



# Metodologias para a identificação de microrganismos patogénicos em amostras alimentares: a técnica de PNA-FISH

Rui Rocha<sup>1,2,3</sup>, Carina Almeida<sup>1,2,3</sup> e Nuno Filipe Azevedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LEPABE, Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>2</sup>Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

<sup>3</sup>BIOMODE, Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152, 4806-909 Guimarães, Portugal

E-mail: nazevedo@fe.up.pt

A população mundial tem crescido a um ritmo sem precedentes, estando estimada atualmente na ordem dos 7 mil milhões de pessoas. Com ela, aumenta também a pressão sobre a produção alimentar. Com efeito estima-se que em 2013 foram produzidas mundialmente 308 milhões de toneladas de carne, 780 milhões de toneladas de leite e derivados, 160 milhões de toneladas de peixe e derivados e 1640 milhões de toneladas de fruta e vegetais<sup>1</sup>. Destes, um valor no total de 1,15 trilhões de dólares (USD) foram gerados por exportação [1, 2]. De facto, nas últimas décadas, com a globalização dos mercados agro-alimentares, tem-se verificado um aumento do tráfego internacional de géneros alimentares. Estes 2 factos traduzem-se em potenciais problemas de segurança alimentar, quer pela quantidade produzida e/ou transportada, quer pelas diferenças nas práticas de segurança alimentar praticadas por cada um dos países de origem dos alimentos.

As doenças causadas por patogénios alimentares são um importante problema de saúde pública a nível mundial, resultando numa elevada taxa de morbilidade e mortalidade. Atualmente são reconhecidos cerca de 31 patogénios, dos quais *Escherichia coli* patogénica, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Sigella* spp. e *Yersinia* spp. são os principais responsáveis pela maioria das doenças, hospitalizações e mortes associadas a infeções de origem alimentar [3].

<sup>1</sup> Dados relativos a 2011

Os últimos dados disponibilizados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), relativos a 2012 estão sumariados na tabela 1. Nela é possível observar que o número de casos com mais ocorrências foram as campilobacterioses (infeções causadas por *Campylobacter* spp.) e que os casos que se traduziram numa maior taxa de hospitalizações e mortes foram os casos de listeriose (infeções causadas por *L. monocytogenes*) com, respetivamente, 91,6% e 17,8%. Relativamente às colites (infeções causadas por *E. coli* patogénicas) o serotipo O157 foi o mais identificado, seguido pelos serotipos O26 e O91 [4]. Em 2012 foram contabilizados cerca de 5 363 surtos alimentares, dos quais 7 tiveram origem em Portugal [4]. Até hoje, o surto alimentar Europeu de 2011 com *E. coli* O104:H4 continua a ser o caso mais grave, em grande parte devido aos erros e atrasos na deteção da fonte do surto [5].

A prevenção da contaminação de géneros alimentares é de vital importância, dado que uma grande percentagem destes produtos é consumida crua e sem qualquer tratamento pós colheita. A juntar a este facto, existe a possibilidade de contaminação cruzada de produtos processados e a sua disseminação a nível local, nacional e internacional.

Os testes microbiológicos de alimentos foram sempre parte integrante da produção alimentar, mas eram geralmente empregues em controlos de produto final, que hoje em dia

Tabela 1 - Dados relativos às infeções causadas por patogénios alimentares na Europa em 2012 [4,6]. Apenas os casos mais relevantes (> 1000 casos), confirmados e comunicados à EFSA, foram considerados.

Doença	Área	Casos	Taxa de hospitalização (%)	Taxa de mortalidade (%)
Campilobacteriose	EU	214 268	47,7	0,03
	Portugal	328	-	-
Salmonelose	EU	91 034	45,1	0,14
	Portugal	76	-	-
Colite	EU	5 671	36,5	0,36
	Portugal	4	-	-
Listeriose	EU	1 642	91,6	17,8
	Portugal	12	-	-

se reconhece como sendo uma estratégia errada. Atualmente encontra-se implementado o sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que mudou o ónus da segurança alimentar dos testes para o controlo do processo de produção [7]. Os testes microbiológicos continuam, no entanto, a ser uma ferramenta fundamental nos processos de controlo e monitorização, visando dois objetivos principais: estabelecer a ausência de agentes patogénios de forma a garantir a segurança dos alimentos e prevenir ou minimizar possíveis contaminações ao longo da cadeia alimentar; enumerar a carga microbiana total e deste modo avaliar a eficácia de tratamentos de higiene, a qualidade e a vida útil do produto. Os testes microbiológicos podem ser divididos em métodos convencionais e alternativos.

