



**Joana Carina da Ressurreição Garcia**

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

## **Toxinfecções Alimentares de origem bacteriana – uma revisão**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia  
e Segurança Alimentar

**Orientadora:** Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar da  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Júri:**

**Presidente:** Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

**Arguente:** Doutora Elisabete Muchagato Maurício

**Vogal:** Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro 2020**

“Toxinfecções Alimentares de origem bacteriana – uma revisão” © Joana Carina da Ressurreição Garcia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Não podia começar por agradecer a alguém que não os meus pais, João e Isabel, por todo o carinho, apoio, resiliência e amor que depositaram em mim, não só durante este mestrado, mas durante toda a minha vida. A eles o meu mais profundo obrigado por uma vida de memórias e possibilidades, por eles criadas. À minha irmã, Liliana, obrigado, muito do que sou hoje foi com o teu apoio, humor e companheirismo.

Às irmãs que a vida me deu sob a forma de amigas, Liliana, Ana Rita, e Alexandra, obrigado. Pelos anos inesquecíveis da nossa vida de escola e faculdade, e pela vida adulta que nos espera. Às minhas amigas e companheiras de mestrado Luísa e Márcia, obrigado! Tornaram o que poderiam ter sido 2 anos complicados de estudo e trabalho, em anos certamente mais fáceis. Obrigado pelas dormidas, pelas noitadas de estudo e pela amizade! Obrigado ao meu amigo Rafael, por diariamente me manter um sorriso no rosto, mesmo encontrando-nos nós em países diferentes.

Por último e, de todo, não menos importante, obrigado à Professora Paula Duarte, pela paciência e orientação na realização desta tese.

Obrigado também a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para que chegasse a este momento, o culminar da minha vida académica e o início, do que espero ser, a minha carreira.

## RESUMO

As toxinfecções alimentares de origem bacteriana são causadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados por microrganismos patogénicos ou pelas suas toxinas e constituem um grande problema de saúde pública. Todos os anos as toxinfecções de origem alimentar afetam a vida de milhões de pessoas e representam um peso económico significativo considerando os custos dos tratamentos médicos associados, a perda de rendimentos, assim como os custos da perda de alimentos, que é paga tanto pelos produtores como pelos consumidores. Só na Europa, em 2018, a *Campylobacter jejuni* foi responsável por mais de 246 mil casos de doença em humanos, levando a cerca de 21 mil hospitalizações e cerca de 60 mortes.

Este trabalho teve como objetivo identificar os principais microrganismos patogénicos responsáveis por toxinfecções alimentares, os instrumentos utilizados para os controlar e regulamentar assim como, deixar uma perspetiva dos perigos em emergência para a segurança alimentar. A pesquisa efetuada permitiu identificar dez espécies/géneros de bactérias causadoras de toxinfecções alimentares (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* e *Vibrio* spp.). Foram ainda identificados diversos fatores que podem originar o aparecimento de problemas emergentes para a segurança alimentar, nomeadamente fatores como a resistência bacteriana a antibióticos, as alterações climáticas, a globalização dos mercados e o aparecimento de novos microrganismos patogénicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** toxinfecção alimentar, microrganismo, bactéria, segurança, resistência, patogénicos, contaminação

## ABSTRACT

Food-borne bacterial diseases are caused by the ingestion of water or food contaminated by pathogenical microorganisms or by their toxins and represent a major public health concern. Every year, foodborne diseases affect the lives of millions of people and represent a considerable economical burden considering the costs of medical treatments associated, the loss of revenues and the costs of the food, paid by the producers and the consumers.

Only in Europe, in the year of 2018, *Campylobacter* was responsible for over 246 thousand cases of human disease, leading to close to 21 thousand hospitalizations and 60 deaths.

This paper aims to identify the main pathogenical microorganisms responsible for foodborne diseases, the instruments used to control and regulate them, as well to give insight towards the emergent dangers to food safety. The research made allowed to identify ten species/genres of bacteria known to be the main cause of foodborne illnesses (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* e *Vibrio* spp.). There were still identified several risk factors concerning food safety, such as bacterial resistance to antibiotics, climate changes, globalization of the markets and the appearance of new pathogenic microorganisms.

**KEY-WORDS:** Food-borne diseases, microorganism, bacteria, safety, resistant, pathogenic, contamination

## ÍNDICE

1. Introdução .....	1
2. Toxinfeções Alimentares.....	3
2.1. Fontes de contaminação e Condições que favorecem o crescimento e sobrevivência de microrganismos nos alimentos .....	4
2.2. Bactérias causadoras de toxinfeções alimentares .....	7
2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
2.2.3. <i>Clostridium</i> spp. ....	12
2.2.4. <i>Campylobacter jejuni</i> .....	18
2.2.5. <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.2.6. <i>Salmonella</i> spp. ....	22
2.2.7. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	24
2.2.8. <i>Shigella</i> spp. ....	25
2.2.9. <i>Vibrio</i> spp.....	27
2.2.10. <i>Bacillus</i> spp. ....	29
2.3. Ocorrência de toxinfeções alimentares na União Europeia.....	30
3. Ferramentas de Gestão da Segurança Alimentar .....	34
3.1. Análise de perigos e pontos de controlo críticos (HACCP) .....	35
3.2. Critérios microbiológicos .....	40
3.3. Vigilância das doenças de origem alimentar .....	43
4. Perigos emergentes para a segurança bacteriológica dos alimentos .....	45
4.1. Resistência aos antibióticos.....	45
4.1.1. Mecanismos de resistência antimicrobiana .....	46
4.2. Alterações climáticas.....	47
4.3. Globalização.....	49
4.4. Patogénicos Emergentes.....	51
5. Conclusão/Perspetivas Futuras.....	54
6. Referência Bibliográficas .....	55

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Representação gráfica da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respetivamente.	.....	Página 8
<b>Figura 2.2</b> – Imagem representativa da bactéria <i>Listeria Monocytogenes</i>	.....	Página 9
<b>Fig 2.3</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Staphilococcus Aureus</i>	.....	Página 10
<b>Fig 2.4</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Clostridium perfringens</i>	.....	Página 13
<b>Fig 2.5</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Clostridium botulinum</i>	.....	Página 15
<b>Fig 2.6</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Campylobacter Jejuni</i>	.....	Página 17
<b>Fig 2.7</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Escherichia coli O157:h7</i>	.....	Página 19
<b>Fig 2.8</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Salmonella</i>	.....	Página 21
<b>Fig 2.9</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Yersinia Enterocolitica</i>	.....	Página 23
<b>Fig 2.10</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Shigella</i> spp	.....	Página 25
<b>Fig 2.11</b> - Imagem representativa da bactéria <i>Vibrio</i> spp.	.....	Página 26
<b>Fig. 2.12</b> - Imagem representativa da bactéria <i>B. cereus</i> .	.....	Página 28
<b>Figura 3.1</b> - Mapa de severidade <i>versus</i> probabilidade das ocorrências – identificação de perigos significativos (exemplo). Adaptado de Baptista et al, 2003	.....	Página 37
<b>Figura 3.2</b> - Árvore da Decisão	.....	Página 37

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> Fontes de contaminação microbiana em diferentes etapas da cadeia alimentar. (Adaptado de Correia et al., 2019)	.....	Página 6
<b>Tabela 2.2</b> Bactérias causadoras de toxinfecções alimentares e alimentos associados (adaptado de FDA 2008; ASAE, 2018).	.....	Página 7
<b>Tabela 2.3</b> Subgrupos de <i>Clostridium botulinum</i> (adaptado de ASAE, 2007c)	.....	Página 15
<b>Tabela 2.4</b> Caracterização das principais estirpes de <i>E. coli</i> envolvidas em toxinfecções alimentares (adaptado de Cameán et al., 2006).	.....	Página 20
<b>Tabela 2.5</b> Resumo dos casos confirmados, hospitalizações e mortes reportadas devido a zoonoses confirmadas em humanos, entre 2016 e 2018 (EFSA & ECDC, 2017, 2018 e 2019)	.....	Página 31
<b>Tabela 3.1:</b> Exemplos de classificações de perigos quanto à sua severidade (Adaptado de Baptista et al., 2003)	.....	Página 36
<b>Tabela 3.2-</b> - Grupos de alimentos prontos para consumo (adaptado de Saraiva et al., 2019)	.....	Página 41
<b>Tabela 3.3</b> - “Valores-guia INSA”- microrganismos patogénicos e toxinas em alimentos prontos para consumo (adaptado de Saraiva et al., 2019).	.....	Página 42

## **LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ASAE** - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

**Aw**- Atividade da água

**BPA**- Boas práticas agrícolas

**BPHF**- Boas práticas de higiene e fabrico

**ECDC**- *European Centre for Disease Control and Prevention*

**EFSA**- Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

**EHEC**- *Escherichia coli* enterohemorrágica

**EUFORS**- *European union foodborne reporting system*

**FDA**- *Food and Drug Administration*

**FQ**- Fluorquinolonas

**GBS**- Síndrome de Guillain Barre

**HACCP**- Análise de perigos e controlo de pontos críticos

**HIV**- Virus da imunodeficiência humana

**IBS**- Síndrome do intestino irritável

**MDR**- Resistência a múltiplos fármacos

**MRSA**- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PRSA**- *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina

**ReA**- Artrite

**UE**- União Europeia

## 1 INTRODUÇÃO

Considera-se um surto de toxinfecção alimentar uma doença infecciosa ou tóxica que afeta dois ou mais indivíduos, causada, ou que se suspeita ter sido causada, pelo consumo de género(s) alimentício(s) ou água contaminados por microrganismos, suas toxinas ou metabolitos (Viegas et al., 2016).

É importante salientar que o conceito “toxinfecção” engloba as infeções e as intoxicações alimentares. As **infeções alimentares** desenvolvem-se quando ocorre ingestão de um alimento contaminado com um microrganismo que consegue multiplicar-se no tubo digestivo (a nível do intestino), são exemplos de bactérias que levam a esta condição de insalubridade: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Yersinia enterocolitica*. Por outro lado, as **intoxicações alimentares**, que ocorrem com frequência, resultam da ingestão de alimentos que contêm a(s) toxina(s) produzida(s) pelo microrganismo, não sendo necessária a ingestão do microrganismo em si. Algumas das toxinas são destruídas pelo processamento mas outras continuam no alimento mesmo quando o microorganismo é eliminado. Exemplos de bactérias que podem causar intoxicações alimentares: *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (Qualfood, sem data).

Outro aspeto importante é que muitas vezes a transmissão dos agentes patogénicos é feita através das mãos, que são responsáveis pela maior disseminação dos microrganismos de uns locais para outros. Um centímetro quadrado de pele humana pode apresentar em média 100 000 bactérias, tornando fácil a disseminação ao preparar ou manipular os alimentos (Metis, 2018).

A toxinfecção alimentar apresenta um quadro sintomático que, comumente, se desenvolve nas 24 a 72h após ingestão, mas pode demorar dias ou até semanas. Na maioria das vezes existe uma ordem de aparecimento de sintomas, começando pelas dores de estômago e vômitos, e, mais tarde, a diarreia. Nos casos mais graves, pode também surgir dor de cabeça, febre, fadiga, dificuldade respiratória, alterações da visão ou fala, meningite, e, em situações extremas, morte. A febre superior a 38,5 °C, a presença de sangue nas fezes e o aparecimento de sinais de desidratação, sonolência ou cansaço excessivos e tonturas, são sinais de alerta que devem fazer recorrer a assistência médica (Metis, 2018).

Todos os anos as toxinfecções de origem alimentar afetam a vida de milhões de pessoas e representam um peso económico significativo considerando os custos dos tratamentos médicos associados, a perda de rendimentos, assim como os custos da perda de alimentos, que é suportado tanto pelos produtores como pelos consumidores. Só na Europa, em 2018, a *Campylobacter* spp., foi responsável por mais de 246 mil casos de doença em humanos, levando a cerca de 21 mil hospitalizações e cerca de 60 mortes (EFSA & ECDC, 2019).

Este trabalho teve como objetivo identificar os principais microrganismos patogénicos responsáveis por toxinfecções alimentares, os instrumentos utilizados para os controlar e regulamentar assim como, deixar uma perspetiva dos perigos bacteriológicos em emergência para a segurança alimentar.

## 2. TOXINFEÇÕES ALIMENTARES

Conforme referido anteriormente, a toxinfecção alimentar é uma doença infecciosa ou tóxica, causada, ou que se suspeita ter sido causada, pelo consumo de género(s) alimentício(s) ou água contaminados por microrganismos, suas toxinas ou metabolitos (Viegas et al., 2016). Grande parte destas toxinfecções estão relacionadas com a contaminação dos alimentos por bactérias.

As bactérias são organismos procariotas e unicelulares que podem estar presentes nos ambientes mais variados. Por possuírem uma estrutura muito simples, estes organismos, replicam-se a uma grande velocidade caso encontrem nutrientes e condições de temperatura, pH, humidade e concentração de oxigénio favoráveis. Nalguns casos, apenas 20 minutos são suficientes para que o número de bactérias duplique (ASAE, 2018; Fischetti et al., 2019).

A maioria das bactérias não representa um risco para a saúde dos consumidores e, em alguns casos, a sua presença nos alimentos pode até ser benéfica. Exemplo desta situação são os alimentos probióticos. A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “para a vida”. Os probióticos são alimentos suplementados com microrganismos vivos (normalmente *Lactobacillus* spp. e/ou *Bifidobacterium* spp.) e que, quando consumidos regularmente e em quantidades suficientes, devem contribuir para a saúde e bem estar; beneficiando o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal. Os probióticos constituem uma categoria de Alimentos Funcionais, cujo principal alvo é a mucosa intestinal e a sua microbiota, estando inclusos neste grupo o iogurte, leites fermentados e alguns biscoitos (Varavallo et al., 2008; Raizel et al., 2011).

As bactérias, probióticas (como as Bifidobactérias e Lactobacilos) são importantes para a saúde humana, pois quando ingeridas, podem fazer com que o número e atividade dos microrganismos que residem no intestino e que possuem propriedades úteis ao hospedeiro, aumentem. As propriedades benéficas dos probióticos são observáveis em muitas doenças, estes facilitam a formação da chamada barreira probiótica no intestino, impedindo, assim, a colonização da microbiota por bactérias patogénicas. A competição que ocorre no intestino favorecendo as bactérias probióticas e o facto destas estimularem o sistema imunológico, facilitando a defesa do organismo são alguns dos mecanismos descritos para esse impedimento. Outros benefícios que têm vindo a ser associados aos probióticos são a significativa redução dos níveis de colesterol total com diminuição do colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a melhoria da digestão de proteínas e o aumento da absorção de vitaminas e minerais (Varavallo et al., 2008).

Existem também bactérias de utilização industrial, como é o caso das bactérias utilizadas nos produtos lácteos. Entre os inúmeros derivados lácteos comercializados, o iogurte é um dos produtos fermentados com maior popularidade e importância económica. O produto é elaborado

a partir de leite enriquecido com alto teor de sólidos, usando uma cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Tais bactérias ácido lácticas exercem efeitos favoráveis na saúde dos consumidores, inibindo bactérias patogénicas e equilibrando a microbiota intestinal. Muitas bactérias ácido lácticas podem ser consideradas probióticas (Cunha et al., 2013; Botelho et al., 2018).

Contudo, existem diversas espécies de bactérias que quando presentes nos alimentos podem provocar doenças no Homem. Estas espécies de bactérias patogénicas podem causar toxinfecções alimentares e representam uma ameaça para a saúde e bem estar humano (FDA, 2008).

## **2.1. FONTES DE CONTAMINAÇÃO E CONDIÇÕES QUE FAVORECEM O CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE MICRORGANISMOS NOS ALIMENTOS**

Para que uma doença transmitida por alimentos ocorra, o microrganismo patogénico ou a sua toxina deve estar presente no alimento. Na maioria dos casos será necessário que: i) o microrganismo patogénico se encontre em quantidade suficiente para causar uma infecção ou para produzir toxinas; ii) O alimento seja capaz de sustentar o crescimento do microrganismo patogénico; iii) O alimento permaneça a temperatura propícia ao intervalo de crescimento do microrganismo por tempo suficiente para que o organismo se multiplique e/ou produza a toxina; e/ou iv) Seja ingerida uma quantidade suficiente do alimento de modo a ultrapassar o limiar de susceptibilidade do indivíduo que ingere o alimento (Trindade, 2014).

A capacidade de crescimento e sobrevivência dos microrganismos patogénicos nos alimentos depende não só das características físicas e nutricionais do alimento, como também de um conjunto de fatores denominados: extrínsecos (que dizem respeito ao meio envolvente do género alimentício e intrínsecos (inerentes ao próprio alimento). Estes fatores podem ser manipulados de modo a impedir ou diminuir a probabilidade de contaminação e multiplicação de microrganismos indesejados, quer os que deteriorem o alimento e diminuam o seu tempo de prateleira, quer os que provocam situações perigosas para a saúde de quem os consumir.

Uma vez que existe um grande e variado espectro de microrganismos, todos os alimentos possuem alguma característica que os torna aptos a alguma proliferação microbiana, tornando-se assim excelentes meios de multiplicação de microrganismos, o que impõe, às unidades produtivas e aos manipuladores, um rigoroso controlo sobre os fatores facilitadores do crescimento assim como do acesso dos microrganismos aos alimentos.

Os principais **fatores intrínsecos** aos produtos alimentares que afetam o crescimento microbiano são: a sua composição nutricional, atividade da água (aw); pH; potencial de oxidação/redução (Eh); a existência ou não de estruturas biológicas que dificultem o acesso dos microrganismos; e a existência ou não de substâncias antimicrobianas naturais presentes no alimento. Por sua vez, os principais **fatores extrínsecos** aos produtos alimentares que afetam o

crescimento microbiano são: a temperatura; a humidade relativa, a composição atmosférica. O grau de processamento também é um fator condicionante do crescimento de microrganismos. Exemplo desta situação é a maior susceptibilidade ao desenvolvimento microbiano apresentado pela carne picada comparativamente com a carne não picada. Esta maior susceptibilidade resulta da maior área superficial apresentada pela carne picada.

A influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no crescimento microbiano leva a que processos como a secagem ou a salga (diminuição de *aw*), adição de ácidos (diminuição do pH), acondicionamento a temperatura controlada (refrigeração, congelação ou temperatura elevada) ou em atmosfera modificada, sejam métodos utilizados na preservação de alimentos.

O crescimento e sobrevivência de microrganismos nos alimentos pode também ser influenciado pela presença de microflora competitiva, que não afigura como um perigo direto para a saúde. Estes competidores não patogénicos, não causam toxinfecções alimentares, mas a sua taxa de crescimento relativamente rápida pode prevenir que os patogénicos contaminantes cresçam, atingindo níveis altos o suficiente para causar estados de doença aos humanos. As interações entre os fatores extrínsecos e intrínsecos e com a microflora competitiva são complexas e muitas vezes imprevisíveis (Lee-Ann & Marion, 2009).

A aplicação dos Regulamentos (CE) n.º852/2004 e n.º853/2004, fiscalizados pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE - Portugal), exige que os operadores do setor alimentar que realizem qualquer fase da produção, transformação e distribuição de alimentos depois da produção primária e das operações associadas, possuam um sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP – *Hazards Analysis and Critical Control Points*) desenvolvido pela Comissão do *Codex Alimentarius*, com o objetivo de manter a inocuidade dos produtos alimentares cumprindo todas as exigências legais neste âmbito (Baptista et al., 2007; Gaspar et al., 2009).

Como em muitas outras situações, a prevenção é a melhor estratégia para evitar a contaminação e crescimento microbiano, sendo assim importante adotar boas práticas de manipulação e conservação tanto de equipamentos como de géneros alimentícios e isto inclui, por exemplo: manter a limpeza lavando frequentemente as mãos e efetuando a devida higienização de todos os equipamentos, superfícies e utensílios utilizados na preparação dos alimentos; separar os alimentos crus dos alimentos cozinhados assim como as matérias primas secas das húmidas; utilizar diferentes equipamentos e utensílios, como facas ou tábuas de corte, para alimentos crus e alimentos cozinhados; guardar os alimentos em embalagens ou recipientes fechados datados e rotulados, para que não haja contato entre eles e para que se saiba o que cada recipiente contém; cozinhar bem os alimentos (especialmente carne, ovos e peixe); manter os alimentos a temperaturas seguras; não deixar alimentos cozinhados, mais de 2 horas, à temperatura ambiente; não armazenar alimentos durante muito tempo, mesmo que seja no

frigorífico; não descongelar os alimentos à temperatura ambiente; usar água potável e matérias-primas seguras; lavar frutas e vegetais, especialmente se forem comidos crus e verificar o prazo de validade dos alimentos e rejeitá-los se ultrapassado (Metis, 2018).

