meio de cultura.

	Serotipo	AN	AP	CA-STEC	TBX
<i>E. coli</i> ATCC 35150	O157:H7	-	-	P	-
<i>E. coli</i> WDMC 00013	-	P	P	S	P
<i>E. coli</i> O157:H7 WDMC 00014	O157:H7	P	P	P	P
<i>Enterococcus faecalis</i> WDMC 00087	-	-	-	S	-

2.2.2. Verificação do método de referência para implementação no Laboratório

Para a implementação de um novo método de referência, ou de métodos alternativos, é necessário efetuar um estudo prévio de verificação do mesmo, de modo a demonstrar que no Laboratório o seu desempenho está de acordo com as especificações obtidas no estudo de validação e que este é adequado ao pretendido [121]. A norma ISO 16140-3:2021 tem descrito protocolos para esta verificação.

No caso dos métodos qualitativos, a norma indica que se deve proceder à determinação da estimativa do limite de deteção a 50% (eLOD₅₀), já que uma determinação precisa do limite de deteção a 50% (LOD₅₀) não é possível [121]. Isto acontece, pois, o número de amostras testadas é pequeno, em comparação com o número de amostras exigidas pela norma ISO 16140-2:2016 [122]. O método ISO/DIS 13136-1:2025 ainda não se encontra validado, pelo que apenas é necessário efetuar a verificação do género alimentício.

O LOD₅₀ corresponde à concentração mínima de uma substância que pode ser detetada, de forma consistente, em 50% dos casos, em uma amostra. O cálculo deste limite é amplamente utilizado em microbiologia, constituindo um método qualitativo para avaliar a sensibilidade dos métodos de deteção [123]. Desta forma, a determinação da eLOD₅₀ dos métodos a utilizar no desenvolver deste trabalho teve como base o Protocolo 1 do Anexo F, descrito na norma ISO 16140-3:2021 e esquematizado na Figura 2 [121].

Para dar início à determinação da eLOD₅₀ é necessário que seja efetuado um estudo preliminar para verificar a contagem do inóculo a utilizar. É necessário que a concentração do microrganismo utilizada no nível mais baixo seja inferior ou igual a LOD₅₀.

Com base nesta contagem foram efetuadas várias tomas de amostra contaminadas com diferentes níveis de concentração (diluições sucessivas de 1:3) do microrganismo *E. coli* ATCC 35150, que foram utilizadas para a determinação dos valores de eLOD₅₀:

- Uma toma de amostra para o nível de concentração mais elevado (9×LOD₅₀)
- Quatro tomas para o nível de concentração médio (3×LOD₅₀)
- Quatro tomas para o nível de concentração baixo (1×LOD₅₀)

De acordo com a norma ISO 16140-3:2021, o valor correspondente ao LOD₅₀, no caso dos métodos de referência ainda não validados, é considerado 1 ufc/ toma de amostra. O ensaio foi realizado com queijo *Boffard* (queijo de leite cru de ovelha) contaminado artificialmente com *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150), cuja contagem apresentava valores inferiores a 10 ufc/g e a deteção de STEC para os genes *stx1* e *stx2* foi negativa.

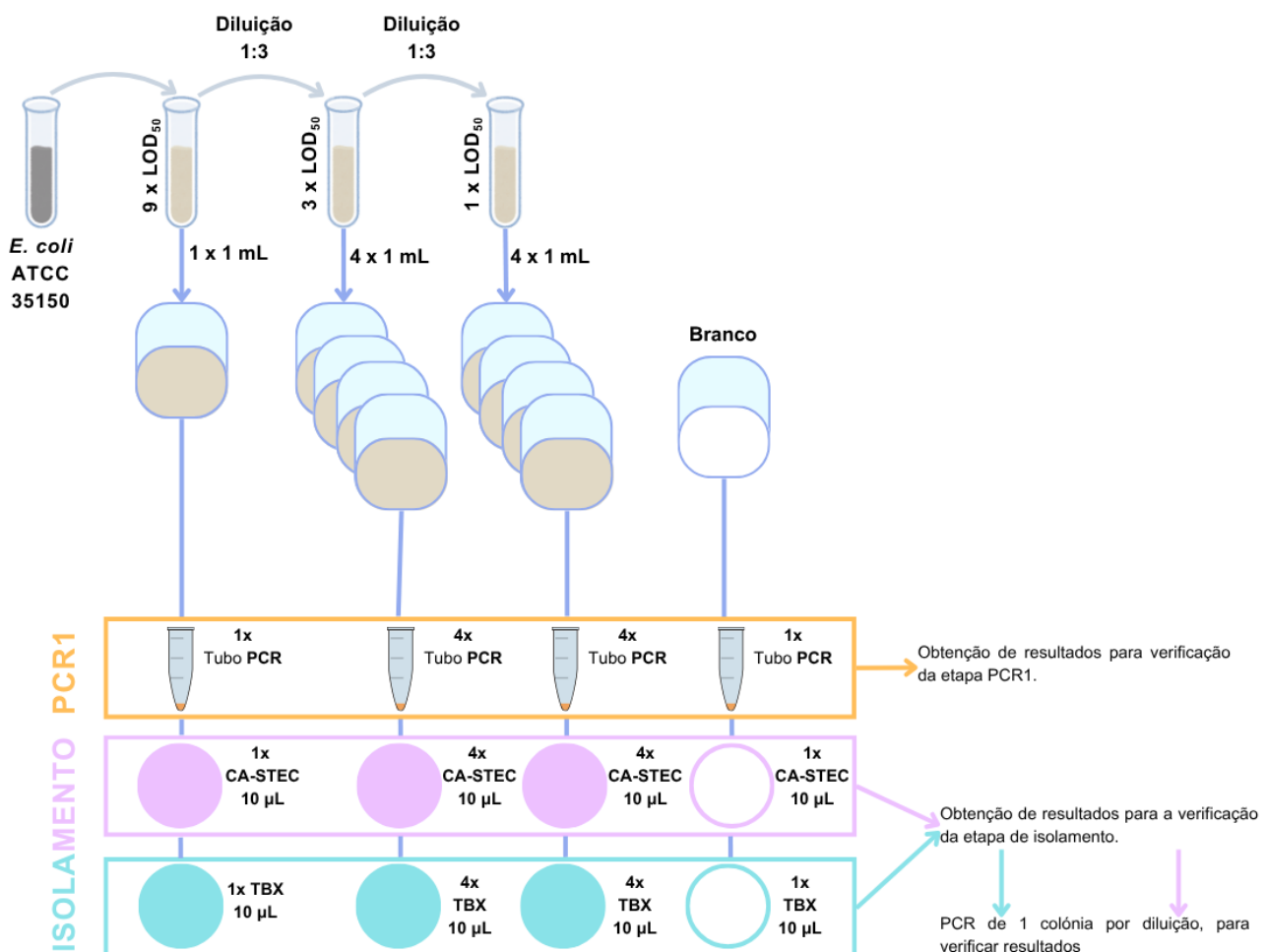


Figura 2: Esquema exemplificativo do protocolo a seguir para a determinação da eLOD₅₀, com base no anexo F (protocolo 1) da norma ISO 16140-3:2021.

O ensaio relativo à determinação da eLOD₅₀ foi analisado separadamente para a etapa PCR1 (PCR ao caldo de enriquecimento) e para a etapa de isolamento (isolamento de colónias obtidas em CA-STECC e TBX em AN), para verificar qual das etapas apresentava um limite de deteção mais elevado.

Em paralelo com os ensaios para determinação da eLOD₅₀, realizou-se, tal como descrito na norma ISO 16140-3:2021 e ilustrado na Figura 3, uma contagem pelo método de Número Mais Provável (NMP) para obtenção do valor correspondente ao Nível Mais Baixo de Inoculação (*Low Inoculation Level* – LIL).

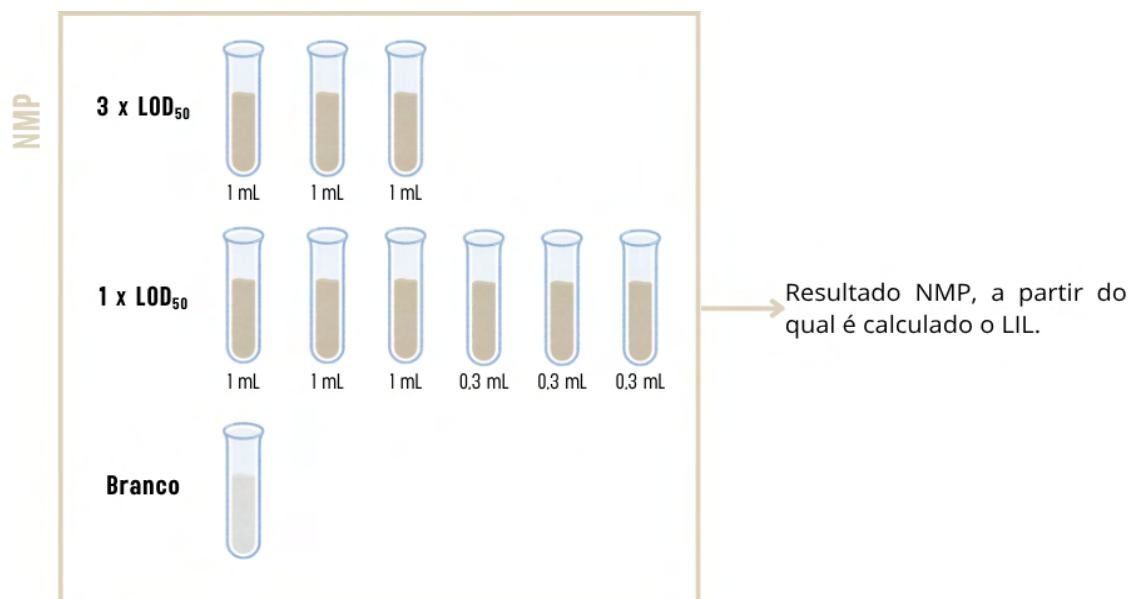


Figura 3: Esquema exemplificativo do protocolo seguido para a realização de contagem do microrganismo *E. coli* ATCC 35150 pelo método NMP, para cálculo do LIL utilizado no ensaio (ISO 16140-3:2021).

2.3. Determinação do nível de contaminação de *E. coli* em TBX

Anteriormente à deteção de STEC, foi realizada, em todas as amostras, uma contagem de *E. coli* em TBX. Esta análise teve como objetivo a determinação do nível de contaminação deste microrganismo nas amostras a analisar, já que poderia vir a interferir com os resultados obtidos para a deteção de STEC. Esta contagem, foi realizada de acordo com o protocolo presente na norma ISO 16649-2:2001[124].

2.4. Deteção de STEC em queijos de leite cru

2.4.1. Amostras analisadas

Para a realização do presente trabalho foram analisadas 22 amostras de queijos de leite cru fabricados em Portugal (Tabela 5). Todas as amostras foram adquiridas no mercado nacional, entre janeiro e maio de 2025, encontrando-se disponíveis à unidade ou em porções.

Tabela 5: Listagem de amostras analisadas e sua descrição.

Nº DA AMOSTRA	NOME	LOCAL DE ORDENHA	LOCAL DE TRANSFORMAÇÃO	LISTA DE INGREDIENTES
1	Queijo Serra da Estrela DOP	Portugal (Serra da Estrela)	Portugal (Serra da Estrela)	Leite cru de ovelha Serra da Estrela, Sal, Flor de Cardo.
2	Queijo Serra da estrela DOP	Portugal (Serra da Estrela)	Portugal (Serra da Estrela)	Leite cru de ovelha Serra da Estrela, Sal, Flor de Cardo.
3	Queijo Serra da Estrela DOP	Portugal (Serra da Estrela)	Portugal (Serra da Estrela)	Leite cru de ovelha Serra da Estrela, Sal, Flor de Cardo.
4	Queijo Beira Baixa DOP Amarelo	Portugal	Portugal	Leite cru de ovelha e cabra, sal e coalho animal.
5	Queijo Beira Baixa DOP Amarelo	Portugal	Portugal (Beira Baixa - Fundão)	Leite cru de ovelha e cabra, sal e coalho animal.
6	Queijo Beira Baixa DOP Amarelo	Portugal	Portugal (Beira Baixa - Fundão)	Leite cru de ovelha e cabra, sal e coalho animal.
7	Queijo de Ovelha Curado	Portugal e União Europeia	Portugal	Leite de ovelha cru, sal, flor de cardo. Conservantes: Sorbato de potássio (E202) e Natamicina (E235)
8	Queijo de Ovelha de Seia	União Europeia	Portugal (Seia)	Leite de ovelha cru, sal, coalho, cardo. Conservantes: E202 e E235
9	Queijo de Mistura Curado	Portugal	Portugal	Leite de vaca e ovelha crus, fermento, coalho, sal. Conservantes: E235

Nº DA AMOSTRA	NOME	LOCAL DE ORDENHA	LOCAL DE TRANSFORMAÇÃO	LISTA DE INGREDIENTES
10	Queijo de Ovelha Curado	Espanha	Portugal	Leite de ovelha cru, sal e coalho. Conservantes: E235
11	Queijo de Azeitão DOP Ovelha	Portugal	Portugal (Palmela)	Leite cru de ovelha, sal, cardo.
12	Queijo de Mistura (Vaca e Ovelha) Curado	Portugal	Portugal	Leite de vaca e ovelha crus, fermento, coalho, sal. Conservantes: E235
13	Queijo de Cabra Curado	Portugal	Portugal	Leite de cabra cru, sal, coalho. Conservantes: E235
14	Queijo de Ovelha de Seia	Portugal	Portugal	Leite de ovelha cru, sal, cardo.
15	Queijo de Vaca S. Jorge DOP	Portugal (Açores)	Portugal (Açores)	Leite de vaca cru, sal, coalho animal
16	Queijo de Ovelha Curado	União Europeia	Portugal	Leite cru de ovelha, coalho animal, sal
17	Queijo de Ovelha Curado	União Europeia	Portugal	Leite de ovelha cru, sal, coalho, cálcio. Conservantes: E235
18	Queijo de Ovelha e Cabra	Portugal	Portugal	Leite de ovelha e cabra crus, coalho, sal. Conservantes: E235. Barrado com pimentão
19	Queijo de Ovelha Curado	União Europeia	Portugal	Leite de ovelha cru, coalho, sal. Conservantes: E235. Barrado com pimentão

Nº DA AMOSTRA	NOME	LOCAL DE ORDENHA	LOCAL DE TRANSFORMAÇÃO	LISTA DE INGREDIENTES
20	Queijo de Ovelha curado	Portugal	Portugal	Leite de ovelha cru, sal, coalho. Conservantes: E235
21	Queijo de Ovelha Serpa DOP	Portugal	Portugal	Leite de ovelha cru, sal, cardo.
22	Queijo de Ovelha Évora DOP	Portugal	Portugal	Leite de ovelha cru, sal, cardo.

2.4.2. Método utilizado: Norma ISO/DIS 13136-1:2025

A deteção de STEC em todas as amostras analisadas foi realizada de acordo com o protocolo da norma ISO/DIS 13136-1:2025, esquematizado na Figura 4.

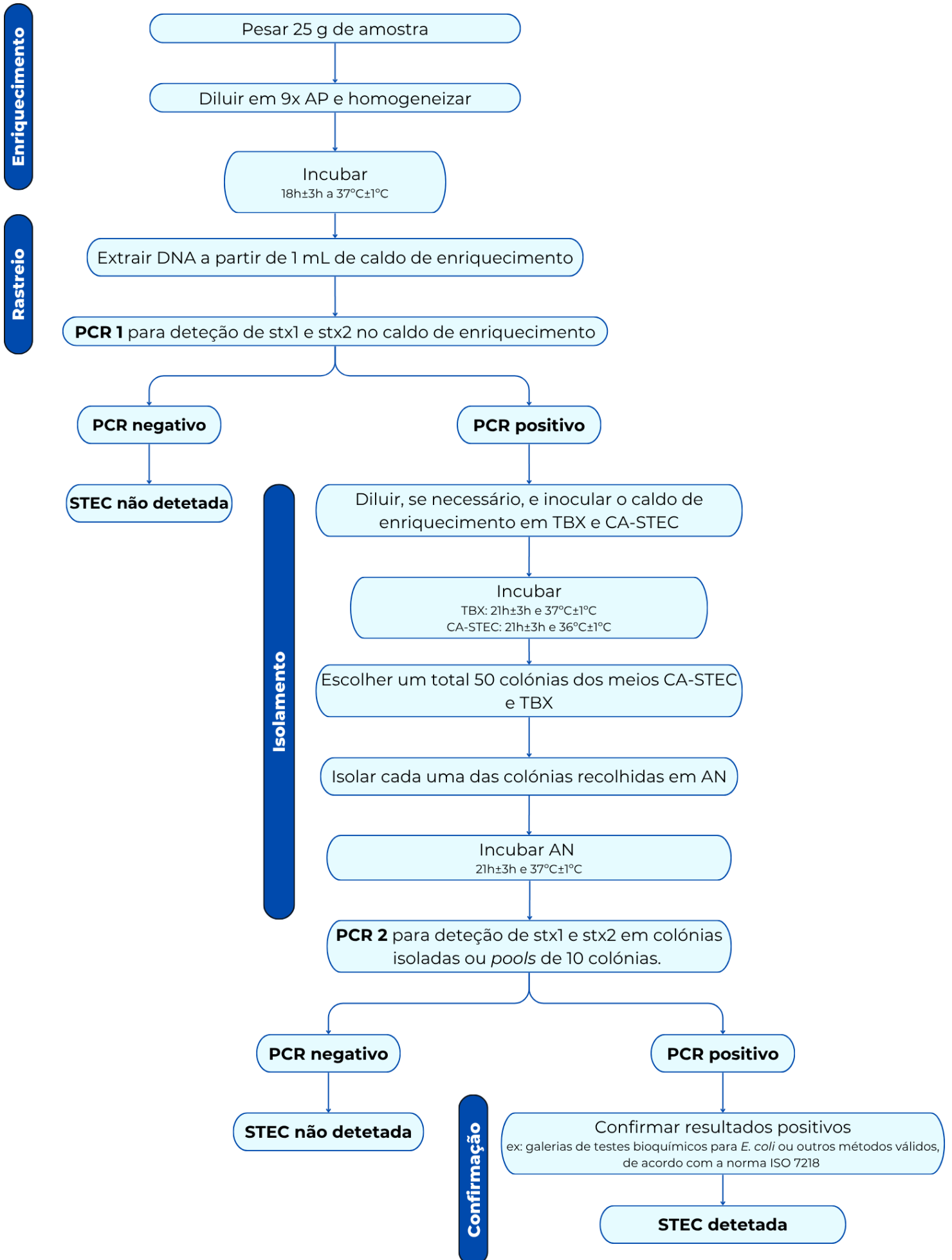


Figura 4: Procedimento para a deteção e isolamento de STEC. Adaptado da norma ISO/DIS 13136-1:2025.

Para a realização da PCR em tempo real no caldo de enriquecimento, cuja realização é exigida na norma ISO/DIS 13136-1:2025, é necessário realizar-se a extração de DNA. Esta foi realizada de acordo com o método para extração de DNA de bactérias gram-negativas, esquematizado na Figura 5 [95].

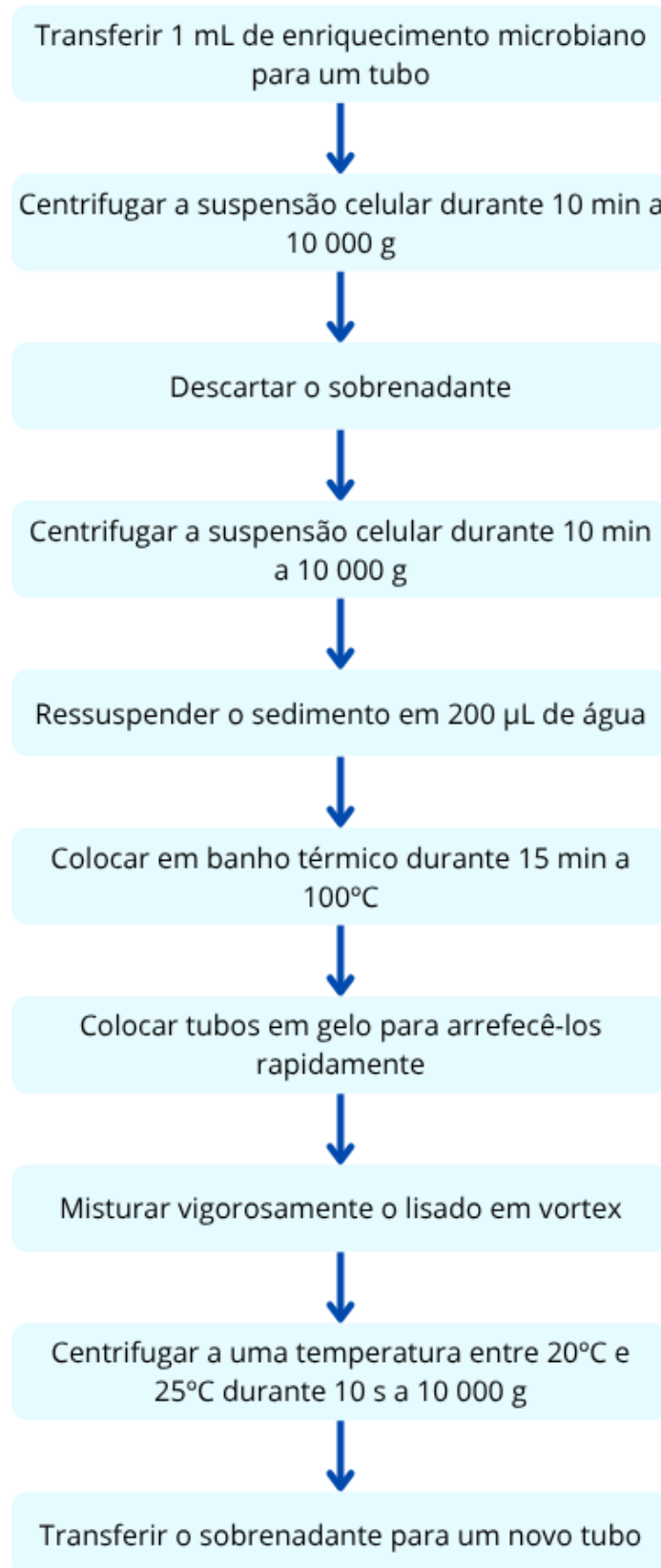


Figura 5: Método de extração de DNA de bactérias gram-negativas.

