



Caracterização de isolados de *Pseudomonas* spp. e de *Listeria monocytogenes* de origem alimentar

Ricardo Mantinha Gomes

Orientadores

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Engenheiro Vítor Manuel Amaro Lopes

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Engenharia Biológica e Alimentar, realizado sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e Engenheiro Vítor Manuel Amaro Lopes, da empresa Aquimisa ☐ Consultores Agroindustriais.

Novembro 2015

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à preciosa colaboração de algumas pessoas que passo a citar e a quem expresso os meus mais sinceros agradecimentos:

- Aos técnicos da empresa Aquimisa, Lda. ☐ consultores agroindustriais, pela oportunidade de integração no laboratório e por todos os conhecimentos transmitidos durante o estágio;

- À Dra. Cristina Santos Pintado, por ter aceite ser minha orientadora interna, por toda a orientação do trabalho e revisão do manuscrito;

- À Eng.^a Manuela Goulão pelo acompanhamento e conhecimentos transmitidos durante todo o trabalho realizado na Escola Superior Agrária de Castelo Branco;

- Aos meus pais, família e namorada pelo suporte, incentivo, paciência e orgulho manifestado ao longo da minha vida académica.

Resumo

O estágio curricular foi realizado no Laboratório de Microbiologia da empresa Aquimisa - consultores agroindustriais, que se encontra situado na Zona Industrial de Castelo Branco. Aqui foi feito um acompanhamento da rotina de um laboratório de análises microbiológicas e foram recolhidos isolados de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de vários tipos de produtos.

Posteriormente, no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, foi realizada a caracterização fenotípica e molecular de 25 isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de 23 amostras, maioritariamente de origem alimentar, e de 2 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de água.

Foram feitos testes de confirmação que nos permitiram confirmar a presença de *L. monocytogenes* em todas as amostras provenientes da Aquimisa, Lda. e também identificar a presença de uma outra espécie de *Listeria* em uma das amostras.

A partir da serotipagem dos isolados dos de *L. monocytogenes* por *multiplex* PCR estes foram divididos em 4 serogrupos que contêm os serotipos 1/2a, 1/2b, 1/3c e 4b, os quais são os 4 serotipos mais comuns em contaminações de produtos alimentares e em casos de listeriose humana.

Um dos isolados de *Pseudomonas* foi confirmado como sendo *P. aeruginosa*, através da utilização de um API 20 NE da bioMérieux.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, produtos alimentares, serotipagem por *multiplex* PCR, análises microbiológicas

Abstract

The internship was carried out in the Microbiology Laboratory of the company Aquimisa 2 Consultores Agroindustriais Lda., located in Castelo Branco. Here was made a follow-up of the work routine of a microbiological analysis laboratory and isolates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* were taken from various types of samples.

Later, in the Microbiology Laboratory of the School of Agriculture in Castelo Branco, it was carried out the phenotypic and molecular characterization of 25 isolates of *L. monocytogenes*, mainly of food origin, and 2 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from water samples.

Confirmation tests were performed which allowed us to confirm the identification of *L. monocytogenes* in all isolates from Aquimisa, Lda. and to identify the presence of another species of *Listeria* in one isolate.

Serotyping of *L. monocytogenes* isolates by PCR Multiplex divided this species into four serogroups containing the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b, which are the four most common serotypes in food contamination and in human listeriosis cases.

One of the isolates of *Pseudomonas* was identified as *P. aeruginosa*, through the API 20 NE kit (bioMérieux).

Key-words: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, food isolates, serotyping by *multiplex* PCR, microbiological analysis

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
1.INTRODUÇÃO	1
2. MICRORGANISMOS ANALISADOS NESTE TRABALHO.....	2
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	2
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
3. APRESENTAÇÃO DA AQUIMISA, LDA.....	4
3.1 Laboratório de Microbiologia da Aquimisa, Lda.	5
3.2. Trabalho realizado na Aquimisa, Lda.	6
4. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> E <i>P. AERUGINOSA</i>.....	8
4.1 Isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	8
4.2 Isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
4.3. Material e métodos.....	11
4.4. Resultados e Discussão	17
4.4.1. Coloração Gram	17
4.4.2. Teste iluminação de Henry.....	18
4.4.3. Catalase	18
4.4.4. Mobilidade	18
4.4.5. Teste CAMP.....	19
4.4.6. Serotipagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
4.4.7. Teste API 20NE	27
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema do laboratório de Microbiologia da Aquimisa, Lda.	5
Figura 2 - Colónias características de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio <i>Rapid L. mono.</i>	9
Figura 3 - Percentagem de amostras consoante a sua origem.	9
Figura 4 - Lâmina preparada com coloração Gram	12
Figura 5 - Esquema do teste de iluminação de Henry	12
Figura 6 - Placa agar sangue para CAMP test para <i>L. monocytogenes</i>	13
Figura 7 - Termociclador carregado com as amostras de DNA	14
Figura 8 - Gel de agarose 2% com poços carregados.	15
Figura 9 - Transformador e tina de eletroforese.	16
Figura 10 - Coloração Gram de <i>L. monocytogenes</i>	17
Figura 11 - Coloração Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 12 - <i>L. monocytogenes</i> observada à iluminação de Henry	18
Figura 13 - Teste mobilidade <i>L. monocytogenes</i>	19
Figura 14 - Camp test para <i>L. monocytogenes</i>	19
Figura 15 - Primeiro gel de agarose observado no transiluminador UV	21
Figura 16 - Segundo gel de agarose observado no transiluminador UV	21
Figura 17 - Terceiro gel de agarose observado no transiluminador UV	22
Figura 18 - Percentagem de cada serogrupo para os 25 isolados de <i>L. monocytogenes</i>	24
Figura 19 - Percentagem de cada serogrupo em isolados de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de carne e produtos cárneos.	25
Figura 20 - Percentagem de serotipos presente em superfícies e manipuladores.	26
Figura 21 - Perfil API 20 NE em cima e teste API 20 NE em baixo.	27
Figura 22 - Resultado enviado pela bioMérieux	27