A microflora dos alimentos consiste em microrganismos associados com a matéria-prima, microrganismos adquiridos durante o manuseamento e processamento e com aqueles que sobreviveram às técnicas de preservação e armazenamento. As bactérias patogénicas que frequentemente contaminam o abastecimento alimentar podem ser sub-categorizadas com base na sua origem, estes organismos são: i) predominantemente associados com matéria fecal (animal/humana), como é o caso da *e. coli*, ii) ubíquos na pele, nariz e garganta de indivíduos saudáveis, iii) ubíquos na natureza. Com base nesta categorização, os cenários gerais em que os alimentos podem ficar infetados com patogénios incluem: i) contacto com esgotos/fezes humanas/animais, ii) contacto com operadores infetados dos géneros alimentícios, iii) contaminação ambiental (através do solo, ar, água, materiais que entram em contacto com a comida, etc), iv) contacto com matérias primas, etc. Tais contaminações podem surgir em qualquer parte do contínuo *Farm to Fork* (isto é, da cadeia alimentar que vem desde a produção agrícola, até a consumidor final) e podem surgir de um sem número de fontes (FAO, 2008; Lee-Ann & Marion, 2009). A **tabela 2.1**. mostra diversas formas de contaminação dos alimentos com bactérias patogénicas, sendo essa contaminação introduzida em várias etapas da cadeia alimentar. A consciencialização do risco da contaminação em cada etapa, permite a sua diminuição ou até mesmo, exclusão, através das boas práticas de higiene e fabrico por parte dos manipuladores/operadores dos géneros alimentícios.

**Tabela 2.1** Fontes de contaminação microbiana em diferentes etapas da cadeia alimentar. (Adaptado de Correia et al., 2019)

Etapas da cadeia alimentar	Fontes de contaminação
Na produção primária	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Os alimentos para animais podem ser contaminados por bactérias designadamente <i>Salmonella</i> spp. que podem procovar infeções nos animais e potencialmente infetar os humanos na sequência do consumo de alimentos de origem animal</li> <li>➤ O leite pode ser contaminado por contacto (ex: com fezes ou com poeiras ambientais)</li> <li>➤ A pele e a pelagem dos animais pode ser contaminada por fezes e pelo meio ambiente</li> <li>➤ Os ovos e diferentes tipos de vegetais podem ser contaminados na produção</li> <li>➤ Contaminação dos vegetais (por exemplo, através da água de rega ou do solo especialmente quando há adubação da terra com estrume de animais)</li> </ul>

**Tabela 2.1** (continuação) Fontes de contaminação microbiana em diferentes etapas da cadeia alimentar. (Adaptado de Correia et al., 2019)

<b>Etapas da cadeia alimentar</b>	<b>Fontes de contaminação</b>
Durante o abate	➤ A carne pode ser contaminada por contacto com o conteúdo intestinal ou com a pele do animal
Durante processos adicionais	➤ os microrganismos presentes em produtos agrícolas crus ou em superfícies de contacto com alimentos, podem contaminar os alimentos ➤ Os manipuladores de alimentos podem contaminar os alimentos
Em cozinhas: <i>caterings/</i> restaurantes/casa	➤ Os microrganismos podem ser transferidos de um alimento para outro pela utilização inadequada de utensílios de cozinha ou pela manipulação de alimentos por manipuladores infetados

## 2.2. BACTÉRIAS CAUSADORAS DE TOXINFEÇÕES ALIMENTARES

A tabela 2.2 apresenta a lista das principais bactérias envolvidas em toxinfeções de origem alimentar, bem como os alimentos mais comumente associados a cada uma delas (FDA, 2008; ASAE, 2018).

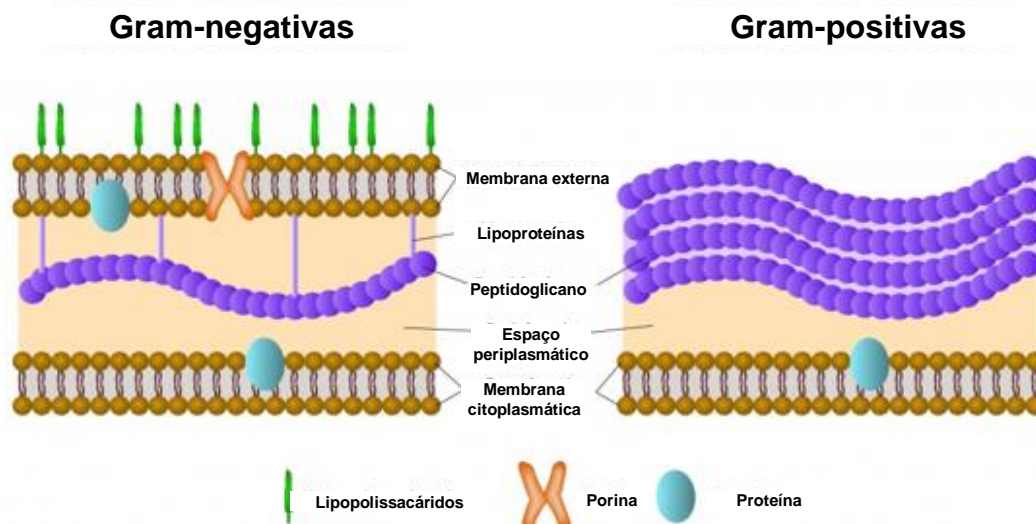
**Tabela 2.2:** Bactérias causadoras de toxinfeções alimentares e alimentos associados (adaptado de FDA 2008; ASAE, 2018).

<b>Espécie/Género</b>	<b>Reação à coloração de Gram</b>	<b>Alimentos mais comumente associados</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram-positiva	Alimentos prontos a consumir refrigerados
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positiva	Produtos lácteos, saladas, pastelaria recheada com creme e outras sobremesas, comida com alto teor proteico (como fiambre cozinhado, carne crua e aves)
<i>Clostridium perfringens</i>	Gram-positiva	Enlatados caseiros, comida embalada a vácuo, produtos cárneos e marisco
<i>Clostridium botulinum</i>	Gram-positiva	Carne e produtos cárneos, produtos com condições anaeróbias
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-positiva	Carne, leite, fruta, hortícolas, arroz, produtos desidratados
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gram-negativa	Leite cru, água não tratada, carne crua ou mal cozinhada, especialmente de aves, marisco
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativa	Carne (especialmente mal cozinhada ou hamburger cru), produtos não cozinhados, leite cru, sumo não pasteurizado e água contaminada

**Tabela 2.2** (continuação): Bactérias causadoras de toxinfeições alimentares e alimentos associados (adaptado de FDA 2008; ASAE, 2018).

Espécie/Género	Reação à coloração de Gram	Alimentos mais commumente associados
<i>Salmonella</i> spp.	Gram-negativa	Ovos pouco cozinhados ou crus, carne crua, aves, marisco, leite cru, lacticínios
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gram-negativa	Leite cru, marisco, produtos lácteos, água não tratada
<i>Shigella</i> spp	Gram-negativa	Saladas, água contaminada, aves, leite e produtos lácteos, ostras cruas e carne de vaca picada
<i>Vibrio cholerae</i>	Gram-negativa	Marisco cru ou mal cozinhado ou água
<i>Vibrio vulnificus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	Gram-negativa	Peixe cru, marisco (especialmente ostras cruas)

Em relação à constituição da parede celular, as bactérias podem dividir-se em dois grandes grupos: As Gram-positivas e as Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular formada por uma camada de peptidoglicano que pode apresentar uma espessura entre 30 a 100 nm ou até superior. Já a parede das bactérias Gram-negativas é formada por uma fina camada de peptidoglicano, de apenas alguns nanómetros, revestida por uma membrana externa formada por lipopolissacáridos, fosfolipídios e proteínas (figura 2.1) (Fischetti et al., 2019). A diferente constituição da parede confere às bactérias diferentes tipos de sensibilidade a agentes antimicrobianos, nomeadamente a desinfetantes e antibióticos.



**Figura 2.1** - Representação gráfica da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respetivamente. (Fonte: <https://s3.sanar.online/images/b/gram-positive-gram-negative-penicilina.png>, visitado em Abril de 2020)

### 2.2.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

A *Listeria monocytogenes* (figura 2.2) é uma bactéria gram-positiva, que possui um formato de bastonete pequeno com extremidades arredondadas, não produz esporos, e é móvel quando cresce a uma temperatura entre 20 e 25 °C, sendo, porém, imóvel ou apresentando fraca mobilidade quando cresce a 37°C. A *L. monocytogenes* pertence à família Listeriaceae, sendo capaz de crescer em presença ou na ausência de oxigénio (anaeróbia facultativa) (Rocourt & Buchrieser, 2007; ASAE, 2019). Esta bactéria consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 4,3 e 9,4, sendo que, no entanto, esta gama pode variar em função do tipo de ácido e da temperatura a que se encontra o alimento. Apesar de poder crescer na gama atrás mencionada, a *L. monocytogenes* apresenta uma taxa específica de crescimento máxima a valores de pH entre 6 e 8 (ASAE, 2019).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica responsável por uma infeção denominada Listeriose, que é relativamente rara em humanos, mas cuja taxa de mortalidade pode chegar aos 50%, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Pal et al., 2008; Radoshevich & Cossart, 2018).



**Figura 2.2** – Bactéria *Listeria monocytogenes* (Fonte: [https://air-dr.com/wp-content/uploads/2019/08/AdobeStock\\_128549555-1030x601.jpeg](https://air-dr.com/wp-content/uploads/2019/08/AdobeStock_128549555-1030x601.jpeg), visitado em Abril de 2020)

A bactéria é particularmente bem sucedida a causar toxinfeções alimentares porque consegue sobreviver a tecnologias de processamento alimentar que se baseiam em condições de acidez ou de salinidade. Ao contrário de muitos patogénicos, a *L. monocytogenes* é um organismos psicrotrófico, e, por isso, consegue continuar a multiplicar-se lentamente a baixas temperaturas, permitindo o seu crescimento mesmo em géneros alimentícios devidamente acondicionados em refrigeração (Favretti et al., 2016).

Ainda não foi verificada em ensaios clínicos uma terapia ideal para doentes infetados contudo, a utilização de penicilina ou ampicilina isoladas ou em combinação com gentamicina são consideradas os antibióticos de eleição (Casella et al., 2017; Pallota, 2019).

A deteção de *L. monocytogenes* em leite cru pode ser difícil devido às baixas contagens encontradas (normalmente inferiores a 10 Unidades formadoras de colónias (UFC)/mL) e

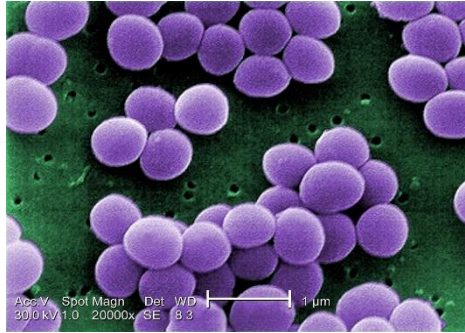
devido à competição da microbiota bacteriana. Quando a bactéria é detetada em leite pasteurizado, as causas mais prováveis são pasteurização inadequada ou contaminação pós-processamento (Meyer-Broseta et al., 2003; Ryser & Marth, 2007).

Em termos de quadro sintomático, em humanos, as desordens começam, normalmente, com sintomas que se assemelham aos sintomas gripais com febre persistente. Podem também verificar-se sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos e/ou diarreia, e estes sintomas precedem ou acompanham as manifestações mais graves da doença. Os sintomas gastrointestinais podem aparecer 9 a 72 h após o consumo dos alimentos contaminados e a doença invasiva aparecer 2 a 6 semanas após a ingestão, sendo de duração variável. Nas situações mais graves podem ocorrer casos de meningite e outras infeções potencialmente letais. As manifestações mais graves ocorrem normalmente em crianças, idosos, grávidas e indivíduos com o sistema imunitário comprometido. (FDA, 2008; Flores & Melo, 2015).

Para impedir uma doença alimentar por *L. monocytogenes* é necessário que haja um controle no local de processamento dos alimentos. Uma vez que esta bactéria se encontra amplamente distribuída na natureza (solo, água, vegetais, insetos, seres humanos, etc.) e consegue multiplicar-se à temperatura de refrigeração, deve fazer-se uma prevenção da sua entrada na indústria alimentar através do rigoroso controlo da matéria prima, limpeza e desinfecção de equipamentos, instalações sem entrada de animais, poeira e insetos, evitar o contacto do produto final com a matéria-prima, evitando assim a contaminação cruzada (Franco & Landgraf, 1996).

### **2.2.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

A bactéria *Staphylococcus aureus* é uma bactéria imóvel com formato de cocos, que muitas vezes se agrupam em cachos e anaeróbia facultativa (figura 2.3). Esta bactéria é conhecida por provocar lesões cutâneas e encontra-se associada a altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo capaz de produzir infeções em diversos tecidos do corpo humano. A *S. aureus* é também considerada um perigoso agente infeccioso em ambiente hospitalar, ocupando o segundo lugar, logo após a bactéria *Escherichia coli*, porque possui estirpes que adquiriram resistência aos diversos antibióticos e porque é capaz de sobreviver em diferentes condições ambientais (Flores & Melo, 2015; Gomes et al., 2019).



**Figura 2.3** - Bactéria *Staphylococcus aureus* (Fonte: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d3/Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_2.jpg/1200px-Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_2.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d3/Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg/1200px-Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg), visitado em Abril de 2020)

Esta bactéria é transportada na pele e nas fossas nasais dos humanos e é também capaz de se reproduzir muito rapidamente em alimentos que sejam deixados à temperatura ambiente. Entre as bactérias do género *Staphylococcus*, a *S. aureus* é a mais relacionada com os surtos de intoxicação alimentar devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas (Da Silva et al., 2005; FDA, 2008). Existem diferentes tipos de enterotoxinas, mas todas elas são exotoxinas proteínicas hidrossolúveis e termoresistentes, mantendo a sua actividade mesmo após a pasteurização. A destruição da enterotoxina obtém-se pelo tratamento a 100 °C durante pelo menos 30 minutos (ASAE, 2007a). Para além das enterotoxinas a *S. aureus* produz ainda uma série de enzimas, como coagulases, hemolisinas, fibrinolisinases ou hialuronidases, que constituem igualmente fatores de virulência (Cameán et al., 2006).

Para que se consiga multiplicar e sobreviver necessita que a temperatura se encontre entre os 7 e 46 °C, com uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37 °C. A produção de enterotoxina ocorre a temperaturas entre 10 e 45 °C. A *S. aureus* consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 4,5 e 9,3 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 6,0 e 7,0. A produção de enterotoxina ocorre em ambientes com valores de pH entre 5,2 e 9,0. Em termos de aw é osmótolerante (organismos que crescem numa larga amplitude de valores de aw ou de concentrações osmóticas) o que lhe permite crescer em ambientes com uma aw até 0,86 e com uma concentração de NaCl entre 5 e 7% (algumas estirpes crescem a concentrações de NaCl de 20%). A produção de enterotoxina ocorre em ambientes em que as concentrações de NaCl se situam entre 0-20% e em que os valores de aw são superiores a 0,87 (ASAE, 2007a).

A utilização de antibióticos, como a penicilina ou a metilicina, que se iniciou a meio do século XX, mostrou-se inicialmente eficaz no combate à infeção provocada por *S. aureus*. Contudo, o microrganismo rapidamente adquiriu resistência a estes antibióticos e infeções com *S. aureus* resistente a penicilina (PRSA) assim como *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) tornaram-se difíceis de tratar. Ainda que tenham sido feitos progressos, as estirpes de MRSA

continuam a figurar como uma ameaça significativa à saúde humana globalmente. Por exemplo, *S. aureus*, isoladamente, representa 29% de todos os casos isolados de infeção com bactérias na Europa, e estima-se que tenham ocorrido em 2014, nos Estados Unidos da América, 72 444 casos de infeções invasivas por MRSA (Dantes et al., 2013; McGuinness, 2017).

Em muitos países a *S. aureus* é o segundo ou terceiro patógeno mais comum em surtos de intoxicação alimentar, depois de *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*. Em Espanha, *S. aureus* foi a terceira causa de surtos de doenças transmitidas por alimentos durante o período de 1993-1998, sendo responsável por 228 focos de um total de 5 517 detetados (Flores, 2015).

As enterotoxinas são resistentes às enzimas digestivas sendo o tempo de incubação, normalmente, rápido, entre 30 minutos a 6 horas após a ingestão dos alimentos contaminados. Os sintomas da infeção incluem náuseas, dores abdominais, vômitos (ação da toxina sobre os recetores eméticos do trato gastrointestinal) e diarreia, com duração de 24 a 48 h (FDA, 2008).

Parte do sucesso desta bactéria em causar intoxicações alimentares deve-se à sua resistência a ciclos de congelação/descongelação e à sua capacidade de sobrevivência durante períodos alargados em alimentos armazenados a temperaturas inferiores a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A bactéria em si é destruída pela pasteurização, mas as enterotoxinas já formadas são resistentes aos processos térmicos, incluindo os regimes utilizados para esterilizar enlatados de baixa-acidez (ASAE, 2007a).

Como os estafilococos possuem uma natureza ubiqüitária, a sua eliminação do ambiente é praticamente impossível. O homem, como um dos principais reservatórios desta bactéria e principal manipulador dos alimentos, atua como vetor de uma provável contaminação. O aquecimento do alimento, por exemplo, por confecção, logo após a sua manipulação destrói as bactérias e ajuda na prevenção da intoxicação. No entanto, se cuidados apropriados não forem tomados após este aquecimento, o microrganismo poderá desenvolver-se e produzir a toxina. A rápida refrigeração é crucial para prevenção da multiplicação do microrganismo (Franco & Landgraf, 1996).

### **2.2.3. CLOSTRIDIUM SPP.**

O género *Clostridium* engloba um grupo diverso de bactérias com a forma de bastonetes, que não são capazes de crescer na presença de oxigénio (anaeróbios estritos) e que têm a capacidade de formar endósporos com elevada resistência ao calor (Cooper et al., 2013).

As espécies de *Clostridium* que mais comumente estão envolvidas em toxinfecções alimentares são *C. perfringens* e *C. botulinum*. A intoxicação por *C. perfringens* é, normalmente, breve e raramente fatal, contudo, as neurotoxinas de *C. botulinum* estão entre as

substâncias mais tóxicas que ocorrem naturalmente e causam toxinfecções alimentares severas, por vezes fatais, com sintomas que perduram por meses (EFSA, 2005).

As bactérias do género *Clostridium* ocorrem naturalmente no solo, poeira, em ambientes aquáticos e no intestino de animais. Consequentemente, *C. perfringens* e *C. botulinum* podem estar presentes numa ampla variedade de alimentos. Boas práticas na agricultura e boas práticas de higiene no geral contribuem para uma redução da contaminação dos alimentos através da minimização da contaminação do solo e do contacto com matérias contaminadas (EFSA, 2005).

### 2.2.3.1. *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, imóvel e formadora de esporos, patogénica para o Homem e para animais (figura 2.4). Esta espécie de *Clostridium* está entre as bactérias mais difundidas, devido à sua natureza ubiqüitária, encontrando-se virtualmente em todos os ambientes onde foi pesquisada, com uma distribuição ambiental que vai desde o solo, a esgotos, comida, até à normal flora intestinal de humanos e animais (Li et al., 2013).



**Figura 2.4** - Bactéria *Clostridium perfringens* (Fonte: [https://higieneambiental.com/sites/default/files/styles/noticia\\_post/public/noticies\\_imatges/c.perfringens.jpg?itok=v4XJAr\\_7](https://higieneambiental.com/sites/default/files/styles/noticia_post/public/noticies_imatges/c.perfringens.jpg?itok=v4XJAr_7) visitado em Abril de 2020)

As doenças causadas por *C. perfringens* são mediadas pela produção de diversas e potentes toxinas proteicas (Uzal et al., 2014; Rood et al., 2018). Existe uma variabilidade considerável no arsenal de toxinas de diferentes estirpes de *C. perfringens*, que fornece a base para um sistema de classificação de toxinotipagem que divide isolados de *C. perfringens* em cinco tipos (A-E) dependendo da sua capacidade na produção das quatro principais toxinas: alpha (CPA), beta

(CPB), epsilon (ETX) e iota (ITX) (Uzal et al., 2014; Freedman et al., 2016). Algumas estirpes de *C. perfringens* produzem outras toxinas, como a enterotoxina (CPE), e enzimas hidrolíticas (Khan et al., 2015).

Esta bactéria causa duas doenças distintas em humanos, que podem ser transmitidas pelos alimentos, uma é uma forma comum de toxinfecção alimentar, causada por estirpes do tipo A e a outra é enterite necrótica, que é relativamente rara, e é causada por estirpes do tipo C e algumas do tipo A (Bos et al., 2005; García & Heredia, 2011).

Esta bactéria pode ser controlada adequadamente desde que sejam seguidas as regras de segurança apropriadas, como aquecimento e arrefecimento durante o processamento dos géneros alimentícios (Cooper et al., 2013).

A bactéria consegue crescer entre os 15 °C e os 50 °C, com um crescimento ótimo na faixa dos 37 °C a 45 °C, para a maioria das estirpes. A produção de enterotoxinas ocorre a temperaturas entre 30 e 40 °C. As células vegetativas são facilmente destruídas por cozedura, mas os esporos são muito resistentes ao calor. Alguns esporos sobrevivem à ebulição durante uma hora. As células vegetativas são muito sensíveis a temperaturas de refrigeração e de congelação. Os esporos sobrevivem tanto a temperaturas de refrigeração como de congelação. A enterotoxina de *C. perfringens* é inativada por aquecimento a 60 °C durante 10 minutos. A capacidade de *C. perfringens* para formar esporos termorresistentes e o largo intervalo de temperaturas a que o organismo consegue crescer são características que permitem à bactéria multiplicar-se e sobreviver numa variedade de ambientes alimentícios (Brynstad & Granum, 2002; ASAE, 2007b).