Para a realização da PCR em tempo real foi utilizado o termociclador CFX96D *Touch Real-Time PCR Detection Systems* com o software *CFX Manager Software IDE v3.1*, comercializado pela *Biorad* (São Francisco, Estados Unidos da América) e um kit PCR, o kit *PATHfinder E. coli Shiga-toxin producing (STEC) Multiplex Detection Kits PMB10M-V1C2E-50*, comercializado pela *Generon S.p.A.* (Modena, Itália).

Este kit tem como alvos os genes *stx1*, *stx2* e *eae* e é constituído pelos seguintes componentes:

- 1 unidade *PATHfinder oligo Mix*;
- 1 unidade *GENERase ULTRA Mastermix*;
- 1 unidade Controlo positivo;
- 1 unidade Controlo negativo;
- 1 unidade de Solução Diluente.

Para a utilização deste kit é necessário fazer a preparação da *working mastermix*, através da incorporação do *GENERase ULTRA Mastermix* e do diluente na *PATHfinder oligo Mix*.

Este kit permite a deteção de genes que codificam para fatores de virulência de STEC em amostras de alimentos pré-enriquecidos, ou em colónias isoladas, utilizando os primers mencionados na norma ISO/TS 13136-1:2012.

A preparação da reação de PCR para DNA extraído foi efetuada da seguinte forma:

1. Transferir 15 µL de *Working Mastermix* para os poços das placas de PCR de acordo com o número de amostras e o número de poços correspondentes aos controlos de reação;
2. Adicionar 5 µL de controlo positivo nos poços que atuam como controlo positivo da PCR;
3. Adicionar 5 µL de cada amostra aos poços que testam as amostras desconhecidas;
4. Adicionar 5 µL de controlos positivo e negativo de processo;
5. Adicionar 5 µL de controlo negativo nos poços que atuam como controlo negativo da PCR.

Já para a preparação da reação de PCR a partir de colónias isoladas procedeu-se da seguinte forma:

1. Transferir 7,5 µL de *Working Mastermix* para poços das placas de PCR de acordo com o número de colónias a rastrear, mais o número de poços correspondentes aos controlos negativo e positivo;
2. Adicionar 2,5 µL de controlo positivo nos poços que funcionam como controlo positivo;
3. Adicionar 2,5 µL de controlo negativo nos poços que funcionam como controlo negativo;
4. Para 1 colónia isolada: Recolher a colónia com fio reto e suspendê-la em 0,1 mL de água esterilizada e homogeneizar;

Para *pool* de 10 colónias: Recolher cada colónia com fio reto e suspendê-las em 0,5 mL de água esterilizada e homogeneizar;

5. Pipetar 2,5 µL da suspensão preparada anteriormente para cada poço para rastreio das colónias/ *pools* de colónias.

A programação do software para execução de PCR em tempo real foi feita de forma a selecionarem-se quatro fluoróforos, são eles: FAM, TexasRed e Cy5 (que visam a deteção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*, respetivamente) e HEX (que funciona como controlo de amplificação interno (IAC)). Esta informação encontra-se resumida na Tabela 6.

Tabela 6: Kit PCR em tempo real, fluoróforos utilizados e correspondentes genes visados.

KIT PCR	FAM	TexasRed	Cy5	HEX
PMB10M-V1C2E-50	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	IAC

Tendo em conta o objetivo do presente trabalho, embora o kit de PCR tenha apresentado resultados para o gene *eae*, estes não foram considerados. Assim, apenas os resultados obtidos para os genes *stx1* e *stx2* foram utilizados para dar seguimento ao protocolo e para a emissão de resultados.

O protocolo a utilizar no termociclador deve seguir as condições abaixo listadas (Tabela 7).

Tabela 7: Protocolo utilizador no termociclador.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	DURAÇÃO	CICLOS (LOOPS)
Ativação da Taq Polimerase	95	3 min	1
Desnaturação	95	10 s	45 (para extrato de DNA) 30 (para colónias isoladas)
<i>Annealing</i> + Leitura de Placa	60	45 s	

Adicionalmente, para além dos controlos PCR disponibilizados no *Kit*, foram utilizados controlos de processo, tendo sido utilizado para o controlo positivo do processo *E. coli* O157:H7 ATCC35150 e para o controlo negativo do processo água desmineralizada esterilizada no caso das colónias isoladas e AP no caso do caldo de enriquecimento.

No final da PCR é emitido, pelo *software*, um relatório, cuja análise é necessária para a validação e interpretação dos resultados.

Para que os resultados sejam considerados válidos é necessário que todas as amostras apresentem amplificação no fluoróforo HEX (IAC). Adicionalmente, é necessário que haja amplificação de ambos os controlos positivos e que nenhum dos controlos negativos amplifique. Verificadas estas condições pode proceder-se à análise dos resultados das amostras para os restantes fluoróforos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Ensaio de Controlo

3.1.1. Avaliação do desempenho dos meios de cultura

Para proceder à avaliação do desempenho dos meios de cultura utilizados, foram avaliadas as concentrações dos microrganismos presentes nas diluições utilizadas neste controlo. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos nas contagens em TSA de cada microrganismo utilizado. De referir que estas contagens se encontram de acordo com as mencionadas na norma ISO 11133.

Tabela 8: Resultados das contagens em TSA de cada microrganismo a utilizar, para verificação da sua concentração.

MICROORGANISMO	CONTAGEM (ufc)	DILUIÇÃO CORRESPONDENTE
<i>E. coli</i> (WDMC 00013)	191	10 ⁻⁷
<i>E. coli</i> (ATCC 35150)	151	10 ⁻⁷
<i>E. coli</i> O157:H7 (WDMC 00014)	163	10 ⁻⁷
<i>Enterococcus faecalis</i> (WDMC 00087)	147	10 ⁻⁷

Com base nestes resultados foram seleccionadas as diluições a inocular, para cada microrganismo, nos diferentes meios de cultura, de modo a cumprir o mencionado na norma ISO 11133 para a realização da avaliação de desempenho dos meios de cultura.

Os resultados obtidos para cada meio de cultura em avaliação encontram-se abaixo listados: AN (Tabela 9), AP (Tabela 10), TBX (Tabela 11) e CA-STECC (Tabela 12).

Tabela 9: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade do meio AN, tendo em conta cada estirpe e inoculação.

NUTRIENT AGAR				
	ESTIRPES	INOCULAÇÃO	CONTAGEM TEÓRICA (ufc)	RESULTADO QUALITATIVO
PRODUTIVIDADE	<i>E. coli</i> (WDMC 00013)	10 µL da diluição 10 ⁻⁴	1,91 x 10 ³	Bom crescimento
	<i>E. coli</i> O157:H7 (WDMC 00014)	10 µL da diluição 10 ⁻⁴	1,63 x 10 ³	Bom crescimento

Tabela 10: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade do meio AP, tendo em conta cada estirpe e inoculação.

ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA				
	ESTIRPES	INOCULAÇÃO	CONTAGEM TEÓRICA (ufc)	RESULTADO QUALITATIVO
PRODUTIVIDADE	<i>E. coli</i> (WDMC 00013)	1 mL da diluição 10 ⁻⁸	19,1	Bom crescimento
		0,1 mL da diluição 10 ⁻⁸	1,91	Bom crescimento
	<i>E. coli</i> O157:H7 (WDMC 00014)	1 mL da diluição 10 ⁻⁸	16,3	Bom crescimento
		0,1 mL da diluição 10 ⁻⁸	1,63	Bom crescimento

Tabela 11: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade do meio TBX, tendo em conta cada estirpe e inoculação.

TRYPTONE-BILE-X-GLUCURONATE AGAR				
	ESTIRPES	INOCULAÇÃO	CONTAGEM TEÓRICA (ufc)	RESULTADO QUALITATIVO
PRODUTIVIDADE	<i>E. coli</i> (WDMC 00013)	100 µL da diluição 10 ⁻⁵	1,91 x 10 ³	Bom crescimento
	<i>E. coli</i> O157:H7 (WDMC 00014)	100 µL da diluição 10 ⁻⁵	1,63 x 10 ³	Bom crescimento

Tabela 12: Resultados da avaliação de desempenho para a produtividade e seletividade do meio CA-STECC, tendo em conta cada estirpe e inoculação.

CHROMAGAR™ STEC				
	ESTIRPES	INOCULAÇÃO	CONTAGEM TEÓRICA (ufc)	RESULTADO QUALITATIVO
PRODUTIVIDADE	<i>E. coli</i> ATCC 35150	100 µL da diluição 10 ⁻⁵	1,51 x 10 ³	Bom crescimento
	<i>E. coli</i> O157:H7 (WDMC 00014)	100 µL da diluição 10 ⁻⁵	1,63 x 10 ³	Bom crescimento
SELETIVIDADE	<i>E. coli</i> (WDMC 00013)	10 µL da diluição 10 ⁻¹	1,91 x 10 ⁶	Inibição
	<i>Enterococcus faecalis</i> (WDMC 00087)	10 µL da diluição 10 ⁻¹	1,91 x 10 ⁶	Inibição

Os resultados obtidos em todos os testes de produtividade e seletividade para a avaliação de desempenho dos meios a utilizar no presente trabalho foram os esperados e, portanto, satisfatórios.

Tendo o desempenho dos meios sido avaliado e testado com sucesso é possível afirmar que os resultados do ensaio microbiológico que envolve a sua utilização pode ser considerado fiável, já que todos os meios evidenciaram capacidade de fornecer resultados consistentes e reprodutíveis.

3.1.2. Implementação do método de referência no Laboratório

Na etapa de verificação do método de referência, para determinar qual seria a eLOD₅₀ no laboratório, realizou-se uma contagem pelo método do NMP, para obtenção do valor correspondente ao valor do LIL.

Os resultados da contagem por NMP encontram-se na Tabela 13, adaptada da Tabela C.1 da norma ISO 16140-3:2021 (Anexo I), e estão ilustrados na Figura 6.

Tabela 13: Resultados NMP, tendo em conta o número de tubos com resultado positivo (turbacção) em cada diluição e LIL correspondente.

	1 mL 3×LOD ₅₀	1 mL 1×LOD ₅₀	0,3 mL 1×LOD ₅₀	LIL
Nº DE POSITIVOS	2/3	2/3	0/3	0,5 NMP/mL da Diluição LOD50



Figura 6: Resultados NMP, em que cada tubo com turbacção corresponde a um resultado positivo.

Posteriormente à determinação do valor do LIL é necessário verificar-se a aceitabilidade do valor obtido, sendo este aceite se obedecer à seguinte condição: $LIL \leq LOD_{50}$ [121]. Como o valor obtido para LIL foi inferior a 1, a condição foi verificada e, conseqüentemente, os resultados obtidos no ensaio para determinação do eLOD₅₀ foram aceites.

Este ensaio foi realizado para verificação do método descrito na ISO/DIS 13136-1:2025, mas efetuou-se, separadamente, uma análise dos resultados de cada uma das etapas. Para a verificação da etapa PCR 1 foi necessário proceder à realização da PCR para deteção dos genes *stx1* e/ou *stx2*, nos diferentes níveis de contaminação, tal como esquematizado anteriormente (ver Figura 2).

O valor correspondente à eLOD₅₀ foi calculado tendo em conta o número de diluições que evidenciaram resultados positivos, isto é, em que houve deteção dos genes *stx1* e/ ou *stx2*. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14, adaptada da Tabela 6 da norma ISO 16140-3:2021 (Anexo II).

Tabela 14: Resultados PCR 1 – número de amostras positivas por nível de contaminação e correspondente eLOD₅₀.

	9×LOD₅₀	3×LOD₅₀	1×LOD₅₀	eLOD₅₀ (ufc/ toma de amostra)
Nº DE POSITIVOS PCR	1/1	4/4	2/4	0,7 x LIL

Desta forma, e tendo em conta o valor de LIL obtido anteriormente, conclui-se que a eLOD₅₀ determinada apresentava o valor de 0,35 ufc/toma da amostra para a etapa PCR 1.

Para verificação da etapa de isolamento procedeu-se à inoculação de placas de CA-STECC e TBX com os diferentes níveis de contaminação, tal como esquematizado na Figura 2.

O valor correspondente à eLOD₅₀ foi calculado tendo em conta o número de diluições que evidenciaram resultados positivos, isto é, em que houve crescimento de colónias características de STEC nas placas de CA-STECC e TBX.

Posteriormente, realizou-se a recolha e passagem para AN de uma colónia isolada suspeita, por nível de contaminação, proveniente de cada um dos meios anteriormente inoculados. Todas as colónias isoladas em AN foram depois analisadas por PCR, já que para validar o resultado é necessário que nestas se verifique a presença dos genes *stx1* e/ ou *stx2*. Como todas as colónias testadas obtiveram resultados PCR positivos para os dois genes em análise, foi possível calcular a eLOD₅₀ baseada no número de resultados positivos por nível de contaminação. Estes resultados encontram-se na Tabela 15, adaptada da tabela C.1 da norma ISO 16140-3:2021 (Anexo I).

Tabela 15: Resultados da etapa de isolamento – número de amostras positivas por nível de contaminação e correspondente eLOD₅₀.

	9×LOD₅₀	3×LOD₅₀	1×LOD₅₀	eLOD₅₀ (ufc/ toma de amostra)
Nº DE POSITIVOS	1/1	3/4	2/4	1,3 x LIL

Desta forma, e tendo em conta o valor de LIL obtido anteriormente, concluiu-se que, para a etapa de isolamento, a eLOD₅₀ determinada apresentava o valor de 0,65 ufc/toma da amostra. Analisando globalmente os resultados concluiu-se que o valor eLOD₅₀ para o método em estudo tinha o valor de 0,65 ufc/toma da amostra.

Adicionalmente, foi necessário verificar a aceitabilidade dos valores obtidos para a eLOD₅₀. Para tal, é necessário que estes obedeçam à seguinte condição: eLOD₅₀ ≤ 4 x LOD₅₀ [121].

Como já referido, o valor correspondente ao LOD₅₀ foi considerado 1 ufc/ toma de amostra, pelo que, para validar a condição, ambos os valores determinados para a eLOD₅₀ teriam de ser inferiores a 4. Como tal se verificou, foi possível aceitar os resultados obtidos para o eLOD₅₀.

Destaca-se ainda que foi realizado, de acordo com o protocolo seguido, um ensaio em branco, isto é, sem microrganismos, cujo resultado negativo validou a inexistência de contaminações durante todo processo e, conseqüentemente, os resultados dos ensaios apresentados.

3.2. Caracterização das amostras analisadas

Com o objetivo de melhor compreender o perfil das amostras em análise, foi realizada uma caracterização baseada em três variáveis: o tipo de leite utilizado na sua produção, a origem geográfica do leite e a presença ou ausência de conservantes.

Os gráficos seguintes (Figura 7, Figura 8 e Figura 9) apresentam a distribuição percentual das amostras a analisar, segundo cada um destes critérios, permitindo uma visão mais clara da diversidade e representatividade dos produtos incluídos no estudo.

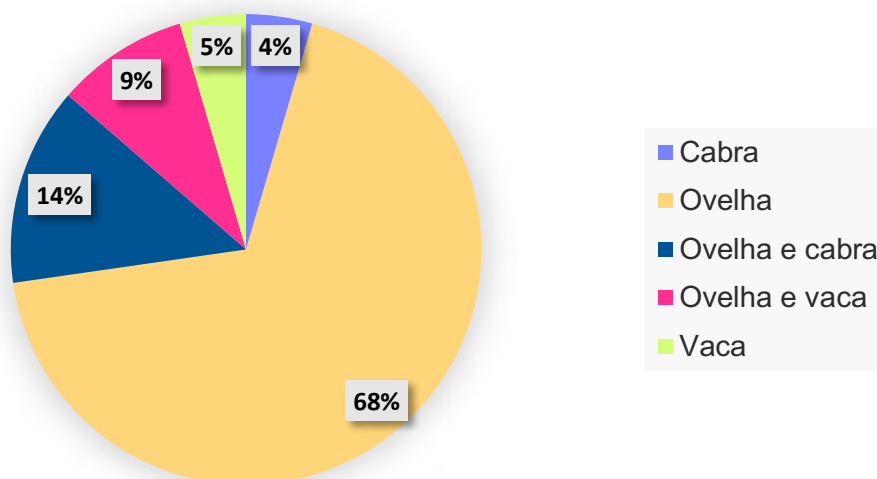


Figura 7: Distribuição percentual das amostras analisadas, consoante o tipo de leite utilizado na produção.

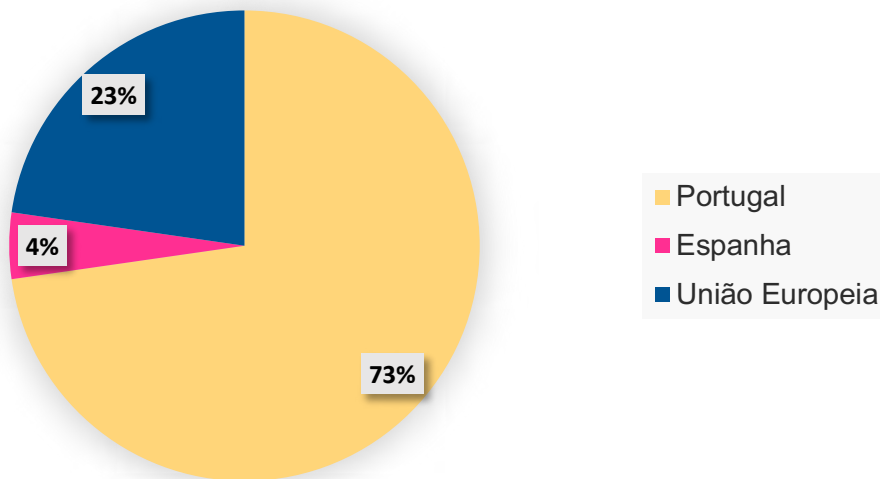


Figura 8: Distribuição percentual das amostras analisadas, consoante a origem geográfica do leite utilizado na produção.

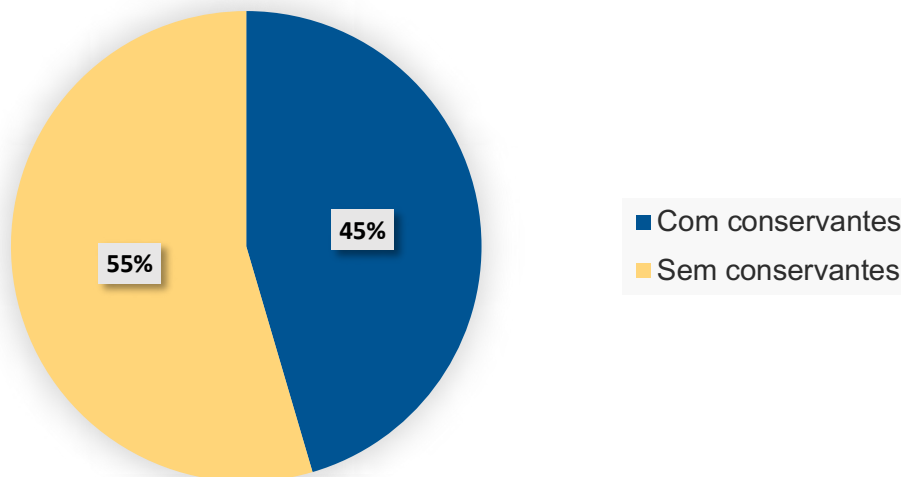


Figura 9: Distribuição percentual das amostras analisadas, consoante a utilização de conservantes.

Esta análise preliminar permitiu não só descrever a diversidade das amostras estudadas, como também fornecer informações relevantes para a posterior interpretação dos resultados microbiológicos, nomeadamente no que respeita à eventual associação entre estas variáveis e a ocorrência de contaminação por STEC.

3.3. Análise de amostras de queijos feitos com leite cru

3.3.1. Contagem de *E. coli* em TBX

Anteriormente à deteção de STEC, foi realizada em todas as amostras uma contagem de *E. coli* em TBX, com o objetivo de determinar o nível de contaminação deste microrganismo nas amostras a analisar, uma vez que *E. coli* é um bom indicador de higiene. Para além disso, também se pretendeu verificar qual a influencia de elevados

níveis de contaminação de *E. coli* não STEC na deteção de STEC. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados das contagens de colónias correspondentes a *E. coli* em TBX (colónias azuis) realizada antes do início do protocolo para a deteção de STEC em todas as amostras analisadas.

AMOSTRA	CONTAGEM DE <i>E. coli</i>
	(ufc/g)
Q1	$5,7 \times 10^3$
Q2	$< 1,0 \times 10^1$
Q3	$< 1,0 \times 10^1$
Q4	$< 1,0 \times 10^1$
Q5	$< 1,0 \times 10^1$
Q6	$< 1,0 \times 10^1$
Q7	$< 1,0 \times 10^1$
Q8	$< 1,0 \times 10^1$
Q9	$< 4,0 \times 10^1$
Q10	$1,1 \times 10^5$
Q11	$2,5 \times 10^3$
Q12	$< 1,0 \times 10^1$
Q13	$< 1,0 \times 10^1$
Q14	$< 1,0 \times 10^1$
Q15	$2,4 \times 10^3$
Q16	$1,7 \times 10^4$
Q17	$< 1,0 \times 10^1$
Q18	$< 1,0 \times 10^1$
Q19	$< 1,0 \times 10^1$
Q20	$< 1,0 \times 10^1$
Q21	$1,5 \times 10^4$
Q22	$4,1 \times 10^6$

A presença de *E. coli* nos géneros alimentícios pode dever-se a contaminações cruzadas entre matérias-primas de origem animal/ vegetal ou do meio ambiente [125].

