



right solutions.
right partner.

Caracterização por PCR Multiplex de isolados de *Listeria monocytogenes* obtidos em amostras alimentares

Raquel Vale Cardoso

Orientadores

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Soraia Ferreira Pinto

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de licenciada em Biotecnologia Alimentar, realizado sob orientação científica da Professora Doutora Cristina Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e da Engenheira Soraia Pinto da ALS Life Sciences Portugal.

Outubro de 2023

Composição do júri

Presidente do júri

Vogais

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio e esforço investido na minha educação e por sempre acreditarem e confiarem em mim.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Cristina Pintado por me ter despertado o interesse por Microbiologia, ter aceitado ser minha orientadora, construir um bom plano de trabalho para a minha aprendizagem e me guiar na direção correta que o trabalho deveria tomar.

Agradeço à minha orientadora Soraia Pinto, responsável do Laboratório de Microbiologia da ALS Life Sciences SA, em Tondela, por me ter aceitado como estagiária. Um grande obrigado por me permitir usufruir dos equipamentos e materiais necessários ao desempenho do meu trabalho. E por sempre ser atenciosa, compreensiva e dedicar do seu tempo escasso sempre que podia.

A todas as trabalhadoras da ALS Life Sciences SA, agradeço todas as vezes que se disponibilizaram a ajudar e ensinar novos procedimentos e técnicas. Foram todas impecáveis comigo, muito simpáticas e amáveis. Um grande obrigado por me integrarem na equipa de uma forma tão feliz. Tenho de agradecer especialmente à Alda, Sandra e Carla por estarem sempre alerta, e carinhosamente me chamarem à atenção a variadas situações, para que eu não errasse e realiza-se as tarefas da forma mais correta. Um agradecimento especial também à Anabela e à Sara, por me ajudarem sempre a interpretar as leituras das minhas culturas, de maneira a eu adquirir destreza e confiança nesse campo. E ainda partilharem factos interessantes sobre outros aspetos.

Agradeço à Kristina, que estagiou comigo, por se ter tornado uma amiga para mim e boa companheira, tornando esta experiência muito mais feliz. Formámos uma boa dupla que se traduziu numa melhoria na dinâmica das tarefas realizadas.

Mais uma vez agradeço à Professora Cristina por me receber na escola com os isolados de *Listeria* e fazer várias confirmações comigo explicando tudo com detalhe. Com ela aprendi outra técnica interessante que desconhecia e pratiquei outras que ainda não tinha realizado.

Agradeço à Engenheira Manuela por me acompanhar na serotipagem molecular por PCR multiplex dos isolados de *Listeria monocytogenes* e por sempre garantir que ensinava todos os passos e explicava de várias formas de modo a eu compreender tudo ao pormenor.

Também agradeço à Escola Superior Agrária de Castelo Branco e a todos os professores por fazerem parte das minhas influências que levaram à sedimentação e construção dos meus interesses profissionais e ideias para o futuro.

Resumo

Sendo *Listeria monocytogenes* uma bactéria ubíqua que se adapta bem a ambientes adversos, causadora de listeriose e de elevada taxa de mortalidade, é de grande importância o conhecimento da sua presença nos alimentos e o seu controlo nas indústrias alimentares.

No âmbito do estágio curricular que decorreu entre março e junho de 2023 no Laboratório de Microbiologia da ALS Life Sciences SA, em Tondela, foram obtidos isolados de *Listeria monocytogenes*, os quais foram caracterizados por PCR multiplex para caracterização molecular do respetivo serogrupo. Foram também realizados testes complementares, como o teste de CAMP, a prova de hemólise e a identificação bioquímica por meio de API *Listeria*. Todos os isolados analisados provinham de amostras de origem animal.

Os resultados obtidos permitem concluir que 71,4% dos isolados pertenciam ao serogrupo 1/2a, 3a, dos quais provenientes de carnes, mas principalmente enchidos, 14,3% ao serogrupo 1/2b, 3b, 7, proveniente de uma canja pronta para consumo e um peito de frango cru e 14,3% ao serogrupo 4b, 4d, 4e, provenientes de uma salada de polvo e um leite de ovelha.

Palavras-chave

Análises microbiológicas; Controlo de qualidade; Listeriose; Segurança alimentar; Serotipagem molecular.

Abstract

As *Listeria monocytogenes* being a ubiquitous bacterium that adapts well to adverse environments, causing listeriosis and high mortality rates, knowledge of its presence in food and its control in the food industry is of great importance.