Em termos de pH, o *C. perfringens* consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 5,5 e 9,0 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 6,0 e 7,0. A esporulação ocorre para valores de pH entre 6,0 e 8,0 (ASAE, 2007b).

Os sintomas predominantes de intoxicação por *C. perfringens* incluem diarreia e severas dores abdominais, náuseas (pouco comuns), febre e vómitos (muito raro). A terapia com antibióticos não é recomendada (Labbe & Juneja, 2017).

A intoxicação alimentar é causada quando os alimentos se encontram contaminados com um número elevado de células vegetativas (>10<sup>6</sup> CFU/g). Os sintomas de doença aparecem 8 a 24 h após ingestão dos alimentos contaminados. Muitas das células bacterianas provavelmente morrerão quando expostas ao ambiente ácido do estômago, mas se o veículo alimentar estiver suficientemente contaminado, algumas células vegetativas vão sobreviver à passagem para o estômago e vão entrar no intestino delgado onde se vão multiplicar e esporular, produzindo então a enterotoxina (CPE) que é, eventualmente, libertada no lúmen intestinal quando se der a lise das células esporuladas para que libertem os seus endósporos (Khan et al., 2015).

*C. perfringens* possui assim diversos atributos que contribuem significativamente para a sua capacidade de causar toxinfecções alimentares. Primeiramente, *C. perfringens* tem uma distribuição ubiqüitária no ambiente, dando-lhe uma ampla oportunidade de contaminar os alimentos. Segundo, *C. perfringens* tem a capacidade de formar esporos termorresistentes, permitindo que sobreviva numa variedade de ambientes e através de processos, incluindo a incompleta confecção de comidas ou técnicas de esterilização pouco eficientes. Terceiramente, *C. perfringens* tem a capacidade de se multiplicar muito rapidamente nos géneros alimentícios, permitindo que as bactérias cheguem aos níveis necessários para causar as intoxicações alimentares. Finalmente, *C. perfringens* é capaz de produzir uma enterotoxina ativa intestinalmente (CPE) que é responsável pelos sintomas gastrointestinais característicos da intoxicação alimentar por esta bactéria (McClane, 2005).

A temperatura de 60 °C inativa rapidamente as células vegetativas de *C. perfringens*. A resistência térmica dos esporos varia de estirpe para estirpe. Em geral, existem dois tipos de esporos: os termorresistentes e os termosensíveis. Os esporos de ambas as classes sobrevivem à cozedura dos alimentos e podem ter a sua germinação estimulada pelo aquecimento. As estirpes termorresistentes sobrevivem a períodos mais longos de aquecimento, e são as principais responsáveis pelos casos de intoxicação alimentar (Franco & Landgraf, 1996).

### **2.2.3.2. *Clostridium botulinum***

*C. botulinum* é uma bactéria Gram-positiva cujas células têm a forma de bastonetes (bacilos), são móveis por flagelos peritricos, formam esporos e produzem neurotoxinas (figura 2.5) (ASAE 2007c).



**Figura 2.5** - Bactéria *Clostridium botulinum* (Fonte: [https://www.newsmedical.net/image.axd?picture=2018%2F7%2Fshutterstock\\_1060051259.jpg](https://www.newsmedical.net/image.axd?picture=2018%2F7%2Fshutterstock_1060051259.jpg) visitado em Abril de 2020)

Com base nas suas características serológicas e culturais, as estirpes de *C. botulinum* são divididas em quatro subgrupos (**Tabela 2.3**). Existem sete subtipos de neurotoxinas classificadas de A a G (Johnson, 2019).

**Tabela 2.3-** Subgrupos de *Clostridium botulinum* (adaptado de ASAE, 2007<sup>c</sup>)

Subgrupo	Tipo de toxina	Fisiologia
I	A, B, F	Proteolítico, mesófilo
II	B, E, F	Não proteolítico, psicrotrófico
III	C, D	Não proteolítico
IV	G	Ligeiramente proteolítico

Dos subgrupos representados na **Tabela 2.3**, o subgrupo I e II estão, maioritariamente, envolvidos em doenças que afetam o ser humano, enquanto que o grupo III está associados a doenças animais (Le Maréchal, 2016).

O *C. botulinum* é o agente etiológico produtor da toxina botulínica que é responsável pela doença denominada botulismo. O botulismo como intoxicação alimentar em humanos é raro, ainda assim, quando se verifica, é potencialmente fatal (Ferreira-Juliano & Cardoso, 2014).

Este microrganismo pode ser encontrado no solo, no fundo de lagos e oceanos e também no trato intestinal de animais. Pode ser encontrado, por vezes, em alimentos pouco ácidos que estejam em ambientes húmidos, contendo menos de 2% de oxigénio e armazenados a uma temperatura entre 4 °C e 49 °C. Devido a esta distribuição poucos são os géneros alimentícios crus que não estiveram expostos aos esporos desta bactéria. Ainda assim, a simples presença de esporos viáveis de *C. botulinum* não torna um produto alimentar perigoso. Desde que o organismo não se multiplique a toxina não é sintetizada. Muitos alimentos satisfazem os requisitos nutricionais do *C. botulinum*, mas nem todos providenciam as condições anaeróbias necessárias para a sua germinação. Mesmo quando os esporos se encontram presentes, a produção da toxina botulínica é normalmente evitada se o alimento for, naturalmente ou não, ácido ( $\text{pH} \leq 4,6$ ), tiver baixa  $a_w$  ( $a_w < 0,93$ ), possuir uma elevada concentração de cloreto de sódio, ou uma concentração inibitória de nitrito de sódio (100-200 ppm usados em conjunto com outros inibidores) e/ou estiver refrigerado (FDA, 2008; Maslanka et al., 2015).

O diagnóstico clínico do botulismo de origem alimentar é confirmado em laboratório através da confirmação da presença da toxina nas fezes ou vómito do paciente ou nos alimentos que se

sabe terem sido por ele consumidos. Adicionalmente, o isolamento de *C. botulinum* nas fezes de adultos é prova suficiente do botulismo (Wilder-Kofie et al., 2011).

Para além da intoxicação de origem alimentar, o botulismo infantil é a única outra forma de botulismo que é associada com os géneros alimentícios. O mel é uma fonte comum de esporos de *C. botulinum* e tem sido relacionado com alguns casos desta doença infantil. O sistema imunitário dos adultos e das crianças mais velhas pode prevenir a germinação dos ingeridos, contudo, numa criança com menos de dois anos, estes esporos podem germinar no intestino, dar origem às células vegetativas e causar botulismo infantil. Além disso, a bactéria não é considerada boa competidora, logo, não consegue desenvolver as suas funções em simultâneo com outros microrganismos que ocupam o mesmo ambiente, e isso explica o facto de indivíduos adultos saudáveis que ingerem os esporos do *C. botulinum* não desenvolverem sintomas da doença, a não ser que a microbiota intestinal esteja bastante comprometida (Hauschild et al., 1988; Brett et al., 2005; Cereser et al., 2008; FDA, 2008).

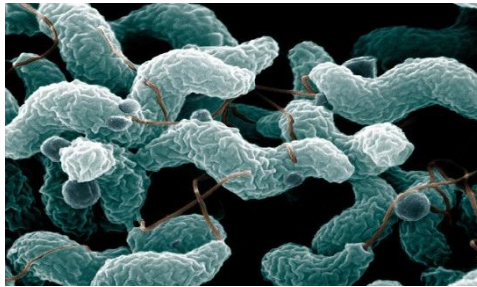
O botulismo encontra-se muito associado aos enlatados. Os enlatados são géneros alimentícios conservados em anaerobiose, cuja flora microbiana foi destruída através do recurso a processamento térmico a cerca de 121 °C. Se este processamento térmico não for corretamente efetuado, podem subsistir esporos viáveis, capazes de germinar na lata e produzir a toxina botulínica, potencialmente letal (FDA, 2008).

A incubação da doença dá-se 12 h a 72 h após ingestão, com um quadro sintomático que inclui: boca seca, visão dupla seguida de náuseas, vômitos e diarreia. Mais tarde, prisão de ventre, fraqueza, paralisia muscular que pode resultar em paralisia respiratória e morte. Com o tratamento adequado a maioria das vítimas sobrevive, podendo a recuperação demorar de umas semanas até um ano (Peck et al., 2011).

Para que um alimento não seja causador de botulismo é necessário impedir que a neurotoxina botulínica venha a ser formada, sendo imperativo impedir a germinação dos esporos e a proliferação de células de *C. botulinum*. Podem ser utilizados alguns microrganismos fermentativos (bactérias lácticas, por exemplo) para produzir ácidos em quantidades suficientes que impeçam a multiplicação e outras substâncias inibitórias como bacteriocinas, água oxigenada ou antibióticos. Podem também ser utilizados nitritos e nitratos. Se as células vegetativas e esporos de *C. botulinum* estiverem presentes no alimento, estas podem ser destruídas por tratamento térmico elevado devido à elevada resistência térmica dos esporos. A congelação, assim como a refrigeração, não tem qualquer efeito prático na destruição de células vegetativas, esporos ou neurotoxinas botulínicas (Franco & Landgraf, 1996)

#### 2.2.4. CAMPYLOBACTER JEJUNI

A *Campylobacter jejuni* é uma bactéria Gram-negativa, móvel, microaerófila (apenas cresce em meios com baixas concentrações de oxigénio), não formadora de esporos, de forma curva (figura 2.6) considerada a causa mais comum de diarreia mediada por bactérias (Zilbauer et al., 2008; Fernández-Cruz et al., 2010).



**Figura 2.6** - Bactéria *Campylobacter jejuni* (Fonte: <https://zoonoticecology.files.wordpress.com/2013/05/campylobacter-e1367919882392.jpg> visitado em Setembro de 2020)

Para além da diarreia, dores abdominais, febre e, por vezes, fezes com sangue, a *C. jejuni* é também responsável, em menor grau, por bacteremia (presença de bactérias na corrente sanguínea). Esta bactéria está também associada a uma série de sequelas pós-infecção como Síndrome de Guillain Barre (GBS), artrite (ReA) e síndrome do intestino irritável (IBS) (Feodoroff et al., 2011; Keithlin et al., 2014). A bacteremia por *Campylobacter* é uma doença muito rara, ocorrendo maioritariamente em pacientes com deficiências no sistema imunitário ou outra condição subjacente grave, incluindo doenças no fígado, vírus da imunodeficiência humana (HIV), entre outros (Fernández-Cruz et al., 2010).

A sua transmissão é reduzida no contacto de humano para humano, provavelmente devido à sua natureza microaerófila. Em vez disso, é principalmente uma zoonose uma vez que é um organismo que vive associado a animais para alimentação, particularmente a aves, que servem de principal veículo para infeções humanas. A carne fica contaminada durante o processo de abate, e a *C. jejuni* sobrevive nas fendas das carcaças onde a tensão do oxigénio é baixa (Allos & Blaser, 2010). Existem outros meios de transmissão, igualmente importantes, como a ingestão de leite e águas contaminadas (Iovine, 2013).

O uso indiscriminado de antibióticos na população humana, assim como na criação de animais, para tratamento, promoção de crescimento e para outros propósitos, conduziu a um aumento de infeções por *Campylobacter* antibiótico-resistentes, particularmente no que diz respeito às fluorquinolonas (FQ). As fluorquinolonas são um grupo de substâncias químicas sintéticas com atividade antimicrobiana, com extensiva aplicação tanto na medicina humana

como na medicina veterinária, consideradas importantes armas no combate a organismos Gram-negativos, Gram-positivos (Da Silva & Hollenbach, 2010). Esta situação é problemática, ainda que nem todos os casos de infeção por *Campylobacter* requeiram tratamento, a gastroenterite provocada por *C. jejuni* é clinicamente indistinguível das gastroenterites causadas por outros patogénicos bacterianos, e essas doenças são normalmente tratadas empiricamente com fluorquinolonas. Uma vez que a *C. jejuni* é naturalmente transformável, a aquisição de genes adicionais que transmitam a resistência a antibióticos é muito provável. É assim muito importante o correto diagnóstico para aplicação da devida terapêutica (van Boven et al., 2003; Iovine, 2013).

Devido ao aparecimento de *C. jejuni* resistente a antibióticos em vários países, o Centro para a Prevenção e Controlo de Doenças dos Estados Unidos da América, classificou esta bactéria como uma séria ameaça microbiana e a estirpes resistentes à fluoquinolona são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um patogénico de alta prioridade (CDC, 2013; Collado et al., 2018).

A *C. jejuni* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 32 e 45°C e tem uma temperatura óptima de crescimento entre 42 e 43°C. Em termos de pH consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 4,9 e 9,0 e apresenta uma taxa de pH ótimo entre 6,5 e 7,5. Esta bactéria tem dificuldade a crescer em ambientes secos e é inibida também por ambientes com elevada concentração salina (concentrações de NaCl superiores a 2%) (ASAE, 2007d). Relativamente ao estado de doença, o tempo de incubação é geralmente de 2 a 5 dias após ingestão e os seus sintomas (diarreia – por vezes acompanhada de sangue-, dores abdominais, febre, dores musculares, dores de cabeça e náuseas) perduram de 2 a 10 dias (FDA, 2008).

### **2.2.5. *ESCHERICHIA COLI***

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, anaeróbia facultativa, pode ser imóvel ou móvel por flagelos (figura 2.7). A *E. coli* cresce em intervalos de temperatura de 8 °C a 44/45 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 37 °C. Existem, no entanto, algumas estirpes que crescem em limites de temperatura mais alargados. As estirpes patogénicas sobrevivem, geralmente, às temperaturas de refrigeração, apesar de ocorrer uma ligeira redução após uma a cinco semanas de armazenamento. Em relação ao pH, a *E. coli* consegue crescer a pH 4,5 se este for ajustado com um ácido forte, como, por exemplo, o ácido clorídrico, mas não consegue crescer a esse mesmo pH quando ajustado com ácido láctico. Para a aw o limite mínimo que permite o crescimento é de 0,95. Os meios com concentrações salinas de 8,5% são inibitórios de crescimento (ASAE, 2007e).



**Figura 2.7** - Bactéria *Escherichia coli* (Fonte: [https://www.id-hub.com/wp-content/uploads/2016/09/1200px-E.-coli\\_Bacteria\\_by-NIAID-702x336.jpg](https://www.id-hub.com/wp-content/uploads/2016/09/1200px-E.-coli_Bacteria_by-NIAID-702x336.jpg) visitado a 07 de Setembro de 2020)

A maioria das estirpes de *E. coli* não representam perigo e colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais fazendo parte da sua normal flora. Contudo, existem algumas estirpes que evoluíram e se tornaram patogênicas, adquirindo fatores de virulência através de plasmídeos, bacteriófagos, entre outros. Estes tipos patogênicos de *E. coli* podem ser categorizados com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K), bem como pelos mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos ou fatores de virulência (Kaper et al., 2004; Lim et al., 2010). As estirpes patogênicas de *E. coli* podem subdividir-se em seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), correspondendo estas últimas às estirpes capazes de originar as formas mais severas de doença (tabela 2.4) (Cameán et al., 2006).

**Tabela 2.4** - Caracterização das principais estirpes de *E. coli* envolvidas em toxinfeições alimentares (adaptado de Cameán et al., 2006).

<b>Grupo patogénico</b>	<b>Fatores de virulência</b>	<b>Sintomas clínicos</b>
<i>E. coli</i> enterotoxigénicas (ETEC)	Fatores de colonização, toxinas termolábeis e termoestáveis	Diarreia aquosa e severa
<i>E. coli</i> enteropatogénicas (EPEC)	Fímbrias e intimina	Diarreia aguda e persistente
<i>E. coli</i> enteroinvasivas (EIEC)	Proteínas de adesão e invasão	Desintéria aguda
<i>E. coli</i> enterohemorrágicas (EHEC)	Toxinas similares à toxina shiga ( <i>E. coli</i> verotoxigénicas, VTEC), hemolisina	Diarreia com sangue; Síndrome hemolítica urémica
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EIEC)	Aderência agregativa, fímbrias, toxina termoestável	Diarreia persistente
<i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC)	Adesinas	Diarreia persistente

A primeira EHEC a ser identificada foi a estirpe *E. coli* O157:H7, que foi reconhecida em 1982 como um patogénico humano associado a surtos de diarreia com sangue (Lim et al., 2010). O gado bovino é o maior reservatório desta estirpe, sendo os hospedeiro normalmente assintomáticos. Posteriormente foram identificados outros serotipos (O111, O26, O103 e O104) associados a quadros clínicos semelhantes. Estas estirpes produzem toxinas semelhantes a toxina shiga (produzida por *Shigella dysenteriae*), pelo que também são demoninadas de *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) (Cameán et al., 2006). Ainda que o número total de casos de infeção por *E. coli* O157:H7 seja mais baixo do que aqueles causados por outros patogénicos entéricos como *Salmonella* spp. ou *Campylobacter* spp., as doenças causadas por esta estirpe de *E. coli* mostraram taxas muito superiores de hospitalização e fatalidade (Yara et al., 2020).

O quadro sintomático da doença provocada por *E. coli* O157:H7 tem um tempo de incubação de, normalmente, 3 a 4 dias após ingestão, mas pode ocorrer em qualquer momento de 1 a 10 dias após ingestão. Os sintomas costumam ser severas dores abdominais, diarreia ensanguentada e náuseas. A duração dos sintomas é de 5 a 10 dias. Especialmente em jovens crianças, idosos e pessoas com o sistema imunitário enfraquecido, existe o risco de desenvolvimento da síndrome hemolítica urémica (HUS), uma condição sistémica e potencialmente fatal, associada a falha renal aguda e a complicações cardíacas e neurológicas (FDA, 2008; Yara et al., 2020).

A maioria das rotas de transmissão prende-se com o consumo de alimentos e água contaminados. Contudo, a infeção pode igualmente ser adquirida através do contacto direto pessoa a pessoa, particularmente em creches, e através do contacto animal-pessoa. Existem casos de infeções documentadas em pessoas que visitaram jardins zoológicos ou quintas onde, anteriormente, os animais pastaram (Heuvelink et al., 2002; Yara et al., 2020).

A *E. coli* assumiu um papel de relevância como modelo de estudo da resistência a múltiplos fármacos (MDR) e para o estudo da disseminação de fatores de virulência em comunidades bacterianas de origem alimentar. A bactéria apresenta desafios significativos aos tratamentos clínicos devido à resistência originada pelo uso indiscriminado de antibióticos na produção animal. A significância clínica de *E. coli* deve-se ao seu rápido desenvolvimento de resistência a antibióticos e fatores de virulência do seu potencial invasivo e patogénese (Khalil et al., 2015). As estirpes de *E. coli* resistentes a múltiplos fármacos e possuindo fatores de virulência são assim consideradas um modelo de referência em programas de monitorização mundial de doenças de origem alimentar causadas por patogénicos de *E. coli*, tendo estabelecido, inevitavelmente, novos horizontes terapêuticos (Valadbeigi et al., 2020).

#### **2.2.6. SALMONELLA SPP.**

As bactérias do género *Salmonella* são bacérias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae. As células têm a forma de bastonete, podem ser imóveis ou móveis por flagelos e, em termos da sua relação com o oxigénio, são consideradas bactérias anaeróbias facultativas (figura 2.8) (Hayes, 1993; ASAE, 2007f; Gast & Porter, 2020).



**Figura 2.8** - Bactérias do género *Salmonella* (Fonte: [https://ichef.bbci.co.uk/news/660/media/images/76963000/jpg/\\_76963531\\_salmonella\\_enteritidis\\_bacteria-spl.jpg](https://ichef.bbci.co.uk/news/660/media/images/76963000/jpg/_76963531_salmonella_enteritidis_bacteria-spl.jpg)) visitado em Setembro de 2020)

As *Salmonella* spp. são frequentemente associadas a enfermidades transmitidas por alimentos, podendo estar presentes no trato intestinal de animais de sangue quente e frio. As infeções por *Salmonella* spp. são consistentemente reportadas como estando entre as principais

fontes internacionais de toxinfecções humanas (Quintiliano et al., 2008; CDC, 201, EFSA & ECDC, 2016, 2017 e 2018).

O género *Salmonella* engloba duas distintas: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira está dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Por sua vez, em cada subespécie são reconhecidos diferentes números de serotipos tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), sendo a subespécie *enterica* a que apresenta maior número de serotipos (MS, 2011). Ainda que mais de 2600 serótipos de *S. enterica* subespécie *enterica* tenham sido descritos até à data, os serotipos Enteritidis e Typhimurium permanecem os mais comuns a causar doenças no Homem, sendo responsáveis por cerca de 80% do total de casos de salmonelose (Jajere, 2019). Os serotipos Typhi, Paratyphi e Choleraesuis constituem outros serotipos da *S. enterica* subespécie *enterica* igualmente responsáveis por doenças de origem alimentar (Cameán et al., 2006)

Um estudo europeu multinacional concluiu que as galinhas poedeiras eram o principal reservatório para a transmissão das bactérias do género *Salmonella* a humanos, encontrando-se associadas a 42% de todos os casos. Os humanos podem também ser infetados com estas bactérias através do contacto com aves vivas. A maioria dos serotipos que são mais prevalentes em humanos (especialmente Enteritidis e Typhimurium) são igualmente comuns nas aves (De Knegt et al., 2015; Gast & Porter, 2020).

