

MÉTODOS MOLECULARES COMO FERRAMENTA DE SUPORTE À SEGURANÇA DE ALIMENTOS: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E DETECÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM PIMENTA-DO-REINO

Mariana Barboza Vinha¹; Túlio Morgan²; Larissa Bernardino Moro³; Inorbert de Melo Lima⁴; Jairo Pinto de Oliveira⁵; Servio Tulio Alves Cassini⁶

Resumo – Doenças de origem alimentar configuram importante causa de morbidade e mortalidade, dificultando o desenvolvimento socioeconômico em todo o mundo. Detectar bactérias patogênicas em alimentos é necessário para prevenção e controle desses surtos, mitigando seus impactos na saúde pública. Métodos baseados em cultura *in vitro* são sensíveis para identificar esses patógenos mesmo quando presentes em baixas contagens, no entanto, são trabalhosos e lentos. Ações de vigilância dos alimentos demandam baixo tempo de resposta, o que impulsiona o desenvolvimento de métodos mais rápidos de análise. Este trabalho objetivou caracterizar a microbiota e detectar *Salmonella* em pimenta-do-reino. Amostras de pimenta-do-reino em grãos produzidas na região Norte do Espírito Santo foram submetidas a *metabarcoding* para caracterização da microbiota e a qPCR para detecção de *Salmonella* sp. Amostras com qPCR positivo foram submetidas ao cultivo para isolamento do patógeno e sorotipificação. Uma elevada diversidade do número de gêneros de bactérias foi constatada nas amostras. O uso do PCR reduziu o tempo de análise em cinco dias e detectou o patógeno em 30,5% (11/36) das amostras. O método foi sensível, capaz de detectar *Salmonella* em contagens que variaram entre 0,004 NMP/g e > 0,092 NMP/g. As técnicas avaliadas mostraram-se promissoras na detecção do gênero *Salmonella* e contribuíram para melhoria da segurança dos alimentos. O *metabarcoding* apresentou baixa sensibilidade para detecção do patógeno e os métodos utilizados apresentaram limitação na identificação das espécies. A combinação de métodos moleculares e tradicionais ainda são necessários para uma avaliação de risco mais completa e confiável.

Palavras-chaves: *Salmonella*; qPCR; metagenômica; *metabarcoding*; vigilância de alimentos.

¹D.Sc. Engenharia Ambiental, Extensionista do Incaper, mariana.vinha@incaper.es.gov.br

²D.Sc. Bioinformática, Pesquisador do Incaper

³D.Sc. Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Pesquisadora CPID/Lacar

⁴D.Sc. Fitopatologia, Pesquisador do Incaper

⁵D.Sc. Biotecnologia, Professor da Ufes, Pesquisador CPID/Lacar

⁶D.Sc. Microbiologia Ambiental, Professor da Ufes, Pesquisador CPID/Lacar

MOLECULAR METHODS AS A TOOL TO SUPPORT FOOD SAFETY: CHARACTERIZATION OF THE MICROBIOTA AND DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA IN BLACK PEPPER

Abstract – Foodborne diseases represent an important cause of morbidity and mortality, hindering socioeconomic development worldwide. Detecting pathogenic bacteria in food is necessary for the prevention and control of outbreaks, thereby mitigating their impacts on public health. *In vitro* culture-based methods are sensitive for identifying these pathogens even when present at low counts; however, they are laborious and time-consuming. Food surveillance actions demand a short response time, which drives the development of faster analytical methods. This study aimed to characterize the microbiota and detect *Salmonella* in black pepper. Samples of black pepper collected from the northern region of Espírito Santo were subjected to *metabarcoding* for microbiota characterization and to qPCR for *Salmonella* detection. Samples that tested positive by qPCR were cultured for pathogen isolation and serotyping. A high diversity in the number of bacterial genera was observed in the samples. The use of PCR reduced the analysis time by five days and detected the pathogen in 30.5% (11/36) of the samples. The method proved sensitive, able to detect *Salmonella* at counts ranging from 0.004 MPN/g to >0.092 MPN/g. The evaluated techniques showed great potential for detecting the genus *Salmonella* and contributed to improving food safety. Metabarcoding showed low sensitivity for pathogen detection, and the applied methods used had limitations in species identification. The combination of molecular and traditional methods is still necessary to achieve a more complete and reliable risk assessment.

Keywords: *Salmonella*; qPCR; metagenomics; metabarcoding; food surveillance.