Os métodos convencionais baseiam-se no enriquecimento de culturas seguido de ensaios de confirmação, centrados nas propriedades metabólicas e antigénicas do microrganismo a identificar. As principais vantagens da aplicação deste tipo de métodos residem no facto de serem relativamente baratos, tecnicamente simples e apresentarem elevada especificidade e sensibilidade. As desvantagens advêm do facto de serem morosos, laboriosos, propensos a contaminações cruzadas e incapazes de detetar patogénios em baixo número ou no estado viável não cultivável (isto é, células incapazes de crescer nos meios ricos convencionais) [3].

Nesse sentido e de forma a acompanhar o processo de produção e distribuição alimentar, há a necessidade de implementar métodos alternativos de deteção que sejam rápidos, sensíveis, fiáveis e versáteis, que possam adaptar-se facilmente às necessidades das diferentes linhas de produção/processamento de alimentos. Com estas metodologias procura-se reduzir substancialmente o tempo, o trabalho e custo global do processo de deteção. De alguns anos para cá, muito trabalho tem sido realizado neste sentido, sendo possível encontrar no mercado diversos métodos rápidos alternativos de testes de patogénio, os que globalmente se incluem nas categorias de testes moleculares e de biossensores [3].

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam elementos biológicos reativos (sondas e/ou anticorpos) na deteção de microrganismos. Estes sistemas são rápidos e permitem a análise de diversos tipos de elementos empregando um pequeno volume de amostra. No entanto, a entrada no mercado deste tipo de sistemas tem sido dificultada pela baixa sensibilidade, custo elevado aliado a um procedimento complexo e de difícil reprodutibilidade. Adicionalmente, à semelhança de outros métodos moleculares, apresentam limitações na deteção em matrizes alimentares complexas [3].

Os métodos moleculares podem ser subdivididos em imunológicos e os baseados em ácidos nucleicos. Os primeiros baseiam-se na ligação específica entre antígeno e anticorpo, sendo que os segundos (ex: PCR e suas variantes e DNA *microarrays*) usam parte de sequências de DNA ou RNA específicas para os microrganismos a identificar, processando-as por amplificação e/ou hibridação. Os métodos moleculares são na generalidade rápidos e robustos. No entanto, enquanto os métodos imunológicos podem apresentar alguma reatividade cruzada com antígenos semelhantes; os métodos



Figura 1 – Kit Probe4Salmonella desenvolvido pela Biomode S. A. para a deteção de *Salmonella* spp.

baseados em ácidos nucleicos estão dependentes de um passo de amplificação enzimática, que pode ser inibido pela presença de contaminantes [3]. Estes últimos também não permitem distinguir células viáveis de não viáveis e podem necessitar de passos adicionais de extração e purificação do DNA.

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) é também uma metodologia que nos últimos anos tem sido desenvolvida para aplicação a testes microbiológicos de controlo alimentar. Esta consiste basicamente no uso de sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência que hibridam com regiões complementares dos ácidos nucleicos de microrganismos, geralmente RNA ribossomal (rRNA). O método assenta em 4 passos, fixação e permeabilização da amostra, hibridação da sonda com a sequência de rRNA alvo, lavagem (que visa a extração de sonda não hibridada) e finalmente, a observação da amostra ao microscópio de fluorescência ou a sua deteção por citometria de fluxo [8]. Nos trabalhos de FISH, no passo de hibridação, é comum usar uma sonda de DNA ou RNA, que atribuem algumas limitações à metodologia, como baixa robustez e passo de hibridação moroso. A utilização de mímicos de ácidos nucleicos, como o ácido péptido nucleico (PNA), permite ultrapassar algumas destas limitações. O PNA é uma poliamina com uma estrutura neutra composta por unidades de glicina N-(2-aminoetil) ao invés de pentoses e grupos fosfato da molécula de DNA. Esta composição confere, comparativamente às sondas de DNA, várias vantagens, nomeadamente a falta de repulsão electrostática e uma superior estabilidade dos duplexos de PNA/DNA, resultando numa maior especificidade. Por fim as sondas de PNA permitem uma maior acessibilidade ao material genético alvo, dado que a hibridação é realizada sob baixa concentração de sal, promovendo a destabilização das estruturas secundárias do rRNA. Isto traduz-se numa etapa de hibridação muito rápida [8].