A temperatura ótima para a multiplicação destas bactérias é de 37 °C, mas é observado algum crescimento num intervalo que vai dos 5 °C aos 45 °C. As salmonelas não se multiplicam à temperatura de refrigeração, mas são extremamente resistentes à congelação. Em termos de pH, as bactérias do género *Salmonella* conseguem crescer numa gama que vai de, aproximadamente, 4,0 a 9,0, com um crescimento ótimo a 7,0, ainda que alguns componentes celulares (como os flagelos e fimbrias) possam não ser expressos sob condições extremas de pH. Já, para a atividade da água, o limite mínimo de  $a_w$  que permite crescimento é 0,93. O crescimento de *Salmonella* spp. é inibido em meios (ou alimentos) com concentrações de NaCl entre 3 e 4% (com o aumento de temperatura - dentro da gama das temperaturas toleradas - aumenta a tolerância ao NaCl). As necessidades nutricionais destas bactérias são relativamente simples e a maioria dos meios de cultura que fornecem fontes de carbono e azoto são capazes de possibilitar o seu crescimento (ASAE, 2007f; Gast & Porter, 2020).

Em termos de doença, a incubação é de 12 a 72h após o consumo dos géneros alimentícios contaminados. Os seus sintomas incluem: diarreia, febre e dores abdominais (sintomas estes que podem ser mais severos e até mesmo causar a morte a pessoas que se encontrem nos grupos de risco – idosos, grávidas e crianças). A duração dos sintomas pode perdurar de 4 a 7 dias (FDA, 2008).

Virtualmente todos os alimentos podem ser contaminados por *Salmonella* spp., porém esta contaminação é mais frequente em carnes, especialmente de aves, ovos e produtos derivados. Os produtos mais contaminados são normalmente produtos manipulados, como carnes preparadas, produtos de pastelaria e gelados (Cameán et al., 2006).

### 2.2.7. YERSINIA ENTEROCOLITICA

*Yersinia enterocolitica* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, capaz de provocar uma condição, yersiniose, caracterizada por diarreias ou vômitos. As células têm a forma de bastonetes (bacilos) e exibem mobilidade por flagelos quando crescem a temperaturas inferiores a 30 °C (figura 2.9) (ASAE, 2007g; FDA, 2008; Bottone, 2018).



**Figura 2.9** - Bactéria *Yersinia Enterocolitica* (Fonte:

<https://johnnyandeve.files.wordpress.com/2012/05/yersinia-enterocolitica.jpg> visitado em de Setembro de 2020)

Esta bactéria consegue crescer em ambientes com temperaturas entre -1,3 °C e 44 °C e tem uma temperatura ótima de crescimento entre 25 e 37 °C. Sobrevive à congelação por longos períodos de tempo. Os tratamentos térmicos normalmente utilizados na preparação de alimentos destroem o microrganismo. Já as embalagens em vácuo, não impossibilitam a presença deste microrganismo, somente atrasam o seu crescimento (presença de CO<sub>2</sub>). Dadas estas condições, é imperativo não só a refrigeração como o tratamento térmico, sempre que apropriado (ASAE, 2007g; FDA, 2008).

Em termos de pH, a *Y. enterocolitica* consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 4,2 e 9,6 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 7,0 e 8,0. Já para a atividade da água (aw), o limite mínimo de aw que

permite o crescimento de *Y. enterocolitica* é 0,96, correspondente a cerca de 5% de NaCl. Concentrações de NaCl de 7% são inibitórias (ASAE, 2007g).

O género *Yersinia* engloba 18 espécies das quais, apenas três, são patogénicas para humanos e animais (*Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*). De acordo com um relatório recente da EFSA, yersiniose causada por *Y. enterocolitica* é uma das mais importantes doenças zoonóticas de origem alimentar, na Europa. Esta espécie patogénica tem sido, intensivamente, estudada há muitos anos. Até à data foram identificados seis biótipos (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) e mais de 70 serotipos de *Y. enterocolitica*. Os biótipos desta bactéria estão divididos de acordo com as suas propriedades patogénicas, sendo que o biótipo 1<sup>a</sup> é não-patogénico, os biótipos 2 a 5 são pouco patogénicos e o biótipo 1B é altamente patogénico. Os serotipos O:3, O:9, O:8 e O:5,27 são os mais frequentemente associados a yersiniose (Bottone, 2015; Bancercz-Kisiel et al., 2018; EFSA & ECDC, 2018).

Nem todas as estirpes de *Y. enterocolitica* são patogénicas. A patogenicidade depende da presença de um plasmídeo contendo genes que são referenciados como marcadores de virulência ou determinadores de virulência. As proteínas codificadas por estes genes permitem que as bactérias invadam organismos suscetíveis, os colonizem, evitem uma resposta imunitária e que cresçam quando em condições favoráveis (Galindo et al., 2011; Bancercz-Kisiel et al, 2018).

A incubação da doença leva 1 a 2 dias após a ingestão de alimentos contaminados, contudo, este tempo de incubação pode estender-se de 1 a 11 dias após ingestão. Os sintomas dependem da estirpe e persistem de 5 a 14 dias (ou nos casos mais graves até meses). O quadro sintomático é muito similar a uma manifestação de gastroenterite aguda e inclui febre, diarreia, vómitos e dores abdominais, que podem ser particularmente severas no caso das crianças (ASAE, 2008; FDA, 2008).

### **2.2.8. SHIGELLA SPP.**

*Shigella* spp. são bactérias patogénicas causadoras de diarreia intimamente relacionadas com a *Escherichia coli*. Estas bactérias têm forma de bastonete (figura 2.11) são imóveis, Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas que, em humanos e outros primatas, causam situações diarreicas, que conduz a inflamações do cólon, úlceras da mucosa intestinal, e perdas na função de barreira intestinal. A shigelose pode ser fatal em crianças pequenas e indivíduos infetados imunocomprometidos ou que não tenham acesso a tratamento médica adequado (Schnupf & Sansonetti, 2019).



**Figura 2.10** - Bactérias *Shigella* spp. (Fonte: [https://cdn.shortpixel.ai/client/q\\_glossy\\_ret\\_img\\_w\\_717/https://vivadifferences.com/wp-content/uploads/2019/07/Shigella.png](https://cdn.shortpixel.ai/client/q_glossy_ret_img_w_717/https://vivadifferences.com/wp-content/uploads/2019/07/Shigella.png) visitado em Setembro de 2020)

De acordo com ASAE (2007h) as condições aceites para o crescimento e sobrevivência deste microrganismo são: temperaturas em que regista crescimento entre 10 e 45 °C e uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C. Estas bactérias não se multiplicam à temperatura de refrigeração mas sobrevivem durante a refrigeração e a congelação, sendo destruídas por pasteurização. Relativamente a pH, conseguem crescer em ambientes com valores de pH entre 5 e 8 mas sobrevivem por períodos de tempo curtos em alimentos com pH inferior a 4,5. Na sua relação com a aw, vários estudos têm demonstrado que a *Shigella* spp. sobrevive por longos períodos em alimentos com baixa atividade da água, como a farinha.

O género *Shigella* é composto por quatro espécies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnei*. Cada espécie representa um serogrupo diferente (de A a D, respetivamente) e cada um é composto por múltiplos (15 a 20) serotipos, exceto *S. sonnei*, que apenas tem um serotipo. Uma vacina para este microrganismo ainda não foi licenciada, parcialmente devido ao amplo reportório de serotipos que precisam de ser avaliados para que uma vacina seja globalmente eficaz (Hosangadi et al., 2019; Schnupf & Sansonetti, 2019).

As fontes de infeção são fezes de pessoas infetadas ou de portadores convalescentes, sendo os seres humanos o único reservatório natural para *Shigella* spp.. A transmissão pode ser direta, através da via fecal-oral, ou, indireta, através da ingestão de alimentos ou água contaminada. Na maioria dos casos, causa é uma doença auto-limitada que pode ser eficazmente tratada por re-hidratação oral ou antibióticos, ainda que um aumento constante no número de casos de shigelose causado por estirpes resistentes a antibióticos seja uma preocupação crescente (Schroeder & Hildi, 2008; Anderson et al, 2016; Manual MSD, 2018).

A doença tem um período de incubação de 1 a 4 dias após ingestão dos alimentos contaminados. Os sintomas clínicos de shigelose variam de diarreia aquosa moderada a diarreia mucóide com sangue, acompanhada de dolorosas cólicas abdominais e febre. Os diferentes sintomas estão relacionados com o estado do sistema imunitário do hospedeiro e a espécie de *Shigella* causadora da condição, espécies estas que diferem na presença de fatores críticos de virulência, incluindo a toxina shiga. Um episódio de shigelose confere imunidade específica ao

serótipo por, pelo menos, vários anos. Os pacientes podem, contudo, ter episódios adicionais de shigelose causada por outros serótipos (Muthuirulandi, 2017). A doença geralmente não necessita de terapêutica, acabando por se resolver espontaneamente em adultos — casos leves em 4 a 8 dias, casos graves em 3 a 6 semanas. Desidratação significativa e perda de eletrólitos com colapso circulatório e morte podem ocorrer principalmente em adultos debilitados e crianças com idade inferior a 2 anos (FDA, 2008; Manual MSD, 2018).

A ocorrência de shigelose está amplamente restrita a países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de água potável é limitada e a fraca higienização e desnutrição criam condições para a transmissão da doença e contribuem para a sua severidade.

### 2.2.9. VIBRIO SPP.

Existem cerca de 35 espécies do género *Vibrio*, das quais 12 são patogénicas para o homem. De entre essas as espécies *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*, são as mais importantes para a segurança alimentar (ASAE, 2006).

Estas bactérias ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e marinhos. *V. cholerae* causa uma doença denominada cólera que, se não for tratada, pode ser letal. Já *V. vulnificus* normalmente vive em águas marinhas quentes e pode causar uma infeção em pessoas que comem marisco contaminado cru ou mal cozinhado (normalmente de concha) ou que tenham uma ferida aberta exposta à água contaminada. A infeção com *V. parahaemolyticus* tem igualmente sido associada à ingestão de marisco proveniente de águas contaminadas e especialmente de espécies provenientes de zonas com água mais quente (ASAE, 2006; FDA, 2008).

*Vibrio* spp. são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, pertencentes à família *Vibrionaceae*. As células têm a forma de bastonetes (bacilos), frequentemente curvados, e são móveis por flagelos (figura 2.12) (ASAE, 2006; FDA, 2008).



**Figura 2.11-** Bactérias *Vibrio* spp. (Fonte: [https://www.luciacangussu.bio.br/wp-content/uploads/2016/10/Vibrio\\_cholerae\\_maior.jpg](https://www.luciacangussu.bio.br/wp-content/uploads/2016/10/Vibrio_cholerae_maior.jpg) visitado em Setembro de 2020)

As condições que permitem o seu crescimento apresentam alguma diferença entre as várias espécies. Em termos de temperatura *V. cholerae* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 10 e 43 °C e tem uma temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37 °C. Não é um organismo resistente a temperaturas elevadas sendo destruído durante a pasteurização e a exposição a temperaturas superiores a 70 °C. Já *V. vulnificus* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 8 e 43 °C e o *V. parahaemolyticus* entre 5 e 43 °C, tendo ambas as espécies uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C. Assim como *V. cholerae* não são organismos resistentes a altas temperaturas, mas são sensíveis a baixas temperaturas. Os valores de pH são muito similares para ambos, sendo separados por décimas, conseguindo crescer em ambientes com valores de pH entre 5 e 10, e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH 7,6 (para *V. cholerae*), pH 7,8 (para *V. vulnificus*) e entre 7,5 e 8,5 para *V. parahaemolyticus*. Relativamente à atividade da água (aw), o limite mínimo de aw que permite o crescimento de *V. cholerae* é 0,97 (o valor ótimo 0,98). Embora não seja um organismo halofílico, o seu crescimento é estimulado pela presença de baixas concentrações de NaCl (concentração máxima tolerada 4%). O limite mínimo de aw que permite crescimento de *V. vulnificus* é 0,96 (ótimo 0,98) e para *V. parahaemolyticus* é 0,94; ambas as espécies são halofílicas crescendo em ambientes com concentrações de NaCl entre 0,5 e 5,0%, no caso do *V. vulnificus*, ou entre 0,5 e 8,0%, no caso do *V. parahaemolyticus*, apresentando uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com concentrações de 2,5% %, no caso do *V. vulnificus*, ou entre 3,0%, no caso do *V. parahaemolyticus* (ASAE, 2006).

A Cólera é uma infeção intestinal aguda que conduz a uma rápida e severa diarreia desidratante e é causada pelo serogrupo O1 e O139 de *Vibrio cholerae*. Estima-se que, globalmente, existam 1,3 a 4 milhões de casos por ano com um total de 21 000 a 143 000 mortes, contudo, cerca de 80% dos casos é eficazmente tratado com soluções de rehidratação oral. Providenciar tratamento de águas, correta sanitização e águas seguras é um ponto crítico para controlar a transmissão de cólera e de outras doenças provenientes do meio aquático (Domman et al., 2017; WHO, 2019).

Como referido acima, *Vibrio vulnificus* pode causar infeções tanto em pessoas que ingerem alimentos provenientes de águas contaminadas como através da exposição de feridas abertas a águas onde este resida, especialmente nos meses quentes. As infeções por *V. vulnificus* são caracterizadas por um curto período de incubação entre a primeira demonstração dos sintomas e o resultado clínico subsequente, normalmente 24 h após exposição. Uma vez que esta bactéria é capaz de causar infeções tão severas, como septicemia e infeções em feridas, que podem necessitar de amputação, é essencial uma terapêutica antimicrobiana célere, assim como uma rápida e precisa identificação deste microrganismo, especialmente em indivíduos em que se

suspeite existirem outras condições de risco subjacentes. O tratamento é cada vez mais desafiante, uma vez que *V. vulnificus* começou a desenvolver resistência contra certos antibióticos devido ao uso indiscriminado destas substâncias (Baker-Austin & Oliver, 2016; Heng et al., 2017).

No caso do *V. parahaemolyticus* o tempo de incubação varia entre 4 e 96 h (tempo médio de 15 h). Este microrganismo causa normalmente um quadro de gastroenterite moderada, com cólicas abdominais e diarreia aquosa, que podem ser acompanhadas por febre, náuseas e vômitos (Lawley et al., 2008).

#### 2.2.10. *BACILLUS SPP.*

O género *Bacillus* é um grupo de bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos, em forma de bastonete, entre as quais existem algumas espécies, maioritariamente o *Bacillus cereus*, capazes de provocar doenças de origem alimentar (figura 2.12). O *B. cereus* encontra-se naturalmente nos solos, água e trato gastrointestinal do Homem e de animais, podendo contaminar alimentos como vegetais, leite, carne, fruta, arroz e especiarias (Cameán et al., 2006; Lawley et al., 2008).



**Figura 2.12-** Imagem representativa da bactéria *B. cereus*. (Fonte:

<https://www.foodsafetynews.com/2018/12/australian-scientists-discover-how-to-fight-bacillus-cereus-bacteria/>, visitado em Setembro de 2020)

A intoxicação alimentar por *B. cereus* é causada por toxinas produzidas durante o seu crescimento: A toxina emética, resistente à temperatura elevada, à proteólise e a valores de pH entre 2,0 e 11,0, e a toxina diarreica, termolábil, instável a pH < 4,0 e sensível à ação das proteases digestivas. Ambas as formas de intoxicação alimentar exigem que as bactérias atinjam números elevados nos alimentos (geralmente >10<sup>5</sup> UFC/g), para que a doença possa ser produzida. A intoxicação mais comum é a emética, provocada pela ingestão da toxina pré-formada. Esta forma de intoxicação tem um período de incubação entre 0,5 e 6 h, e um quadro

de sintomas que inclui vômitos, náusea e, raramente cólicas abdominais e diarreia. O arroz torna-se um alimento particularmente problemático devido a poder conter esporos de *B. cereus* que não são destruídos à temperatura de confeção. A manutenção do arroz cozido à temperatura ambiente pode permitir a germinação dos esporos e a produção da toxina termoestável (toxina emética) que permanece mesmo após o reaquecimento. Pelo contrário, a intoxicação diarreica implica a ingestão de células viáveis e a produção e libertação intestinal da toxina. Nestes casos, os sintomas aparecem normalmente 6 a 24 h após a ingestão e incluem diarreia aquosa e cólicas abdominais e, muito raramente, náuseas e vômitos (Cameán et al., 2006; Lawley et al., 2008).

A temperatura ótima de crescimento do *B. cereus* situa-se entre os 30 e os 40 °C, embora nalgumas estirpes possa ser mais elevada (50 a 55 °C). Algumas estirpes são psicrotróficas. A temperatura ótima de produção de enterotoxina emética situa-se entre 25 e 30 °C. As células vegetativas são facilmente destruídas pelo calor, enquanto que os esporos são moderadamente resistentes. O *B. cereus* suporta valores de pH entre 5,0 e 9,3, cresce valores de aw mínimos entre 0,92 e 0,95, não suportando concentrações de NaCl superiores a 7,5%. Os esporos resistem por longos períodos em alimentos desidratados (ASAE, 2007i).

### **2.3. OCORRÊNCIA DE TOXINFEÇÕES ALIMENTARES NA UNIÃO EUROPEIA**

Os registos e notificações de casos de doença provocados por géneros alimentícios constituem apenas parte de todas as ocorrências reais. A probabilidade de que um caso de toxinfecção seja reconhecido e notificado pelas autoridades de saúde depende, de entre vários factores, da participação dos consumidores, do registo por parte das autoridades médicas e das acções desenvolvidas pelas entidades nacionais com responsabilidade de vigilância sanitária (Forsythe, 2013).

O sistema atualmente em vigor em que são reportados os dados relativos à ocorrência de zoonoses, agentes zoonóticos, resistência antimicrobiana e surtos de toxinfecção alimentar por parte dos Estados-Membros é designado *European Union Food-borne reporting System* (EUFORS) e foi implementado em 2010.

Como Correia et al. (2019) afirmam, num artigo publicado no Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, “neste sistema os surtos são classificados em categorias de acordo com o nível de incerteza associado à identificação de um potencial veículo alimentar, fatores contributivos e agentes causais. Esta categorização da força da evidência dos surtos, baseia-se na consistência das provas que implicam um veículo alimentar suspeito como a causa do surto, e é feita através da avaliação de todos os tipos de evidência relacionados com a informação sobre a doença e a exposição (microbiológica, epidemiológica, descritiva, ambiental ou baseada na rastreabilidade dos géneros alimentícios investigados)”.

A deteção do agente causal no veículo alimentar consumido, nos seus componentes ou ainda na cadeia ou ambiente da produção alimentar, combinada com a deteção, desse mesmo agente causal, nos humanos afetados ou com a manifestação de sintomas clínicos fortemente compatíveis com o agente causal identificado é a evidência microbiológica que suporta a hipótese do surto ser de origem alimentar (EFSA 2014; EFSA & ECDPC, 2018).

À Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) compete analisar os dados reportados anualmente e publicá-los sob a forma de relatórios em cooperação com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) que fornece e analisa os dados relativos às toxinfeções alimentares e às infeções zoonóticas nos humanos (Correia et al., 2019).

Apesar destes relatórios produzidos pela EFSA e pelo ECDC, procurarem ilustrar a situação na União Europeia (UE) no que se refere à presença de microrganismos zoonóticos na cadeia alimentar e à prevalência de infeções em várias populações animais (incluindo galinhas, perus e suínos) e nos humanos, assim como de surtos de doença provocados pelo consumo de alimentos contaminados, estes dados devem ser interpretados com cuidado, uma vez que os sistemas de vigilância, monitorização e reporte não estão harmonizados entre os diferentes Estados-Membros, contribuindo para uma subnotificação substancial e muito variável (EFSA & ECDPC, 2018; Correia et al., 2019).

Apesar de a Organização Mundial da Saúde (OMS) evidenciar, que a nível mundial, a Europa é a região em que o peso económico das doenças de origem alimentar é mais baixo, só anualmente na UE são reportados mais de 320 000 casos de doenças zoonóticas em humanos, estimando-se que exista um subdiagnóstico e uma subnotificação consideráveis, dado que apenas uma pequena fração das que ocorrem na realidade chega ao conhecimento das autoridades de saúde pública responsáveis pela vigilância das doenças de origem alimentar (EFSA & ECDPC, 2018; WHO, 2015).