Importa destacar que, para os queijos feitos com leite cru, não existem, no regulamento (CE) nº 2073/2005, critérios microbiológicos de higiene relativos a *E. coli*. No entanto, *E. coli* é critério de higiene para queijos fabricados a partir de leite termicamente tratado. Para estes, encontram-se definidos três níveis de aceitabilidade, tendo em conta a concentração deste microrganismo [126]:

- Nível Insatisfatório: superior a 10^2 ufc/g;
- Nível Aceitável: igual ou inferior a 10^2 ufc/g, mas superior ou igual 20 ufc/g;
- Nível Satisfatório: Presença em quantidade inferior a 20 ufc/g

A Figura 10 ilustra a percentagem de amostras analisadas, de queijos feitos com leite cru, que se poderia encontrar em cada um dos níveis acima descritos.

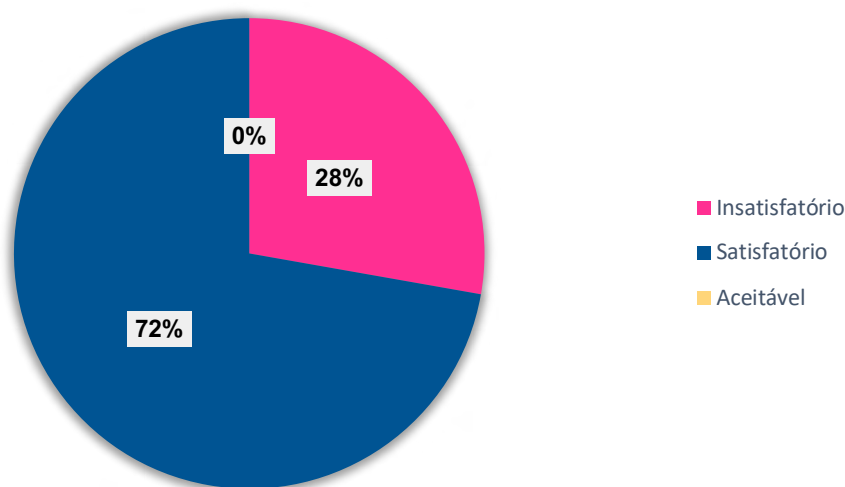


Figura 10: Percentagem de amostras em cada nível de aceitabilidade, se se tratasse de queijo feito com leite tratado termicamente, tendo em conta os resultados da análise para contagem de *E. coli* em queijo de leite cru.

No entanto, não devem ser estabelecidas, com base nestes resultados, quaisquer suposições acerca da presença de STEC nas amostras, já que a presença de *E. coli* não patogénica não garante a presença de patogénicos entéricos [125].

3.3.2. Detecção de STEC de acordo com o método ISO/DIS 13136-1:2025

3.3.2.1. Etapa de rastreio (screening): PCR 1 - Detecção de genes *stx1* e/ou *stx2* no caldo de enriquecimento

Segundo a norma ISO/DIS 13136-1:2025, as amostras devem ser inicialmente testadas para a deteção de *stx1* e/ou *stx2* através da realização de PCR ao caldo de enriquecimento que foi sujeito a incubação. Os resultados obtidos para cada amostra nesta análise encontram-se listados na Tabela 17, já os relatórios das diversas corridas PCR encontram-se em anexo (Anexos III a VI).

Tabela 17: Resultados PCR obtidos para a detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* a partir do caldo de enriquecimento.

AMOSTRA	PCR CALDO DE ENRIQUECIMENTO			RESULTADO (em 25 g)
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	
Q1	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q2	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q3	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q4	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q5	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q6	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q7	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q8	Positivo	Negativo	Negativo	Continuar Protocolo
Q9	Negativo	Positivo	Positivo	Continuar Protocolo
Q10	Positivo	Negativo	Positivo	Continuar Protocolo
Q11	Negativo	Negativo	Positivo	STEC não detetada
Q12	Negativo	Negativo	Positivo	STEC não detetada
Q13	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q14	Negativo	Negativo	Positivo	STEC não detetada
Q15	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q16	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q17	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q18	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q19	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q20	Negativo	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q21	Positivo	Positivo	Negativo	Continuar Protocolo
Q22	Positivo	Positivo	Positivo	Continuar Protocolo

Para as amostras cujo resultado da PCR foi negativo para os genes *stx1* e/ou *stx2* a análise terminou, sendo o resultado “*STEC não detetada/* toma de amostra”, isto independentemente do resultado obtido para o gene *eae*, dado que a deteção deste último não está indicada na norma ISO/DIS 13136-1:2025.

Para as amostras cujo resultado da análise PCR foi positiva para algum ou para ambos os genes *stx* deu-se continuidade ao protocolo, de acordo com o que é indicado pela norma ISO/DIS 13136-1:2025 (Figura 4). Na Tabela 18 encontram-se alguns dados referentes aos resultados PCR das amostras anteriormente positivas para estes genes.

Tabela 18: Valores de Cq e caracterização do tipo de curva de amplificação (típica ou não típica) das amostras em que foram detetados os genes *stx1* e/ou *stx2*.

AMOSTRA	GENE	Cq	CURVA DE AMPLIFICAÇÃO
Q8	<i>stx1</i>	32,94	Atípica
Q9	<i>stx2</i>	30,54	Atípica
Q10	<i>stx1</i>	30,26	Atípica
Q21	<i>stx1</i>	25,95	Típica
	<i>stx2</i>	25,94	Típica
Q22	<i>stx1</i>	32,66	Atípica
	<i>stx2</i>	37,03	Atípica

Os valores de Cq podem indicar a utilização da diluição correta para posterior colheita de colónias isoladas. Valores elevados de Cq indicam números relativamente baixos de STEC no caldo de enriquecimento, o que pode vir a dificultar o isolamento da estirpe. Ao contrário, valores mais baixos de Cq sugerem concentrações de STEC mais elevadas no caldo de enriquecimento, o que poderá facilitar o isolamento deste microrganismo [95].

A Figura 11 e a Figura 12 exemplificam o resultado de uma curva de amplificação típica e atípica, respetivamente.

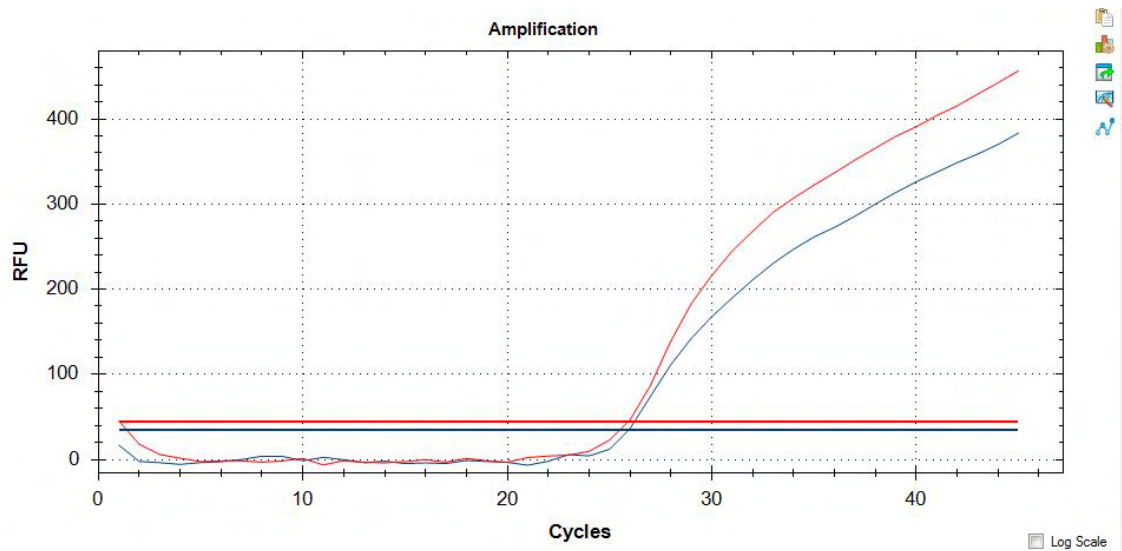


Figura 11: Exemplo de duas curvas de amplificação PCR típicas. Resultado Q21 para *stx1* (azul) e *stx2* (vermelho).

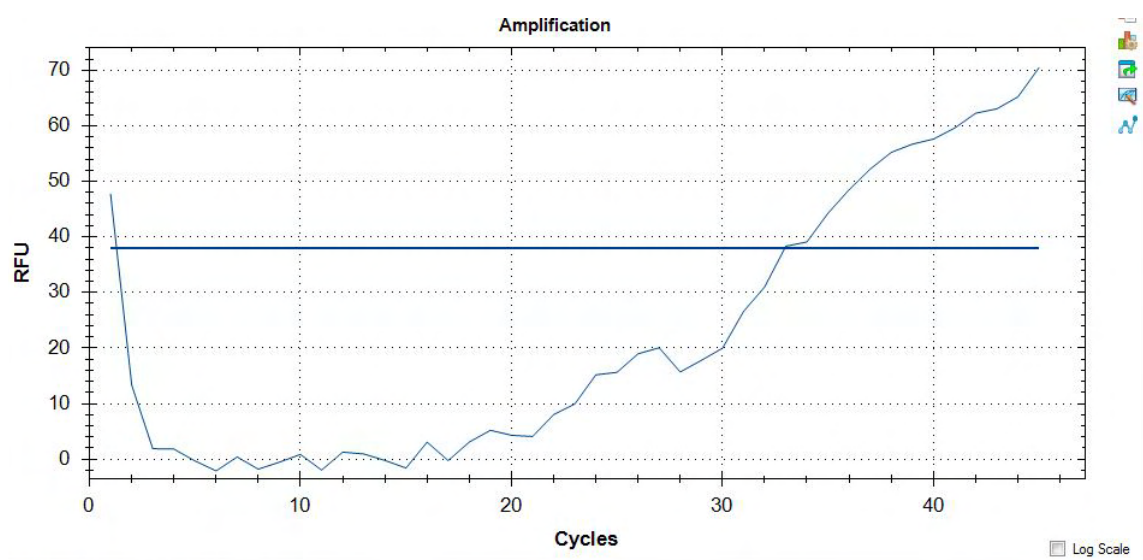


Figura 12: Exemplo de curva de amplificação PCR atípica. Resultado Q8 para *stx1*.

Dos resultados obtidos nos 22 queijos analisados, destaca-se a amostra Q21, uma vez que esta foi a única amostra positiva para os genes *stx1* e *stx2* cuja curva de amplificação correspondeu a uma curva típica. Para além disso, o valor de Cq desta é o mais baixo de entre todas as amostras positivas para os genes *stx1* e/ou *stx2*, o que indica uma maior concentração destes no caldo de enriquecimento.

Comparativamente a Q8, Q9, Q10 e Q22, será mais provável conseguir isolar-se STEC a partir da amostra Q21.

Nas figuras seguintes são apresentados os resultados positivos por número total de amostras analisadas, tendo em conta o tipo de leite utilizado no fabrico (Figura 13), a origem geográfica do leite (Figura 14) e a presença ou ausência de conservantes (Figura 15).

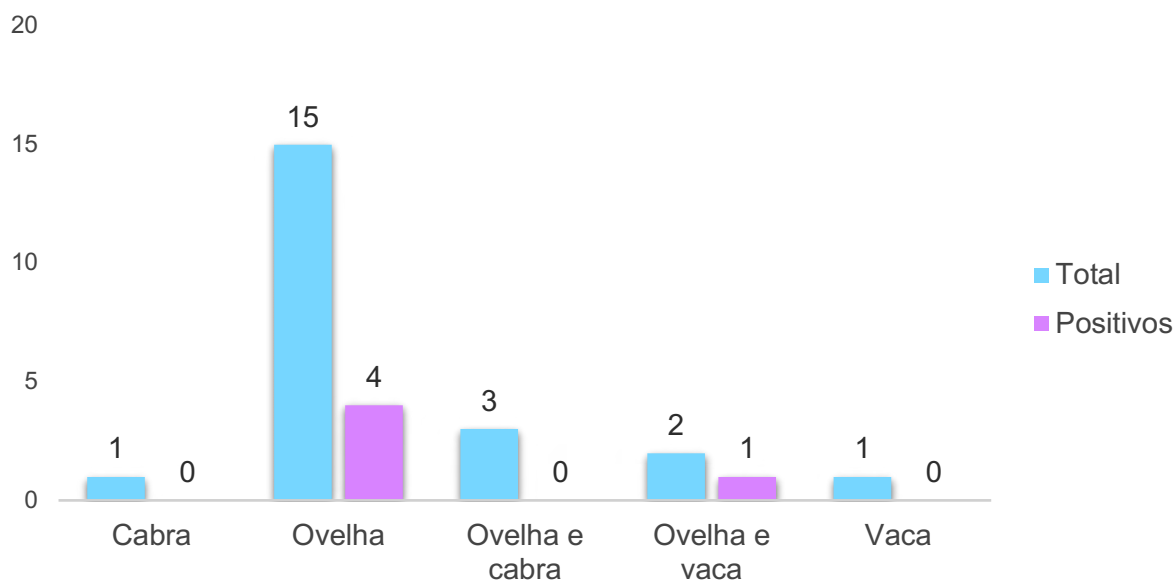


Figura 13: Número total e número de amostras positivas para STEC, tendo em conta o tipo de leite utilizado no fabrico.

Verificou-se uma maior incidência relativa de STEC em queijos feitos com leite de ovelha (28,6%). No que toca aos resultados obtidos para amostras produzidas a partir de leite cru de vaca, de cabra ou de mistura, apesar de não terem sido detetadas STEC, o número de amostras foi muito reduzido e a ausência de positivos poderá estar relacionada com o pequeno número de amostras analisadas.

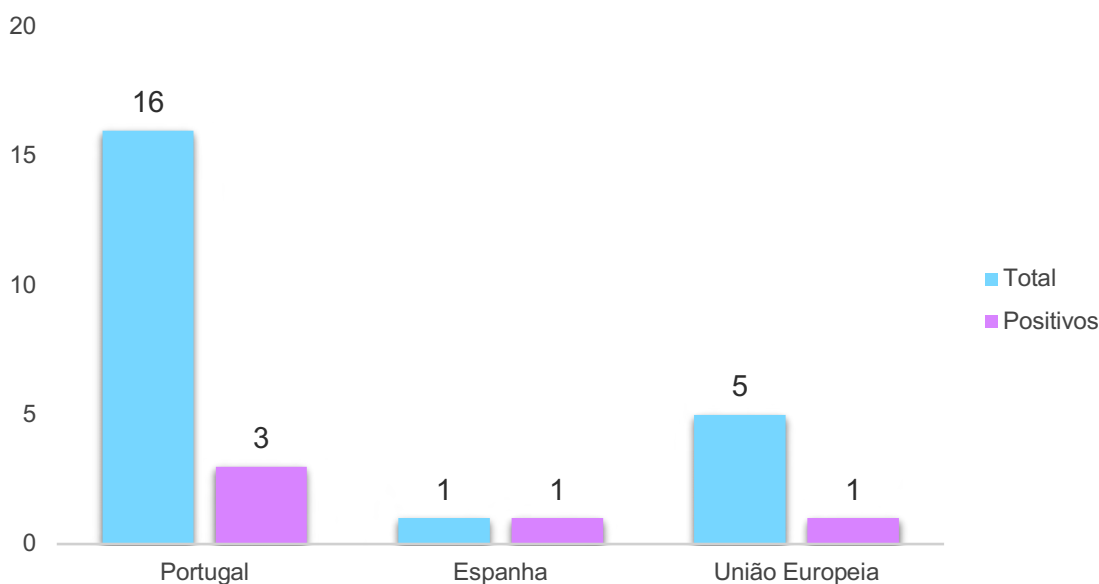


Figura 14: Número total e número de amostras positivas, tendo em conta a origem geográfica do leite utilizado no fabrico.

Quanto à origem do leite, apesar de os queijos terem sido todos fabricados em Portugal, em seis deles o leite tinha origem diferente. Embora o número de amostras de queijo feito com

leite com diferente origem geográfica tenha sido diferente, a percentagem de amostras com resultados positivos entre leite de Portugal e da EU foi semelhante (respetivamente 18,8 e 20%). No entanto, as amostras de queijo feito com leite obtido em Espanha (1 amostra) e de outros países da União Europeia (5 amostras), não fornecem resultados relevantes precisamente devido ao reduzido tamanho amostral.

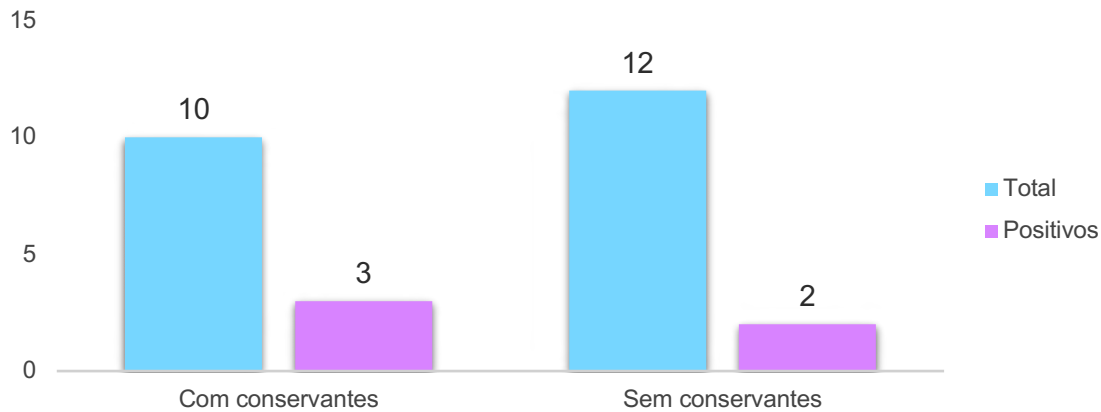


Figura 15: Número total e número de amostras positivas, tendo em conta a presença de conservantes.

Relativamente à presença de conservantes no queijo, as amostras que continham E235 (natamicina - antifúngico) apresentaram uma taxa de positividade de 30%. Por outro lado, nas amostras sem conservantes, a frequência foi inferior (16,7%). No que respeita às amostras que contêm E202 (sorbato de potássio – antimicrobiano) apesar de possuírem uma incidência relativa de 50%, novamente, não fornecem resultados relevantes devido ao reduzido tamanho amostral. No entanto, é de admitir que a necessidade de adição de conservantes, particularmente de E202, poderá estar relacionada com a pior qualidade microbiológica do leite utilizado.

A Tabela 19 compara os resultados obtidos na análise PCR1 com as contagens de *E. coli* feitas inicialmente (Tabela 16) e com o tipo de curva PCR obtida para as amostras positivas (Tabela 18).

Tabela 19: Resultados das contagens de *E. coli* e PCR1, com correspondente tipo de curva de amplificação obtida.

AMOSTRA	CONTAGEM DE <i>E. coli</i> (ufc/g)	DETEÇÃO DOS GENES <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i>	CURVA DE AMPLIFICAÇÃO
Q1	5,7x10 ³	Não	-
Q2	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q3	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q4	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q5	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q6	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q7	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q8	< 1,0 x10 ¹	Sim	Atípica
Q9	< 4,0 x 10 ¹	Sim	Atípica
Q10	1,0 x 10 ⁵	Sim	Atípica
Q11	2,5 x 10 ³	Não	-
Q12	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q13	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q14	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q15	2,4 x 10 ³	Não	-
Q16	1,7 x 10 ⁴	Não	-
Q17	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q18	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q19	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q20	< 1,0 x10 ¹	Não	-
Q21	1,5 x 10 ⁴	Sim	Típica
Q22	4,1 x 10 ⁶	Sim	Atípica

Através da análise da Tabela 19 é possível verificar que existem diversas amostras com contagem de *E. coli* em TBX, mas em que se verifica a ausência de STEC, como é o caso das amostras Q1, Q11, Q15 e Q16.

Por outro lado, a maioria das amostras que apresentaram valores mais elevados de *E. coli* (>10⁴ ufc/g) correspondem àquelas em que houve detecção dos genes *stx1* e *stx2*, como é o caso das amostras Q10, Q21 e Q22.

Deve ainda destacar-se os resultados obtidos para a amostra Q8, amostra onde, apesar de não se verificarem contagens de *E. coli* em TBX, houve deteção dos genes *stx1* e *stx2*, ainda que em quantidade reduzida (curva atípica).

Através da análise dos dados apresentados, é possível verificar que em todos os 14 queijos que não apresentaram contagens de *E. coli* ($< 1,0 \times 10^1$ ufc/g), em apenas uma amostra (Q8) houve deteção de genes *stx1* e/ou *stx2*. Embora o número de amostras analisado tenha sido reduzido pode-se admitir-se uma tendência de maior probabilidade de deteção dos genes *stx1* e/ou *stx2* em queijos de fraca qualidade higiénica.

Estes resultados evidenciam a necessidade de reforçar os controlos microbiológicos na produção de queijos feitos com leite cru para a mitigação do risco microbiológico associado à presença de STEC.

3.3.2.2. Etapa de isolamento de colónias suspeitas de STEC

Para a obtenção de colónias isoladas, as amostras que apresentaram amplificação dos genes *stx1* e/ou *stx2* (Q8, Q9, Q10, Q21 e Q22), independentemente do tipo de curva de amplificação PCR obtida, foram inoculadas em CA-STECC e TBX, conforme descrito na norma ISO/DIS 13136-1:2025. A inoculação foi realizada com 10 µL e/ou com 100 µL, diretamente do caldo de enriquecimento e com 10 µL e/ou 100 µL do caldo de enriquecimento diluído, consoante necessário. Posteriormente, no caso da existência de crescimento de colónias suspeitas em algum dos meios inoculados, procedeu-se ao seu isolamento em AN.