MÉTODOS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA DE APOYO A LA SEGURIDAD ALIMENTARIA: CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA Y DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN LA PIMIENTA NEGRA

Resumen – Las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, lo que dificulta el desarrollo socioeconómico a nivel mundial. La detección de bacterias patógenas en los alimentos es necesario para prevenir y controlar estos brotes, mitigando su impacto en la salud pública. Los métodos basados en cultivos *in vitro* son sensibles para identificar estos patógenos incluso cuando están presentes en cantidades bajas, sin embargo, son laboriosos y lentos. Las medidas de vigilancia alimentaria requieren tiempos de respuesta cortos, lo que impulsa el desarrollo de métodos de análisis más rápidos. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la microbiota y detectar *Salmonella* en la pimienta negra. Se analizaron muestras de granos enteros de pimienta negra producidos en la región norte de Espírito Santo mediante metabarcoding para la caracterización de la microbiota y qPCR para la detección de *Salmonella* sp. Las muestras con qPCR positiva se sometieron a cultivos para aislar el patógeno y realizar la serotipificación. Se observó una gran diversidad en el número de géneros de bacterias en las muestras. El uso de PCR redujo el tiempo de análisis en cinco días y detectó el patógeno en el 30,5 % (11/36) de las muestras. El método fue sensible, capaz de detectar *Salmonella* en recuentos que variaron entre 0,004 NMP/g y > 0,092 NMP/g. Las técnicas evaluadas se mostraron prometedoras en la detección del género *Salmonella* y contribuyeron a mejorar la seguridad alimentaria. El metabarcoding mostró baja sensibilidad para detectar el patógeno y los métodos utilizados mostraron limitaciones en la identificación de las especies. La combinación de métodos moleculares y tradicionales sigue siendo necesaria para realizar una evaluación de riesgos más completa y fiable.

Palabras clave: *Salmonella*; qPCR; metagenómica; metabarcoding; vigilancia alimentaria.

INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar configuram importante causa de morbidade, mortalidade e dificultam o desenvolvimento socioeconômico em todo o mundo (WHO, 2015). Especiarias são ingredientes de grande relevância na transmissão de patógenos alimentares, pois apresentam ampla utilização na culinária e na indústria de alimentos, além de uma extensa vida de prateleira. Portanto, contaminações por bactérias patogênicas podem provocar surtos prolongados e difíceis de elucidar, acometendo um elevado número de doentes e com ampla distribuição geográfica dos casos (Szűcs et al., 2018).

O aumento do número de notificações para a presença de *Salmonella* sp. em pimenta-do-reino brasileira, importada pela União Europeia, resultou na adoção de controles especiais para o produto como medida de proteção à saúde nos estados membros da União Europeia, resultando no rechaço de remessas e prejuízos econômicos para os produtores e exportadores brasileiros (União Europeia, 2019, 2021). Além disso, a detecção de *Salmonella* sp. em pimenta-do-reino comercializada no varejo e em remessas importadas é relatada com frequência em diferentes países (György et al., 2021; Matosinhos et al., 2020; Ogur, 2022; Sagoo et al., 2009; Zhang et al., 2017), reforçando que o seu consumo representa risco potencial à saúde pública.

Salmonella sp. pode provocar surtos alimentares mesmo quando presente em baixas contagens em alimentos (Lehmacher; Bockemuhl; Aleksic, 1995). Sua detecção em especiarias é um grande desafio dada a complexidade química dos alimentos, a baixa prevalência e contagem nas amostras e a necessidade de avaliação de grandes lotes comercializados (Ricke et al., 2018). Para garantir a eficácia dessa avaliação, é necessário que os métodos de análise empregados sejam sensíveis, rápidos e confiáveis (Bradford et al., 2024; Grützke et al., 2019), possibilitando uma avaliação eficiente dos lotes de pimenta-do-reino, para evitar surtos e reduzir os impactos das contaminações na saúde pública.

Métodos analíticos devem ser sensíveis o suficiente para garantir a detecção de uma unidade formadora de colônia em 25 g do alimento, pois a legislação brasileira, e de outros países, determina a ausência do patógeno como padrão de segurança (Brasil, 2022). Métodos baseados em cultura são altamente sensíveis, porém podem ser trabalhosos e demorar até sete dias para confirmar a presença de *Salmonella* em um alimento (Bradford et al.,

2024). Essas limitações atrasam a liberação de lotes para comercialização, atrasam a aprovação da entrada de produtos nos países importadores e comprometem ações de investigação e contenção de surtos alimentares por parte dos órgãos de saúde pública (Ricke et al., 2018).