Analisa-se, de seguida, os últimos três relatórios disponíveis da EFSA, relativos às zoonoses reportadas nos anos de 2016, 2017 e 2018. Nestes três anos a campylobacteriose foi a zoonose mais comumente reportada, mantendo a tendência desde 2005, representado cerca de 70% de todos os casos reportados. A campylobacteriose foi seguida de outras doenças bacterianas como salmonelose, infeção por estirpes patogénicas de *Escherichia coli*, yersiniose e listeriose (EFSA & ECDC, 2017; EFSA & ECDC, 2018; EFSA & ECDC, 2019).

A severidade destas doenças foi analisada com base no número de hospitalizações e de mortes associadas aos casos reportados (tabela 2.5). Com base na severidade, a listeriose for a zoonose mais severa, com a maior taxa de hospitalização e taxa de mortalidade mais elevada (EFSA & ECDC, 2017; EFSA & ECDC, 2018; EFSA & ECDC, 2019).

**Tabela 2.5.** Resumo dos casos confirmados, hospitalizações e mortes reportadas devido a zoonoses confirmadas em humanos, entre 2016 e 2018 (EFSA & ECDC, 2017, 2018 e 2019)

Doença	Casos Confirmados			Hospitalizações			Mortes reportadas		
	2016	2017	2018	2016	2017	2018	2016	2017	2018
<b>Campylobacteriose</b>	246 307	246 158	246 571	19 265	20 810	20 948	62	45	60
<b>Salmonelose</b>	94 530	91 662	91 857	12 182	16 796	16 556	128	156	119
<b>Infeção com <i>E.coli</i></b>	6 378	6 073	8 161	940	933	1 151	10	20	11
<b>Yersiniose</b>	6 861	6 823	6 699	521	616	519	5	3	3
<b>Listeriose</b>	2 536	2 480	2 549	962	988	1049	247	225	229
<b>Brucelose</b>	516	378	358	146	104	159	1	1	1

Através da tabela 2.5 pode verificar-se que a listeriose constituiu, com largo avanço, a doença mais severa, com um número de mortes muito superior às zoonoses com ela comparadas, mesmo não sendo das doenças com maior número de casos (taxa de mortalidade de 16,2% em 2016; 13,8% em 2017 e 15,6% em 2018). A seguir à listeriose foi a infeção por *Salmonella* spp. a doença que originou o maior número de fatalidades. A brucelose, destaca-se como tendo sido a doença com menor número de fatalidades, tendo, nos anos em análise, uma morte anual reportada, nos Estados-Membros.

De acordo com o último relatório disponível da EFSA (EFSA & ECDC, 2019), relativo às zoonoses reportadas em 2018, os alimentos mais associados às infeções por bactérias do género *Campylobacter*, foram o leite e a carne de frango.

Em 2018, no âmbito das ações de monitorização de alimentos desenvolvidas pelos diversos Estados-Membros, a carne fresca de frango foi a categoria de alimentos com maior proporção de amostras contaminadas com *Campylobacter* spp. (37,5%, 18 Estados-Membros), seguida de carne fresca de peru (28,2%, 9 Estados-Membros) e da carne de outras aves (23,8%, 8 Estados-Membros). A *Campylobacter* spp. foi detetada em 11 amostras de leite originárias da Alemanha, Itália e Eslováquia, o que representou cerca de 0,6% do total de amostras analisadas. Apenas uma amostra das 1 515 unidades testadas (provenientes de 6 Estados-Membros diferentes) de alimentos de origem não-animal, como fruta ou vegetais, testou positivo para *Campylobacter* spp. (EFSA & ECDC, 2019).

De acordo com os dados disponíveis na UE a infeção com *Salmonella* spp., estabilizou nos últimos 5 anos após um longo período a diminuir. Em 2018, esta bactéria originou em 24 Estados-Membros um total de 1 580 surtos de origem alimentar e um surto de origem de águas contaminadas. A infeção por *Salmonella* spp. foi responsável por cerca de 30,7% de todos os surtos de origem alimentar no ano de 2018, sendo os ovos e ovoprodutos os géneros alimentícios mais associados. Em 2018, no âmbito das ações de monitorização de alimentos

desenvolvidas pelos diversos Estados-Membros, a carne de aves e outras carnes foram os géneros alimentícios com maior número de testes positivos para *Salmonella* spp. (EFSA & ECDC, 2019).

Para a bactéria *Listeria monocytogenes*, causadora da infeção denominada por Listeriose, o número de casos confirmados notificados aumentou em 2018 comparativamente com o verificado em 2017 (tabela 2.5). De acordo com os dados disponíveis o grupo reportado como sendo o mais afetado encontra-se na faixa etária acima dos 64 anos, e particularmente no intervalo de idades acima dos 84 anos. Conforme já referido, o número de casos fatais associado a esta infeção é elevado, o que torna a listeriose uma das mais sérias infeções alimentares sob vigilância na UE. Em 2018, verificaram-se 14 surtos de listeriose relacionados com géneros alimentícios, sendo os “vegetais, sumos e outros produtos derivados” o principal veículo alimentar apontado. Em anos anteriores, a categoria de “alimentos misturadas”, seguida de “peixe e produtos com peixe”, foram as mais envolvidas em surtos de listeriose, seguidas de “vegetais, sumos e outros produtos derivados” e de “crustáceos, marisco, moluscos e produtos derivados”. Em 2018, a ocorrência de amostras de alimentos prontos para consumo contaminados com *L. monocytogenes*, detetados no âmbito das ações de vigilância da segurança dos alimentos na UE, variou de 0,09% para quijos fabricados com leite pasteurizado, até 3,1% para produtos prontos a consumir à base de carne de bovino (EFSA & ECDC, 2019).

As infeções por *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em humanos foi a terceira zoonose mais comumente relatadas na UE e aumentou de 2014 a 2018, tendo sido reportados 8 161 casos confirmados em 2018 (tabela 1.1). O nível mais alto de notificações teve origem na Irlanda, Suécia, Malta e Dinamarca. No total, 48 surtos alimentares e de origem em águas contaminadas, com 381 casos humanos, foram reportados em 2018, na EU, com forte evidência de terem sido causados por queijo, leite, “mistura de carnes vermelhas e produtos derivados”, e “vegetais, sumos e outros produtos derivados”. Sendo que no período de 2010 a 2017 tais surtos foram maioritariamente causados por “carne de bovino e produtos derivados”, seguidos de “vegetais, sumos e outros produtos derivados”, leite e queijos (EFSA & ECDC, 2019).

A **Yersiniose** foi a quarta zoonose relatada com mais frequência em humanos em 2018 com uma tendência estável em 2014–2018. De acordo com os dados disponíveis para a **brucelose**, no ano de 2018 foram reportados 358 casos confirmados, na UE. Apesar da tendência de diminuição, a Grécia, Itália, Portugal e Espanha tiveram o maior número de notificações, somando na totalidade cerca de 70% dos casos de brucelose, na UE. A maioria dos casos confirmados foram hospitalizados, mas em 2018, à semelhança dos dois anos anteriores, só foi registada uma morte (EFSA & ECDC, 2019).

### 3 FERRAMENTAS DE GESTÃO DA SEGURANÇA ALIMENTAR

A segurança alimentar é uma das principais preocupações dos cidadãos, enquanto consumidores, e também dos governadores, como responsáveis pela qualidade e segurança de vida dos cidadãos e das populações pelas quais são responsáveis. Para responder aos desafios da segurança alimentar a UE publicou, em Janeiro de 2000, o Livro Branco que estabelece uma política mais preventiva face a eventuais riscos alimentares. As premissas que constavam neste livro acabaram por dar o mote ao Regulamento (CE) N.º 178/2002, cujo objetivo principal é o de garantir um elevado nível de proteção da saúde humana e animal, com base numa abordagem global integrada ao longo da cadeia alimentar (do prado ao prato), na definição das responsabilidades dos diferentes intervenientes (operadores do setor alimentar, autoridades competentes responsáveis pela vigilância e controlo) e na implementação de um sistema de rastreabilidade ao longo de todas as fases da produção, transformação e distribuição. Mais tarde, em 2004, foi publicado o “Pacote de Higiene” que instituiu requisitos em matéria de higiene dos géneros alimentícios (Dias, 2006). O “Pacote” inclui: o Regulamento (CE) n.º 852/2004 e o Regulamento (CE) n.º 853/2004, relativos à higiene dos géneros alimentícios e os Regulamentos (CE) n.º 882/2004 e (CE) n.º 854/2004, entretanto revogados pelo Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de março de 2017, relativos à actuação das autoridades de controlo oficial.

De acordo com o artigo 2º, do Regulamento (CE) n.º 882/2004 de 29 de Abril, entende-se por Controlo Oficial, “qualquer forma de controlo que a autoridade competente ou a Comunidade efetue para verificar o cumprimento da legislação em matéria de alimentos para animais e de géneros alimentícios, assim como das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais”. Essa verificação pode ser feita através de uma ou mais das seguintes formas de controlo: controlo de identidade, controlo físico, controlo documental, inspeção, auditoria, acompanhamento, vigilância, verificação e amostragem para efeitos de análise. No Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho encontram-se dispostas as regras para a realização e para o financiamento de controlos oficiais. De modo a aplicar a legislação são implementados e executados pelas autoridades competentes de cada estado membro, planos de Controlo e Vigilância que visam assegurar o cumprimento da legislação em matéria de segurança ao longo de toda a cadeia de produção e distribuição de géneros alimentícios.

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 852/2004, “Os operadores do sector alimentar são os principais responsáveis pela segurança dos géneros alimentícios,” e esta segurança é garantida através de uma abordagem preventiva resultante da aplicação geral dos procedimentos

baseados nos princípios da Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) e associados à observância de Boas Práticas de Higiene (BPH). Esta exigência legislativa significa que todos os operadores do setor alimentar deverão implementar BPH em combinação com o HACCP, alicerçando-se este sistema na implementação de programas de pré-requisitos que garantam a produção de géneros alimentícios seguros, isto é, que não constituam um risco para a saúde do consumidor (Correia et al., 2019).

### 3.1. ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS DE CONTROLO CRÍTICOS (HACCP)

O HACCP é um sistema preventivo que tem como objetivo garantir a idoneidade dos géneros alimentícios através da identificação dos perigos associados ao seu manuseamento e das medidas adequadas ao seu controlo. É assim percebido como uma ferramenta de análise e prevenção de perigos ligados a toda a cadeia de processamento do alimento e não apenas relativo ao produto acabado.. Este sistema de autocontrolo pode ser aplicado ao longo de toda a cadeia alimentar, desde a produção primária até ao consumidor final e a sua implementação deve ser orientada por evidências científicas dos perigos para a saúde pública. Qualquer sistema de HACCP deve ser revisto, caso surjam alterações nos equipamentos, procedimentos ou desenvolvimentos técnicos. Desde 1986 que o Comité do Codex Alimentarius, recomenda às empresas alimentares, a aplicação de sistemas de autocontrolo baseados nos princípios do sistema de HACCP (Mortimore & Wallace, 2013).

Em termos de enquadramento legal, em Portugal, o Regulamento (CE) nº 852/2004 estabelece a implementação bem sucedida dos princípios HACCP ao setor alimentar, e o Decreto-Lei nº 113/2006, estabelece a obrigatoriedade da aplicabilidade do Reg nº852/2004 e define a ASAE como a entidade com poderes de fiscalização.

Para o estabelecimento de um plano de HACCP existem 5 etapas preliminares (Figueiredo & Costa Neto, 2001):

- i) **Constituição da equipa responsável:** a equipa deve ter uma formação multidisciplinar. As pessoas devem estar familiarizadas com os produtos e os seus métodos de elaboração. As pessoas integrantes da equipa devem ter poder de liderança, responsabilidade, conhecimentos e experiência na empresa. O líder da equipa deve ter treino e conhecimento suficiente em HACCP. O foco do estudo deve ser definido, sabendo-se quais etapas da cadeia produtiva que devem ser envolvidas. Podem ser incluídos consultores externos.
- ii) **Descrição do produto:** a descrição do produto deve ser feita de modo detalhado, incluindo as suas características gerais (composição, estrutura, etc.); Características físico-químicas (pH, viscosidade, actividade da água, temperatura e modo

de conservação, aditivos, etc.); Características microbiológicas; Informação ao nível da rotulagem (tempo de vida, instruções de conservação e modo de preparação); Condições de armazenamento e distribuição.

**iii) Identificação do uso:** deve identificar-se qual o público-alvo do produto e refletir sobre as condições de utilização por parte do consumidor, nomeadamente, sobre se podem existir consumidores particularmente sensíveis ao produto e se a descrição do género alimentício e do seu modo de preparação exclui a possibilidade de um uso indevido por parte do consumidor, bem como avaliar o risco resultante do uso indevido.

**iv) Construção do fluxograma:** deve figurar como um diagrama simples, que forneça uma ideia geral do processo realçando a localização dos perigos potenciais identificados. É importante não negligenciar nenhuma etapa que possa afetar a segurança do alimento.

**v) Confirmação no local das etapas descritas no fluxograma:** após elaboração do diagrama simplificado das etapas, deve-se efetuar a inspeção no local, verificando a concordância das operações verificadas com a sua descrição teórica. Esta etapa irá assegurar que os principais passos do processo terão sido identificados e possibilitar os ajustes necessários. É uma fase essencial que deverá ser efetuada na unidade produtiva em causa durante o período de funcionamento normal da mesma .

Já o plano HACCP, em si, assenta em 7 princípios:

1) **Análise de Perigos:** A realização da análise de perigos, pressupõe a identificação dos potenciais perigos químicos, físicos e microbiológicos, associados a todas as fases do processo e na identificação das medidas preventivas que os possam evitar. De mãos dadas com a análise dos perigos está a avaliação do risco, em função da probabilidade de ocorrência e da severidade do perigo identificado, no sentido de determinar a significância dos mesmos. Apenas os perigos considerados significativos são levados à “árvore de decisão” para identificação de pontos críticos de controlo (PCC). Em relação aos perigos biológicos e mais concretamente às bactérias, a severidade é normalmente classificada em três níveis: severidade alta, média e baixa (tabela 3.1).

**Tabela 3.1-** Exemplos de classificações de perigos quanto à sua severidade (Adaptado de Baptista et al., 2003)

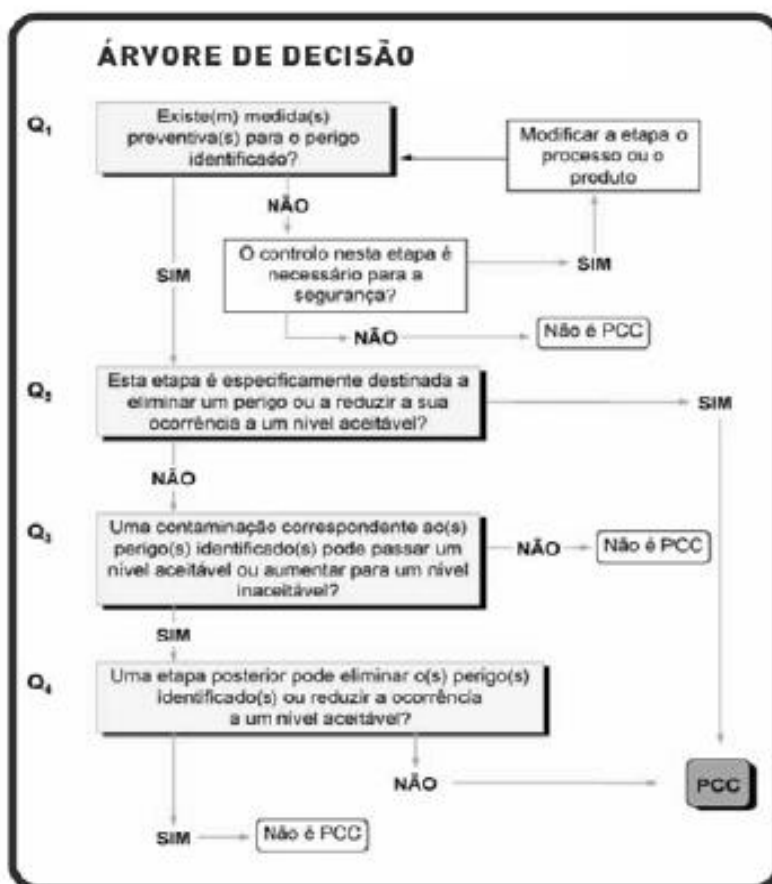
Severidade	Descrição	Exemplos
Alta (3)	Efeitos graves para a saúde, obrigando a internamento ou podendo inclusive provocar a morte.	<i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> A e B, <i>V. cholerae</i> , toxina do <i>C. botulinum</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 (estirpes enterohemorrágicas)
Média (2)	A patogenicidade mais baixa. Os efeitos podem ser revertidos por atendimento médico, no entanto podem incluir hospitalização;	<i>Salmonella</i> spp, estirpes patogénicas de <i>E. coli</i> com excepção das estirpes enterohemorrágicas
Baixa (1)	Causa mais comum de surtos, com disseminação posterior rara ou limitada. Relevantes quando os alimentos ingeridos contêm uma grande quantidade de patogénicos, podendo causar indisposição e mal estar, podendo ser necessário atendimento médico.	<i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i> tipo A, <i>S. aureus</i> .

O risco é também uma função da probabilidade de um perigo ocorrer num processo e afectar a segurança do alimento. A avaliação da probabilidade pressupõe uma análise estatística. À semelhança do efetuado para a avaliação da severidade, devem estabelecer-se níveis para a probabilidade, sendo que os respectivos limites deverão ter uma quantificação associada (por exemplo: número de ocorrências por ano, com base nas ocorrências/histórico da organização ou com base em dados epidemiológicos), mesmo quando expressos de uma forma qualitativa. Normalmente, a probabilidade de ocorrência de um perigo é classificada em três níveis: elevada (3), média (2), baixa (1). O produto da probabilidade pela severidade permite identificar a significância de um perigo. Quando se utiliza a classificação de 1 a 3, são considerados significativos os perigos cujo produto da classificação da severidade pela classificação da probabilidade seja maior ou igual a 3 (figura 3.1).

Probabilidade	Alta (3)			
	Média (2)			
	Baixa (1)			
		Baixa (1)	Média (2)	Alta (3)
		Severidade		

**Figura 3.1-** Mapa de severidade *versus* probabilidade das ocorrências – identificação de perigos significativos (exemplo) (Adaptado de Baptista et al., 2003).

2) **Determinação dos Pontos Críticos de Controlo (PCC's):** Por forma a determinar os pontos críticos de controlo que podem ser controlados para eliminar o perigo ou minimizar a probabilidade da sua ocorrência pode recorrer-se a uma “árvore de decisão”. Estas árvores fornecem à equipa de HACCP uma aproximação sistemática e lógica para a determinação dos PCC's, uma das árvores mais utilizadas é a desenvolvida pelo *Codex Alimentarius* (figura 3.2).



**Figura 3.2-** Árvore da Decisão. Q) Questão; PCC) Ponto crítico de controlo. (Adaptado de Baptista et al., 2003).

3) **Estabelecimento dos Limites Críticos:** Para cada PCC devem ser estabelecidos os respetivos Limites críticos. Estes limites representam os valores ou critérios que diferenciam a aceitabilidade da não aceitabilidade. Estes parâmetros deverão ser fixados em relação às diversas características que definem a especificidade e a qualidade do produto: físicas, químicas, microbiológicas, sensoriais.

4) **Estabelecimento de um sistema de Monitorização:** Implica a realização de uma sequência planeada de medições dos parâmetros de controlo para avaliar o cumprimento dos limites críticos. O sistema de monitorização permite detetar a perda de controlo dos PCC e fornece atempadamente informação que possa desencadear medidas correctivas para repor a conformidade e isolar os produtos produzidos durante o período que violou os limites.

5) **Estabelecimento de Ações Correctivas:** São acções a desencadear imediatamente, assim que o sistema de vigilância revele um incumprimento num qualquer dos PCC's. Para cada um desses pontos deverá estar prevista: qual a reacção imediata a tomar, as medidas para eliminação desse risco, as medidas para a correcção da situação observada e as medidas necessárias à gestão dos produtos cuja qualidade tenha sido eventualmente afectada.

6) **Estabelecimento de Procedimentos de Verificação:** Tem como objetivo a aplicação de métodos, procedimentos, testes e outras avaliações que permitam confirmar o cumprimento e a eficácia do plano de HACCP: Correcta determinação dos PCC; Correcto estabelecimento dos limites críticos; Adequada monitorização Implementação das medidas correctivas necessárias; Validação e determinação da capacidade do sistema implementado para satisfazer o controlo efectivo das exigências de segurança impostas ao produto

7) **Estabelecimento de documentação e Registo:** É essencial para uma aplicação eficiente do sistema HACCP, a existência de um sistema documental, rigoroso e de fácil utilização. Este sistema deverá incluir dois tipos de documentos: Documentos específicos (metodologias operacionais, instruções de trabalho, descrições da aparelhagem usada e dos procedimentos a adoptar, etc.) e Documentos que constituem o Plano HACCP (todos os registos, incluindo relatórios, resultados de observações e análises realizadas (matérias primas, produtos finais, etc.), relatórios de ocorrências anormais, resumos das decisões tomadas, etc.).

