



Caracterização de isolados alimentares de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella spp.*

Suscetibilidade a antibióticos e serotipagem molecular

Jaqueline Danila Corchana Vitória Nogueira

Orientadores

Orientador interno: Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Orientador externo: Engenheiro Vitor Lopes Amaro

Relatório final de curso apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Pintado, Professora da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Engenheiro Vitor Lopes Amaro, da empresa Aquimisa- Consultores Agro-Industriais, Lda., em Castelo Branco.

Agradecimentos

Este trabalho tem muita da minha dedicação, mas também um enorme contributo de quem me acompanhou e tornou possível o conluo de mais uma etapa da minha vida. A todos não posso deixar de expressar os meus mais sinceros agradecimentos e uma palavra especial de apreço:

À Professora Doutora Cristina Pintado, na qualidade de minha orientadora interna, gostaria de agradecer por toda a enorme transmissão de conhecimento, disponibilidade e amabilidade sempre demonstrada ao longo da realização do trabalho.

A todos, e sem exceção, membros da empresa Aquimisa- Consultores Agro-Industriais, Lda., por todo o apoio técnico, toda a paciência e amizade prestados durante o período de estágio.

Um especial agradecimento à Engenheira Manuela Goulão, do laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, toda a simpatia, disponibilidade e ajuda técnica, essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Mariana Corchana e João Pedro Nogueira, pelo incentivo, amor e esforço monetário feito ao longo de toda a minha vida académica e pessoal.

Ao meu irmão Manuel Mendes, por toda a preocupação, carinho e força transmitida ao longo dos anos.

Ao meu irmão Renato Mendes por todo o encorajamento, afeto e positivismo transmitidos durante a minha existência.

A todos os meus colegas e amigos, que sempre me impulsionaram a progredir, por toda a amizade e bons momentos proporcionados.

Ao Eduardo, meu namorado, pela infindável bondade, paciência, e apoio incondicional que em muito contribuíram para o que sou hoje.

A todos, um grande e sincero bem-haja!

Resumo

Ao longo do período de estágio, no Laboratório de Microbiologia da empresa Aquimisa, Lda. - Consultores Agro-Industriais foi realizado o acompanhamento da rotina laboratorial ao nível da preparação de meios de cultura e de material. Durante este primeiro período de estágio, foram obtidos 34 isolados alimentares de *Listeria monocytogenes* e 5 de *Salmonella* spp., provenientes de várias zonas geográficas. Estes isolados foram posteriormente purificados, caracterizados e crioconservados para integrarem a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Foi feita a avaliação da suscetibilidade dos isolados bacterianos a um conjunto de seis antibióticos, verificando-se que a percentagem de estirpes de *Listeria monocytogenes* resistentes foi de 9% para a ampicilina (10 µg), 6% para a penicilina G (10 IU), 6% para a oxitetramicina (30 µg) e com menor percentagem de resistentes, com apenas 3%, o sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg). Considerando ainda os 34 isolados de *Listeria monocytogenes*, foi demonstrada a suscetibilidade dos isolados a todos os seis antibióticos utilizados.

Os 5 isolados de *Salmonella* spp. comportaram-se de forma resistente na presença dos seis antibióticos, com 100% de resistência à penicilina G (10 IU) e à eritromicina (15 µg) e a maior percentagem de sensíveis foi registada relativamente ao sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg) com 80%, sendo que os isolados também demonstram sensibilidade, com iguais percentagens, 20% de sensíveis à oxitetramicina (30 µg), à ampicilina (10 µg) e à estreptomicina (10 µg).

No geral, os isolados de *L. monocytogenes* mostraram-se mais suscetíveis aos antibióticos do que os isolados provenientes de *Salmonella* spp. Para além da suscetibilidade aos antibióticos, os isolados de *L. monocytogenes* foram caracterizados quanto ao seu serogrupo, por multiplex PCR, tendo-se observado a existência de quatro serogrupos: o serogrupo 1/2a, 3a em isolados provenientes de produtos cárneos e derivados e de produtos prontos a comer; o serogrupo 1/2b, 3b, 7 num isolado proveniente de produtos cárneos e derivados; o serogrupo 1/2c, 3c num leque mais diversificado de isolados provenientes de produtos cárneos, produtos prontos a comer e produtos lácteos e derivados; o serogrupo 4b, 4d, 4e em isolados provenientes de produtos cárneos.

Palavras chave

Listeria monocytogenes; *Salmonella* spp.; Antibioresistência; Serotipagem molecular; Microbiologia de alimentos; Segurança alimentar.

Abstract

During the stage period at the Microbiology laboratory of the company Aquimisa – Consultores Agro-Indutriais,Ldt,. was performed routine laboratory monitoring at the level of preparation of culture media and materials. In this first stage, collected 36 plates with colonies of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp from different geographical areas and after, in the Microbiology laboratory / Escola Agrária de Castelo Branco was determined its characterization, Cryopreservation and Serotyping.

The susceptibility of the bacterial isolates was evaluated, to a set of six antibiotics, with the percentage of resistant strains of *Listeria monocytogenes* being 9% for ampicillin (10 µg), 6% for penicillin G (10 IU), 6% for oxytetramicin (30 µg) and with a lower percentage of resistant, with only 3%, the sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg). Also considering the 34 isolates of *Listeria monocytogenes*, have shown the susceptibility of the isolates to all six Antibiotics used.

The 5 isolates of *Salmonella* spp. with 100% resistance to penicillin G (10 IU) and erythromycin (30 µg), and the highest percentage of susceptibility was recorded for sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg) with 80% of the antibiotics, and also detected in the isolates, in equal percentage ,20%, susceptibility for oxytetramicin (30 µg), ampicillin (10 µg) and streptomycin (10 µg).

In general, the isolates of *L. monocytogenes* have shown more susceptible to antibiotics than the isolates from *Salmonella* spp.

In addition to the susceptibility to antibiotics, the isolates of *L. monocytogenes* were further characterized to their serogroup, by multiplex PCR, with serogroups 1/2a, 3a being isolated from meat products and derivatives, Ready-to-eat products, serogroup 1 / 2b, 3b, 7 with an isolate from meat products and derivatives, serogroup 1 / 2c, 3c with a more diversified range of isolates from meat products, ready-to-eat products and products Dairy products and derivatives, and, last but not least, serogroup 4b, 4d, 4e with isolates from meat products.

Keywords

Listeria monocytogenes; *Salmonella* spp.; Antibioresistance; Molecular serotyping; Food Microbiology; Food safety.

Índice geral

I - Introdução	1
II - Revisão bibliográfica.....	2
1. Caracterização das bactérias em estudo.....	2
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.2. <i>Salmonella</i> spp.....	3
2. Coleções de culturas de microrganismos	4
III – Trabalho laboratorial	5
1. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da empresa Aquimisa.....	5
2. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco	10
2.1. Amostras alimentares	10
2.2. Confirmação do género <i>Listeria</i>	12
2.2.1. Primeira observação e primeira repicagem	12
2.2.2. Testes da mobilidade.....	14
2.2.2.1. Em meio semi-sólido	14
2.2.2.2. Ao microscópio - preparação a fresco.....	14
2.2.3. Prova da catalase.....	14
2.2.4. Coloração de Gram	15
2.3. Confirmação da espécie <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.3.1. Meios cromogénicos ALOA e RAPID' <i>L.mono</i>	16
2.3.2. Teste CAMP (Christie, Atkins, and Munch-Peterson)	16
2.4. Crioconservação.....	17
2.5. Antibióticos.....	19
2.5.1. Antibióticos testados	19
2.5.2. Método de difusão	19
2.5.3. Leitura e interpretação dos resultados	21
2.6. Extração de DNA	23
2.7. Amplificação por multiplex PCR	23
IV – Resultados e discussão.....	25
1. Resultados de confirmação do género <i>Listeria</i> sp.....	25

2.	Resultados de confirmação da espécie <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3.	Resultados de validação da técnica de difusão	27
4.	Caracterização da suscetibilidade aos antibióticos.....	28
4.1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.2.	<i>Salmonella</i> spp.	30
4.3.	Resultados globais.....	32
5.	Serotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
V	– Considerações finais.....	37
	Referências Bibliográficas.....	38

Índice de figuras

Figura 1 - Diferenças nas características de algumas espécies do género <i>Listeria</i>	13
Figura 2 - Criotubo com células concentradas no fundo.	18
Figura 3 - Inoculação das placas para antibiogramas.....	20
Figura 4 - Medição dos diâmetros das zonas de inibição.....	21
Figura 5 - Mobilidade com aspeto de " guarda-chuva" observado nos isolados de <i>Listeria</i> pelo teste de mobilidade em meio semi-sólido.	25
Figura 6 - Observação das características relativas á hemólise, através do teste CAMP, de cada espécie de <i>Listeria</i>	26
Figura 7 - Medição dos halos de inibição do isolado <i>E. coli</i> ATCC 25922	27
Figura 8 - Suscetibilidade de 34 dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> aos antibióticos	29
Figura 9 - Suscetibilidade dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. aos antibióticos testados	31
Figura 10 - Primeiro gel com os perfis moleculares de 17 isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> obtidos por multiplex PCR.	32
Figura 11 - Segundo gel com os perfis moleculares de 17 isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> obtidos por multiplex PCR	33
Figura 12 - Distribuição das 31 amostras de <i>Listeria monocytogenes</i> pelos quatro serogrupos associados.....	34

Lista de tabelas

Tabela 1 - Caracterização das placas de Petri utilizadas neste estudo.....	11
Tabela 2 - Dados relativos à primeira observação e à primeira repicagem.	12
Tabela 3 - Resultados típicos para as espécies de <i>Listeria</i> sp. em sete testes bioquímicos.....	16
Tabela 4 - Antibióticos testados para os isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	19
Tabela 5 - Valores (mm) para os diâmetros esperados das zonas de inibição, no âmbito do controlo de qualidade dos testes por difusão em agar usando a estirpe <i>E. coli</i> ATCC 25922	21
Tabela 6 - Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição para os antibióticos utilizados para os isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	22
Tabela 7 - Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição para os antibióticos utilizados para os isolados de <i>L. monocytogenes</i>	22
Tabela 8 - Sequência de bases dos primers utilizados na reação de multiplex PCR.	23
Tabela 9 - Resultados dos 2 ensaios para os diâmetros de inibição obtidos (em mm) para os 6 antibióticos testados para a estirpe de referência <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	27
Tabela 10 - Resultados médios dos diâmetros de inibição (em mm) de ensaios antimicrobianos feitos em duplicado para 34 dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
Tabela 11 - Suscetibilidade média dos cinco isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	30
Tabela 12 - Caracterização dos isolados quanto à sua espécie e ao seu serogrupo	35

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AMP - Ampicilina
ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
 a_w - Atividade da água
bp - *Base pairs*
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
C - Controlo da reação
DNA - *Deoxyribonucleic acid*
EFSA - *European Food Safety Authority*
ESACB - Escola Superior Agrária de Castelo Branco
For. - *Forward*
I - Intermédio
IU - International Units
L. monocytogenes - *Listeria monocytogenes*
M - Marcador
NR - Não referido
OMS - Organização Mundial de Saúde
P - Penicilina G
PCA - *Plate Count Agar*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
pH - Potencial hidrogeniónico
R - Resistente
Ref. - Referência
Rer. - *Reverse*
S - Estreptomina (10 mcg)
Sens. - Sensível
s - Desvio padrão
spp. - Espécies de um género
SXT - Sulfametoxazol-Trimetoprim
OT - Oxitetraciclina (30 mcg)
WHO - *World Health Organization*
X- Média