As part of the curricular internship that took place between March and June 2023 at the Microbiology Laboratory of ALS Life Sciences SA, in Tondela, isolates of *Listeria monocytogenes* were obtained, which were characterized by multiplex PCR for molecular characterization of the serogroup. Additional tests were also carried out, such as the CAMP test, hemolysis test and biochemical identification using API Listeria. All analyzed isolates were provided with samples of animal origin.

The results obtained allow us to conclude that 71.4% of the isolates reach serogroups 1/2a, 3a, of which originating from meat, but mainly sausages, 14.3% to serogroups 1/2b, 3b, 7, originating from ready-made chicken soup and a raw chicken breast and 14.3% to serogroups 4b, 4d, 4e, coming from an octopus salad and sheep's milk.

Keywords

Microbiological analyses; Quality control; Listeriosis; Food safety; Molecular serotyping.

Índice geral

1. Introdução	1
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.1. Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e culturais	3
2.2. Contaminação em alimentos e instalações de processamento	3
2.3. Patogenicidade e epidemiologia da listeriose	4
2.4. Controlo na indústria alimentar	5
3. Métodos analíticos para o estudo de <i>Listeria spp.</i>	8
3.1. Métodos culturais	8
3.1.1. Ágar <i>Listeria</i> com Ottaviani e Agosti (ALOA)	8
3.1.2. Compass <i>Listeria</i> Agar	8
3.1.3. Agar Sangue	9
3.1.4. Confirm' Lmono Agar	9
3.1.5. Teste API <i>Listeria</i>	9
3.2. Métodos moleculares	9
3.2.1. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	9
3.2.2. Eletroforese em gel de agarose para serotipagem molecular	10
4. Controlo de Qualidade Interno dos ensaios microbiológicos	11
4.1. Ensaio em branco	11
4.2. Controlo positivo e negativo de especificidade e controlo negativo de seletividade	11
4.3. Duplicados e paralelos (Precisão)	11
4.4. Controlo positivo de execução de método de deteção	12
4.5. Análise de materiais de referência e cartas de controlo	12
5. Componente laboratorial realizada nos Laboratórios de Microbiologia ALS Life Sciences SA e da ESACB	13
5.1. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	13
5.2. Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	13
5.3. Obtenção, purificação, e origem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> utilizados neste trabalho	13
5.4. Testes realizados na ESACB aos isolados estudados	14
5.4.1. Iluminação de Henry, comportamento em ALOA e teste CAMP	14
5.4.2. Caracterização bioquímica e identificação por API <i>Listeria</i> de isolados não <i>Listeria monocytogenes</i>	15
5.4.3. Serotipagem molecular por PCR Multiplex	15
5.4.3.1. Extração de DNA	15
5.4.3.2. Amplificação por reação de Polimerização em Cadeia	15
5.4.3.3. Separação dos fragmentos de DNA por Eletroforese em Gel de Agarose	17
5.5. Esterilização e inativação do material	17
6. Resultados e discussão	18
7. Conclusão	22
Referências bibliográficas	23

Índice de figuras

Figura 1 - Illustra PuReTaq Ready-to-go PCR (Cytiva)	16
Figura 2 - Termociclador Biometra Tgradient.....	16
Figura 3 - Bio-Rad mini subcell GT com poços carregados.....	17
Figura 4 - Cultura característica de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
Figura 5 - Confirmação positiva para <i>Listeria monocytogenes</i>	18
Figura 6 - Confirmações para <i>Listeria monocytogenes</i> A - em meio ALOA; B - em teste CAMP.....	19
Figura 7 - Galeria API Listeria para teste de confirmação com alvéolos hidratados e inoculados. Resultado após incubação.....	19
Figura 8 - Transluminação UV, fotografia dos fragmentos de DNA dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> captada por câmara digital Kodack DC290 adaptada em formato TIFF. M - Marcador. Todas as amostras apresentam o gene prs (370bp) que identifica o género <i>Listeria</i> . As amostras 1 e 3 correspondem ao serogrupo 4b, as amostras 2, 5, 6, 7, 9, 10,11, 14, 15 e 16 correspondem ao serogrupo 1/2a e as amostras 8 e 13 ao serogrupo 1/2b, C- controlo da reação.....	20

Índice de tabelas

Tabela 1 - Culturas obtidas.....	14
Tabela 2 - Sequência dos nucleótidos usados na serotipagem molecular de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Tabela 3 - Fragmentos amplificados em cada um dos serogrupos de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
Tabela 4 - Tabela informativa dos resultados obtidos da eletroforese gel de agarose e dados de orientação da acerca da posição do gel, referência da amostra e informação de natureza e origem da amostra.....	21