### 3.2. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS

A relevância e reconhecimento da importância da prevenção das doenças de origem alimentar e a preocupação com a segurança microbiológica dos alimentos, aumentou, impulsionando o desenvolvimento de métodos analíticos. Foi então há 50 anos que se começou a sentir a necessidade de estabelecer critérios microbiológicos (CM), para dar resposta à crescente atenção e preocupação com a saúde pública. O Professor António Mário Ribeiro, em 1974, foi quem publicou os primeiros valores-guia denominados “Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses” para que os resultados microbiológicos fossem passíveis de serem interpretados, tendo em conta diferentes grupos de géneros alimentícios, crus e processados, de origem animal e vegetal. Estes valores-guia constituíram um contributo fundamental para que a realidade nacional padecesse de um instrumento adaptado a esta, numa época em que ainda não existia qualquer regulamentação para este tipo de produtos. Em 1997, o *Institute of Food and Technology* do Reino Unido publicou o “*Development and use of microbiological criteria for foods*” para responder à necessidade de se estipularem limites críticos nos sistemas HACCP, verificar o seu cumprimento e fornecer informação em estudos de estabelecimento do prazo de vida útil e de avaliação do risco (Saraiva et al., 2019).

Os Critérios Microbiológicos afiguram-se como uma ferramenta de gestão de risco, utilizada a nível mundial para garantir a segurança dos alimentos para consumo. De acordo com Saraiva et al. (2019), os CM podem ser:

1) **Leis e Regulamentos** – contidos em legislação internacional, nacional, regional e regulamentos. De cumprimento obrigatório, as autoridades competentes verificam a sua aplicação. O seu incumprimento dá origem à aplicação de sanções. Indicam o máximo aceitável/admissível de microrganismos de um determinado grupo que pode estar presente num determinado alimento de modo a que seja assegurada a proteção do consumidor. Esta determinação deve ser efetuada utilizando um método definido (método de análise de referência) e um plano de amostragem estabelecido, para uma determinada categoria de alimentos. Um exemplo são os critérios estipulados no Regulamento (CE) N.º 2073/2005, que estabelece os critérios microbiológicos para que assegurem a segurança dos géneros alimentícios, a higiene dos processos e ainda as regras em matéria de amostragem e preparação de amostras para análise.

2) **Especificações Microbiológicas** – aplicáveis a produtos crus, ingredientes, produtos semiacabados ou ao produto final constituindo um acordo contratual. Dizem respeito a trocas comerciais e estabelecem os atributos de qualidade e segurança que um comprador deve/pode exigir a um fornecedor/vendedor, para um determinado produto.

De forma similar com as Leis e Regulamentos, também indicam um valor máximo aceitável/admissível de microrganismos. Podem incluir microrganismos indicadores ou de alteração, patogénicos e toxinas e pretendem garantir a segurança do produto ou a sua qualidade até à data limite de consumo, sendo frequentemente mais rigorosos do que a legislação. Podem ser de cumprimento obrigatório ou constituir apenas uma recomendação.

3) **Valores-guia** – os menos restritivos em comparação com os critérios anteriormente apresentados, uma vez que são recomendações sem estatuto legal, nem vínculo contratual, podendo por vezes anteceder o estabelecimento de um regulamento. Podem ser encarados como linhas orientativas para que se avalie a qualidade microbiológicas dos produtos, ou processos, geralmente estabelecidos por produtores, associações comerciais ou entidades governamentais. Os valores-guia não estabelecem planos de amostragem nem métodos de análise mas definem sim, limites microbiológicos para os géneros alimentícios em questão e combinações de parâmetros microbiológicos. Os valores indicados neste tipo de CM não possuem obrigatoriedade de cumprimento. Apresentam-se como uma ferramenta que avalia os processos de produção e conservação dos alimentos prontos para serem consumidos, produtos intermédios de fabrico ou de matérias-primas e permitem que se verifiquem as Boas Práticas de Higiene e Fabrico e que as datas estipuladas para o consumo dos produtos, estão sob controlo, dando aso a que os produtos obtidos sejam inócuos do ponto de vista microbiológico. Os valores-guia dizem-nos também se os ensaios microbiológicos possuem resultados com níveis aceitáveis (habitualmente) e, deste modo, possibilitam analisar tendências que identificam situações esporádicas que se encontrem fora dos parâmetros, alertando para a necessidade de implementar medidas corretivas adequadas. Como não estão regulamentados acompanham as evoluções científicas, podendo ser rapidamente modificados e atualizados.

Na legislação europeia não existem critérios microbiológicos para as refeições prontas a consumir. Neste sentido, e após muitos anos de estudos de amostras colhidas em restauração coletiva, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) estabeleceu valores guia no que respeita aos critérios microbiológicos dos alimentos (Santos et al., 2005). Estes critérios, posteriormente revistos e atualizados (Saraiva et al., 2019), são reconhecidos a nível nacional e servem de base ao controlo de qualidade da restauração. Os valores-guia podem ser utilizados para interpretar, no âmbito de programas de vigilância microbiológica, os resultados de ensaios microbiológicos obtidos em amostras de alimentos prontos para o consumo e em superfícies do

ambiente de preparação e distribuição alimentar incluindo as mãos das pessoas em contacto direto com os géneros alimentícios, aplicável em estabelecimentos e instituições onde se preparam e/ou servem alimentos, refeições e bebidas que, por norma, são consumidos fora de casa como os que abreviadamente são definidos como setor HoReCa (Hotel/Restaurante/*Catering* ou Café ou Cantina), mercados, entre outros. Podem também ser utilizados para avaliar o resultado de ensaios para microrganismos patogénicos em todos os ambientes de produção, preparação e distribuição alimentar, incluindo casas particulares (Saraiva et al, 2019).

Os valores guia definidos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) identificam 4 grupos de alimentos prontos para consumo (tabela 3.2) e apontam limites para a presença de diversos microrganismos em cada um desses grupos, definindo valores considerados satisfatórios, não Satisfatório e não satisfatório/potencialmente perigosos (tabela 3.3).

**Tabela 3.2-** Grupos de alimentos prontos para consumo (adaptado de Saraiva et al., 2019)

<b>Grupo 1</b>	Alimentos que sofreram tratamento térmico
<b>Grupo 2</b>	Alimentos compostos de alimentos totalmente cozinhados/pasteurizados, adicionados de componentes crus, ou carne ou peixe crus, prontos para consumo
<b>Grupo 3</b>	Frutos e produtos hortícolas crus
<b>Grupo 4</b>	Alimentos ou seus componentes contendo flora específica própria

**Tabela 3.3.** - “Valores-guia INSA”- microrganismos patogénicos e toxinas em alimentos prontos para consumo (adaptado de Saraiva et al., 2019).

Microrganismos Patogénicos e Toxinas	Resultado		
	Contagem (UFC/g ou UFC/mL) ou Pesquisa (em 25 g)		
	Satisfatório	Não Satisfatório	Não satisfatório/ potencialmente perigoso
<i>Bacillus cereus</i> <sup>2</sup>	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> – ≤10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>
Outros <i>Bacillus</i> spp. patogénicos	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> – ≤10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
<i>Estafilococcus coagulase positiva</i>	<10	10 <sup>2</sup> – ≤10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não detetado	Detetado	>10 <sup>2</sup>
<i>Campylobacter</i> spp.	Não detetado	NA	Detetado
Enterotoxina estafilocócica	Não detetado	NA	Detetado
<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica (VTEC)	Não detetado	NA	Detetado
<i>Escherichia coli</i> (EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, DAEC)	Não detetado	NA	Detetado
<i>Salmonella</i> spp.	Não detetado	NA	Detetado
<i>Shigella</i> spp.	Não detetado	NA	Detetado
<i>Vibrio cholerae</i>	Não detetado	NA	Detetado
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Não detetado	NA	Detetado
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Não detetado	NA	Detetado

NA) Não Aplicável; UFC) unidades formadoras de colónias; EPEC) *E. coli* enteropatogénica; ETEC) *E. coli* enterotoxigénica; EIEC) *E. coli* enteroinvasiva; EAEC) *E. coli* enteroagregativa; DAEC) *E. coli* de aderência difusa.

### 3.3. VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR

De acordo com a **Diretiva 2003/99/CE** do parlamento europeu e do conselho de 17 de novembro de 2003, publicada no Jornal Oficial da União Europeia, relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos, reitera que a protecção da saúde humana contra doenças e infecções directa ou indirectamente transmissíveis entre os animais e o homem (zoonoses) é de importância primordial e como tal foi estabelecido um sistema de vigilância de certas zoonoses a nível dos Estados-Membros e da Comunidade.

Com o auxílio do Laboratório de Referência Comunitário para a epidemiologia das zoonoses, a Comissão recolhe todos os anos dos Estados-Membros e compila os resultados da vigilância. Esses resultados têm sido publicados anualmente desde 1995 e proporcionam uma base para a avaliação da situação actual em matéria de zoonoses e agentes zoonóticos. No entanto, os sistemas de recolha de dados não estão harmonizados e não permitem, portanto, comparações entre Estados-Membros.

A recolha destes dados sobre a ocorrência de zoonoses e agentes zoonóticos nos animais, nos alimentos para animais e no homem é necessária para determinar as tendências e origens das zoonoses, para que se possam evitar ou minimizar uma vez que as zoonoses transmissíveis através dos géneros alimentícios podem provocar não só sofrimento no Homem como também perdas económicas nos setores da produção alimentar e da indústria alimentar.

Em Portugal, o Sistema de Vigilância de Doenças de Declaração Obrigatória, atualmente designado SINAVE (Sistema de Informação Nacional de Vigilância Epidemiológica), destina-se a fornecer às Autoridades de Saúde Locais, Regionais e Nacional a capacidade de monitorizar a ocorrência e disseminação de um conjunto de doenças, incluindo muitas toxinfecções bacterianas. Assim, entre as doenças de notificação obrigatória encontra-se o botulismo, brucelose, campilobacteriose, cólera, salmoneloses não Typhi e não Paratyphi, shigelose, infeção por *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (VTEC), listeriose, yersiniose e febre tifoide e paratifoide. O Sistema de Vigilância de Doenças de Declaração Obrigatória permite identificar as tendências a nível regional e nacional da ocorrência destas doenças e monitorizar a necessidade e impacto dos programas nacionais de prevenção e controlo, bem como agregar os dados necessários para reportar às organizações internacionais como a OMS ou o ECDC (Gaspar et al., 2017).

De acordo com os últimos dados publicados, no ano de 2016 verificou-se, comparativamente com o ano anterior, um grande aumento de casos notificados de campilobacteriose e salmoneloses não Typhi e não Paratyphi, uma diminuição de casos notificados de shigelose e yersiniose e um reduzido número de casos notificados de botulismo (Gaspar et al., 2017).

## **4. PERIGOS EMERGENTES PARA A SEGURANÇA BACTERIOLÓGICA DOS ALIMENTOS**

Diversas situações têm vindo a ser identificadas como podendo constituir novos perigos para a segurança bacteriológica dos alimentos. Essas situações incluem o aparecimento cada vez mais generalizado de bactérias resistentes a antibióticos, as alterações climáticas, a globalização e o aparecimento de novos microrganismos nos alimentos (patogénicos emergentes). Todas estas questões serão abordadas no presente capítulo.

### **4.1. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS**

Os antibióticos são substâncias que matam ou inibem o crescimento de microrganismos, e são vistos como uma das maiores contribuições do séc. XX para a medicina e humanidade (Davies & Davies, 2010). Os antibióticos são utilizados para tratar um grande espectro de doenças infecciosas causadas por bactérias, tanto em animais como em humanos (O'Bryan et al., 2018).

A resistência antimicrobiana de bactérias patogénicas é, não só, um crescente problema para a saúde humana como também um peso financeiro para os sistemas de saúde. Como O'Bryan (2018) retrata, apenas nos Estados Unidos da América, o custo estimado relacionado com infeções resistentes a antibióticos, excede os 20 mil milhões de dólares, por ano.

A maioria das resistências adquiridas é atribuída ao uso inapropriado de antibióticos em humanos, ainda assim, há um aumento de evidências que apontam que o uso de antimicrobianos nos animais seja responsável pela transmissão, a humanos, de patogénicos alimentares resistentes, através de alimentos contaminados (White et al., 2002).

Ainda que a quantidade total de agentes antimicrobianos utilizada em cada país não seja conhecida, quantidades substanciais de antimicrobianos são utilizados na produção de gado e de galináceos. Além disso, a prática de aplicações não direccionadas destes fármacos em animais para consumo, tanto para propósitos terapêuticos como para propósitos não terapêuticos contribui para a prevalência de bactérias resistentes, presentes nestes animais que, mais tarde, irão ser consumidos. Globalmente, há cada vez mais evidências de que as bactérias patogénicas resistentes a antibióticos estão a entrar na cadeia alimentar humana, através da carne dos animais tratados regularmente com antibióticos (Anderson et al., 2004; Schroeder et al., 2004).

Este problema afeta a saúde humana uma vez que muitos dos antimicrobianos utilizados na produção animal e nas terapêuticas humanas são análogos. O uso de antibióticos análogos, também usados nas terapêuticas humanas pode seleccionar fenótipos resistentes de patogénicos alimentares que podem causar mais doenças bacterianas resistentes a antibióticos, em humanos.

Números crescentes de estirpes patogénicas de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. estão a ameaçar a saúde humana demonstrando cada vez mais resistência a terapias com antibióticos. Além disso, também certas bactérias comensais não patogénicas, como é o caso de várias espécies do género *Enterococcus* e várias estirpes de *E. coli*, que se encontram nos tratos gastrointestinais humanos e animais, podem também contaminar os alimentos ou providenciar um reservatório de estirpes resistentes a antimicrobianos (O'Bryan et al., 2018).

Muitos dos antibióticos usados atualmente foram desenvolvidos a partir de substâncias produzidas por determinados microrganismos para inibir ou matar os competidores microbianos do seu ambiente. Estas substâncias eram produzidas pelos organismos muito antes dos humanos as começarem a utilizar como antibióticos (Finley et al., 2013).

A maioria dos antibióticos exerce os seus efeitos através de um ou mais de quatro métodos básicos: (1) interferência com a síntese da parede celular; (2) inibição da síntese proteica; (3) interferência com a síntese de ácidos nucleicos e (4) inibição de vias metabólicas (Tenover, 2006). O tipo de resistência que as bactérias desenvolvem antes dos antibióticos ficarem comercialmente disponíveis é conhecida como resistência intrínseca (Raghunath, 2008).

De acordo com a EFSA (2020) *Salmonella* e *Campylobacter* estão a tornar-se cada vez mais resistentes à ciprofloxacina, um dos antibióticos de eleição para tratar infeções causadas por estas bactérias. A conclusão é parte do último relatório sobre resistências antimicrobianas em zoonoses. As últimas informações mostram o isolamento de estirpes de *Salmonella* multi-resistentes (resistem a 3 ou mais antimicrobianos). A resistência a concentrações elevadas deste antibiótico aumentou de uma maneira geral de 1,7% (2016) para 4,6% (2018). Para *Campylobacter*, 16 de 19 países reportaram uma percentagem de resistência à ciprofloxacina muito elevada ou extremamente elevada. Estima-se que as infeções causadas por bactérias resistentes a antibióticos conduzem a cerca de 25 000 mortes, na UE, todos os anos.

O relatório da EFSA de 2017 marcou o primeiro aparecimento detetado de resistência a carbapenema, uma classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com um espectro bactericida muito amplo, sendo normalmente a última opção de tratamento, para pacientes infetados com bactérias multi-resistentes a outros antibióticos disponíveis. Níveis muito baixos de resistência foram observados em bactérias de *E. coli* encontradas em porcos e em carne de porcos (EFSA, 2017). Já o relatório de 2018, lista casos esporádicos de infeções de *Salmonella* spp. em humanos com resistência a carbapenema.

#### **4.1.1. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Existem três tipos de mecanismos bioquímicos através dos quais uma bactéria se consegue defender contra os antibióticos. Uma é alterando as proteínas-alvo de modo a que os antibióticos

não se consigam ligar a elas. As bactérias conseguem também produzir enzimas que decompõem os antibióticos ou que alteram a sua estrutura para prevenir a sua entrada nas células. As bactérias conseguem produzir enzimas que decompõem ou alteram a estrutura das moléculas do antibiótico para o tornar menos eficaz ou completamente ineficaz. As três principais enzimas que inativam os antibióticos são as  $\beta$ -lactamases, enzimas modificadores de aminoglicosídeos e cloranfenicol acetiltransferases (Castanheira et al., 2014; Hur et al., 2012). A utilidade dos antibióticos aminoglicosídeos, que incluem a gentamicina, foi reduzida pelo aparecimento e disseminação destas enzimas que providenciam a resistência a antibióticos (Ramirez and Tolmasky, 2010).

Outro mecanismo de resistência aos antibióticos consiste em adquirir capacidade para os excretar rapidamente do interior celular, de modo a impossibilitar a sua ação. Este mecanismo tem sido encontrado em microrganismos com resistência a múltiplos fármacos e está, frequentemente, associado com sistemas membranares de transporte ativo que reconhecem e bombeiam os antibióticos para fora das células (Fisher et al., 2018).

#### **4.2. ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS**

De acordo com um consenso geral, o clima global está em mudança, o que pode afetar a produção de alimentos. O potencial impacto das alterações climáticas na segurança alimentar é um tema amplamente debatido e investigado (Miraglia et al., 2009).

A Convenção das Nações Unidas nas Alterações Climáticas define alterações climáticas como “uma mudança de clima que é atribuída direta ou indiretamente à atividade humana e que altera a composição da atmosfera global, e que é, em adição à variabilidade natural do clima, observada em períodos de tempo comparáveis”. Além disso, a Convenção define os efeitos adversos das alterações climáticas como mudanças que têm efeitos deletérios nos ecossistemas, nos sistemas socio-económicos, e no bem-estar humano e animal (United Nations, 1994; United Nations, 2012). Um dos principais objetivos da Convenção é o de garantir que a produção alimentar não ficará em perigo devido às alterações climáticas, indicando a importante ligação entre estes dois itens.

As alterações climáticas são prováveis de impactar consideravelmente a segurança alimentar, tanto direta como indiretamente, colocando a saúde pública em risco. A alteração dos padrões de pluviosidade, o aumento de eventos de clima extremo e da temperatura média anual podem afetar a persistência e ocorrência de bactérias e de outros perigos biológicos, como, fungos, vírus, parasitas ou algas prejudiciais, o que pode originar uma alteração dos padrões das toxinfecções alimentares provocadas por estes organismos, e aumentar o risco de contaminações tóxicas. Para além do efeito que podem ter diretamente nos microrganismos, as alterações

climáticas podem originar alterações na pressão das pragas aumentando a necessidade de utilização de agentes fitossanitários, com o possível impacto a nível do aumento de resíduos químicos de pesticidas nas plantas e, consequentemente, nas cadeias alimentares. As alterações climáticas podem contribuir para o aumento global das doenças alimentares, incluindo a subnutrição e as doenças diarréicas e transmitidas por microrganismos (WHO, 2019).

Usando a clássica tríade epidemiológica (hospedeiro, agente e ambiente), torna-se claro que o clima possa ter um efeito dramático nas doenças infecciosas, uma vez que afeta todos os três setores desta tríade. Isto é bem documentado e até mesmo previsível para algumas doenças de origem alimentar nos países subdesenvolvidos (por exemplo, disenteria bacilar, cólera), podendo ter um menor impacto nos países mais desenvolvidos, onde as medidas rigorosas de saúde pública (sistemas de esgotos, saneamento e higiene) moderam o risco de doenças diarréicas. Evidências do impacto das mudanças climáticas na transição de doenças de origem alimentar ou de ingestão de águas contaminadas, provém de diferentes fontes, por ex, sazonalidade de toxinfecções alimentares e diarréicas, mudanças nos padrões das doenças que ocorrem por consequência da temperatura e associações entre o aumento de incidentes de doenças alimentares e de ingestão de águas contaminadas e eventos de clima extremo (Hall et al., 2002).

A produção agrícola é extremamente suscetível às alterações climáticas. Tem sido estimado que as mudanças do clima são responsáveis por reduzir rendimentos e/ou danificar as culturas, no séc. XXI, ainda que, seja expectável a ocorrência de efeitos mais ou menos severos em diferentes regiões do globo (IPCC, 2007). As mudanças climáticas afetam a população microbiana do solo, ar e água, podendo contribuir para a ocorrência e gravidade de doenças bióticas atribuíveis a microrganismos como fungos, bactérias ou vírus. Os fatores abióticos tais como a deficiência de nutrientes e situações extremas de temperatura/humidade afetam também a saúde e produtividade das plantas (Lee-Ann & Marion, 2009).

As alterações climáticas, em particular o aumento da temperatura, pode ter efeitos tanto direta como indiretamente na produção animal. O *stress* do calor pode ter um efeito direto e prejudicial na saúde, crescimento e reprodução. Mudanças no ambiente nutricional (por exemplo, na disponibilidade de alimento para gado ou na quantidade e qualidade dos pastos para consumo animal) podem ter um efeito indireto. Estima-se que estes efeitos sejam mais dramáticos em regiões de temperaturas temperadas. As mudanças climáticas podem afetar as zoonoses de diferentes maneiras. Podem levar ao aumento do ciclo de transmissão de muitos vetores. Em algumas regiões pode resultar no estabelecimento de novas doenças. Mudanças nas práticas de alimentação dos animais de consumo, mudanças na situação ecológica nas quais os animais são criados e aumento da irrigação (tudo consequências das mudanças climáticas) podem aumentar esses efeitos (Lee-Ann & Marion, 2009).