A Tabela 20 indica a aparência das colónias obtidas em CA-STECC e TBX e em que amostras o isolamento em AN foi conseguido.

Tabela 20: Aspeto das colónias obtidas em CA-STECC e TBX a partir do caldo de enriquecimento das diferentes amostras cujo resultado do PCR1 foi positivo. E conseqüente resultado da tentativa de isolamento em AN.

AMOSTRA	COLÓNIAS CA-STECC	COLÓNIAS TBX	ISOLAMENTO EM AN
Q8	Azuis e cinzas	Azuis e brancas	Não
Q9	Azuis, malvas e cinzas	Azuis e brancas	Sim
Q10	Azuis, malvas e cinzas	Azuis e brancas	Sim
Q21	Azuis, malvas e cinzas	Azuis e brancas	Sim
Q22	Azuis, malvas, cinzas e roxas	Azuis, brancas e brancas com centro azul	Sim

De um modo geral, foram obtidas, em CA-STEPC, colónias de quatro tipos distintos: colónias azuis (CA), colónias cinzentas (CC), colónias malva (CM) e colónias roxas (CR) (Figura 16). No entanto, as instruções do fabricante apenas mencionam a possibilidade de crescimento de colónias de dois tipos: CM, que correspondem a colónias malva de aparência típica de STEC e CA, que correspondem a outras enterobactérias. Não existe qualquer referência à possibilidade de crescimento de CC ou CR.

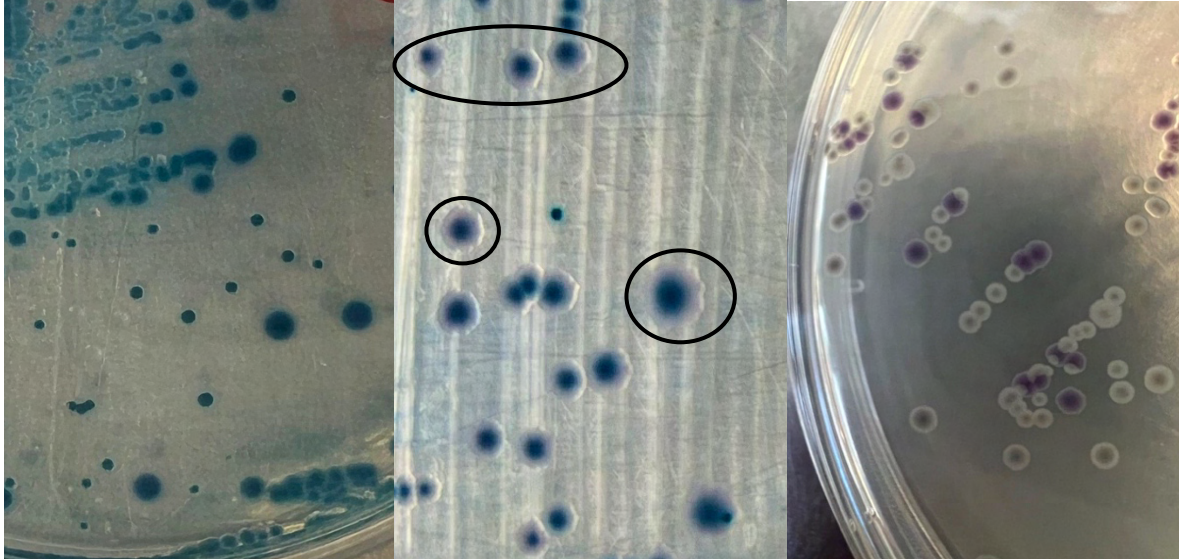


Figura 16: Exemplo ilustrativo em CA-STEPC, de colónias azuis (CA) à esquerda, roxas (CR) ao centro e cinzentas (CC) e malva (CM) à direita.

No meio TBX foram obtidas colónias de três tipos diferentes: colónias azuis (CA), colónias brancas com centro azul (CAB) e colónias brancas (CB) (Figura 17).

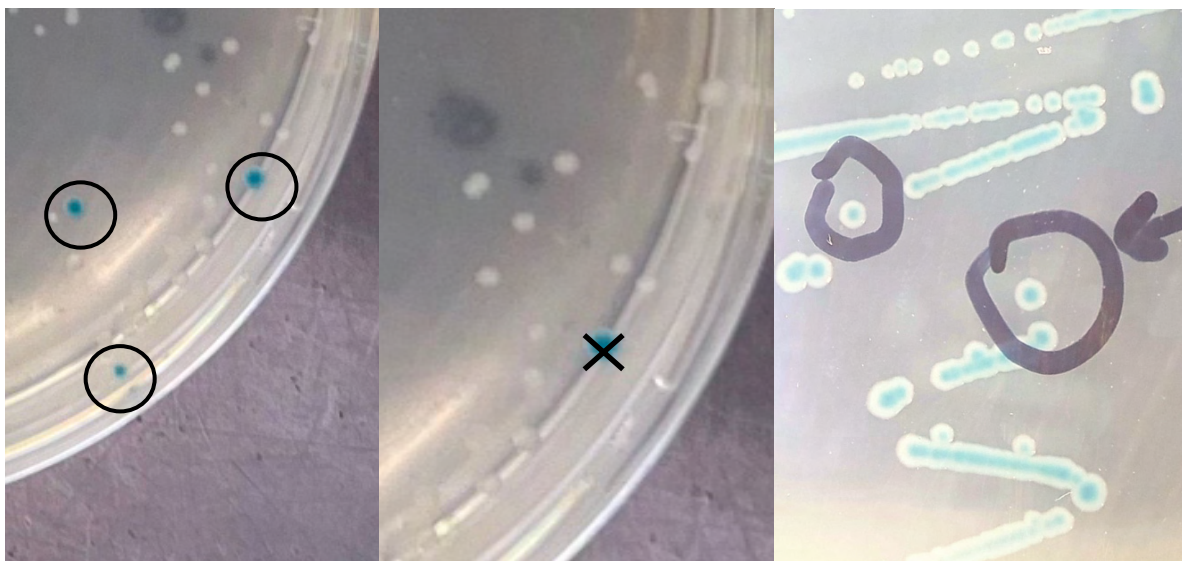


Figura 17: Exemplo ilustrativo de colónias em TBX, CA à esquerda, CB ao centro e CAB à direita.

Destaca-se dos resultados apresentados na Tabela 20 a amostra Q8, que apesar de ter um resultado positivo na PCR do caldo de enriquecimento (Tabela 17), apresenta uma curva PCR atípica (Tabela 18) e não evidenciou o crescimento de colónias de aparência típica de STEC (CM) em CA-STECC.

Tendo em conta estes resultados e, uma vez que o crescimento de colónias azuis e brancas em TBX não é indicador de presença exclusiva de STEC, por este se tratar de um meio seletivo para *E. coli* e não especificamente para STEC, não se procedeu ao isolamento de qualquer colónia desta amostra em AN.

Para todas as restantes amostras, verificou-se crescimento de colónias de aparência típica de STEC em CA-STECC (Tabela 20) o que, conseqüentemente, viabiliza a possibilidade de as colónias presentes em TBX serem STEC.

Assim sendo, apesar de nem todas as curvas PCR serem típicas (Tabela 18), procedeu-se ao isolamento em AN de 50 colónias suspeitas provenientes de cada uma das quatro amostras (Q9, Q10, Q21 e Q22). As colónias foram recolhidas quer de CA-STECC (apenas CM), quer de TBX (todos os tipos), de uma forma equitativa. A partir destas colónias foram realizados cinco *pools* com 10 colónias cada, por amostra, com o objetivo de se detetar, numa reação PCR (PCR 2) a presença dos genes *stx1* e/ou *stx2*, tal como é indicado na ISO/DIS 13136-1:2025.

3.3.2.3. PCR 2: deteção de genes *stx1* e/ou *stx2* em colónias isoladas

Nenhuma das amostras analisadas nesta etapa, isto é, amostras nas quais houve deteção dos genes *stx1* e/ou *stx2* no caldo de enriquecimento, evidenciou a presença destes genes nas 50 colónias isoladas.

Desta forma, e segundo a norma ISO/DIS 13136-1:2025, a análise destas amostras é dada por terminada e todas as amostras têm como resultado “STEC não detetada/toma de amostra” (Tabela 21), independentemente do resultado obtido para o gene *eae*.

Tabela 21: Resultados PCR obtidos para a deteção de *stx1* e/ou *stx2* a partir de colónias suspeitas de CA-STECC e TBX isoladas em AN.

AMOSTRA	RESULTADO PCR COLÓNIAS ISOLADAS		RESULTADO FINAL
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	
Q9	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q10	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q21	Negativo	Negativo	STEC não detetada
Q22	Negativo	Negativo	STEC não detetada

Apesar de terem sido analisadas pelo menos 50 colónias suspeitas para STEC, provenientes de cada uma destas amostras, os resultados obtidos não corresponderam às expectativas. Por se ter conseguido isolar em AN, com sucesso, CM em CA-STECC, isto é, colónias de cor malva, correspondente às colónias de aparência típica de STEC neste meio, que, segundo as instruções de uso do fabricante, correspondem só e apenas a STEC, seria expectável que o resultado obtido fosse ao encontro dos resultados do primeiro PCR (Tabela 17), ou seja, que fossem detetados os genes *stx1* e/ou *stx2*. Este resultado revela-se particularmente imprevisível para a amostra Q21, já que esta foi a única amostra com uma curva típica na PCR.

Na figura abaixo (Figura 18) encontram-se alguns exemplos de placas de CA-STECC, inoculadas com caldo de enriquecimento de diferentes amostras (Q21 e Q22) onde se observaram colónias malva, ao lado de uma placa onde foi inoculada a estirpe utilizada para controlo positivo (*E. coli* ATCC 35150).

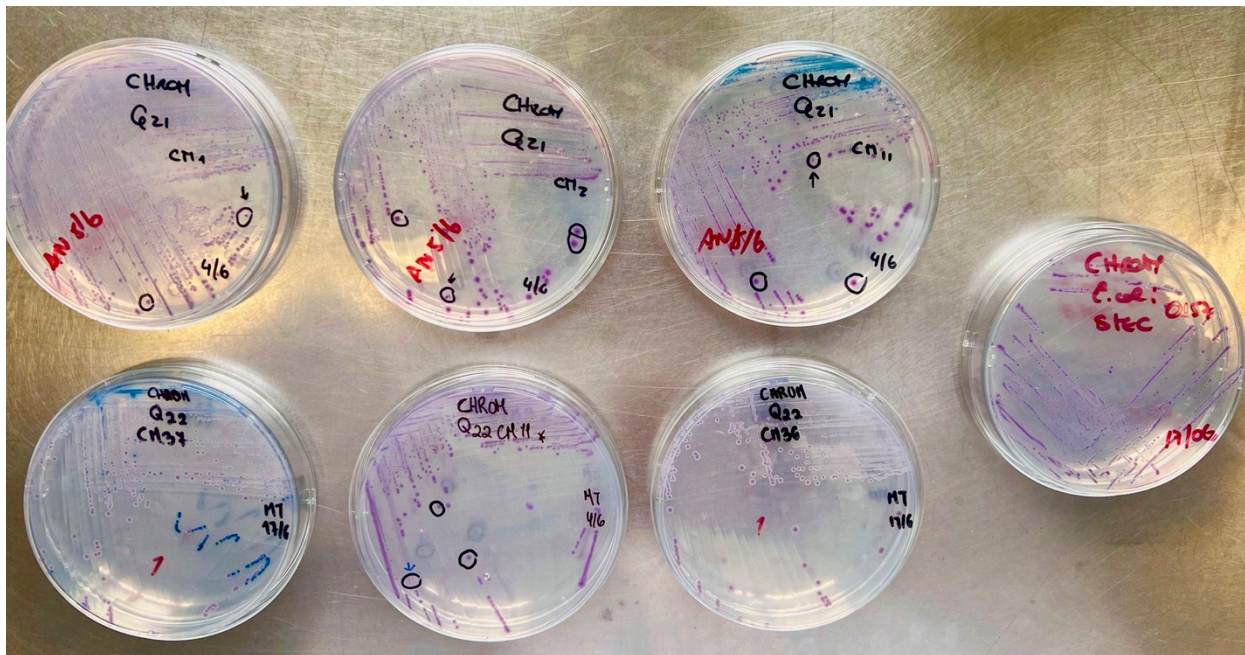


Figura 18: Exemplos da aparência de colónias negativas para STEC (esquerda), em comparação com aparência da estirpe utilizada como controlo positivo (direita).

Como se pode verificar na Figura 18, a cor malva obtida em CA-STECC com a estirpe *E. coli* STEC O157:H7 ATCC 35150, utilizada como controlo positivo, é idêntica à obtida nas colónias de cor malva isoladas a partir do caldo de enriquecimento das amostras Q21 e Q22.

Um conjunto representativo de colónias malva como as representadas na Figura 18, isto é, com aparência idêntica às colónias obtidas com a estirpe utilizada para controlo positivo, foram isoladas em AN para a realização do segundo PCR. Desta forma, seria expectável que se tivessem obtido resultados positivos para a deteção dos genes *stx1* e/ou *stx2* no PCR2, ou

seja, que estes resultados estivessem em concordância com os obtidos no PCR1, realizado a partir do caldo de enriquecimento das amostras.

Resultados semelhantes já foram reportados por Zelyas *et al.* (2016) onde, a partir de 79 isolados com colónias de aparência típica de STEC em CA-STECS, apenas 11 (13,92%) confirmaram ser STEC em PCR [127].

Macori *et al* (2020) observaram que as principais causas para a discrepância entre o resultado da PCR e o isolamento em meio de cultura podem estar relacionadas com a baixa concentração de células, presença de células mortas, presença de microbiota competitiva, células lesadas, células em estado viável mas não cultivável (VBNC), DNA livre de células, ou ainda devido à presença de partículas do fago Stx livres nas amostras [128]. As STEC são capazes de entrar no estado viável, mas não cultivável quando se encontram em circunstâncias stressantes. O estado VBNC é uma condição específica na qual as bactérias permanecem vivas, mas não conseguem formar colónias em meios de cultura que normalmente suportam o seu crescimento [128], [129].

Quanto às colónias que cresceram em TBX, como este se trata de um meio seletivo para *E. coli* e não especificamente para STEC não foi possível, pela observação da aparência das colónias, esperar um resultado PCR positivo para STEC, uma vez que as colónias que crescem neste meio podem corresponder a um tipo de *E. coli* não STEC.

Tal como indicado no ponto 9.5. da norma ISO/DIS 13136-1:2025 (*STEC strain isolation*), à etapa de isolamento de STEC pode ser adicionado um passo de separação imunomagnética (IMS), para a tentativa de isolamento de serogrupos específicos. A IMS permite separar e concentrar os microrganismos alvo nos caldos de enriquecimento, através de esferas imunomagnéticas revestidas por anticorpos específicos [130]. Como esta etapa é direcionada a serogrupos específicos, não é possível pesquisar todos os serogrupos existentes e que podem estar presentes na amostra. Por este motivo, a utilização da IMS pode originar resultados falso negativos. Por isso esta etapa não foi incluída na realização deste trabalho.

3.3.2.4. Etapa de confirmação

A etapa de confirmação descrita no procedimento (Figura 4) não foi realizada, uma vez que as colónias isoladas testadas não revelaram a presença dos genes *stx1* e/ ou *stx2*. Desta forma, para todas as amostras analisadas, o resultado obtido foi “*STEC não detetada/ toma de amostra*”.

Embora não tenha sido possível isolar o microrganismo alvo, fez-se um estudo paralelo para identificar as colónias que se conseguiram isolar.

3.3.3. Identificação dos vários tipos de colónias isoladas de CA-STECC e TBX

Face aos resultados obtidos decidiu proceder-se à identificação de alguns exemplares dos vários tipos de colónias isoladas, de forma a verificar que espécies de microrganismos, presentes no queijo de leite cru, podem interferir na deteção de STEC.

Para tal, decidiu recorrer-se às galerias miniaturizadas de testes bioquímicos, API® 20 E, cuja utilização é, segundo a norma ISO/DIS 13136-1:2025, recomendada na etapa de confirmação, para identificação de colónias isoladas suspeitas.

3.3.3.1. Identificação de colónias suspeitas de STEC

Foram investigadas as colónias provenientes de TBX (CA, CAB, CB) e de CA-STECC (CM), suspeitas de serem STEC, mas para as quais o resultado do PCR 2 foi negativo.

Adicionalmente, também se decidiu avaliar a aparência de cada um deste tipo de colónias no meio de cultura complementar. Desta forma, procedeu-se à inoculação de TBX com as colónias isoladas provenientes de CA-STECC e à inoculação de CA-STECC com colónias provenientes de TBX. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Origem, resultado da identificação por API® 20 E, e respetiva aparência em meio complementar de diferentes tipos de colónias isoladas suspeitas de serem STEC, mas cujo resultado PCR 2 para deteção de genes *stx1* e/ou *stx2* foi negativo.

COR DA COLÓNIA	ORIGEM	IDENTIFICAÇÃO API® 20 E	APARÊNCIA DA COLÓNIA EM MEIO DE CULTURA COMPLEMENTAR
COLÓNIA AZUL 1	Q21 TBX	<i>Escherichia coli</i>	CA-STECC: Colónias Malva
COLÓNIA AZUL 2	Q22 TBX	<i>Escherichia coli</i>	CA-STECC: Inibida
COLÓNIA BRANCA 1	Q21 TBX	<i>Hafnia alvei</i>	CA-STECC: Inibida
COLÓNIA BRANCA 2	Q22 TBX	<i>Hafnia alvei</i>	CA-STECC: Inibida
COLÓNIA BRANCA COM CENTRO AZUL 1	Q22 TBX	<i>Escherichia coli</i>	CA-STECC: Colónias Malva
COLÓNIA BRANCA COM CENTRO AZUL 2	Q22 TBX	<i>Escherichia coli</i>	CA-STECC: Colónias Malva
COLÓNIA MALVA 1	Q21 CA-STECC	<i>Escherichia coli</i>	TBX: Colónias azuis
COLÓNIA MALVA 2	Q21 CA-STECC	<i>Escherichia coli</i>	TBX: Colónias azuis
COLÓNIA MALVA 3	Q22 CA-STECC	<i>Escherichia coli</i>	TBX: Colónias azuis
COLÓNIA MALVA 4	Q22 CA-STECC	<i>Escherichia coli</i>	TBX: Colónias azuis

A Figura 19 e a Figura 20 ilustram o resultado dos testes API® 20 E para cada uma das espécies identificadas.



Figura 19: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a *Escherichia coli* (CM2).



Figura 20: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a *Hafnia alvei* (CB)

Hirvonen *et al.* (2012) também relataram o crescimento de *E. coli* não STEC sob a forma de colônias malvas em CA-STECC, o que evidencia que o meio nem sempre tem a capacidade de distinguir *E. coli* não STEC de STEC [131]. Tal corrobora os resultados aqui obtidos, em que apenas uma em oito colônias testadas, identificadas como *E. coli* e molecularmente comprovadas como não sendo STEC, foi inibida no meio CA-STECC.

3.3.3.2. Identificação de colônias não suspeitas de STEC

Posteriormente, procedeu-se à identificação, também com recurso a API® 20 E, de colônias roxas (CR) e cinzentas (CC) que, não sendo suspeitas de STEC, cresceram em CA-STECC. Esta identificação foi realizada com o objetivo de determinar que tipo de microrganismos poderiam originar colônias com esta aparência, uma vez que, para além de criarem um ambiente competitivo neste meio de cultura, não está previsto o seu crescimento.

Foram ainda inoculadas placas de TBX com cada uma das colônias identificadas em API® 20E, para se perceber a aparência que estas colônias teriam neste meio. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23: Origem, resultado da identificação por API® 20 E e respectiva aparência em TBX de diferentes tipos de colônias roxas e colônias cinzentas provenientes de CA-STEC.

COR DA COLÔNIA	ORIGEM	IDENTIFICAÇÃO API® 20 E	APARÊNCIA EM TBX
COLÔNIA CINZENTA 1	Q21 CA-STEC	<i>Proteus vulgaris</i>	Colônia Branca
COLÔNIA CINZENTA 2	Q22 CA-STEC	<i>Morganella morganii</i>	Colônia Branca
COLÔNIA ROXA	Q22 CA-STEC	<i>Citrobacter freundii</i>	Colônia Branca

As figuras abaixo (Figura 21, Figura 22 e Figura 23) apresentam os resultados obtidos após incubação das galerias bioquímicas API® 20 E para cada uma das colônias acima mencionadas.



Figura 21: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a *Proteus vulgaris* (CC1).



Figura 22: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a *Morganella morganii* (CC2).

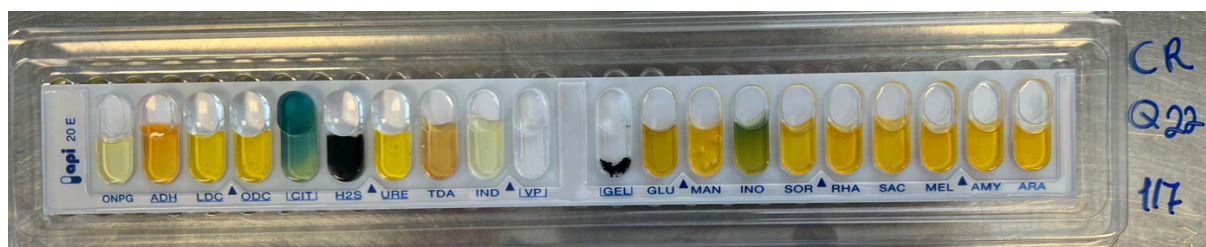


Figura 23: Exemplo de resultado de teste API® 20 E correspondente a *Citrobacter freundii* (Identificação CR).

