



# Projetos Integrados

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO BIOMOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO *IN HOUSE* DE *Salmonella* spp. E *Listeria monocytogenes* EM ALIMENTOS A PARTIR DO PRÉ-ENRIQUECIMENTO E ENRIQUECIMENTO SELETIVO DA MICROBIOLOGIA *STANDARD***

**Área Temática: CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

SILVA, K.O.<sup>1</sup>

RIBEIRO JÚNIOR, J.C.<sup>2</sup>

## Resumo

As doenças transmitidas por alimentos têm alta prevalência global, como a *Salmonella* spp. sendo uma das principais causas de surtos alimentares e *Listeria monocytogenes*, embora menos frequente, apresentando uma alta taxa de mortalidade. No Brasil, a subnotificação desses casos prejudica a estimativa precisa de sua ocorrência. O método convencional para detecção de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos, com base em microbiologia, demora, no mínimo, 5 dias para um resultado preciso, levando ao aumento de custos e à necessidade de maior tempo de estocagem dos produtos. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e aprimorar mix multiplex *read to use* para identificação de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* por reação em cadeia da polimerase qualitativa (clássica) *in house* em alimentos de origem animal, verificando sua sensibilidade para detecção desses patógenos nas etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo em paralelo a microbiologia preditiva padrão. Foi verificado um resultado não fidedigno ao final da análise, apresentando variações nos resultados, podendo levar a um falso positivo ou



# Projetos Integrados

falso negativo, assim, conclui-se que os resultados preliminares sustentam-se em recomendar a manter a microbiologia preditiva padrão

**Palavras-chave:** Patógenos, alimentos, DTAs, microbiologia.

## I. Introdução

A *Salmonella* spp. foi o terceiro microrganismo mais envolvido nas doenças de transmissão hídrica e alimentar (DHTA) no Brasil no período entre 2012 e 2021 (RODRIGUES, 2022). Esses surtos podem resultar em muitas perdas econômicas, devido a incapacidade para o trabalho, custos com tratamentos e hospitalizações, com as investigações epidemiológicas, assim como prejuízos ao comércio e ao turismo (RODRIGUES, 2022).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) estão entre as enfermidades de maior ocorrência mundial. No Brasil, a subnotificação de casos dificulta a estimativa de prevalência, bem como a identificação dos agentes etiológicos e alimentos envolvidos nos surtos (PISSETTI, 2012). Os principais alimentos envolvidos na veiculação de salmonelose são ovos, carne de aves e seus derivados. (CARDOSO, 2008)

Dentre as infecções alimentares, a salmonelose é a de maior ocorrência no Brasil e no mundo, em contraste, a listeriose é menos frequente, contudo, apresenta elevada taxa de mortalidade e espécie *L. monocytogenes* é a principal patogênica para o homem (FAI, 2011).

A salmonelose é considerada uma infecção do trato gastrointestinal de origem alimentar e tem sido relatada como tendo altas taxas de incidência (EHUWA, 2021). Para obtenção higiênica e adequada de uma carne de qualidade, bem conservada, é necessário que todos os processos de beneficiamento sejam seguidos dentro da legislação específica que regulamenta a atividade (DE OLIVEIRA, 2011). Tais métodos são trabalhosos e necessitam de insumos e recursos humanos para obter resultados (GARRIDO, 2013).

Essa metodologia tradicional ou microbiologia convencional para detecção de *Salmonella* spp. requer no mínimo quatro dias para obtenção de resultado. As indústrias de alimentos necessitam de resultados em menor tempo para reduzir a estocagem de produtos e custos associados, assim, métodos rápidos para detecção de *Salmonella* spp. (DE ANDRADE, 2021).



# Projetos Integrados

O ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) representa um grande avanço nos métodos diagnósticos em termos de velocidade e sensibilidade (FRESCHI, 2005). O rápido diagnóstico da presença de patógenos em alimentos é fundamental para o setor produtivo que precisa de resultados laboratoriais para liberar os seus produtos, principalmente os de alta perecibilidade, como os de origem animal. Dessa forma, os métodos moleculares podem ser empregados para a pesquisa desses patógenos de forma a dar celeridade ao fluxograma de produção.

## II. Objetivos

Desenvolver e otimizar um mix multiplex *read to use* para identificação de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* por reação em cadeia da polimerase qualitativa (clássica) *in house* em alimentos de origem animal, verificando sua sensibilidade para detecção desses patógenos nas etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo em paralelo a microbiologia preditiva padrão.

## III. Material e Métodos

Foram avaliadas 45 amostras de filé de peito de frango, e 9 pools de 4 frangos cada, coletadas do comércio local do município de Araguaína, no norte do Tocantins. As coletas realizadas, seguiram cronograma detalhado conforme descrito abaixo. Foi coletado de comércios e lotes distintos bandejas de filé de peito de frango de frigoríficos do estado do Tocantins. As amostras então foram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), campus Araguaína.

De cada amostra foi retirado assepticamente uma alíquota de 25g representativa de toda a peça do produto, posteriormente foi homogeneizada em Stomacher com 225mL de água peptonada tamponada por 180 segundos em saco plástico tipo Bag estéril. Nessa etapa, também chamada de pré-enriquecimento, a amostra homogeneizada com o meio de cultura foi incubada a 35°C por 24 horas.

Após o pré-enriquecimento, foi coletado 1 mL da bag e enviado para PCR, posteriormente as amostras (1mL) da bag foram repicadas de forma asséptica em 10 mL de caldo Fraser para *Listeria*, e Rappaport e selenito cistina para *Salmonella*, e



# Projetos Integrados

novamente incubadas por 24 horas a 35°C, e caldo Rappaport em banho maria a 41,5° por 24 horas, para o enriquecimento seletivo.