A técnica de PNA-FISH oferece portanto uma maior especificidade, estabilidade e rapidez que outros métodos moleculares. Para além disso, e ao contrário de outros métodos baseados em ácidos nucleicos, não é afetada pela presença de inibidores e só deteta microrganismos com um conteúdo ribossomal estável, em teoria, viáveis.

As desvantagens desta metodologia podem residir na inexistência de um passo único de fixação e permeabilização, sendo necessário adaptar tento em conta o microrganismo alvo. Adicionalmente, a identificação dos microrganismos tendo por base as sequências de rRNA, pode gerar problemas em encontrar uma sequência que consiga discriminar microrganismos evolutivamente próximos.

Nesse sentido, os nossos esforços de investigação tem-se focado, desde 2001, na exploração dos mímicos de ácidos nucleicos, nomeadamente as sondas de PNA, e na sua aplicabilidade ao protocolo de FISH. O desenvolvimento, com sucesso, de métodos de PNA-FISH específicos para a deteção de patógenos alimentares, como *Cronobacter*, na origem de graves infeções com elevada taxa de mortalidade em recém-nascidos pelo consumo de fórmula infantil em pó contaminada [9], *Salmonella spp.* [10,11] ou *E. coli* O157:H7 [12]; resultou numa evolução natural para aplicações comerciais (ex.: 2 pedidos de patente internacionais para a aplicação do método de PNA-FISH em *Salmonella spp.*, PCT/IB2011/051337, e *E. coli* O157:H7, PCT/PT2014/000023). Esta tecnologia, e subsequentes aplicações à área da segurança alimentar, estiveram na base da criação da empresa Biomode S.A.. As aplicações baseadas em PNA-FISH que neste momento se encontram a iniciar o processo de certificação internacional, poderão em breve alargar o leque de soluções moleculares existentes no mercado, contribuindo para um melhor rastreio do processo produtivo e prevenção das infeções alimentares (Figura 1).

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE, através do Programa Operacional do Norte (ON2) e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos projetos PEst-C/EQB/UI0511, NORTE-07-0124-FEDER-000025 - RL2\_ Environment&Health e Projeto “DNA mimics” PIC/IC/82815/2007; Bolsa de Doutoramento SFRH/BDE/51910/2012 e Bolsa de Pós-Doutoramento SFRH/BPD/74480/2010.

## Referências

- [1] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. FAO food outlook, biannual report on global food markets November 2013, FAO Publishing
- [2] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. FAO statistical yearbook 2014, Near East and North Africa Food and Agriculture, FAO Publishing
- [3] Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö. G., Soyer, Y. e Alpas, H. 2014. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control*, 40:359-367
- [4] EFSA, European Food Safety Authority. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. Parma, Itália: EFSA Journal, 12:3547
- [5] WHO, World Health Organization. 2011. A public health review of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreak in Germany 9
- [6] EFSA, European Food Safety Authority. Portugal - 2012 Report on trends and sources of zoonoses. Parma, Itália
- [7] FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2003. Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water: Guidelines. Microbiological Risk Assessment Series No. 3. Roma, Italia
- [8] Cerqueira, L., Azevedo, N. F., Almeida, C., Tatiana, J., Keevil, C. W. and Vieira, M. J. 2008. DNA Mimics for the Rapid Identification of Microorganisms by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). *International Journal of Molecular Sciences*, 9:1944-1960
- [9] Almeida, C., Azevedo, N. F., Iversen, C., Fanning, S., Keevil, C. W. e Vieira, M. J. 2009. Development and Application of a Novel Peptide Nucleic Acid Probe for the Specific Detection of *Cronobacter* Genomespecies (*Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:2925-2930
- [10] Almeida, C., Azevedo, N. F., Fernandes, R. M., Keevil, C. W. e Vieira, M. J. 2010. Fluorescence *In Situ* Hybridization Method Using a Peptide Nucleic Acid Probe for Identification of *Salmonella spp.* in a Broad Spectrum of Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:4476-4485
- [11] Almeida, C., Cerqueira, L., Azevedo, N. F. e Vieira, M. J. 2013. Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 161:16-22
- [12] Almeida, C., Sousa, J. M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S. Azevedo, N. F. e Vieira, M. J. 2013. Detection of *Escherichia coli* O157 by Peptide Nucleic Acid Fluorescence *In Situ* Hybridization (PNA-FISH) and Comparison to a Standard Culture Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:6293-6300