Hirvonen *et al.* (2012) também relataram o crescimento de *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp., sob a forma de colónias azuis e sem cor em CA-STECC, respetivamente [131]. Apesar de a coloração obtida para as colónias de *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp. no presente trabalho não corresponder às do estudo mencionado, os resultados de Hirvonen *et al.* (2012) estão de acordo com os aqui obtidos, no que diz respeito à possibilidade de existir crescimento destas espécies em CA-STECC.

3.4. Constrangimentos à implementação do método de Detecção de STECC ISO/DIS 13136-1:2025

Ao ter sido adotado o método de deteção e isolamento de STECC descrito na Norma ISO/DIS 13136-1:2025 com o objetivo de averiguar a prevalência dos genes *stx1* e/ ou *stx2* em queijos de leite cru produzidos a nível nacional, e por ter sido efetuado um estudo prévio de verificação do modo como o mesmo era desempenhado no laboratório, foram assinalados vários constrangimentos que são apresentados nos pontos seguintes.

3.4.1. Determinação da eLOD₅₀

O facto do valor da eLOD₅₀ obtido ter sido significativamente baixo (0,65 ufc/toma da amostra), pressupunha que deveria ter sido possível conseguir isolar STECC a partir dos meios de cultura utilizados, mesmo se o microrganismo estiver presente em níveis de concentração muito baixos. No entanto, é preciso ter em consideração que a amostra de queijo utilizada nesta determinação foi contaminada artificialmente com uma estirpe STECC de referência sendo que, antes disso, evidenciou contagens de *E. coli* <10 ufc/g e não apresentava outras bactérias que poderão estar presentes no queijo de leite cru e que também crescem em TBX. Assim, para a determinação do eLOD₅₀, a microbiota Gram negativa competitiva era reduzida e a possibilidade de se proceder ao isolamento de uma colónia que revelasse ser um falso positivo era diminuta, o que não se verificou no decorrer da análise das 22 amostras, uma vez que todas as amostras em que os genes *stx1* e/ou *stx2* foram detetados estavam amplamente contaminadas com *E. coli* não STECC.

3.4.2. Competição da microbiota presente no queijo na etapa de enriquecimento

A presença de microrganismos contaminantes tais como, *E. coli* não STECC e outros microrganismos que fazem parte da microbiota natural do queijo de leite cru, também implica a menor disponibilidade de nutrientes para a multiplicação de STECC que possa existir no caldo nutritivo.

Alimentos como o queijo de leite cru, apresentam, frequentemente, *E. coli* não STECC. Durante a incubação do caldo de enriquecimento, estas bactérias multiplicam-se e, conseqüentemente, competem com eventuais STECC que possam estar presentes na amostra, mas em quantidades muito inferiores. Esta competição poderá resultar numa multiplicação de

STEC menos eficaz do que aquela que seria de esperar, devido à competição por nutrientes. Assim, a etapa de enriquecimento acaba por revelar-se uma etapa limitante do método.

Após inoculação e incubação das placas de meio de cultura (TBX e CA-STEC), frequentemente, não se conseguem obter colónias isoladas, principalmente no meio TBX. Isto acontece, pois, contrariamente ao CA-STEC, o TBX não promove a inibição de qualquer tipo de *E. coli*, o que resulta, muitas vezes, em placas onde apenas é possível observar como que uma mancha (Figura 24), e não colónias isoladas.

A diluição do caldo de enriquecimento, para se obterem placas com um menor número de colónias, não se mostra uma solução viável para esta limitação. Como o nível de contaminação de STEC é muito inferior ao da restante microbiota, incluindo outras estirpes de *E. coli*, quanto maior for a diluição do caldo de enriquecimento, menor será a probabilidade de se conseguir isolar STEC.

Desta forma, apesar de ser possível obter colónias isoladas nas diluições mais elevadas, a probabilidade de estas se virem a confirmar como STEC é muito baixa.

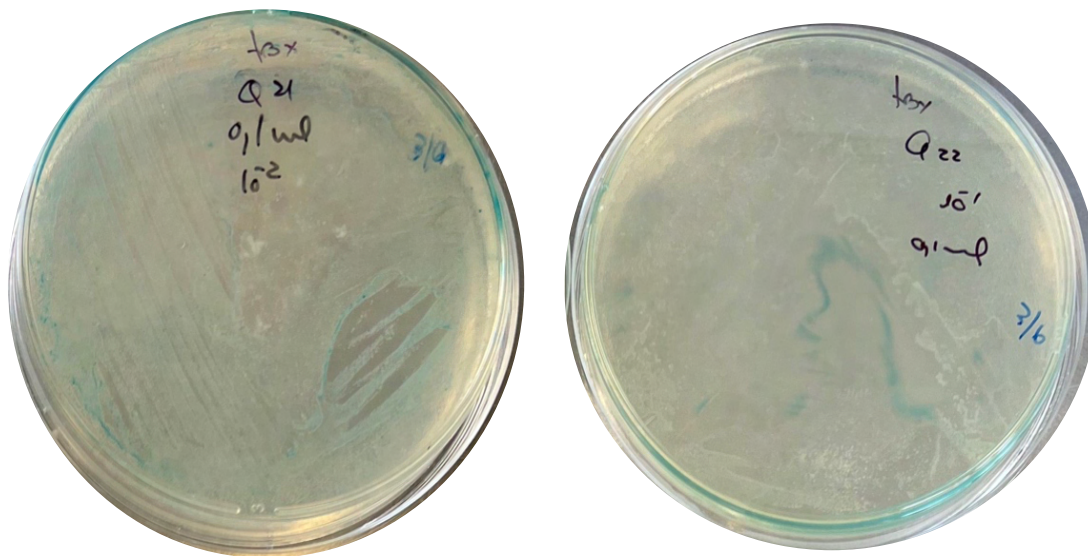


Figura 24: Exemplo de placas TBX com elevada carga microbiana, correspondentes à inoculação de 0,1mL da diluição 10^{-2} da amostra Q21 (esquerda) e da diluição 10^{-1} da amostra Q22 (direita).

3.4.3. Presença de *E. coli* não STEC nas amostras e seletividade dos meios utilizados

Ficou assim demonstrado que, em queijos feitos com leite cru, a presença de *E. coli* não STEC nas amostras constitui uma dificuldade na etapa de isolamento e, conseqüentemente, na confirmação da presença de STEC.

Com base nos resultados obtidos na PCR2 e nas colónias isoladas suspeitas, nomeadamente aquelas em que se procedeu à identificação das espécies e verificação da aparência das colónias em ambos os meios usados, foi possível constatar que nenhum dos meios utilizados é suficientemente seletivo para conseguir distinguir *E. coli* não STEC de STEC.

No caso do meio CA-STECC, apesar de se tratar de um meio cromogénico dito altamente seletivo, aquando da presença de *E. coli* não STEC na amostra analisada, este meio não permite distinguir entre esta *E. coli* e STEC, originando-se colónias de aparência suspeita, mas em que não se confirma, por PCR, a presença dos genes *stx1* e/ou *stx2*.

Já no caso do meio TBX, por ser um meio seletivo para a generalidade de *E. coli* e não especificamente para *E. coli* produtora de toxina Shiga, todas as colónias que nele surgem devem ser tratadas como colónias suspeitas. A partir deste meio, foram identificadas espécies de *E. coli* não STEC, que originam colónias azuis em TBX, bem como *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* e *Citrobacter freundii*, que originam colónias brancas.

3.4.4. Expressão dos resultados: eliminação da possibilidade de deteção presuntiva de STEC

Deve ainda destacar-se que a norma ISO/DIS 13136-1:2025, que virá a substituir a atual norma em vigor (ISO/TS 13136:2012), elimina a possibilidade de o resultado da análise ser dado de forma presuntiva, alteração esta que poderá vir a ter implicações negativas importantes no que diz respeito à deteção de STEC em alimentos. A norma atualmente em vigor permite que, mesmo que não seja conseguido o isolamento e confirmação definitiva de STEC, seja reportado um resultado de deteção presuntiva caso os genes *stx1* e/ou *stx2* tenham sido detetados no caldo de enriquecimento.

Enquanto esta abordagem reconhece as dificuldades inerentes ao isolamento de STEC em matrizes alimentares complexas, como queijo feito com leite cru, a nova norma, ao exigir obrigatoriamente o isolamento e confirmação para validar a deteção, elimina esta flexibilidade interpretativa. Embora a abordagem da norma ISO/DIS 13136-1:2025 possa, à primeira vista, parecer mais rigorosa do ponto de vista científico, na prática pode resultar numa estimativa por defeito da presença de STEC em amostras onde, efetivamente, o microrganismo está presente, mas nas quais não é possível o seu isolamento devido às limitações do método.

Considerando os resultados aqui obtidos, esta questão torna-se particularmente relevante, já que de acordo com a norma atualmente em vigor, o resultado atribuído a cinco das 22 amostras (Q8, Q9, Q10, Q21 e Q22) seria “Deteção presuntiva de STEC na toma da amostra de 25 gramas”. Esta expressão dos resultados alerta para a potencial presença de STEC nas amostras e permite a implementação de medidas preventivas. No entanto, segundo a norma ISO/DIS 13136-1:2025, o resultado passaria a ser apresentado como “STEC não detetada”, o que poderá, conseqüentemente, constituir um risco para o consumidor.

Desta forma, como a STEC é um microrganismo com uma dose infecciosa baixa, a apresentação dos resultados desta nova forma poder gerar alguma dúvida a nível da segurança dos alimentos (*Food safety*).

Este é um aspeto que pode gerar alguma controvérsia já que, no contexto da segurança dos alimentos, em que as STEC representam um risco significativo para a saúde pública, uma abordagem mais conservadora, como aquela que permite a norma atualmente em vigor, pode ser mais apropriada, especialmente quando suportada por evidência molecular (deteção por PCR). O nível de complexidade desta questão torna-se maior ao considerar as limitações identificadas no desenvolvimento do presente trabalho, associadas à etapa de isolamento.

3.5. Possíveis estratégias de mitigação para os constrangimentos e as limitações sentidas

De modo a ultrapassar os constrangimentos e as limitações sentidas durante o desenvolvimento deste trabalho, são apresentadas de seguida algumas estratégias cuja aplicação poderá vir a ser muito útil.

3.5.1. Adição de agentes seletivos ao caldo de enriquecimento e/ou de um meio de enriquecimento verdadeiramente seletivo

Este método deveria incluir uma etapa que, ao condicionar o crescimento tanto de *E. coli* não STEC como da restante microbiota, favoreça especificamente o crescimento de STEC no caldo de enriquecimento.

Uma abordagem possível capaz de impedir ou reduzir a microbiota competitiva das STEC e/ou que favorecesse a multiplicação das STEC poderia passar, por exemplo, pela adição de agentes seletivos ao caldo de enriquecimento, ou pela passagem para um meio de enriquecimento seletivo, antes da inoculação em placas. Tal permitiria uma melhor recuperação do microrganismo alvo e, posteriormente, facilitaria a sua deteção, mesmo quando presente em baixas concentrações. Uma menor competição por nutrientes permitiria uma melhor eficiência de multiplicação das STEC.

3.5.2. Inclusão de uma etapa de concentração específica de STEC

Alternativamente, poderia ser considerada a adição de uma etapa de concentração específica de STEC, com recurso a técnicas como IMS realizada antes da etapa de isolamento, cuja eficiência já foi comprovada experimentalmente. De facto, Kanki *et al.* (2014) concluíram que a inoculação em placa, após aplicação desta técnica, é 100 vezes mais sensível para deteção de estirpes STEC, comparativamente à inoculação em placa sem esta etapa de concentração prévia [132].

Sugere-se assim a implementação de técnicas de IMS como uma estratégia eficaz para isolar e concentrar STEC na matriz alimentar após o enriquecimento, reduzindo significativamente a interferência da microbiota competitiva e aumentando a probabilidade de deteção de STEC,

especialmente em amostras com baixas concentrações deste microrganismo e elevadas concentrações de microbiota competitiva.

Todavia, como referido anteriormente, a etapa de IMS é direcionada para um determinado serogrupo, por exemplo, os de importância para a saúde pública, não permitindo a deteção de outras STEC, aumentando assim a possibilidade de obtenção de um resultado falso negativo. Para além disso, estes procedimentos de IMS são demorados, dispendiosos e exigem muito trabalho. No entanto, esta etapa vem indicada como uma possibilidade na norma ISO/DIS 13136. Contudo, o impacto da sua aplicação não será estudado nos ensaios de validação desta norma, pelo que a sua adequabilidade terá de ser verificada por cada laboratório, utilizando os serogrupos a detetar.

3.5.3. Desenvolvimento de meios de cultura com maior seletividade para STEC

Para além da implementação de técnicas que possam permitir a concentração de STEC antes do isolamento, também se torna evidente a necessidade de se desenvolverem meios de cultura com maior seletividade para STEC, ou mesmo melhorar os atualmente existentes.

O possível desenvolvimento de um meio cromogénico que permita a deteção, a partir das matrizes alimentares, de fatores específicos de STEC constituiria um avanço significativo, já que reduziria a possibilidade de falsos positivos.

4. Conclusões finais e perspetivas futuras

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar a prevalência de STEC em queijos feitos com leite cru, em Portugal, através do método referido na ISO/DIS 13136-1:2025, que se propõe a substituir a ISO/TS 13136:2012, atualmente em vigor.

Embora tenha sido possível detetar a presença de genes *stx1* e/ou *stx2* nalgumas das amostras analisadas, a confirmação definitiva deste resultado revelou-se impossível devido à incapacidade de isolar o microrganismo alvo. Desta forma, os resultados obtidos evidenciam diversas limitações do método proposto aqui utilizado.

Uma das grandes limitações identificadas prendeu-se com o facto de os meios utilizados (desde os meios de enriquecimento aos meios de isolamento) não serem efetivamente seletivos para STEC.

Ao nível da etapa de enriquecimento, não existe maneira de favorecer a multiplicação de STEC, relativamente à multiplicação da microbiota competitiva, o que seria muito importante para a recuperação do microrganismo alvo, já que tal facilitaria, posteriormente, a sua deteção, mesmo quando presente em baixas concentrações.

Já ao nível da etapa de isolamento, verificou-se que, enquanto o meio TBX não é um meio seletivo para STEC, e, portanto, qualquer colónia que surja neste meio será suspeita. Já o

meio de cultura CA-STEC, dito seletivo para STEC, contrariamente ao descrito nas instruções do fabricante do meio, permite o crescimento de colónias com aparência típica de STEC, mas que correspondem a outros tipos de *E. coli*. De facto, nalgumas amostras, procedeu-se ao isolamento de diversas colónias em placas de CA-STEC que, apesar de suspeitas para STEC, não se vieram a confirmar como tal.

Adicionalmente, veio a concluir-se que o meio CA-STEC permite o crescimento de outros tipos de enterobactérias, que resultam em colónias com aparência diversa da descrita nas instruções do fabricante. Estas enterobactérias competem com as STEC, ao nível da disponibilidade de nutrientes, e dificultam igualmente a obtenção de colónias STEC isoladas para confirmação. Perante esta situação, decidiu-se identificação destas colónias de aparência diversa, através de testes bioquímicos (API[®] 20 E), tendo-se concluído que correspondiam a: *Citrobacter freundii* (colónias roxas) e *Proteus vulgaris* e *Morganella morganii* (colónias cinzentas).

A competição microbiana, combinada com a baixa seletividade dos meios utilizados, resultou em grandes dificuldades na etapa de isolamento, quer por se obterem placas com elevada densidade microbiana (principalmente em meio TBX), a partir das quais foi impossível isolar qualquer colónia, quer por se proceder ao isolamento de colónias fortemente suspeitas (sobretudo em CA-STEC), mas que se revelaram falsas positivas.

Perante os resultados obtidos, pode então concluir-se que a implementação de etapas adicionais, que possam condicionar o crescimento da microbiota competitiva, favorecendo especificamente STEC, bem como o desenvolvimento de novos meios de cultura, com maior seletividade, ou a melhoria dos meios seletivos já existentes, são essenciais para a otimização deste método e, conseqüentemente, desta norma, atualmente em discussão.

De facto, embora a norma ISO/DIS 13136-1:2025 apresente uma abordagem mais rigorosa do ponto de vista científico, em comparação com a norma ISO/TS 13136:2012, atualmente em vigor, na prática pode levar a resultados por defeito, subestimando a presença de STEC em amostras alimentares devido à incapacidade de isolar este microrganismo.

Os resultados deste estudo mostram que as dificuldades de isolamento de STEC em queijos de leite cru são reais, não resultando de erros técnico-experimentais, mas sim de limitações metodológicas inerentes aos meios e procedimentos utilizados. Neste contexto, a deteção presuntiva fornece uma ferramenta valiosa para alertar sobre a potencial presença de STEC, permitindo a implementação de medidas preventivas apropriadas, mesmo quando o isolamento da estirpe não é possível.

A natureza exploratória deste trabalho, seguindo um protocolo de uma norma em fase de discussão, proporcionou aprendizagens valiosas sobre as limitações práticas do método proposto e destacou a importância da aplicação de melhorias metodológicas, antes da implementação desta norma ISO, como método de referência.

Recomenda-se, assim, a avaliação e verificação da eficácia dos métodos de concentração específicos mencionados (IMS) e a utilização e desenvolvimento de meios de enriquecimento e isolamento verdadeiramente seletivos, aspetos essenciais para a implementação deste método.

Concluindo, neste trabalho, cujo principal objetivo foi verificar a prevalência dos genes *stx1* e/ou *stx2* em 22 amostras de queijo feito com leite cru, os genes foram detetados em cinco amostras, embora não tenha sido possível confirmar a presença de STEC em nenhuma das amostras. De notar que em apenas um dos queijos analisados havia uma forte probabilidade de se conseguirem isolar STEC viáveis, quer por as curvas de PCR serem típicas, quer pelos valores de C_q fazerem prever que a STEC estaria presente em níveis de concentração elevados. Ainda assim, o método utilizado descrito na norma ISO/DIS 13136-1:2025, que se encontra em discussão, não permitiu confirmar a presença de STEC.

Os resultados obtidos são de grande relevância, uma vez que permitiram sentir as limitações deste método, quando aplicado a amostras de queijo feito com leite cru, etapa a etapa, desde a fase de implementação no laboratório até sua à execução e apresentação dos resultados finais.

5. Referências bibliográficas

- [1] J. Barbosa, «Queijos: um pouco de história», Food Safety Brazil. Acedido: 4 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/queijos-um-pouco-de-historia/>
- [2] Suck Milk, «O processo de pasteurização», Suck Milk. Acedido: 4 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://suckmilk.com.br/o-processo-de-pasteurizacao/>
- [3] Associação Portuguesa de Nutrição, *Queijos, dos frescos aos curados*, vol. E-book nº48. Porto: Associação Portuguesa de Nutrição, 2018.
- [4] Mimosa, «Origem e processamento - Queijo», Mimosa – Cuidar é parte de nós. Acedido: 29 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://mimosa.pt/origem-e-producao/queijo/>
- [5] RTP, «Faça Chuva Faça Sol: Agricultura e Floresta», *Faça Chuva Faça Sol*, 9 de novembro de 2024. Acedido: 6 de setembro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.rtp.pt/play/p12689/e807507/faca-chuva-faca-sol>
- [6] O. O'Sullivan e P. D. Cotter, «Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses», em *Cheese (Fourth Edition)*, P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, e D. W. Everett, Eds., San Diego: Academic Press, 2017, pp. 301–316. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00012-0.
- [7] *Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004*, vol. 226. 2004. Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/corrigendum/2004-06-25/oj/por>
- [8] V. L. Almli, T. Næs, G. Enderli, C. Sulmont-Rossé, S. Issanchou, e M. Hersleth, «Consumers' acceptance of innovations in traditional cheese. A comparative study in France and Norway», *Appetite*, vol. 57, n.º 1, pp. 110–120, ago. 2011, doi: 10.1016/j.appet.2011.04.009.
- [9] «Europa consome nove milhões de toneladas de queijo por ano – Agricultura Internacional», *Voz do Campo*. Acedido: 7 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://vozdocampo.eu/2021/06/22/europa-consome-nove-milhoes-de-toneladas-de-queijo-por-ano/>
- [10] European Commission, «Milk Market Observatory». Acedido: 29 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: https://agriculture.ec.europa.eu/data-and-analysis/markets/overviews/market-observatories/milk_en
- [11] «Queijo da Europa Tamanho do Mercado | Mordor Intelligence», Mordor Intelligence. Acedido: 7 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/europe-cheese-market>
- [12] «Açores produzem 32 mil toneladas de queijo por ano», *Vida Rural*. Acedido: 7 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.vidarural.pt/producao/acoes-producao-queijo/>
- [13] Lusa, «Queijo Serra da Estrela a Património da Humanidade: candidatura até final do Verão», PÚBLICO. Acedido: 7 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.publico.pt/2025/01/22/fugas/noticia/queijo-serra-estrela-patrimonio-humanidade-candidatura-ate-final-verao-2119796>
- [14] Lusa, «Melhor queijo do mundo esgotou de imediato na Queijaria Quinta do Pomar no Fundão», RTP Notícias. Acedido: 8 de maio de 2025. [Online]. Disponível em:

- https://www.rtp.pt/noticias/economia/melhor-queijo-do-mundo-esgotou-de-imediato-na-queijaria-quinta-do-pomar-no-fundao_n1615924
- [15] F. Teixeira, «Queijo mineiro movimentou a economia e conquista paladares», FAEMG SENAR. Acedido: 7 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.faemg.org.br/noticias/queijo-mineiro-movimentou-a-economia-e-conquista-paladares>
- [16] M. C. Coelho, F. X. Malcata, e C. C. G. Silva, «Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions», *Foods*, vol. 11, n.º 15, p. 2276, jul. 2022, doi: 10.3390/foods11152276.
- [17] C. A. Batt e M.-L. Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2ª., vol. 1. Academic Press, 2014.
- [18] A. Salamandane *et al.*, «Metagenomic analysis of the bacterial microbiome, resistome and virulome distinguishes Portuguese Serra da Estrela PDO cheeses from similar non-PDO cheeses: An exploratory approach», *Food Research International*, vol. 189, p. 114556, ago. 2024, doi: 10.1016/j.foodres.2024.114556.
- [19] M. B. Calahorrano-Moreno, J. J. Ordoñez-Bailon, R. J. Baquerizo-Crespo, A. A. Dueñas-Rivadeneira, M. C. B. S. M. Montenegro, e J. M. Rodríguez-Díaz, «Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants», *F1000Res*, vol. 11, p. 91, jan. 2022, doi: 10.12688/f1000research.108779.1.
- [20] C. L. Baylis, «Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by *Verocytotoxin-producing Escherichia coli*», *International Journal of Dairy Technology*, vol. 62, n.º 3, pp. 293–307, 2009, doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00504.x.
- [21] Y. Yoon, S. Lee, e K.-H. Choi, «Microbial benefits and risks of raw milk cheese», *Food Control*, vol. 63, pp. 201–215, mai. 2016, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.11.013.
- [22] C. Farrokh *et al.*, «Review of *Shiga-toxin-producing Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production», *Int J Food Microbiol*, vol. 162, n.º 2, pp. 190–212, mar. 2013, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008.
- [23] H. Momtaz, F. Safarpour Dehkordi, T. Taktaz, A. Rezvani, e S. Yarali, «*Shiga Toxin-Producing Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitic Milk: Serogroups, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance Properties», *ScientificWorldJournal*, vol. 2012, p. 618709, nov. 2012, doi: 10.1100/2012/618709.
- [24] Gazeta Rural, «Conheça a diferença entre Mastite Clínica e Mastite Subclínica e como ela pode evitar perdas na produção de leite», Agroportal. Acedido: 28 de março de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.agroportal.pt/conheca-a-diferenca-entre-mastite-clinica-e-mastite-subclinica-e-como-ela-pode-evitar-perdas-na-producao-de-leite/>
- [25] «Mastite Bovina: O que é, Sintomas e Tratamento - Chemitec®». Acedido: 28 de março de 2025. [Online]. Disponível em: <https://chemitec.com.br/patologias/mastite-bovina/>
- [26] V. M. de O. *et al.*, *Como identificar a vaca com mastite em sua propriedade: cartilhas adaptadas ao letramento do produtor*. Embrapa, 2015.