Posteriormente ao período de incubação seletiva, foi coletado 1000 microlitros de cada tubo e enviado para PCR, posteriormente uma alçada de cada tubo de Fraser foi repicada em placas de ágar Oxford e ágar Listeria seletiva, uma alçada de cada tubo de Rappaport foi repicado em placas de ágar XLD e SS, uma alçada de cada tubo de selenito cistina foi repicado em placas de ágar XLD e SS, novamente incubadas por 24h à 35°C. Os isolados sugestivos em placas foram submetidos à extração de DNA genômico conforme Ribeiro Júnior et al. (2016). Os extraídos foram submetidos à PCR.

A PCR foi realizada da seguinte forma: 50 ng de DNA molde, 10 nM de cada base nitrogenada, 1X buffer, 75 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol.L<sup>-1</sup> de cada *primer*, 2.5 U de *Platinum Taq DNA polymerase*<sup>®</sup> (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

As concentrações de cada reagente foram testadas até ser determinada a que proporcionava a maior recuperação. Esse ensaio foi realizado em termociclador (BioRad<sup>®</sup>, CA, USA) e a leitura foi feita em géis de agarose a 1,5% eletroforizados por 50 minutos a voltagem constante de 90V.

## IV. Resultados e Discussão

Das 45 (24,3%) amostras que apresentaram resultado positivo para *Salmonella* spp. na microbiologia tradicional, 30 (16,2%) já apresentaram resultados positivos nas etapas de pré-enriquecimento e 30 (16,2%) no enriquecimento seletivo, assim como 8 (4,32%) das amostras apresentaram resultados negativos tanto nas etapas de pré isolamento quanto na microbiologia.

Assim como das amostras que apresentaram resultado positivo para *Listeria monocytogenes* na microbiologia tradicional, 6 (3,24%), já apresentaram resultados positivos nas etapas de pré-enriquecimento 2 (1,08%) e enriquecimento seletivo 9 (4,86%), assim como 43 (23,22%) das amostras apresentaram resultados negativos tanto nas etapas de pré isolamento quanto na microbiologia.

No entanto, foram observados resultados discrepantes, como por exemplo: resultado negativo nas etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo das



# Projetos Integrados

amostras F3 e F4 mas resultado positivo no isolamento microbiológico; e, a amostra F7 e F8 apresentou resultado positivo nas etapas pré-isolamento mas resultado negativo na microbiologia.

A partir dos resultados encontrados, foi possível verificar que a etapa do pré-enriquecimento não foi suficiente para a detecção do resultado positivo, assim como, algumas amostras apresentaram resultado positivo na etapa do pré-enriquecimento e resultado negativo na microbiologia tradicional.

Isso pode estar relacionado à baixa quantidade de micro-organismos presentes no pré-enriquecimento, ou ainda, em quantidade inferior ao limite de detecção da PCR, além da possível presença de substâncias que podem inibir a reação, como produtos químicos e resíduos.

Outro ponto importante foi a detecção de resultados falso-positivos nas etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, que podem estar relacionadas à menor sensibilidade do método microbiológico assim como a presença de genes de outros micro-organismos que podem apresentar o mesmo gene alvo.

## V. Conclusão

Foram observados, resultados divergentes na pesquisa molecular qualitativa de *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes* nas etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo com o método de microbiologia convencional. Dessa forma, o método de análise a partir de PCR desde o pré-enriquecimento, não garante um resultado fidedigno ao final da análise, apresenta variações nos resultados, podendo levar a um falso positivo ou falso negativo.

Portanto, os resultados preliminares sustentam-se em recomendar a manter a estratégias de análise com todas as etapas pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, crescimento de colônias em ágar e posteriormente PCR, para obter segurança nos resultados, não sendo sustentável a utilização de etapas preliminares para o diagnóstico dos patógenos.

## VI. Referências Bibliográficas



# Projetos Integrados

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Salmonella na segurança dos alimentos. **Biológico**, v. 70, n. 1, p. 11-13, 2008S.

DE ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 741-750, 2021.

DE FREITAS V. N. F. **Limite mínimo de detecção de métodos de análise de *Salmonella* spp. para alimentos: uma contribuição metodológica.** 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

DE OLIVEIRA, A. V. B. et al. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte: referencial teórico. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, p. 1, 2011.

EHUWA, O; JAISWAL, A.; K.; JAISWAL, S. Salmonella, segurança alimentar e práticas de manipulação de alimentos. **Alimentos**, v. 10, n. 5, pág. 907, 2021.

FAI, A. E. C. et al. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 4, p. 657-662, 2011.

FREITAS, E. I. de; LEMOS, A. A. de; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, p. 1073-1083, 2006

FRESCHI, C. R. et al. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 363-367, 2005.

GARRIDO, A. et al. Um novo método multiplex de PCR em tempo real desenvolvido para *Salmonella* spp. e detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras de alimentos e ambientais. **Controle alimentar**, v. 30, n. 1, pág. 76-85, 2013.

PISSETTI, C et al. Detecção de *Salmonella* enterica e *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1-8, 2012.



# Projetos Integrados

RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; TAMANINI, R.; SOARES, B.F.; OLIVEIRA, A.M.; SILVA, F.G.; SILVA, F.F.; AUGUSTO, N.A; BELOTI, V. **Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk.** *Semina Ciências Agrárias*, v. 7, p. 3069–3078, 2016

RODRIGUES, T. P. Doenças transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* spp. em ovos comerciais. **Pubvet**, v. 16, n. 05, p. a1118, 2022.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & saúde coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008

## VII. Agradecimentos

Equipe Laboratório de Microbiologia (LABMA), Fundação de Amparo a Pesquisa do Tocantins (FAPT) concedente da bolsa, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT)