



Instituto Politécnico de Castelo Branco  
Escola Superior Agrária

# **Isolamento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. e susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes usados na indústria alimentar**

**João Pedro Guedes Barroso**

Relatório apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Dra. Joana Alexandra Rodrigues Trindade, da empresa Labinter - Laboratório Alimentar Lda. na Covilhã



## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho só foi possível através do contributo pessoal e profissional de várias pessoas as quais desejo manifestar o meu agradecimento.

Em primeiro, quero agradecer à Professora Dr.<sup>a</sup> Cristina Pintado, na qualidade de meu orientador interno, pela paciência, disponibilidade demonstrada, por todos os conhecimentos técnico-científicos que me transmitiu e pela leitura crítica do manuscrito.

À empresa Labinter - Laboratório Alimentar Lda., que me proporcionou as condições necessárias à realização deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Joana Trindade pelo apoio e ajuda prestada durante o tempo de estágio na empresa Labinter - Laboratório Alimentar Lda., bem como às técnicas Célia, Inês e Laurinda pelos conhecimentos e bons momentos passados.

Um especial agradecimento à Eng. Manuela Goulão e D. Helena Martins, do laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela disponibilidade e ajuda técnica, mas sobretudo pela simpatia e amizade demonstrada.

Aos meus pais, pelo incentivo, encorajamento e esforço monetário feito ao longo de toda a minha vida académica. Sem eles, nada disto seria possível.

À Ema, minha namorada, pela paciência e apoio incondicional sempre prestado.

A toda a minha família por todo o orgulho e força que demonstraram.

Aos meus amigos, pela compreensão, força e amizade verdadeira que me deram ao longo do curso e do estágio.

A todos os que, directa ou indirectamente, me ajudaram a concretizar este trabalho.

**Um grande bem-haja!**

# Isolamento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. e susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes usados na indústria alimentar

## Resumo

Durante o período de estágio, na empresa Labinter - Laboratório Alimentar Lda., foram obtidos 20 isolados alimentares de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e determinou-se, no laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, o seu perfil de susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes usados na indústria alimentar. Foi utilizada a técnica de difusão em Müller-Hinton Agar.

Dos cinco diferentes desinfetantes comerciais testados, o desinfetante Bioxel, à base de compostos quaternários de amónio, foi o que se mostrou mais eficaz.

Considerando os 11 isolados de *E. coli*, verificou-se 18% de resistência à ampicilina (10µg), sulfametoxazol-trimetropim (1,25/23,75 µg) e tetraciclina (30µg). Os 8 isolados de *L. monocytogenes*, apresentaram 13% de sensibilidade intermédia à penicilina G (10U) e mostraram-se sensíveis aos restantes antibióticos testados. Por fim, o único isolado de *Salmonella* spp. testado, mostrou-se resistente à tetraciclina (30µg) e estreptomicina (10µg).

No geral, os isolados de *L. monocytogenes* mostraram ser mais susceptíveis aos antibióticos e desinfetantes, quando comparados com os isolados de *E. coli* e de *Salmonella* spp.

Para além da susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes, os isolados de *L. monocytogenes* foram ainda caracterizados quanto ao seu serogrupo, por *Multiplex* PCR, tendo-se concluído que os isolados provenientes das amostras de queijo português (n=6) pertenciam ao serogrupo 4b, 4d, 4e e os isolados provenientes de chouriça (n=2) pertenciam ao serogrupo 1/2a, 3a.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Susceptibilidade, Antibióticos, Desinfetantes, Serotipagem.

# Isolation of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. and susceptibility to antibiotics and disinfectants used in food industry

## Abstract

During the stage period at the laboratory *Labinter - Laboratório Alimentar Ltd.*, were obtained 20 food isolates of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp., and was evaluated, at the Laboratory of Microbiology / Escola Superior Agrária de Castelo Branco, the susceptibility of antibiotics and disinfectants used in food industry. Was used a standard disc-diffusion technique.

Among the five different commercial disinfectants tested, the disinfectant Bioxel, based on quaternary ammonium compounds, was the most effective.

Considering the 11 isolates of *E. coli*, we found 18% of resistance to ampicillin (10µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 / 23.75 µg) and tetracycline (30µg). Among the eight isolates of *L. monocytogenes*, 13% had intermediate susceptibility to penicillin G (10U) and were sensitive to other antibiotics tested. Finally, the isolate of *Salmonella* spp. tested showed resistance to tetracycline (30µg) and streptomycin (10µg).

Overall, the isolates of *L. monocytogenes* were more susceptible to antibiotics and disinfectants than the isolates of *E. coli* and *Salmonella* spp.

In addition to the susceptibility to antibiotics and disinfectants, the isolates of *L. monocytogenes* were further characterized to their serogroup, by Multiplex PCR. It was concluded that the isolates from Portuguese cheese samples (n = 6) belonged to serogroup 4b, 4d, 4e and the isolates from sausage (n = 2) belonged to serogroup 1/2a, 3a.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Susceptibility, Antibiotics, Disinfectants, Serotyping.

## ÍNDICE GERAL

	Páginas
Agradecimentos	<i>iii</i>
Resumo	<i>iv</i>
Abstract	<i>v</i>
Índice geral	<i>vi</i>
Índice de figuras	<i>viii</i>
Índice de tabelas	<i>ix</i>
Índice de anexos	<i>xi</i>
Lista de abreviaturas	<i>xii</i>
I - Introdução	1
II - Revisão bibliográfica	3
1 - Caracterização das bactérias em estudo	3
1.1 - <i>Escherichia coli</i>	3
1.2 - <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.3 - <i>Salmonella</i> spp.	4
2 - Resistência bacteriana aos antibióticos e desinfectantes	5
3 - Serotipagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	6
III - Trabalho laboratorial	8
1 - Trabalho desenvolvido na empresa Labinter - Laboratório Alimentar	8
2 - Testes de susceptibilidade a antibióticos e desinfectantes utilizados na indústria alimentar	9
2.1 - Antibióticos e desinfectantes testados	9
2.2 - Método de difusão	11
2.2.1 - Obtenção das culturas jovens	11
2.2.2 - Preparação das suspensões bacterianas	12
2.2.3 - Inoculação em Meio Müller-Hinton	13
2.2.4 - Aplicação dos discos de antibióticos e incorporação dos desinfectantes nos discos de papel	13

2.2.5 - Leitura e interpretação dos resultados	14
2.3 - Tratamento dos discos	15
3 - Serotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> por <i>Multiplex</i> PCR	16
3.1 - Extração do DNA	16
3.2 - Amplificação por <i>Multiplex</i> PCR	16
IV - Resultados e discussão	18
1 - Resultados da validação da técnica de difusão	18
2 - Caracterização da susceptibilidade aos desinfectantes	18
2.1 - <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.	18
2.2 - <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.3 - Resultados globais	21
3 - Caracterização da susceptibilidade aos antibióticos	22
3.1 - <i>Escherichia coli</i>	23
3.2 - <i>Listeria monocytogenes</i>	25
3.3 - <i>Salmonella</i> spp.	26
3.4 - Resultados globais	26
4 - Serotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
V - Considerações finais	29
Referências bibliográficas	30
Anexos	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Serotipagem molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> , de acordo com a técnica descrita por Doumith <i>et al.</i> (2004)	7
Figura 2	Esquema do método de difusão	12
Figura 3	Inoculação dos diâmetros de incubação	13
Figura 4	Medição dos diâmetros de inibição	14
Figura 5	Susceptibilidade dos isolados de <i>E. coli</i> aos desinfetantes	19
Figura 6	Susceptibilidade dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> aos desinfetantes	20
Figura 7	Percentagem da eficácia por contacto para cada tipo de isolado bacteriano	22
Figura 8	Susceptibilidade dos isolados de <i>E. coli</i> aos antibióticos	23
Figura 9	Susceptibilidade dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> aos antibióticos	25
Figura 10	Serogrupos dos 8 isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos por <i>Multiplex</i> PCR	27

## ÍNDICE DE TABELAS

		Paginas
Tabela 1	Caracterização dos isolados bacterianos utilizados neste estudo	8
Tabela 2	Antibióticos testados	9
Tabela 3	Características dos desinfetantes utilizados	10
Tabela 4	Características dos antibióticos utilizados	11
Tabela 5	Valores padrão dos diâmetros de inibição provocados por desinfetantes	14
Tabela 6	Interpretação dos diâmetros de inibição para os antibióticos utilizados para os isolados de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i>	15
Tabela 7	Interpretação dos diâmetros de inibição para os antibióticos utilizados para os isolados de <i>L. monocytogenes</i>	15
Tabela 8	Sequência dos nucleotídeos usados na serotipagem molecular de <i>L. monocytogenes</i>	16
Tabela 9	Resultados médios dos três ensaios para os diâmetros de inibição obtidos (em mm) para os sete antibióticos testados para a estirpe de referência <i>E. coli</i> ATCC - 25922.	18
Tabela 10	Resultados médios dos três ensaios para os diâmetros de inibição obtidos (em mm) para os cinco desinfetantes utilizados para os isolados de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.	19
Tabela 11	Resultados médios dos três ensaios para os diâmetros dos halos de inibição obtidos (em mm) para os cinco desinfetantes utilizados para os isolados de <i>L. monocytogenes</i> .	20
Tabela 12	Resultados médios e respectivo desvio padrão, para os diâmetros de inibição (em mm) obtidos para os quatro diferentes antibióticos utilizados para os isolados de <i>E. coli</i> .	23
Tabela 13	Resultados médios (de dois ensaios) para os diâmetros de inibição (em mm) obtidos para os cinco diferentes antibióticos utilizados para os isolados de <i>L. monocytogenes</i> .	25

Tabela 14	Resultados médios dos dois ensaios para os diâmetros dos halos de inibição obtidos (em mm) para os cinco antibióticos utilizados para o isolado de <i>Salmonella</i> spp.	25
-----------	---	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

		<b>Páginas</b>
Anexo I	Métodos de isolamento	32
Anexo II	Preparação do meio TSYEA	35
Anexo III	Resultados totais da validação do método	36
Anexo IV	Resultados totais - Desinfectantes	37
Anexo V	Resultados totais - Antibióticos	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
$a_w$	Actividade da água
bp	<i>Basis par</i>
C	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CN	Controlo negativo
CP	Controlo positivo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EAggEC	Enteroagregativos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EIEC	Enteroinvasivos
ESACB	Escola Superior Agrária de Castelo Branco
EPEC	Enteropatogénicos
ETEC	Enterotoxigénicos
For.	<i>Forward</i>
I	Intermédio
KZ	Cefazolina
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
M	Marcador
MS	Moderadamente sensível
NR	Não referido
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Penicilina G
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniónico

R	Resistente
Ref.	Referência
Rer.	<i>Reverse</i>
S	Estreptomicina
S	Sensível
s	Desvio padrão
Spp.	Espécies
SS	Discretamente sensível
SXT	Sulfametoxazol-trimetropim
TE	Tetraciclina
VS	Muito sensível
VTEC	Verotoxinogénicos
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	Média