- [27] FAO, «Q&A on food safety | Food safety and quality | Food and Agriculture Organization of the United Nations». Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.fao.org/food-safety/background/qa-on-food-safety/en/>
- [28] S. P. Dias, «Controlo microbiológico e inovação na indústria alimentar», Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2020.
- [29] DGAV, «Codex Alimentarius». Acedido: 29 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/codex-alimentarius/>
- [30] União Europeia, «Segurança alimentar - EUR-Lex». Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/summary/chapter/food_safety.html?locale=pt&root_default=SUM_1_CODED%3D30
- [31] Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002., vol. 031. 2002. Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj/por>
- [32] C. Oliveira, «Segurança Alimentar: Conceito e Legislação», MetSep. Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://met-sep.com/2024/06/07/seguranca-alimentar-conceito-e-legislacao/>
- [33] Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004., vol. 139. 2004. Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj/por>
- [34] «Perigos Biológicos», Quali.pt. Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.quali.pt/perigos-alimentares/589-perigos-biologicos>
- [35] Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão Europeia e do Conselho, de 15 de Novembro de 2005, vol. 338. 2005. Acedido: 22 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/por>
- [36] «Notícias, destaques e novidades - APCER». Acedido: 23 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://apcergroup.com/pt/noticias-e-destaques/3186/a-importancia-da-seguranca-dos-alimentos>
- [37] Harvard Museum of Natural History, «*E. coli*». Acedido: 12 de fevereiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://whatsinaname.hmn.harvard.edu/ecoli>
- [38] PubChem, «*Escherichia coli*». Acedido: 12 de fevereiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Escherichia-coli>
- [39] ASAE, «*Escherichia coli*». Acedido: 29 de outubro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>
- [40] S. C. A. Guerreiro, «Análise molecular e fenotípica da virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de alimentos prontos-a-comer (RTE)».
- [41] T. A. T. Gomes *et al.*, «Diarrheagenic *Escherichia coli*», *Braz. J. Microbiol.*, vol. 47, pp. 3–30, dez. 2016, doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015.

- [42] K. J. Jesser e K. Levy, «Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes», *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 33, n.º 5, pp. 372–380, out. 2020, doi: 10.1097/QCO.0000000000000665.
- [43] J.-P. Facon e I. Desforges, «STEC: uma preocupante *Escherichia coli* zoonótica produtora de toxinas , desde a produção até à mesa | bioMérieux industrial microbiology». Acedido: 29 de outubro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://www.biomerieux-industry.com/pt/seguranca-qualidade-de-alimentos/espaco-de-conhecimento/biblioteca-de-micro-organismos-em-4>
- [44] K. Koutsoumanis *et al.*, «Pathogenicity assessment of *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC», *EFSA Journal*, vol. 18, n.º 1, p. e05967, 2020, doi: 10.2903/j.efsa.2020.5967.
- [45] M.-S. Lee, R. P. Cherla, e V. L. Tesh, «Shiga Toxins: Intracellular Trafficking to the ER Leading to Activation of Host Cell Stress Responses», *Toxins (Basel)*, vol. 2, n.º 6, pp. 1515–1535, jun. 2010, doi: 10.3390/toxins2061515.
- [46] J. P. Nataro e J. B. Kaper, «Diarrheagenic *Escherichia coli*», vol. 11, n.º 1, pp. 144–201, jan. 1998, doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>.
- [47] L. A. Hughes *et al.*, «Risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* virulence genes eae, stx1 and stx2 in wild bird populations», *Epidemiology & Infection*, vol. 137, n.º 11, pp. 1574–1582, nov. 2009, doi: 10.1017/S0950268809002507.
- [48] FAO e WHO, «*Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring», Roma, Meeting report, 2022.
- [49] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of the food chain — Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) Part 2: Horizontal method for the characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolates*, ISO/DIS 13136-2:2025.
- [50] A. Gill *et al.*, «Characterization of Atypical Shiga Toxin Gene Sequences and Description of Stx2j, a New Subtype», *J Clin Microbiol*, vol. 60, n.º 3, pp. e02229-21, mar. 2022, doi: 10.1128/jcm.02229-21.
- [51] X. Wang *et al.*, «A Comprehensive Review on Shiga Toxin Subtypes and Their Niche-Related Distribution Characteristics in *Shiga-Toxin-Producing E. coli* and Other Bacterial Hosts», *Microorganisms*, vol. 12, n.º 4, p. 687, mar. 2024, doi: 10.3390/microorganisms12040687.
- [52] D. W. Lacher, J. Gangiredla, I. Patel, C. A. Elkins, e P. C. H. Feng, «Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli* Isolated from Foods», *Journal of Food Protection*, vol. 79, n.º 10, pp. 1656–1662, out. 2016, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-176.
- [53] ECDC, «*Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC)». Acedido: 29 de outubro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/shiga-toxin-producing-escherichia-coli-stec>
- [54] A. Caprioli, G. Scavia, e S. Morabito, «Public Health Microbiology of *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*», *Microbiol Spectr*, vol. 2, n.º 6, dez. 2014, doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0014-2013.

- [55] CDC, «Risk and *E. coli* Infection», *E. coli* Infection (*Escherichia coli*).
Acedido: 14 de março de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/risk-factors/index.html>
- [56] J. Fujii *et al.*, «Risk of haemolytic uraemic syndrome caused by *shiga-toxin-producing Escherichia coli* infection in adult women in Japan», *Epidemiology & Infection*, vol. 144, n.º 5, pp. 952–961, abr. 2016, doi: 10.1017/S0950268815002289.
- [57] Angela Aparecida Lemos Furtado, «Tecnologia dos alimentos: Tratamento Térmico», Portal Embrapa. Acedido: 6 de setembro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/tratamento-termico>
- [58] «RASFF - European Commission». Acedido: 3 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: https://food.ec.europa.eu/food-safety/rasff_en
- [59] «RASFF Window - Results». Acedido: 2 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/>
- [60] ECDC, «STEC infection Annual Epidemiological Report 2022», epidemiological, 2022.
- [61] «The European Union One Health 2023 Zoonoses report». Acedido: 12 de fevereiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/The-European-Union-One-Health-2023-Zoonoses-report.PDF>
- [62] CDC, «*E. coli* Outbreak Linked to Organic Walnuts», *E. coli* Infection (*Escherichia coli*). Acedido: 16 de fevereiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks/organic-walnuts-04-24.html>
- [63] CDC, «*E. coli* Outbreak Linked to Onions Served at McDonald's», *E. coli* Infection (*Escherichia coli*). Acedido: 16 de fevereiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks/e-coli-O157.html>
- [64] CDC, «*E. coli* Outbreak Linked to Organic Carrots», *E. coli* Infection (*Escherichia coli*). Acedido: 16 de fevereiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks/e-coli-o121.html>
- [65] CDC, «*E. coli* Outbreak Linked to Raw Cheddar Cheese», *E. coli* Infection (*Escherichia coli*). Acedido: 29 de outubro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks/raw-milk-cheese-2-24.html>
- [66] J. T. McCollum *et al.*, «Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with In-Store Sampling of an Aged Raw-Milk Gouda Cheese, 2010†», *Journal of Food Protection*, vol. 75, n.º 10, pp. 1759–1765, out. 2012, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-136.
- [67] A. Currie *et al.*, «Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Aged Raw Milk Gouda Cheese, Canada, 2013», *Journal of Food Protection*, vol. 81, n.º 2, pp. 325–331, fev. 2018, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-283.
- [68] E. Boyd *et al.*, «*Escherichia coli* O121 outbreak associated with raw milk Gouda-like cheese in British Columbia, Canada, 2018», *Can Commun Dis Rep*, vol. 47, n.º 2, pp. 11–16, jan. 2021, doi: 10.14745/ccdr.v47i01a03.

- [69] O. I. Quinn *et al.*, «An outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serotype O145:H28 Associated with Domestic Travel and Consumption of Unpasteurized Cheese, UK, 2023», *Journal of Food Protection*, vol. 88, n.º 4, p. 100470, mar. 2025, doi: 10.1016/j.jfp.2025.100470.
- [70] «One person dies :E. coli Outbreak in UK Linked to Cheese», Global Food Consumers' Forum.
- [71] M. Aladhah, «A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens», *Microorganisms*, vol. 11, n.º 5, Art. n.º 5, mai. 2023, doi: 10.3390/microorganisms11051111.
- [72] A. Saravanan *et al.*, «Methods of detection of food-borne pathogens: a review», *Environ Chem Lett*, vol. 19, n.º 1, pp. 189–207, fev. 2021, doi: 10.1007/s10311-020-01072-z.
- [73] AGQ Labs, «Análise Microbiológica: Controlo Microbiológico Dos Alimentos», AGQ Labs Portugal. Acedido: 29 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://agqlabs.pt/microbiologia/>
- [74] Andreia Filipa Rondão Paulos, «Implementação e Validação do Método Horizontal de Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em carnes», Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014. Acedido: 16 de junho de 2025. [Online]. Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/25109/1/Paulos_2014.pdf
- [75] M. E. Allen, «MacConkey Agar Plates Protocols». 30 de setembro de 2005. [Online]. Disponível em: <https://asm.org/asm/media/protocol-images/macconkey-agar-plates-protocols.pdf>
- [76] A. Lal e N. Cheeptham, «Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol». janeiro de 2006. Acedido: 16 de junho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://asistdl.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aris.1440400118>
- [77] S. Avrameas, «Qualitative and Quantitative Immunoenzymatic Techniques», em *Cell Growth*, C. Nicolini, Ed., Boston, MA: Springer New York, 1982, pp. 61–67. doi: 10.1007/978-1-4684-4046-1_4.
- [78] A. de Varennes, «A técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)», *Anais do Instituto Superior de Agronomia*, Vol. 40, pp. 97-109, 1982, Acedido: 24 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://repositorio.ulisboa.pt/handle/10400.5/17169?mode=simple>
- [79] Dr.K.Pramila, Dr.M.Divya, Dr.Poonguzhali Gopinath, e Dr.K.Menaka Shanthi, «Analytical Sensitivity of TSH Assays by Elisa and Elfa», Acedido: 24 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.academia.edu/106834119/Analytical_Sensitivity_of_TSH_Assays_by_Elisa_and_Elfa
- [80] N. V. Hegde *et al.*, «Detection of the top six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O groups by ELISA», *Foodborne Pathog Dis*, vol. 9, n.º 11, pp. 1044–1048, nov. 2012, doi: 10.1089/fpd.2012.1231.
- [81] A. E. Cohen e K. F. Kerdahi, «Evaluation of a rapid and automated enzyme-linked fluorescent immunoassay for detecting *Escherichia coli* serogroup O157 in cheese», *J AOAC Int*, vol. 79, n.º 4, pp. 858–860, 1996.

- [82] N. Khehra, I. S. Padda, e C. J. Swift, «Polymerase Chain Reaction (PCR)», em *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Acedido: 28 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- [83] M. R. Green e J. Sambrook, «Polymerase Chain Reaction», *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2019, n.º 6, p. pdb.top095109, jan. 2019, doi: 10.1101/pdb.top095109.
- [84] «Polymerase chain reaction (PCR) (article)», Khan Academy. Acedido: 29 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- [85] «Eletroforese em gel (artigo) | Biotecnologia», Khan Academy. Acedido: 29 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
- [86] A. Salamandane, S. Alves, L. Chambel, M. Malfeito-Ferreira, e L. Brito, «Characterization of *Escherichia coli* from Water and Food Sold on the Streets of Maputo: Molecular Typing, Virulence Genes, and Antibiotic Resistance», *Applied Microbiology*, vol. 2, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2022, doi: 10.3390/aplmicrobiol2010008.
- [87] «What is Real-Time PCR (qPCR)? | Bio-Rad». Acedido: 29 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
- [88] I. M. Artika, Y. P. Dewi, I. M. Nainggolan, J. E. Siregar, e U. Antonjaya, «Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis», *Genes (Basel)*, vol. 13, n.º 12, p. 2387, dez. 2022, doi: 10.3390/genes13122387.
- [89] Oncolines®, «Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)», Oncolines B.V. Acedido: 9 de outubro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.oncolines.com/mechanistic-cell-biology/quantitative-polymerase-chain-reaction-qpcr/>
- [90] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms — General requirements and definitions*, ISO 22174:2024, agosto de 2024.
- [91] E. Moldovan e V. Moldovan, «Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques», *Acta Marisiensis - Seria Medica*, vol. 66, n.º 3, pp. 79–82, set. 2020, doi: 10.2478/amma-2020-0025.
- [92] «Multiplex Polymerase Chain Reaction - an overview | ScienceDirect Topics». Acedido: 29 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/multiplex-polymerase-chain-reaction>
- [93] T. Harada, A. Iguchi, S. Iyoda, K. Seto, M. Taguchi, e Y. Kumeda, «Multiplex Real-Time PCR Assays for Screening of Shiga Toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-Specific Genes in Beef and Sprout Enrichment Cultures», *Journal of Food Protection*, vol. 78, n.º 10, pp. 1800–1811, out. 2015, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-050.
- [94] G. Wang, C. G. Clark, e F. G. Rodgers, «Detection in *Escherichia coli* of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the

- Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR», *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, n.º 10, pp. 3613–3619, out. 2002, doi: 10.1128/jcm.40.10.3613-3619.2002.
- [95] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of the food chain — Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC). Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC)*, ISO/DIS 13136-1:2025.
- [96] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157*, ISO 16654:2001, maio de 2001.
- [97] S. Delannoy, M.-L. Tran, e P. Fach, «Insights into the assessment of highly pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and raw milk cheeses by High Throughput Real-time PCR», *International Journal of Food Microbiology*, vol. 366, p. 109564, abr. 2022, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109564.
- [98] S. D. Miszczycha, S. Ganet, L. Duniere, C. Rozand, E. Loukiadis, e D. Thevenot-sergentet, «Novel Real-Time PCR Method To Detect *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Milk Cheese and Raw Ground Meat», *Journal of Food Protection*, vol. 75, n.º 8, pp. 1373–1381, ago. 2012, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-498.
- [99] «Introduction to Digital PCR | Bio-Rad». Acedido: 30 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/life-science/learning-center/introduction-to-digital-pcr>
- [100] X. Liu *et al.*, «Single-Cell-Based Digital PCR Detection and Association of *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli* Serogroups and Major Virulence Genes», *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 58, n.º 3, p. 10.1128/jcm.01684-19, fev. 2020, doi: 10.1128/jcm.01684-19.
- [101] «dd-Check STEC Solution». Acedido: 29 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/dd-check-stec-solution?ID=PU4Q1CSCUMB7>
- [102] «FTIR Analysis | RTI Laboratories». Acedido: 30 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>
- [103] M. Wenning e S. Scherer, «Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method», *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, n.º 16, pp. 7111–7120, ago. 2013, doi: 10.1007/s00253-013-5087-3.
- [104] C. Santos, J. A. Ventura, L. J. P. Pereira, e N. Lima, «A utilização da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de fitopatógenos e no diagnóstico de doenças de plantas», 2012, Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/20923>
- [105] J. Rychert, «Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms», *Journal of Infectiology and Epidemiology*, vol. 2, n.º 4, fev. 2019, Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.infectiologyjournal.com/articles/benefits-and-limitations-of-malditof-mass-spectrometry-for-the-identification-of-microorganisms.html>
- [106] C. Santos e N. Lima, *MALDI-TOF MS: uma década de experiência na aplicação em microbiologia, sempre olhando o futuro*. 2014. Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/34978>

- [107] «Whole genome sequencing as a tool to strengthen foodborne disease surveillance and response: module 1: introductory module». Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021228>
- [108] «Whole genome sequencing in foodborne outbreaks | EFSA». Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/whole-genome-sequencing-foodborne-outbreaks>
- [109] H. F. Program, «Whole Genome Sequencing (WGS) Program», FDA. Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/microbiology-research-food/whole-genome-sequencing-wgs-program>
- [110] «Whole genome sequencing — Knowledge Hub». Acedido: 2 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/whole-genome-sequencing/>
- [111] E. Gomes *et al.*, «Advances in whole genome sequencing for foodborne pathogens: implications for clinical infectious disease surveillance and public health», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 15, p. 1593219, abr. 2025, doi: 10.3389/fcimb.2025.1593219.
- [112] Alejandro Amézquita *et al.*, «The Benefits and Barriers of Whole-Genome Sequencing for Pathogen Source Tracking: A Food Industry Perspective», *Food Safety Magazine*, jun. 2020, Acedido: 30 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.food-safety.com/articles/6696-the-benefits-and-barriers-of-whole-genome-sequencing-for-pathogen-source-tracking-a-food-industry-perspective>
- [113] E. Ferguson, «The strengths and weaknesses of whole-genome sequencing», *Inspire Student Health Sciences Research Journal*, 2020.
- [114] Quimigen, «Peptone water - Non-selective liquid media for microbiology». Acedido: 5 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.quimigen.pt/buy/cat-peptone-water-non-selective-liquid-5508.html>
- [115] BOKAR, «Tryptone-Salt Broth - TECHNICAL DATA SHEET». Acedido: 5 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/product/tryptone-salt-broth/?documentation=2221&_wpnonce=062202c86e
- [116] CHROMagar, «CHROMagar™ STEC - Instructions For Use». Acedido: 23 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.chromagar.com/wp-content/uploads/2021/11/NT-EXT-058-V10.1.pdf>
- [117] BOKAR, «Tryptone-Bile-X-Glucuronate (TBX) Agar», TECHNICAL DATA SHEET. Acedido: 23 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/product/tryptone-bile-x-glucuronate-tbx-agar/?documentation=2206&_wpnonce=141989bd39
- [118] BOKAR, «Nutrient Agar (2 %) - TECHNICAL DATA SHEET». Acedido: 23 de abril de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/product/nutrient-agar-2/?documentation=1762&_wpnonce=141989bd39

- [119] BLOKAR, «Trypto-Casein Soy Agar (TSA) - TECHNICAL DATA SHEET». Acedido: 5 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/product/trypto-casein-soy-agar-tsa/?documentation=2176&_wpnonce=141989bd39
- [120] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*, ISO 11133:2014.
- [121] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory*, ISO 16140-3:2021.
- [122] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of the food chain — Method validation Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*, ISO 16140-2:2016.
- [123] US Food and Drug Administration, «Proposed Use of a 50 % Limit of Detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of Presence - Absence Microbial Detection Methods». Acedido: 14 de maio de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/73471/download>
- [124] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*, ISO 16649-2:2001, abril de 2001.
- [125] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, «Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos: Valores-guia». 2019. Acedido: 30 de julho de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.insa.min-saude.pt/interpretacao-de-resultados-de-ensaios-microbiologicos-valores-guia-insa-2019/>
- [126] UK Health Security Agency, «Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market». setembro de 2024.
- [127] N. Zelyas, A. Poon, L. Patterson-Fortin, R. P. Johnson, W. Lee, e L. Chui, «Assessment of commercial chromogenic solid media for the detection of non-O157 *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC)», *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 85, n.º 3, pp. 302–308, jul. 2016, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.013.
- [128] G. Macori, S. C. McCarthy, C. M. Burgess, S. Fanning, e G. Duffy, «Investigation of the Causes of Shigatoxigenic Escherichia coli PCR Positive and Culture Negative Samples», *Microorganisms*, vol. 8, n.º 4, p. 587, abr. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8040587.
- [129] J. Liu *et al.*, «Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 under cryopreservation», *Res Microbiol*, vol. 168, n.º 3, pp. 188–193, abr. 2017, doi: 10.1016/j.resmic.2016.11.002.
- [130] ISO (International Organization for Standardization), *Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations*, ISO 7218:2024.