As alterações climáticas têm implicações na segurança alimentar dos produtos da pesca. De uma perspetiva microbiológica, estas alterações aumentam a eutrofização, causando o crescimento de fitoplâncton, aumento da frequência de algas prejudiciais, particularmente de espécies tóxicas. A acumulação destas toxinas em diversas espécies de pescado, especialmente nos moluscos bivalves, acarreta sérias implicações para o Homem. Além disso, um aumento na temperatura das águas promove o crescimento de organismos como *Vibrio vulnificus* conduzindo a um aumento do risco associado ao consumo de peixes provenientes destas águas (Paz et al., 2007).

As alterações climáticas, particularmente o aumento da temperatura média pode ainda aumentar os riscos associados com o armazenamento e distribuição dos produtos alimentares. É assim importante, que a indústria alimentar seja vigilante para a necessidade de modificar os programas de higiene (Lee-Ann & Marion, 2009).

### 4.3. GLOBALIZAÇÃO

Atualmente, o comportamento do mercado alimentar, incluído o comportamento dos consumidores, expressa-se como consequência do desenvolvimento civilizacional e cultural e do contínuo processo de globalização. No século XXI, os processos de globalização, que são influenciados pelo fácil acesso a produtos, são extremamente importantes. Comprar produtos de outras partes do mundo, e expressar um estilo de vida desejado pelos consumidores, contribui para que se estabeleçam determinados padrões de consumo. Por exemplo, depois da popularidade dos alimentos coloridos e saborosos, com uma grande *shelf-life*, os consumidores começaram a apreciar particularmente o que é produzido diretamente pela natureza, produzido sem o recurso a pesticidas ou a antibióticos. Numa altura de produção industrial de alimentos, os produtos naturais produzidos de maneira tradicional ganharam um particular destaque (Hanus, 2018).

Fala-se de globalização em diversos campos da atuação humana: plano económico, político, social e cultural. O facto de corriqueiramente falarmos de globalização, não quer dizer que haja um consenso generalizado quanto à sua caracterização ou à percepção das consequências deste fenómeno. Alguns escritores distinguem três perspetivas diferentes no que aborda a temática da globalização: as formadas pelos **hiperglobalizadores**, pelos **céticos** e pelos **transformadores**. Os primeiros entendem-na como um fenómeno surpreendentemente novo na história, que apenas ocorreu nas últimas décadas desde a unificação da economia mundial, usando como força propulsora a expansão do capitalismo e o desenvolvimento da tecnologia.

Os segundos assumem outra posição, em que é defendido que ainda que possam existir nos dias de hoje mais trocas do que anteriormente, não existe verdadeiramente uma economia

globalizada, uma vez que a maioria das trocas comerciais ocorrem no interior de três grandes grupos regionais: a Europa, a Ásia-Pacífico e a América do Norte. Finalmente, o terceiro grupo, o dos transformadores, assume uma posição equilibrada entre os dois extremos do espectro apresentados anteriormente. Assumem a existência da globalização e compreendem a sua amplitude como algo sem precedente no domínio da economia, mas afirmam que possui outras dinâmicas que não sejam estritamente económicas. A globalização alimentar figura nesta lista de temáticas como um tema recente e menos tratado do que outras dimensões deste processo – a globalização (Sobral, 2016).

Os alimentos e a globalização são inseparáveis. O comércio a longa distância envolve desde há muito, tanto alimentos básicos como produtos de luxo (vinho, o chá, o café, as sedas, o arroz, as especiarias, entre outros itens). Tornar os alimentos mais amplamente disponíveis assegurando o seu acesso global foi um dos motivos que impulsionou as expansões coloniais. Uma das principais áreas a se tornarem globalmente conectadas foi a área dos mercados de alimentos, ligando povos e culturas. As culturas alimentares em mudança foram a característica mais discernível da interação entre práticas que se faziam localmente e as trocas globais. O consumo de alimentos desempenha um papel crucial na construção das identidades locais e nacionais e no autoconhecimento em mudança dos grupos sociais, dos emigrantes e das comunidades étnicas (Nützenadel & Trentmann, 2008).

Se falarmos de uma só globalização, esta começou com a própria viagem do ser humano pelo globo, acompanhado do conhecimento imprescindível para conseguir e confeccionar os alimentos, seguindo-se a domesticação de plantas e animais e sua expansão e a troca de alimentos a grande distância, para finalmente se chegar a um momento, como o atual, em que cozinhas, técnicas e sabores se difundem em todo o globo, podendo encontrar-se diferentes opções culinárias num mesmo local. Existem, contudo, autores que mencionam diversas globalizações da produção e consumo de alimentos e não numa única globalização (Sobral, 2016).

Atualmente, a mudança trazida pela globalização alimentar torna acessível e disponível diferentes géneros alimentícios, o que levanta questões de sustentabilidade, de qualidade e de segurança alimentar para os consumidores. Ainda que esta aproximação dos mercados tenha proporcionado uma grande variedade de acesso a diferentes comidas em muitos sítios, o acesso a comida saudável e de preço acessível não é garantido universalmente, muitas populações apenas têm acesso a comidas mais baratas de pobre valor nutricional. A presença de grandes empresas estrangeiras provoca um aumento no consumo de comidas processadas ocidentais, facto que coloca uma grande pressão nos mercados locais e pequenos produtores. Esta presença influencia grandemente as preferências dos consumidores uma vez que as grandes companhias possuem técnicas de marketing e publicidade avançadas, com estratégias de negócio aliciantes

com as quais os pequenos agricultores não conseguem competir, resultando numa diminuição da segurança alimentar e qualidade no que diz respeito à comida saudável. Esta junção de variáveis cria efeitos adversos na população mundial, cada vez mais orientada para dietas pouco sustentáveis em termos ambientais e de fraca qualidade conduzindo a situações de má nutrição, o que por sua vez leva a situações de doença e pouca produtividade económica, entre outras coisas. Nesta medida a globalização alimentar e de negócios, quando pouco monitorizada ou responsabilizada contribui para a insegurança alimentar e má nutrição (Black, 2016; Santos & Cunha, 2011).

Ainda que numa perspectiva, como a acima exposta, a globalização alimentar possa conduzir a situações desfavoráveis do ponto de vista da segurança alimentar, existe também o reverso da moeda. Em conexão com o processo de globalização e da extrema liberalização das relações económicas diretamente ligadas a este, o aumento da consciência dos consumidores sobre comida e saúde pode ser observada. Os consumidores, cada vez mais, exigem, as ações corretivas necessárias no campo de proteção do status de segurança alimentar, para isso existem iniciativas, que se focam em criar, alterar ou modernizar legalmente, as estruturas organizacionais e de controlo na área da segurança alimentar (Kowalczyk, 2017). Assim temos que a globalização acarreta tanto consequências negativas, como positivas.

#### **4.4. PATOGÉNICOS EMERGENTES**

A aparição (ou emergência) de novos ou inesperados patogénicos nos alimentos, tem sido identificada como uma das mais importantes tendências possíveis de afetar a segurança alimentar nos próximos 50 anos (Tauxe et al, 2010).

Microrganismos emergentes, com relevância nos géneros alimentícios, são aqueles que possuem responsabilidade na crescente incidência e disseminação (nas últimas 2 décadas), de doenças de origem alimentar, numa população, e que apresentam evidências de perigosidade no futuro. Os microrganismos emergentes constituem organismos que já conhecemos e identificamos mas que até à relativamente pouco tempo não identificávamos como ameaças, mas que agora representam agentes etiológicos envolvidos em diversos surtos ou epidemias de doenças alimentares em vários países do mundo, despertando o interesse e a preocupação de médicos, epidemiologistas e profissionais ligados à segurança alimentar (de Sá & Ferreira, 2007; Gonçalves et al., 2017).

As mudanças climáticas podem também ter impacto na emergência ou re-emergência de agentes infecciosos causadores de doença. Os patogénicos emergentes causadores de doenças alimentares são definidos como agentes infecciosos, transmitidos através de vias alimentares, que i) recentemente apareceram numa população, ii) era pensado estarem sob controlo mas

estão agora a ressurgir, ou iii) já existiam mas as suas incidências estão a aumentar rapidamente, assim como o seu alcance geográfico, ou outros fatores. Estão também incluídos nestas definições agentes para os quais a via alimentar de transmissão tenha sido apenas identificada recentemente. Raramente, se alguma vez, um patogénico alimentar emergiu sem uma razão. Existem alguns princípios gerais para os patogénicos emergentes, que estão associados com mudanças nos seguintes setores: (i) ecologia e agricultura, (ii) tecnologia e indústria, (iii) globalização, (iv) comportamento humano e demografia, (v) vigilância epidemiológica, (vi) adaptação microbiológica. É importante reconhecer que a emergência de patogénicos normalmente ocorre como consequência da combinação de dois ou mais fatores específicos. Além disso, a emergência pode ou não ser previsível. Por exemplo, mudanças induzidas pelo clima na deslocação de populações animais podem facilitar a disseminação de um patogénico que, previamente, era de baixa prevalência ou que possuía poucas consequências (Tauxe, 2002; Lee-Ann & Marion, 2009).

Nos últimos anos, *Arcobacter* spp. tem sido identificado como um patogénico emergente mundial em termos de surtos alimentares, tendo a Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) classificado *Arcobacter* como um sério perigo para a saúde humana. Esta bactéria foi isolada e descrita pela primeira vez em tecido fetal de um bovino abortado e, mais tarde em fetos de porco. Este microrganismo está apontado como agente causador de diarreia, mastite e aborto em animais, enquanto causa bacterémia, endocardite, peritonite, gastroenterite e diarreia em humanos (Haenel et al., 2016; Ferreira et al., 2016; Ramees et al., 2017).

As aves de consumo assumem um importante papel enquanto reservatório para *Arcobacter* spp. e como uma fonte principal de propagação da infeção. Tem sido proposto que os intestinos destes animais albergam espécies do género *Arcobacter* e acabem por contaminar os estabelecimentos de abate durante o processamento das carcaças, aumentando assim a probabilidade de uma continuação na cadeia de contaminação (Ho et al., 2008).

Espécies do género *Arcobacter* têm sido recuperadas de uma imensa variedade de alimentos de origem animal, nomeadamente: carne de vaca, porco, leite, marisco, bem como de água e vegetais. As águas e a carne contaminadas desempenham um importante papel na sua transmissão. Nos matadouros, a proveniência de *Arcobacter* tem sido reportada de várias fontes e a sua persistência tem-se mantido mesmo após processos de desinfeção, parecendo assim que os matadouros possam constituir potenciais fontes de contágio (Collado et al., 2010).

As constantes mudanças nos hábitos alimentares humanos conduzem a um crescente número de infeções deste patogénico alimentar na comunidade humana. Uma elevada diversidade genética tem sido reportada entre os isolados de *Arcobacter* recuperados de diferentes partes do mundo (Ferreira et al., 2016). Independentemente da disponibilidade de numerosas técnicas de

isolamento, não há um método standardizado e recomendado para o isolamento de *Arcobacter* spp. Devido a este fator limitante, muitos dos casos importantes podem ficar por detetar, resultando numa subestimação do *status* epidemiológico e da prevalência do microrganismo, complicando também a interpretação dos resultados. São essenciais mais estudos no campo do diagnóstico desta bactéria, para melhorar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico atualmente em prática com o objetivo de contabilizar, identificando corretamente, todos os surtos causados por este microrganismo para que, cada país, possa criar ou atualizar as medidas sanitárias necessárias para que as bactérias não representem um perigo para a saúde humana e animal (Ramees et al., 2014).

Diversos relatórios de diferentes países apontam *Arcobacter* como responsável por infeções alimentares, mas não existe ainda documentação sobre os genes/fatores de virulência que estão diretamente envolvidos na causa da infeção e da patogenicidade deste patogénico. Não só no caso de *Arcobacter* mas para todos os patogénicos emergentes, que outrora não representavam perigo, mas atualmente sim, é de extrema importância estudos que garantam que os genes de virulência são conhecidos para que se possa prevenir a propagação da infeção. Os genomas completos de diferentes espécies dentro do género, precisam de ser analisadas para que se possa tirar uma conclusão sobre os factores de virulência e patogenicidade. Assim, o foco da pesquisa devia ter como alvo, num futuro próximo, desvendar os aspetos desconhecidos de patologia e patogenicidade destes organismos, o que pode pavimentar caminho para o adequado desenvolvimento de estratégias de controlo. Um status exato da situação de incidência de *Arcobacter* na vida animal selvagem está atualmente em falta, o que poderia demonstrar o papel desempenhado por estes animais na cadeia de transmissão. Isto também ajudaria na exploração da epidemiologia detalhada e a saber a real magnitude da infeção, compreendendo os diferentes modos de transmissão e propagação de *Arcobacter*, rastreando a fonte de origem, hospedeiros, e revelando os mecanismos associados com a sua diversidade e continua emergência em humanos e animais. Os profissionais médicos e veterinários podiam então estar alerta para as vias de transmissão para que pudessem alertar sobre práticas de higiene em termos de confeção e condições de abate, para que se pudesse diminuir ou até mesmo eliminar as hipóteses de disseminação destes organismos (Ramees et al., 2017).

## 5. CONCLUSÃO/PERSPETIVAS FUTURAS

As toxinfecções alimentares são uma importante causa de doença em todo o mundo, sobretudo em grupos de risco. Ainda que a OMS evidencie que a nível mundial, a Europa é a região em que o peso económico causado pelas doenças de origem alimentar seja o mais baixo, só anualmente na UE são reportados mais de 320 000 casos de doenças zoonóticas em humanos, ainda que se estime existir um subdiagnóstico e uma subnotificação destas enfermidades, o que deixa espaço para pressupor que o número de casos seja, na realidade, ainda mais elevado.

Tendo em conta os dados mais recentes disponíveis, sobre o ano de 2016, 2017 e 2018, as tendências relativas a casos confirmados e hospitalizações têm apresentado uma tendência para aumentar. A campylobacteriose, zoonose causada pela bactéria *Campylobacter* spp., foi a doença mais comumente reportada, mantendo assim uma tendência de 5 anos em que a campylobacteriose representou cerca de 70% de todos os casos reportados anualmente. Em termos de severidade, a zoonose que causou mais mortes, nestes últimos três anos foi a listeriose, causando 229 mortes em 2018, sendo precedida pela salmonelose com 119.

As toxinfecções alimentares afiguram-se assim, como doenças com contornos evitáveis se sujeitas a um maior rigor por parte de todos os envolvidos na sua cadeia de processamento, desde a recolha e acondicionamento dos alimentos crus ou que servirão de “matéria-prima” ao género alimentício final, até ao consumidor final. A prevenção é uma estratégia útil, que pode fazer a diferença tanto no aparecimento como na gravidade da doença e na forma como evolui, após aparecer. Fazem parte das medidas preventivas as boas práticas agrícolas, as boas práticas de higiene e fabrico e a aplicação do sistema de análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP).

A relevância e reconhecimento da importância da prevenção das doenças de origem alimentar e a preocupação com a segurança microbiológica dos alimentos conduziu-nos a um grande avanço nos métodos de análise, e na criação de regulamentação mundial, europeia e nacional em comparação com o estado da situação à 50 anos atrás. Este trabalho mostra ser imperativo considerar que temos de combater não só as problemáticas que atualmente conhecemos como combater, através da prevenção, aqueles que sabemos, estar em perigo de emergência devido a comportamentos atuais da sociedade, como por exemplo, a resistência a antibióticos devido ao uso inapropriado destes em humanos e animais de consumo ou às alterações climáticas (devido à emissão de gases durante os processos fabris, e ao uso/queima de combustíveis fósseis para produção energética, entre outros), para que possamos manter os géneros alimentícios com a qualidade adequada e diminuir o impacto das doenças de origem alimentar.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

Allos, B. M., & Blaser, M. J. (2010). *Campylobacter jejuni and related species*, p 2793–2802. *Principles and practice of infectious diseases, 7th ed.* Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.

Anderson, M., Sansonetti, P. J., & Marteyn, B. S. (2016). **Shigella diversity and changing landscape: insights for the twenty-first century.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 45.

Anderson, A. D., Nelson, J. M., Baker, N. L., Rossiter, S., & Angulo, F. J. (2004). **Public health consequences of use of antimicrobial agents in agriculture.** *Food safety assurance and veterinary public health*, 3, 173-84.

ASAE (2006) – *Vibrio*. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/vibrio.aspx>, consultado em Setembro de 2020

ASAE (2007a) *Staphylococcus Aureus*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx>, consultado em Abril de 2020

ASAE (2007b) *Clostridium Perfringens*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/clostridium.aspx>, consultado em Agosto de 2020

ASAE (2007c) *Clostridium Botulinum*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/clostridium-botulinum.aspx>, consultado em Agosto de 2020

ASAE (2007d) *Campylobacter jejuni*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/campylobacter.aspx> consultado em Abril de 2020

ASAE (2007e) *E. coli*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx> consultado em Abril de 2020

ASAE (2007f) *Salmonella*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAAA>, consultado em Abril de 2020

ASAE (2007g) *Yersinia*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/yersinia-.aspx>, consultado em Agosto de 2020

ASAE (2007h) – *Shigella Disenteriae*. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/shigella-disenteriae.aspx>, consultado em Agosto de 2020

ASAE (2007i) - *Bacillus cereus*. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/bacillus-cereus.aspx>, consultado em Setembro de 2020

ASAE (2018) **Perigos de origem alimentar**. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>, consultado em Abril de 2020

ASAE (2019) *Listeria*. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/listeria-monocytogenes.aspx>, consultado em Abril de 2020

Baker-Austin, C., & Oliver, J. D. (2016). **Rapidly developing and fatal *Vibrio vulnificus* wound infection**. *IDCases*, 6, 13.

Baker-Austin, C., & Oliver, J. D. (2018). ***Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen**. *Environmental microbiology*, 20(2), 423-430.

Bancerz-Kisiel, A., Szczerba-Turek, A., Platt-Samoraj, A., Michalczyk, M., & Szweda, W. (2018). **Characterisation of ail-positive *Yersinia enterocolitica* of different biotypes using HRMA**. *International journal of food microbiology*, 269, 46-51.

Bancerz-Kisiel, A., Pieczywek, M., Łada, P., & Szweda, W. (2018). **The most important virulence markers of *Yersinia enterocolitica* and their role during infection**. *Genes*, 9(5), 235.

Baptista, P., Noronha, J., Oliveira, J., & Saraiva, J. (2003). **Modelos genéricos de HACCP**. *Forvisão–Consultoria em formação integrada, lda*.

Baptista, P., Gaspar, P. D., & Oliveira, J. (2007). **Higiene e segurança alimentar na distribuição de produtos alimentares**.

Brett, M. M., McLauchlin, J., Harris, A., O'Brien, S., Black, N., Forsyth, R. J., ... & Bolton, F. J. (2005). **A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food**. *Journal of medical microbiology*, 54(8), 769-776.

Bos, J., Smithee, L., McClane, B., Distefano, R. F., Uzal, F., Songer, J. G., ... & Crutcher, J. M. (2005). **Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection**. *Clinical Infectious Diseases*, 40(10), e78-e83.

Botelho, L. G., da Cunha, A. F., Alves, R. G., Fernandes, E. N., de Castilho, N. P. A., & Lelis, V. G. (2018). **Resistência antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros.** *Anais simpac*, 8(1).

Bottone, E. J. (2018). **Yersinia enterocolitica.** *CRC Press*.

Bottone, E. J. (2015). **Yersinia enterocolitica: revisitation of an enduring human pathogen.** *Clinical Microbiology Newsletter*, 37(1), 1-8.

Brynstad, S., & Granum, P. E. (2002). **Clostridium perfringens and foodborne infections.** *International journal of food microbiology*, 74(3), 195-202.

Black, E. (2016). **Globalization of the food industry: Transnational food corporations, the spread of processed food, and their implications for food security and nutrition.** Independent Study Project (ISP) Collection. 2353.

Cameán, A. M., Mellado, E., & Repetto, M. (2006). **Contaminantes biológicos.** in Cameán, A., & Repetto, M. (Edts) *Toxicología Alimentaria*. Ediciones Diaz de Santos. Madrid, Espanha, ISBN:84-7978-727-9, 251-272.

Castanheira, M., Farrell, S. E., Krause, K. M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2014). **Contemporary diversity of  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae in the nine US census regions and ceftazidime-avibactam activity tested against isolates producing the most prevalent  $\beta$ -lactamase groups.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(2), 833-838.

Casella, G., Antonelli, E., Villanacci, V., Bachetti, F., Torti, G., Dore, M. P., & Bassotti, G. (2017). **Listeria Infection during Biologic Therapy: An Update.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*, 6(1), 2261-2264.

CDC (2011) . **Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996–2010.** *Morbid Mortal Weekly Rep.* 60:749–755

CDC (2013). **Antibiotic Resistance Threats in the United States.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> 1. Consultado em Abril de 2020.

Cereser, N. D., Costa, F. M. R., Rossi Júnior, O. D., Silva, D. A. R. D., & Sperotto, V. D. R. (2008). **Botulismo de origem alimentar.** *Ciência Rural*, 38(1), 280-287.

- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., ... & Figueras, M. J. (2010). **Occurrence and diversity of Arcobacter spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant.** *Water research*, 44(12), 3696-3702.
- Collado, L., Muñoz, N., Porte, L., Ochoa, S., Varela, C., & Muñoz, I. (2018). **Genetic diversity and clonal characteristics of ciprofloxacin-resistant Campylobacter jejuni isolated from Chilean patients with gastroenteritis.** *Infection, Genetics and Evolution*, 58, 290–293.
- Cooper, K. K., Bueschel, D. M., & Songer, J. G. (2013). **Presence of Clostridium perfringens in retail chicken livers.** *Anaerobe*, 21, 67–68.
- Correia, C. B., Campos Cunha, I., Coelho, A., Maia, C., Pena, C., Bonito, C. C., ... & Toscano, M. M. (2019). **Investigação laboratorial de surtos de toxinfecção alimentar, dados referentes a 2017.** *INSA*
- Cunha, A. F., Acurcio, L. B., Assis, B. S., Oliveira, D. L. S., Leite, M. O., Cerqueira, M. M. O. P., & Souza, M. R. (2013). **In vitro probiotic potential of Lactobacillus spp. isolated from fermented milks.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(6), 1876-1882.
- Da Silva, J. M. B., & Hollenbach, C. B. (2010). **Fluoroquinolonas resistência bacteriana na medicina veterinária.** *Arq Inst Biol*, 77(2), 363-9.
- Da Silva, E. R., do Carmo, L. S., & Da Silva, N. (2005). **Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in Staphylococcus aureus from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds.** *Veterinary microbiology*, 106(1-2), 103-107.
- Dantes, R., Mu, Y., Belflower, R., Aragon, D., Dumyati, G., Harrison, L. H., ... & Ray, S. M. (2013). **National burden of invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections, United States, 2011.** *JAMA internal medicine*, 173(21), 1970-1978.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). **Origins and evolution of antibiotic resistance.** *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.
- De Knecht, L. V., Pires, S. M., & Hald, T. (2015). **Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model.** *Epidemiology & Infection*, 143(6), 1175-1186.
- de Sá, M. I., & Ferreira, C. (2007). **Importância das zoonoses na segurança alimentar.** *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2, 14-17.

Decreto-Lei nº 113/2006 (2006), **Higiene dos géneros alimentícios e higiene dos géneros alimentícios de origem animal**. *Diário da República*, Série I-A, 12 de Junho de 2006, pp. 4143 - 4148

Dias, B. (2006). **Análise dos riscos na cadeia alimentar: evolução europeia e nacional**. *Revista Segurança e Qualidade Alimentar: Noções Gerais, Regulamentação Certificação*, Editideias – Edição e Produção, Lda, 1, pp. 16-18. Lisboa, Portugal.

Directiva 2003/99/CE (2003) **Diretiva do parlamento europeu e do conselho de 17 de novembro de 2003 relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos**. *Jornal Oficial da União Europeia* nº L 325/31

Domman, D., Quilici, M. L., Dorman, M. J., Njamkepo, E., Mutreja, A., Mather, A. E., ... & Bouchier, C. (2017). **Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas**. *Science*, 358(6364), 789-793.

European Food Safety Authority (EFSA). (2005). **Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp in foodstuffs**. *EFSA Journal*, 3(4), 199.

EFSA (2017) **Antimicrobial resistance remains high, says EU report**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/antimicrobial-resistance-remains-high-says-eu-report>  
Consultado em Dezembro de 2020

EFSA. (2014). **Update of the technical specifications for harmonised reporting of food-borne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC**. *EFSA Journal*, 12(3), 3598.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017**. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.

EFSA & ECDC (2019). **The European Union One Health 2018 Zoonoses Report**. *EFSA Journal*, 17(12).

EFSA (2020) **Antimicrobial resistance in the EU: infections with foodborne bacteria becoming harder to treat**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/antimicrobial-resistance-eu-infections-foodborne-bacteria-becoming-harder-treat> consultado em Dezembro de 2020

- Favretti, M., Pezzuto, A., & Arcangeli, G. (2016). **Listeria monocytogenes: A Dangerous and Insidious Pathogen in Seafood.** In *Microbes in Food and Health* (pp. 333-348). Springer, Cham.
- FDA/CFSAN. (2008). **Food Safety A to Z Reference Guide Salmonella.** 37.
- Feodoroff, B., Lauhio, A., Ellström, P., & Rautelin, H. (2011). **A nationwide study of campylobacter jejuni and campylobacter coli bacteremia in Finland over a 10-year period, 1998-2007, with special reference to clinical characteristics and antimicrobial susceptibility.** *Clinical Infectious Diseases*, 53(8).
- Ferreira-Juliano, J. ., & Cardoso, A. . (2014). **Clostridium Botulinum e suas toxinas: Uma reflexão sobre os aspectos relacionados ao botulismo de origem alimentar.** *Estudos, Goiânia*, 41(3), 657–670.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). **Insights in the pathogenesis and resistance of Arcobacter: a review.** *Critical reviews in microbiology*, 42(3), 364-383.
- Fernández-Cruz, A., Muñoz, P., Mohedano, R., Valerio, M., Marín, M., Alcalá, L., ... & Bouza, E. (2010). **Campylobacter bacteremia: clinical characteristics, incidence, and outcome over 23 years.** *Medicine*, 89(5), 319-330.
- Figueiredo, V. F. D., & Costa Neto, P. L. D. O. (2001). **Implantação do HACCP na indústria de alimentos.** *Gestão & Produção*, 8(1), 100-111.
- Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. J., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., ... & Topp, E. (2013). **The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment.** *Clinical infectious diseases*, 57(5), 704-710.
- Fisher, E. L., Otto, M., & Cheung, G. Y. (2018). **Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning.** *Frontiers in microbiology*, 9, 436.
- Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., Braunstein, M., & Rood, J. I. (Eds.). (2019). **Gram-positive pathogens (Vol. 29).** John Wiley & Sons.
- Flores, A., & Melo, C. (2015). **Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar.** *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(1), 65–72.
- Forsythe, S. J. (2013). **Microbiologia da segurança dos alimentos.** *Artmed Editora*, 602 p.
- Freedman, J. C., Shrestha, A., & McClane, B. A. (2016). **Clostridium perfringens enterotoxin: action, genetics, and translational applications.** *Toxins*, 8(3), 73.

- Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. (1996). **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182.
- Galindo, C. L., Rosenzweig, J. A., Kirtley, M. L., & Chopra, A. K. (2011). **Pathogenesis of Y. enterocolitica and Y. pseudotuberculosis in Human Yersiniosis**. *Journal of pathogens*, 2011.
- García, S., & Heredia, N. (2011). **Clostridium perfringens: A Dynamic Foodborne Pathogen**. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 624–630.
- Gaspar, C., Augusto, G., Albuquerque, M., Nascimento, M., Vicêncio, P., & Nogueira, P. (2017). **Doenças de Declaração Obrigatória 2013-2016, Volume I - Portugal**. Direção-Geral da Saúde, Lisboa, Portugal.
- Gaspar, P. D., Domingues, C., Gonçalves, L. C. C., & Andrade, L. P. (2009). **Avaliação da qualidade e segurança alimentar pela previsão do crescimento microbiano em diferentes condições de conservação**. In *V Congreso Ibérico y III Congreso Iberoamericano de Ciencias y Técnicas del Frío*.
- Gast, R. K., & Porter Jr, R. E. (2020). **Salmonella infections – Section III**. *Diseases of poultry*, 717-753.
- Gomes, A., da Silva Aguiar, S. C., da Paz Albaneja, T., & Bega, A. (2019). **Avaliação in vitro da ação do ozônio em Staphylococcus aureus**. *Revista ibero-americana de podologia*, 1(1), 25-29.
- Gonçalves, R. C., Faleiro, J. H., dos Santos, M. N. G., de Carvalho, S. A., & Malafaia, G. (2017). **Micro-organismos emergentes de importância em alimentos: uma revisão da literatura**. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 11(2), 71-83.
- Haenel, I., Tomaso, H., & Neubauer, H. (2016). **Arcobacter-an underestimated zoonotic pathogen?**. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 59(6), 789-794.
- Hall, G. V., D'Souza, R. M., & Kirk, M. D. (2002). **Foodborne disease in the new millennium: out of the frying pan and into the fire?**. *Medical Journal of Australia*, 177(11), 614-618.
- Hauschild, A. H. W., Hilsheimer, R., Weiss, K. F., & Burke, R. B. (1988). **Clostridium botulinum in honey, syrups and dry infant cereals**. *Journal of Food Protection*, 51(11), 892-894.

- Hanus, G. (2018). **The impact of globalization on the food behaviour of consumers—literature and research review.** In *CBU International Conference Proceedings (Vol. 6, pp. 170-174).*
- Heng, S. P., Letchumanan, V., Deng, C. Y., Ab Mutalib, N. S., Khan, T. M., Chuah, L. H., ... & Lee, L. H. (2017). **Vibrio vulnificus: an environmental and clinical burden.** *Frontiers in microbiology*, 8, 997.
- Heuvelink, A. E., Van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Van Oosterom, R., Edink, K., Van Duynhoven, Y. T. H. P., & De Boer, E. (2002). **Escherichia coli O157 infection associated with a petting zoo.** *Epidemiology & Infection*, 129(2), 295-302.
- Ho, H. T., Lipman, L. J., & Gaastra, W. (2008). **The introduction of Arcobacter spp. in poultry slaughterhouses.** *International journal of food microbiology*, 125(3), 223-229.
- Hosangadi, D., Smith, P. G., & Giersing, B. K. (2019). **Considerations for using ETEC and Shigella disease burden estimates to guide vaccine development strategy.** *Vaccine*, 37(50), 7372-7380.
- Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. (2012). **Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review.** *Food Research International*, 45(2), 819-830.
- Iovine, N. M. (2013). **Resistance mechanisms in Campylobacter jejuni.** *Virulence*, 4(3), 230–240.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2007) “Summary for Policymakers.” In **Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikot, P.J. van der Linden, and C.E. Hanson, eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Islam
- Jajere S. M. (2019). **A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance.** *Veterinary world*, 12(4), 504–521.
- Johnson, E. A. (2019). **Clostridium botulinum.** *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 487-512.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). **Pathogenic escherichia coli.** *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.

Keithlin, J., Sargeant, J., Thomas, M. K., & Fazil, A. (2014). **Systematic review and meta-analysis of the proportion of Campylobacter cases that develop chronic sequelae.** *BMC public health*, 14(1), 1203.

Khalil, M. A. E. F., Sonbol, F. I., BADR, A., & ALI, S. S. (2015). **Comparative study of virulence factors among ESBL-producing and nonproducing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates.** *Turkish journal of medical sciences*, 45(1), 60-69.

Khan, M., Nazir, J., Anjum, A. A., Nawaz, M., & Shabbir, M. Z. (2015). **Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic Clostridium perfringens isolates from mutton, beef and chicken meat.** *Journal of food science and technology*, 52(8), 5323-5328.

Kowalczyk, S. (2017). **Free market and the food safety in the globalization era.** *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 104(4), 15-27.

Labbe, R. G., & Juneja, V. K. (2017). **Clostridium perfringens.** In *Foodborne diseases* (pp. 235-242). Academic Press.

Lawley, R., Curtis, L., & Davis, J. (2008). **The food safety hazard guidebook.** *Royal Society of Chemistry*. Cambridge, Reino Unido. ISBN: 978-0-85404-460-3

Le Maréchal, C., Woudstra, C., & Fach, P. (2016). **Botulism.** *Clostridial Diseases of Animals*, 303-330.

Lee-Ann, J., & Marion, W. (2009). **Climate change: Implications for food safety.**

Li, J., Adams, V., Bannam, T. L., Miyamoto, K., Garcia, J. P., Uzal, F. A., ... & McClane, B. A. (2013). **Toxin plasmids of Clostridium perfringens.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(2), 208-233.

Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). **A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157.** *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1), 5.

Manual MSD (2018) **Shigelo**, Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bacilos-gram-negativos/shigelose>, consultado em Agosto de 2020

Maslanka, S. E., Solomon, H. M., Sharma, S., & Johnson, E. A. (2015). 32. **Clostridium botulinum and Its Toxins.** *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, January 2013.

McClane, B. A. (2005). **18 Clostridial Enterotoxins.** *Handbook on Clostridia*, 385.

---

McGuinness, W. A., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2017). **Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus***. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2), 269.

Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Rivière, J., & Cerf, O. (2003). **Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk**. *International journal of food microbiology*, 80(1), 1-15.

Metis (2018) **Toxinfecções Alimentares**. Disponível em: [http://metis.med.up.pt/index.php/Toxinfo%20A7%20B5es\\_alimentares](http://metis.med.up.pt/index.php/Toxinfo%20A7%20B5es_alimentares). Consultado em Setembro de 2020

Mortimore, S., & Wallace, C. (2013). **HACCP: A practical approach**. *Springer Science & Business Media*.

MS-Ministério da Saúde (2011). **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília, Brasil, ISBN 978-85-334-1792-2

Muthurandhi Sethuvel, D. P., Devanga Ragupathi, N. K., Anandan, S., & Veeraraghavan, B. (2017). **Update on: *Shigella* new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance**. *Letters in applied microbiology*, 64(1), 8-18.

Nützenadel, A., & Trentmann, F. (Eds.). (2008). **Food and globalization: consumption, markets and politics in the modern world**. *Berg*, p.1

O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2018). **Antimicrobial resistance in foodborne pathogens**. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 99-115). *Academic Press*.

Pal, A., Labuza, T. P., & Diez-Gonzalez, F. (2008). **Shelf life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth**. *International journal of food microbiology*, 126(1-2), 49-56.

Pallotta, M. L. (2019). **Listeriosis Patients by *Listeria monocytogenes* Infection: A Resurgent Foodborne Disease in Immune-Compromised Subjects**. *EC Microbiology*, 15, 637-639.

Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O., & Cohen, D. (2007). **Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel**. *Environmental Research*, 103(3), 390-396.

Peck, M. W., Stringer, S. C., & Carter, A. T. (2011). **Clostridium botulinum in the post-genomic era.** *Food microbiology*, 28(2), 183-191.

Qualfood (sem data) **Base de dados de Qualidade e Segurança Alimentar, Ambiental e HST.** Disponível em: <http://www.qualfood.com/seguranca-alimentar/infeccao-vs-intoxicacao-alimentar>. Consultado em Setembro de 2020

Quintiliano, C. R., Santos, T. A. D., Paulino, T. S. T., Schattan, R. B., & Gollücke, A. P. B. (2008). **Avaliação das condições higiênico-sanitárias em restaurantes, com aplicação de ficha de inspeção baseada na legislação federal, RDC 216/2004.** *Hig. aliment*, 25-30.

Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). **Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis.** *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32.

Raghunath, D. (2008). **Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India.** *Journal of biosciences*, 33(4), 593-603.

Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., ... & Singh, R. K. (2017). **Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control—a comprehensive review.** *Veterinary Quarterly*, 37(1), 136-161.

Ramees, T. P., Rathore, R. S., Bagalakote, P. S., Mohan, H. V., Kumar, A., & Dhama, K. (2014). **Multiplex PCR detection of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus in skin of poultry.** *J Pure Appl Microbiol*, 8(2), 1755-1758.

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). **Aminoglycoside modifying enzymes.** *Drug resistance updates*, 13(6), 151-171.

Raizel, R., Santini, E., Kopper, A. M., & Reis Filho, A. D. (2011). **Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano.** *Revista Ciência & Saúde*, 4(2), 66-74.

Regulamento (CE) n.º 852/2004 (2004). **Higiene dos géneros alimentícios.** *Jornal oficial da União Europeia L 139/1*, 29 de Abril de 2004.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 (2004). **Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.** *Jornal oficial da União Europeia L 226/22*, 30 de Abril de 2004.

Regulamento (CE) n.º 178/2002 (2002). **Princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos**

---

**em matéria de segurança dos géneros alimentícios.** *Jornal oficial da União Europeia*, 28 de Janeiro de 2002.

Rocourt, J., & Buchrieser, C. (2007). **The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification.** *Food science and technology- New York-Marcel Dekker-*, 161, 1.

Rood, J. I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., ... & Uzal, F. A. (2018). **Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme.** *Anaerobe*, 53, 5-10.

Ryser, E. T., & Marth, E. H. (Eds.). (2007). ***Listeria, listeriosis, and food safety.*** *CRC press*, 896p

Santos, M. I., Correia, C., Cunha, M.I.C., Saraiva, M.M., & Novais, M.R. (2005). **Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração.** Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge -INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição. *Revista da ordem dos Farmacêuticos*, 64, 66–68.

Santos, I., Cunha, I. (2011). **Patogénicos emergentes em alimentos. Segurança e qualidade alimentar**, Vol.2. Citado por Dias, I.M.N. (2014) *A lavagem de mãos em manipuladores de alimentos*. Dissertação de Mestrado, ISCSEM

Saraiva, M., Correia, C. B., Cunha, I. C., Maia, C., Bonito, C. C., Furtado, R., & Calhau, M. A. (2019). **Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar: valores-guia.** INSA, Lisboa, Portugal.

Schnupf, P., & Sansonetti, P. J. (2019). ***Shigella* pathogenesis: new insights through advanced methodologies.** *Bacteria and Intracellularity*, 15-39.

Schroeder, C. M., White, D. G., & Meng, J. (2004). **Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*.** *Food Microbiology*, 21(3), 249-255.

Schroeder, G. N., & Hilbi, H. (2008). **Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion.** *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 134-156.

Sobral, J. M. (2016). **Globalização alimentar, identidades e culinária.** *Estudos sobre a globalização*, 371-395.

---

Tauxe, R. V., Doyle, M. P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J., & Stein, C. E. (2010). **Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections**. *International journal of food microbiology*, 139, S16-S28.

Tenover, F. C. (2006). **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria**. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.

Trindade, C.H.S.R. (2014) **Avaliação da qualidade microbiológica de saladas preparadas em restauração pública**. *Dissertação de Mestrado*, ISCSEM

United Nations (1994). **United Nations Framework Convention on Climate Change**. United Nations, New York. Disponível em: [http://www.unfccc.int/essential\\_background/convention/items/2627.php](http://www.unfccc.int/essential_background/convention/items/2627.php), consultado em Dezembro de 2020

United Nations (2012). **Climate change impact on agriculture and food security**. Disponível em: [https://unfccc.int/sites/default/files/leg\\_2012\\_pacific\\_workshop\\_fao\\_presentation.pdf](https://unfccc.int/sites/default/files/leg_2012_pacific_workshop_fao_presentation.pdf), consultado em Dezembro de 2020

Uzal, F. A., Freedman, J. C., Shrestha, A., Theoret, J. R., Garcia, J., Awad, M. M., Adams, V., Moore, R. J., Rood, J. I., & McClane, B. A. (2014). **Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease**. *Future Microbiology*, 9(3), 361–377.

van Boven, M., Veldman, K. T., de Jong, M. C., & Mevius, D. J. (2003). **Rapid selection of quinolone resistance in Campylobacter jejuni but not in Escherichia coli in individually housed broilers**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 719-723.

Valadbeigi, H., HatamiLak, M., Maleki, A., Kouhsari, E., & Sadeghifard, N. (2020). **Molecular characteristics, antimicrobial resistance profiles, and antibiotic resistance determinants in uropathogenic fluoroquinolone resistant-Escherichia coli isolates**. *Gene Reports*, 18, 100584.

Varavallo, M. A., Thomé, J. N., & Teshima, E. (2008). **Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais**. *Semina: Ciências biológicas e da saúde*, 29(1), 83-104.

Viegas, S., Cunha, I. C., Correia, C. B., Coelho, A., Maia, C., Pena, C., ... & Barreira, M. J. (2016). **Investigação laboratorial de surtos de toxinfeições alimentares, 2015**. *INSA*

White, D. G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D. D., & McDermott, P. F. (2002). **Antimicrobial resistance of foodborne pathogens**. *Microbes and infection*, 4(4), 405-412.

WHO (2019) – **Cholera**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cholera>, consultado a 07 de Setembro de 2020

WHO (2019). **Food safety, climate change and the role of WHO**. Department of food safety and zoonoses

Wilder-Kofie, T. D., Lúquez, C., Adler, M., Dykes, J. K., Coleman, J. D., & Maslanka, S. E. (2011). **An alternative in vivo method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection**. *Comparative medicine*, 61(3), 235-242.

World Health Organization. (2015). **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. *World Health Organization*.

Yara, D. A., Greig, D. R., Gally, D. L., Dallman, T. J., & Jenkins, C. (2020). **Comparison of Shiga toxin-encoding bacteriophages in highly pathogenic strains of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7 in the UK**. *Microbial Genomics*, 6(3), e000334.

Zilbauer, M., Dorrell, N., Wren, B. W., & Bajaj-Elliott, M. (2008). **Campylobacter jejuni-mediated disease pathogenesis: an update**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 123-129.