- [131] J. J. Hirvonen, A. Siitonen, e S.-S. Kaukoranta, «Usability and performance of CHROMagar STEC medium in detection of *Shiga toxin-producing Escherichia coli* strains», *J Clin Microbiol*, vol. 50, n.º 11, pp. 3586–3590, nov. 2012, doi: 10.1128/JCM.01754-12.
- [132] M. Kanki, K. Seto, e Y. Kumeda, «Simultaneous Immunomagnetic Separation Method for the Detection of *Escherichia coli* O26, O111, and O157 from Food Samples», *Journal of Food Protection*, vol. 77, n.º 1, pp. 15–22, jan. 2014, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-225.

6. Anexos

Anexo I - Tabela C. 1 da norma ISO 16140-3:2021

ISO 16140-3:2021(E)

Table C.1 — MPN table for the calculation of the inoculum level using protocols 1, 2 or 3

Number positive results for inoculum volume (ml)				MPN per ml of dilution D (protocols 1 and 2) or of inoculum (protocol 3)	Rarity category ^a
Protocol 1	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 2	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 3	3 ml inoculum	1 ml inoculum	0,3 ml inoculum		
	3	3	3	∞	1
	3	3	2	4,1	1
	3	3	1	2,4	1
	3	3	0	1,5	1
	3	2	3	2,5	1
	3	2	2	1,8	1
	3	2	1	1,3	1
	3	2	0	0,9	1
	3	1	3	1,5	2
	3	1	2	1,1	1
	3	1	1	0,8	1
	3	1	0	0,6	1
	3	0	3	1,0	3
	3	0	2	0,8	1
	3	0	1	0,6	1
	3	0	0	0,4	1
	2	3	3	1,3	3
	2	3	2	1,1	2
	2	3	1	0,9	1
	2	3	0	0,7	1
	2	2	3	1,0	3
	2	2	2	0,8	1
	2	2	1	0,7	1
	2	2	0	0,5	1
	2	1	3	0,8	3
	2	1	2	0,6	1
	2	1	1	0,5	1
	2	1	0	0,3	1
	2	0	3	0,6	3
	2	0	2	0,5	2
	2	0	1	0,3	1
	2	0	0	0,2	1
	1	3	3	0,8	3
	1	3	2	0,7	3
	1	3	1	0,5	2
	1	3	0	0,4	2
	1	2	3	0,6	3
	1	2	2	0,5	2
	1	2	1	0,4	1

^a If the result of the rarity category is 3, the MPN combination is very unlikely to occur. In this case, the experiment shall be repeated.

Table C.1 (continued)

Number positive results for inoculum volume (ml)				MPN per ml of dilution D (protocols 1 and 2) or of inoculum (protocol 3)	Rarity category ^a
Protocol 1	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 2	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 3	3 ml inoculum	1 ml inoculum	0,3 ml inoculum		
	1	2	0	0,3	1
	1	1	3	0,5	3
	1	1	2	0,4	2
	1	1	1	0,3	1
	1	1	0	0,2	1
	1	0	3	0,4	3
	1	0	2	0,3	2
	1	0	1	0,2	1
	1	0	0	0,1	1
	0	3	3	0,6	3
	0	3	2	0,5	3
	0	3	1	0,4	3
	0	3	0	0,3	3
	0	2	3	0,4	3
	0	2	2	0,4	3
	0	2	1	0,3	2
	0	2	0	0,2	1
	0	1	3	0,3	3
	0	1	2	0,3	3
	0	1	1	0,2	2
	0	1	0	0,1	1
	0	0	3	0,2	3
	0	0	2	0,2	3
	0	0	1	0,1	1
	0	0	0	0,0	1

^a If the result of the rarity category is 3, the MPN combination is very unlikely to occur. In this case, the experiment shall be repeated.

Nota: A diluição C e a diluição D, mencionadas neste anexo, correspondem às diluições $3 \times eLOD_{50}$ e $1 \times eLOD_{50}$, respetivamente.

Anexo II - Tabela 6 da norma ISO 16140-3:2021

ISO 16140-3:2021(E)

Table 6 — Determination of eLOD₅₀ based on the number of positive results per level of contamination using protocol 1

High inoculation level targeted $9 \times \text{LOD}_{50}$ / test portion	Intermediate inoculation level targeted $3 \times \text{LOD}_{50}$ / test portion	Low inoculation level targeted $1 \times \text{LOD}_{50}$ / test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	< $1,0 \times \text{LIL}^a$
1/1	4/4	3/4	0/1	= $0,5 \times \text{LIL}$
1/1	4/4	2/4	0/1	= $0,7 \times \text{LIL}$
1/1	4/4	1/4	0/1	= $1,0 \times \text{LIL}$
1/1	4/4	0/4	0/1	= $1,5 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	4/4	0/1	= $0,7 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	3/4	0/1	= $1,0 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	2/4	0/1	= $1,3 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	1/4	0/1	= $1,7 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	0/4	0/1	= $2,3 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	4/4	0/1	= $1,1 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	3/4	0/1	= $1,5 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	2/4	0/1	= $1,9 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	1/4	0/1	= $2,6 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	0/4	0/1	= $3,7 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result ^b
1/1	1/4	3/4	0/1	= $2,1 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	2/4	0/1	= $2,8 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	1/4	0/1	= $4,0 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	0/4	0/1	= $6,3 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result ^b
1/1	0/4	3/4	0/1	= $3,0 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	2/4	0/1	= $4,3 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	1/4	0/1	= $6,7 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	0/4	0/1	= $14,0 \times \text{LIL}$

^a LIL = low inoculation level.

^b Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

Anexo III - Relatório PCR amostras Q1 a Q5



admin_2025-05-07 14-48-36_CT060009_Q1-5.pcrd
05/07/2025 16:18

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: admin_2025-05-07 14-48-36_CT060009_Q1-5.pcrd
Data File Path: C:\Users\brcfx\Desktop\PCR MICROBIOLOGIA\STEC Queijos
Well Group Name: All Wells
Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run Date: 05/07/2025 14:49
Run User: admin
Run Type: User-defined
Plate File: Protocolo Placas_Generon_Amostras.pltd
ID:
Notes:
Sample Volume: 20
Temperature Control Mode: Calculated
Lid Temperature: 105
Base Serial Number: CT060009
Optical Head Serial Number: 790BR04321

Protocol

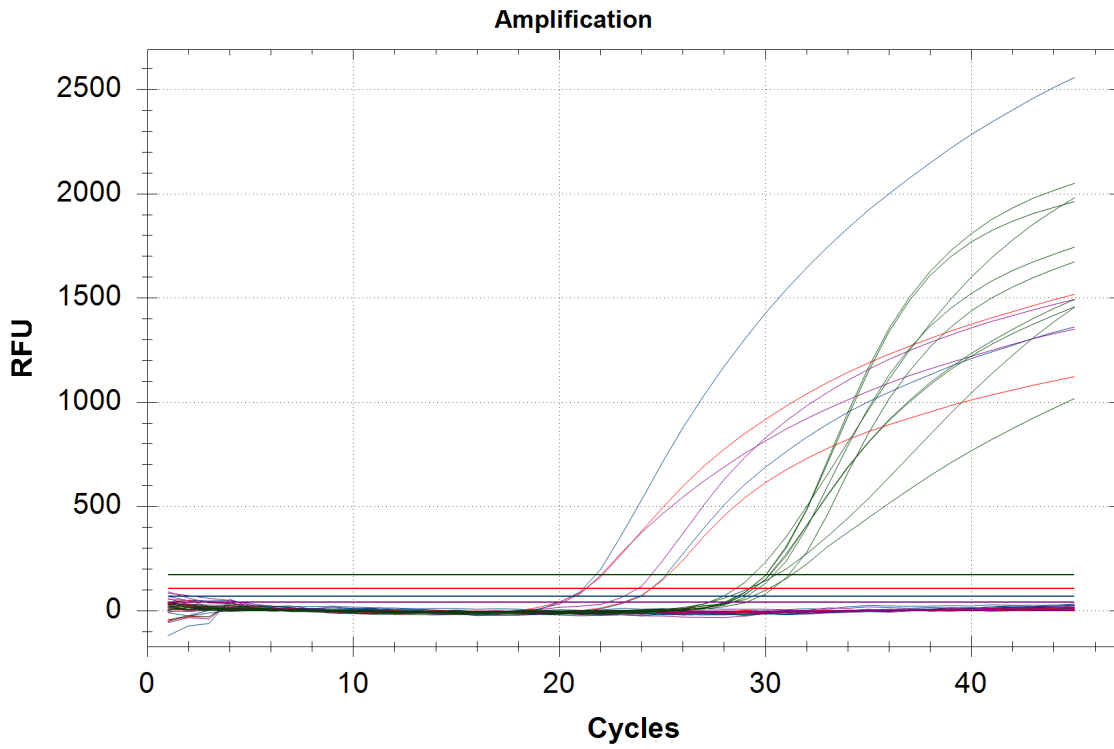
- 1: 95.0°C for 3:00
- 2: 95.0°C for 0:10
- 3: 60.0°C for 0:45
Plate Read
- 4: GOTO 2, 44 more times

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg FAM HEX Texas Red Cy5		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Branco									
B	Pos FAM HEX Texas Red Cy5											
C			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 C+									

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q1											
E	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q2											
F	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q3											
G	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q4											
H	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q5											



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	Cy5		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	Cy5		Unkn	Branco	N/A	0	0
B01	Cy5		Pos Ctrl		20,21	20,21	0
C03	Cy5		Unkn	C+	22,37	22,37	0
D01	Cy5		Unkn	Q1	N/A	0	0
E01	Cy5		Unkn	Q2	N/A	0	0
F01	Cy5		Unkn	Q3	N/A	0	0
G01	Cy5		Unkn	Q4	N/A	0	0
H01	Cy5		Unkn	Q5	N/A	0	0
A01	FAM		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	FAM		Unkn	Branco	N/A	0	0
B01	FAM		Pos Ctrl		20,58	20,58	0
C03	FAM		Unkn	C+	23,98	23,98	0
D01	FAM		Unkn	Q1	N/A	0	0
E01	FAM		Unkn	Q2	N/A	0	0
F01	FAM		Unkn	Q3	N/A	0	0
G01	FAM		Unkn	Q4	N/A	0	0
H01	FAM		Unkn	Q5	N/A	0	0
A01	HEX		Neg Ctrl		30,02	30,02	0
A03	HEX		Unkn	Branco	30,02	30,02	0
B01	HEX		Pos Ctrl		30,5	30,5	0
C03	HEX		Unkn	C+	29,37	29,37	0
D01	HEX		Unkn	Q1	30,2	30,2	0
E01	HEX		Unkn	Q2	30,17	30,17	0
F01	HEX		Unkn	Q3	31,26	31,26	0
G01	HEX		Unkn	Q4	31,12	31,12	0
H01	HEX		Unkn	Q5	30,38	30,38	0
A01	Texas Red		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	Texas Red		Unkn	Branco	N/A	0	0
B01	Texas Red		Pos Ctrl		21,28	21,28	0
C03	Texas Red		Unkn	C+	24,46	24,46	0
D01	Texas Red		Unkn	Q1	N/A	0	0
E01	Texas Red		Unkn	Q2	N/A	0	0
F01	Texas Red		Unkn	Q3	N/A	0	0
G01	Texas Red		Unkn	Q4	N/A	0	0
H01	Texas Red		Unkn	Q5	N/A	0	0



admin_2025-05-13 14-39-
19_CT060009_amostras_Q6_Q10_repetição.pcrd
05/13/2025 16:09

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: admin_2025-05-13 14-39-19_CT060009_amostras_Q6_Q11_repetição.pcrd
Data File Path: C:\Users\brcfx\Desktop
Well Group Name: All Wells
Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run Date: 05/13/2025 14:39
Run User: admin
Run Type: User-defined
Plate File: Protocolo Placas_Generon.pltd
ID:
Notes:
Sample Volume: 20
Temperature Control Mode: Calculated
Lid Temperature: 105
Base Serial Number: CT060009
Optical Head Serial Number: 790BR04321

Protocol

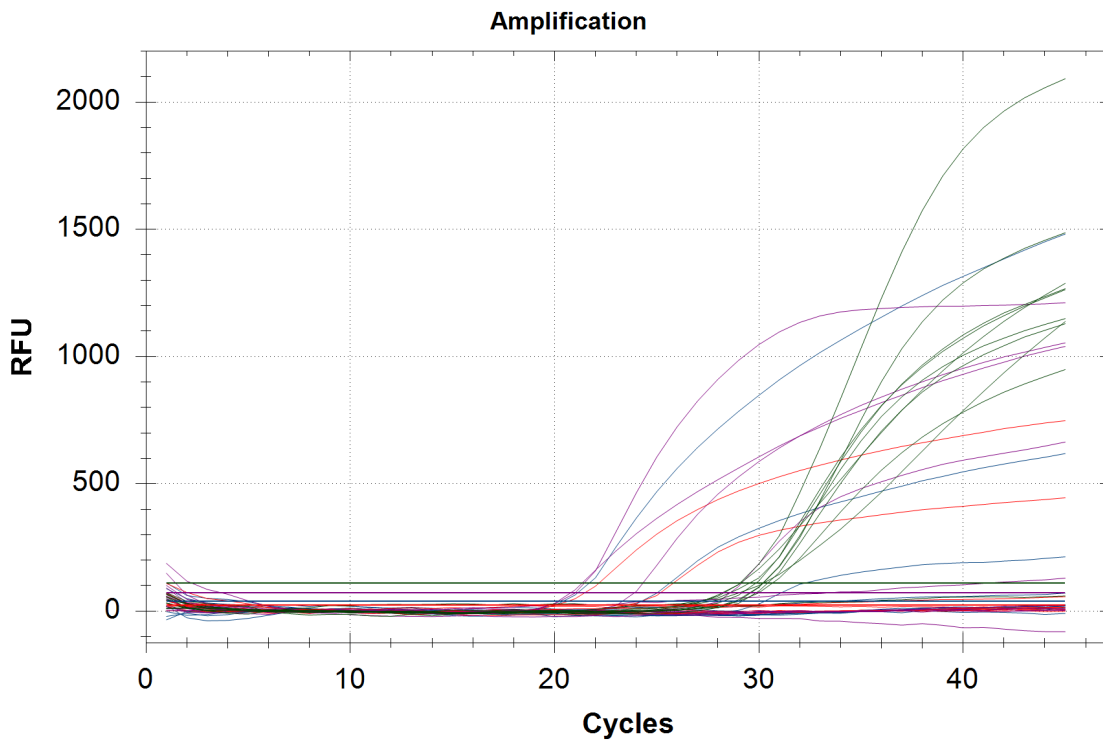
- 1: 95.0°C for 3:00
- 2: 95.0°C for 0:10
- 3: 60.0°C for 0:45
Plate Read
- 4: GOTO 2, 44 more times

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg FAM HEX Texas Red Cy5		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q6									
B	Pos FAM HEX Texas Red Cy5 C+		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q7									

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q8									
D	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Branco		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q9									
E			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q10									
F												
G												
H	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 C+											



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	Cy5		Neg Ctrl		33,38	33,38	0
A03	Cy5		Unkn	Q6	N/A	0	0
B01	Cy5		Pos Ctrl	C+	20,78	20,78	0
B03	Cy5		Unkn	Q7	N/A	0	0
C03	Cy5		Unkn	Q8	N/A	0	0
D01	Cy5		Unkn	Branco	N/A	0	0
D03	Cy5		Unkn	Q9	21,01	21,01	0
E03	Cy5		Unkn	Q10	28,58	28,58	0
H01	FAM		Unkn	C+	24,24	24,24	0
A01	HEX		Neg Ctrl		29,07	29,07	0
A03	HEX		Unkn	Q6	29,53	29,53	0
B01	HEX		Pos Ctrl	C+	30,22	30,22	0
B03	HEX		Unkn	Q7	29,85	29,85	0
C03	HEX		Unkn	Q8	30,19	30,19	0
D01	HEX		Unkn	Branco	30,21	30,21	0
D03	HEX		Unkn	Q9	30,66	30,66	0
E03	HEX		Unkn	Q10	30,43	30,43	0
H01	HEX		Unkn	C+	29,1	29,1	0
A01	Texas Red		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	Texas Red		Unkn	Q6	N/A	0	0
B01	Texas Red		Pos Ctrl	C+	20,09	20,09	0
B03	Texas Red		Unkn	Q7	N/A	0	0
C03	Texas Red		Unkn	Q8	N/A	0	0
D01	Texas Red		Unkn	Branco	N/A	0	0
D03	Texas Red		Unkn	Q9	30,54	30,54	0
E03	Texas Red		Unkn	Q10	N/A	0	0
H01	Texas Red		Unkn	C+	23,51	23,51	0

Anexo V – Relatório PCR amostras Q11 a Q15



admin_2025-05-21 15-32-
10_CT060009_Amostras_Q11_Q15.pcrd
05/22/2025 09:53

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: admin_2025-05-21 15-32-10_CT060009_Amostras_Q11_Q15.pcrd
Data File Path: C:\Users\brcfx\Desktop\PCR MICROBIOLOGIA\STEC Queijos
Well Group Name: All Wells
Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run Date: 05/21/2025 15:32
Run User: admin
Run Type: User-defined
Plate File: Protocolo Placas_Generon_Amostras.pltd
ID:
Notes:
Sample Volume: 20
Temperature Control Mode: Calculated
Lid Temperature: 105
Base Serial Number: CT060009
Optical Head Serial Number: 790BR04321

Protocol

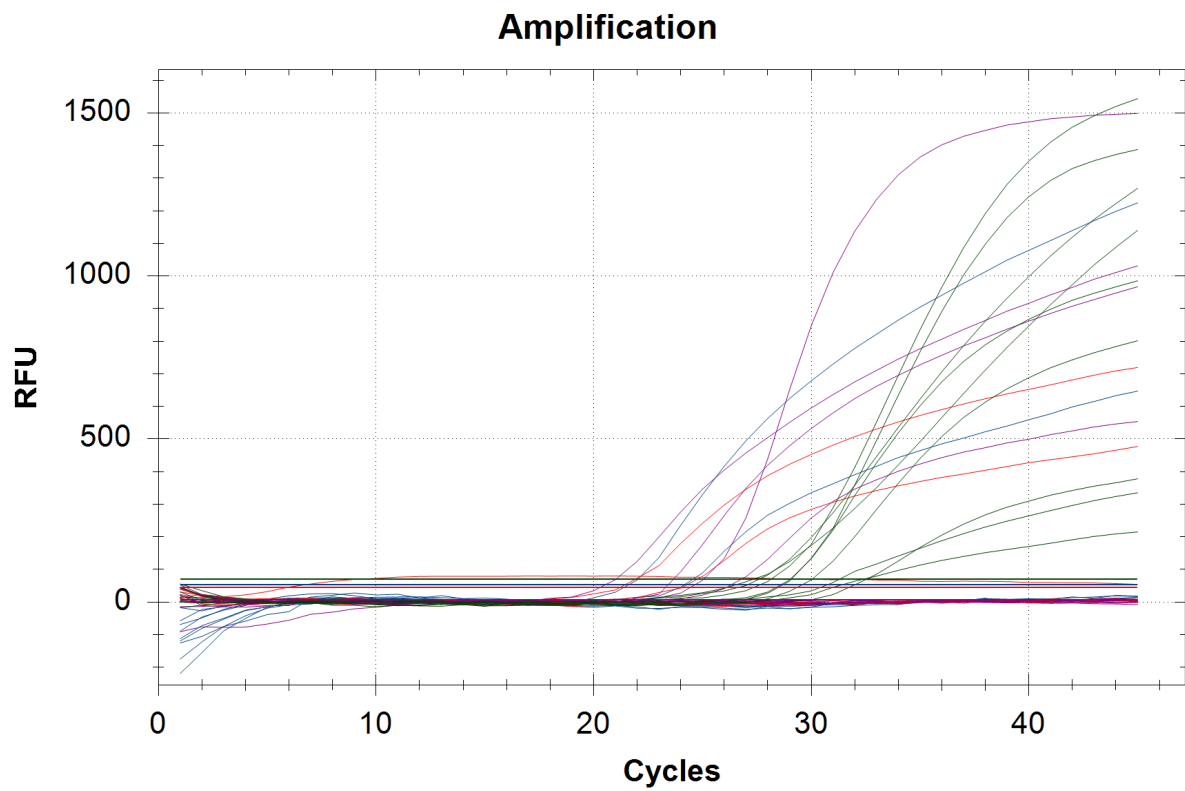
- 1: 95.0°C for 3:00
- 2: 95.0°C for 0:10
- 3: 60.0°C for 0:45
Plate Read
- 4: GOTO 2, 44 more times

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg FAM HEX Texas Red Cy5		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Branco									
B	Pos FAM HEX Texas Red Cy5											
C												

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q11											
E	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q12											
F	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q13											
G	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q14											
H	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q15		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 C+									



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	Cy5		Neg Ctrl		42,57	42,57	0
A03	Cy5		Unkn	Branco	11,67	11,67	0
B01	Cy5		Pos Ctrl		17,47	17,47	0
D01	Cy5		Unkn	Q11	22,93	22,93	0
E01	Cy5		Unkn	Q12	22,45	22,45	0
F01	Cy5		Unkn	Q13	N/A	0	0
G01	Cy5		Unkn	Q14	31,55	31,55	0
H01	Cy5		Unkn	Q15	N/A	0	0
H03	Cy5		Unkn	C+	21,66	21,66	0
A01	FAM		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	FAM		Unkn	Branco	N/A	0	0
B01	FAM		Pos Ctrl		21,59	21,59	0
D01	FAM		Unkn	Q11	N/A	0	0
E01	FAM		Unkn	Q12	N/A	0	0
F01	FAM		Unkn	Q13	N/A	0	0
G01	FAM		Unkn	Q14	N/A	0	0
H01	FAM		Unkn	Q15	N/A	0	0
H03	FAM		Unkn	C+	24,15	24,15	0
A01	HEX		Neg Ctrl		28,15	28,15	0
A03	HEX		Unkn	Branco	29,09	29,09	0
B01	HEX		Pos Ctrl		27,33	27,33	0
D01	HEX		Unkn	Q11	31,3	31,3	0
E01	HEX		Unkn	Q12	29,03	29,03	0
F01	HEX		Unkn	Q13	30,04	30,04	0
G01	HEX		Unkn	Q14	32,38	32,38	0
H01	HEX		Unkn	Q15	32,53	32,53	0
H03	HEX		Unkn	C+	27,6	27,6	0
A01	Texas Red		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	Texas Red		Unkn	Branco	N/A	0	0
B01	Texas Red		Pos Ctrl		21,19	21,19	0
D01	Texas Red		Unkn	Q11	N/A	0	0
E01	Texas Red		Unkn	Q12	N/A	0	0
F01	Texas Red		Unkn	Q13	N/A	0	0
G01	Texas Red		Unkn	Q14	5,84	5,84	0
H01	Texas Red		Unkn	Q15	N/A	0	0
H03	Texas Red		Unkn	C+	24,03	24,03	0

Anexo VI – Relatório PCR resultados amostras Q16 a Q22



admin_2025-06-03 13-02-
52_CT060009_Amostras_Q16_Q22.pcrd
06/03/2025 14:44

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: admin_2025-06-03 13-02-52_CT060009_Amostras_Q16_Q22.pcrd
Data File Path: C:\Users\brcfx\Desktop\PCR MICROBIOLOGIA\STEC Queijos
Well Group Name: All Wells
Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run Date: 06/03/2025 13:03
Run User: admin
Run Type: User-defined
Plate File: Protocolo Placas_Generon_Amostras.pltd
ID:
Notes:
Sample Volume: 20
Temperature Control Mode: Calculated
Lid Temperature: 105
Base Serial Number: CT060009
Optical Head Serial Number: 790BR04321

Protocol

- 1: 95.0°C for 3:00
- 2: 95.0°C for 0:10
- 3: 60.0°C for 0:45
Plate Read
- 4: GOTO 2, 44 more times

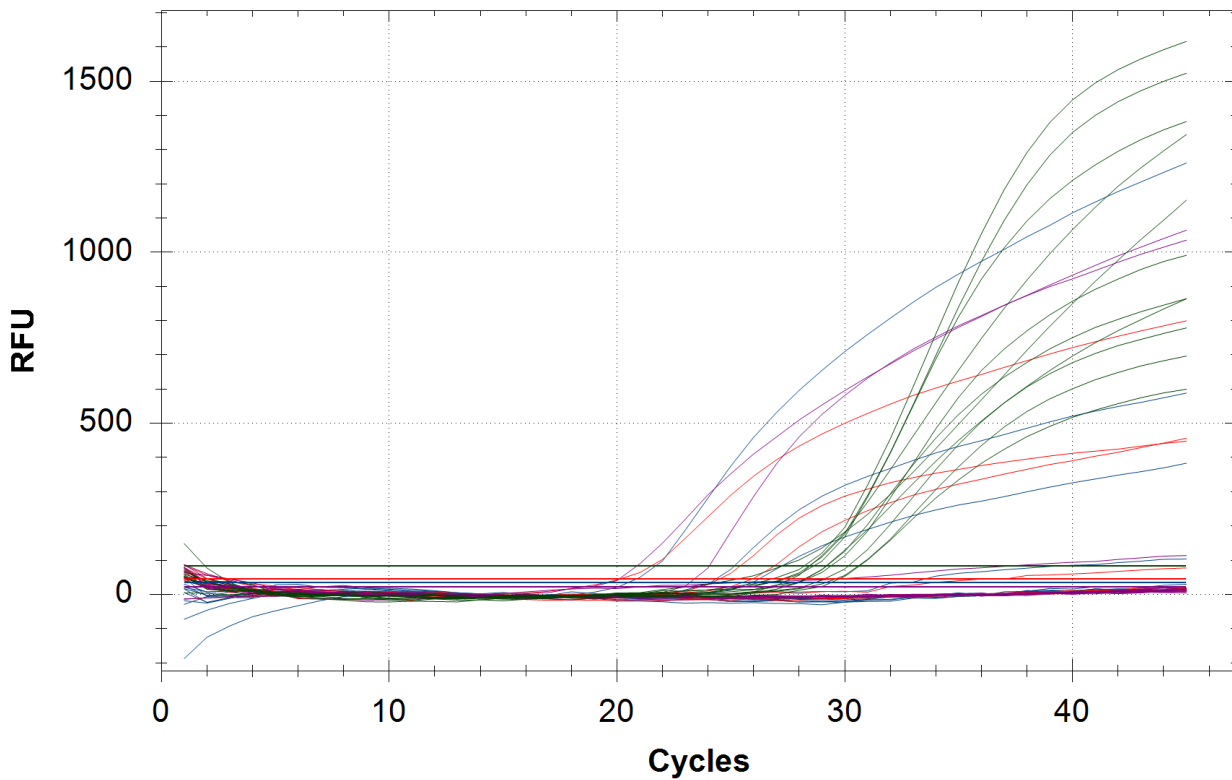
Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg FAM HEX Texas Red Cy5		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q16									
B	Pos FAM HEX Texas Red Cy5		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q17									

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q18									
D	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Branco		Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q19									
E			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q20									
F			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q21									
G			Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Q22									
H	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 E. coli O157H7											

Amplification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	Cy5		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	Cy5		Unkn	Q16	N/A	0	0
B01	Cy5		Pos Ctrl		18,81	18,81	0
B03	Cy5		Unkn	Q17	N/A	0	0
C03	Cy5		Unkn	Q18	N/A	0	0
D01	Cy5		Unkn	Branco	N/A	0	0
D03	Cy5		Unkn	Q19	N/A	0	0
E03	Cy5		Unkn	Q20	N/A	0	0
F03	Cy5		Unkn	Q21	N/A	0	0
G03	Cy5		Unkn	Q22	21,14	21,14	0
H01	Cy5		Unkn	E. coli O157H7	22,92	22,92	0
A01	FAM		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	FAM		Unkn	Q16	N/A	0	0
B01	FAM		Pos Ctrl		20,5	20,5	0
B03	FAM		Unkn	Q17	N/A	0	0
C03	FAM		Unkn	Q18	N/A	0	0
D01	FAM		Unkn	Branco	N/A	0	0
D03	FAM		Unkn	Q19	N/A	0	0
E03	FAM		Unkn	Q20	N/A	0	0
F03	FAM		Unkn	Q21	25,95	25,95	0
G03	FAM		Unkn	Q22	32,66	32,66	0
H01	FAM		Unkn	E. coli O157H7	24,11	24,11	0
A01	HEX		Neg Ctrl		28,41	28,41	0
A03	HEX		Unkn	Q16	30,62	30,62	0
B01	HEX		Pos Ctrl		27,22	27,22	0
B03	HEX		Unkn	Q17	29,18	29,18	0
C03	HEX		Unkn	Q18	30,14	30,14	0
D01	HEX		Unkn	Branco	28,2	28,2	0
D03	HEX		Unkn	Q19	30,57	30,57	0
E03	HEX		Unkn	Q20	28,61	28,61	0
F03	HEX		Unkn	Q21	29,16	29,16	0
G03	HEX		Unkn	Q22	29,37	29,37	0
H01	HEX		Unkn	E. coli O157H7	28,45	28,45	0
A01	Texas Red		Neg Ctrl		N/A	0	0
A03	Texas Red		Unkn	Q16	N/A	0	0
B01	Texas Red		Pos Ctrl		20,13	20,13	0
B03	Texas Red		Unkn	Q17	N/A	0	0
C03	Texas Red		Unkn	Q18	N/A	0	0
D01	Texas Red		Unkn	Branco	N/A	0	0
D03	Texas Red		Unkn	Q19	N/A	0	0
E03	Texas Red		Unkn	Q20	N/A	0	0
F03	Texas Red		Unkn	Q21	25,94	25,94	0
G03	Texas Red		Unkn	Q22	37,03	37,03	0
H01	Texas Red		Unkn	E. coli O157H7	24,49	24,49	0

Anexo VII – Placas de CA-STECC e TBX obtidas a partir da inoculação das amostras cujo resultado PCR foi positivo (Q8, Q9, Q10, Q21 e Q22).

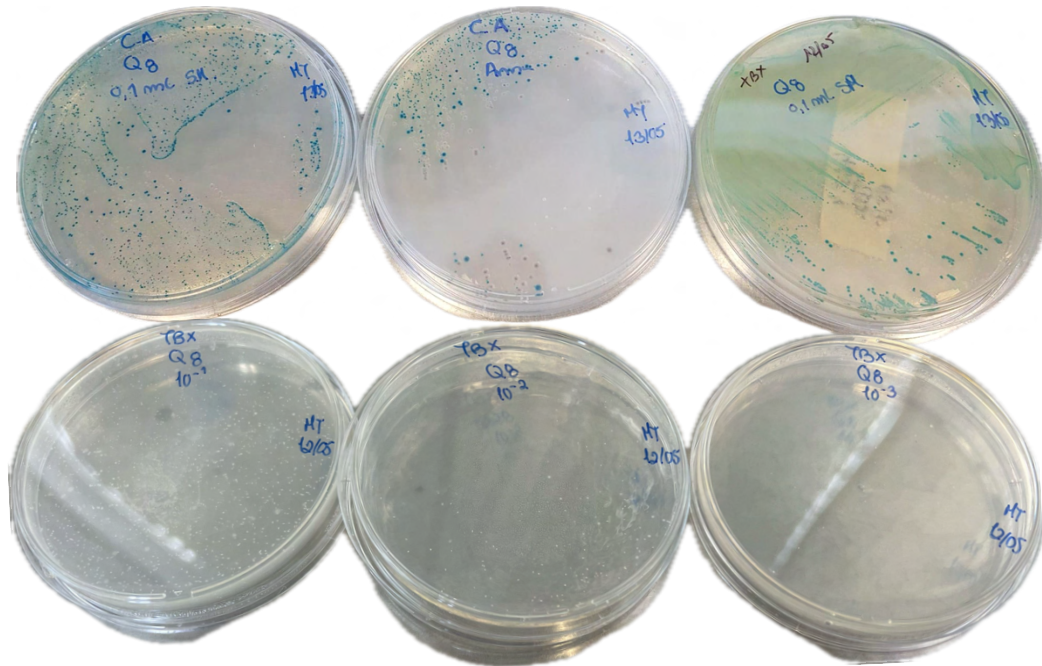


Figura I: Resultados placas CA-STECC (cima) e TBX (baixo) da amostra Q8.

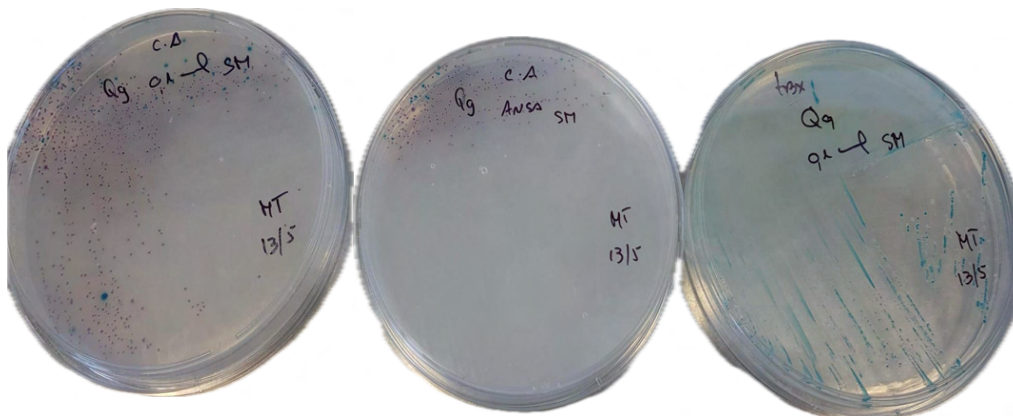


Figura II: Resultado placas CA-STECC (esquerda e centro) e TBX (direita) da amostra Q9.

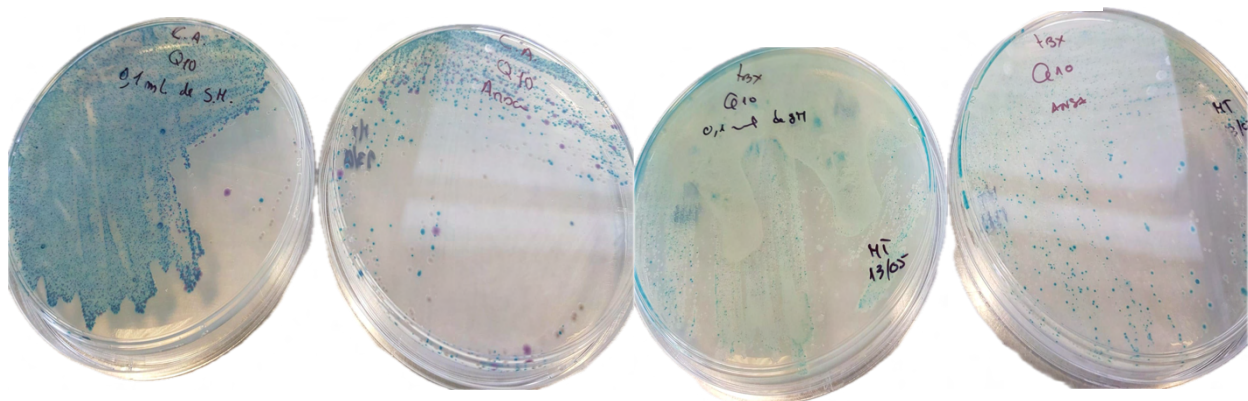


Figura III: Resultado placas CA-STECC (esquerda) e TBX (direita) da amostra Q10.

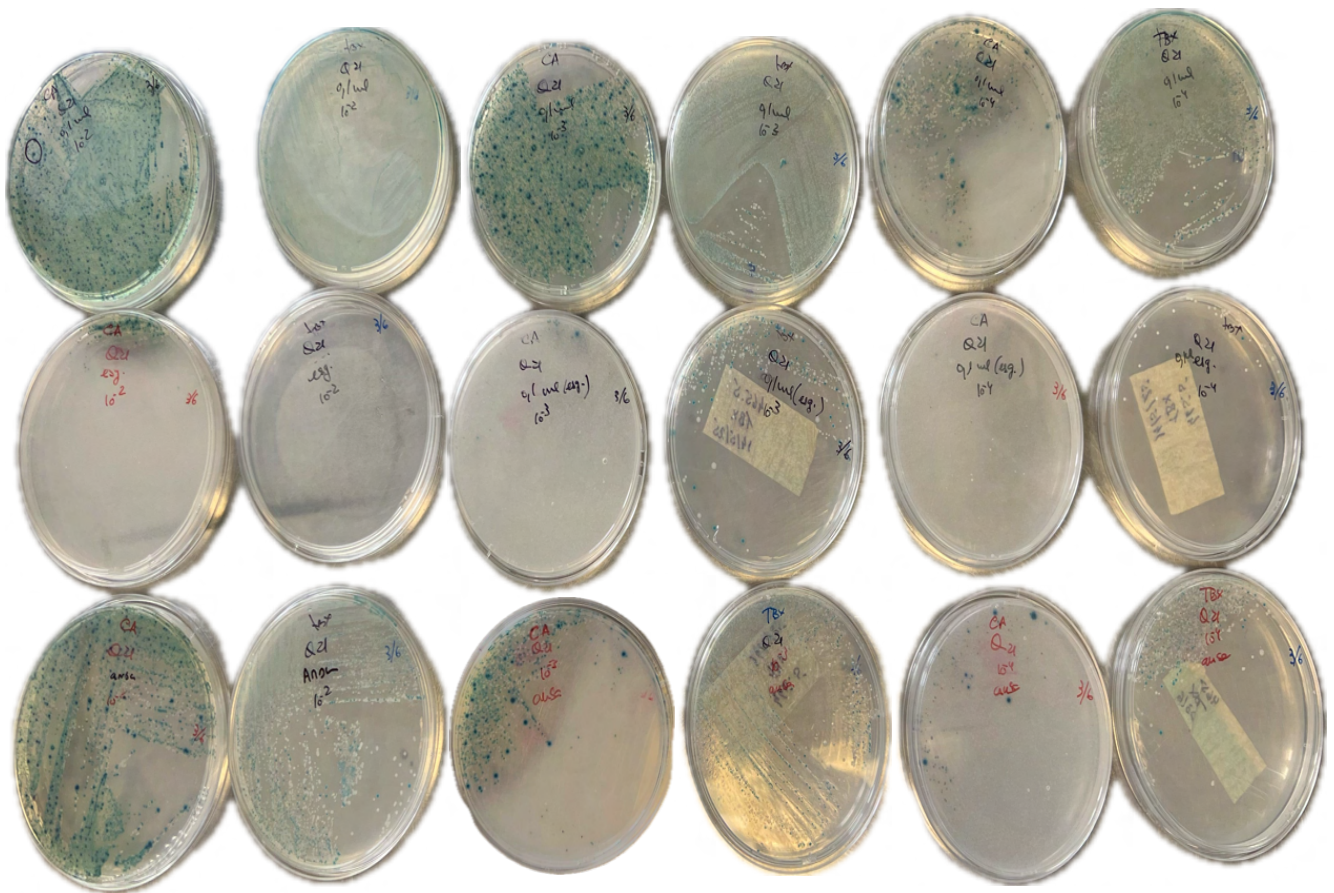


Figura IV: Resultado placas CA-STECC e TBX da amostra Q21.

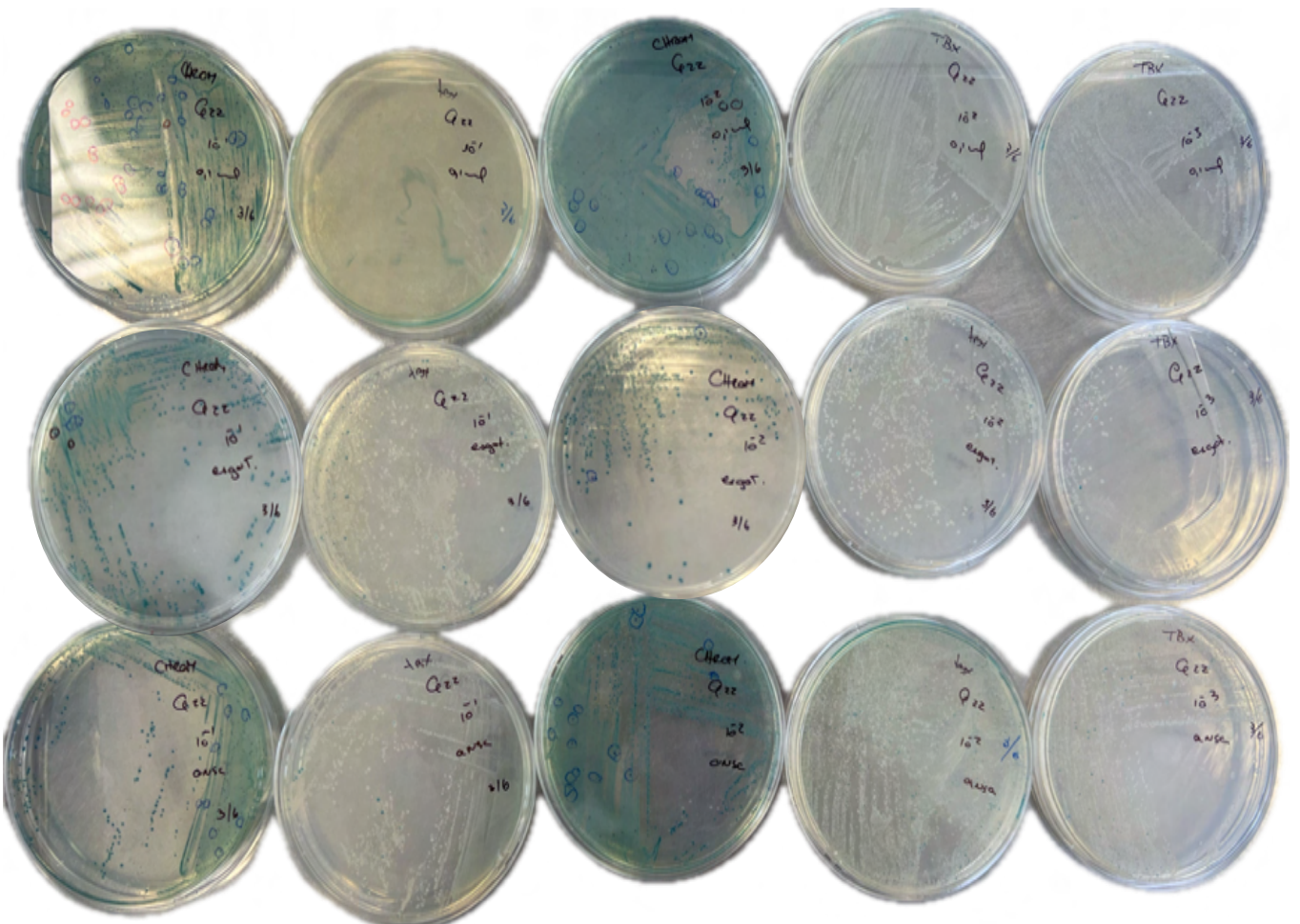


Figura V: Resultados placas CA-STECC e TBX da amostra Q22.