Métodos independentes de cultura, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento de *metabarcodes* e sequenciamento de metagenoma podem ser utilizados para detecção de patógenos, com menor custo, maior velocidade e com potencial de detectar múltiplos patógenos em um único ensaio (Bradford et al., 2024), no entanto, metodologias baseadas nessas abordagens devem apresentar confiabilidade e sensibilidade equivalentes aos métodos oficiais baseados em cultura (Brasil, 2019). Métodos moleculares baseados em PCR oferecem maior agilidade, especificidade, sensibilidade e menor custo e já são utilizados de forma eficiente para detecção do gênero *Salmonella*. Porém, não são capazes de recuperar os isolados bacterianos e apresentam limitações para rastreamento de surtos alimentares em função de sua baixa resolução molecular, que não permite identificação das espécies e sorotipos (Grützke et al., 2019).

O sequenciamento do genoma completo (em inglês: *whole genome sequencing* – WGS) é capaz de fornecer informações sobre identidade de espécies, sorotipo, virulência e genótipos com resistência antimicrobiana em uma única abordagem, o que aumenta sua eficiência na elucidação de surtos e atribuição de fontes de contaminação (Ashton et al., 2016; Elnekave et al., 2020). A evolução das ferramentas de bioinformática favoreceu a implantação do WGS para controle de surtos, substituindo métodos fenotípicos, como a sorotipagem, em países europeus, Reino Unido, Canadá e EUA (Tran et al., 2023). O alto poder discriminatório do WGS permite diferenciar cepas relevantes ou não em um surto, sendo utilizado com sucesso para definir sua origem. No entanto, a dependência de obter os isolados por meio do cultivo é uma limitação relevante para o método, pois o processo de isolamento pode ser muito demorado para triagem de alto rendimento de alimentos suspeitos, reduzindo sua celeridade (Billington; Kingsbury; Rivas, 2022; Grützke et al., 2019). Além disso, alguns patógenos bacterianos são de difícil cultivo ou podem estar presentes no alimento em estado viável, mas não cultivável, impossibilitando o uso desta abordagem (Billington; Kingsbury; Rivas, 2022).

Abordagens metagenômicas são capazes de caracterizar comunidades microbianas em um alimento ou ingredientes sem necessidade de realizar o cultivo (Billington; Kingsbury; Rivas, 2022). Além disso, permite a identificação e a tipagem simultâneas do agente causador e identificação de genes de resistência antimicrobiana ou de virulência (Grützke et al., 2019). O *metabarcoding* visa identificar, simultaneamente, diversos organismos presentes em uma amostra com base em um marcador genético universal, como o gene 16S rRNA, para bactérias. A técnica envolve amplificação *in vitro* deste alvo genético, utilizando PCR, seguida do sequenciamento de alto rendimento (HTS), e permite caracterizar comunidades biológicas de forma rápida e abrangente. Com isso, possibilita a realização de estudos de estrutura e composição de comunidades de organismos, oferecendo uma visão abrangente e com razoável detalhamento da composição taxonômica em amostras complexas (Compson et al., 2020). A metagenômica *shotgun* é baseada na extração e sequenciamento não direcionado de todo o conteúdo genômico da amostra, o que permite avaliar a funcionalidade do microbioma, sua plasticidade, processos biológicos em andamento, variações de sequência e variabilidade evolutiva, além de identificar organismos em uma resolução taxonômica mais alta (Sadurski et al., 2024).

A avaliação metagenômica é parte da próxima revolução disruptiva em diagnósticos para segurança de alimentos. A rápida consolidação do WGS como ferramenta essencial à segurança de alimentos e o avanço acelerado das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento possibilitam aprimorar essas ferramentas e melhorar a eficiência da vigilância e avaliação de riscos para a segurança de alimentos (Billington; Kingsbury; Rivas, 2022). A integração do sequenciamento de próxima geração com tecnologias digitais emergentes poderá ampliar o uso da metagenômica na pesquisa e no controle de qualidade, revolucionando a segurança dos alimentos por meio da detecção de patógenos, monitoramento de resistência antimicrobiana e identificação de fraudes e erros de rotulagem (Sadurski et al., 2024).

O objetivo deste trabalho foi apresentar os resultados obtidos a partir da combinação do método baseado em cultura e de novos métodos de análise que não demandam cultivo, PCR e *metabarcoding* para caracterização do microbiota bacteriana e para detecção de *Salmonella* sp. e outros patógenos alimentares em grãos de pimenta-do-reino.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de pimenta-do-reino em grãos foram coletadas em nove propriedades rurais, localizadas nos municípios de São Mateus (n=6), Jaguaré (n=2) e Rio Bananal (n=1), localizados na região Norte do Espírito Santo, e em três empresas exportadoras, localizadas nos municípios de São Mateus (n=2) e Linhares (n=1). Foram realizadas três coletas, entre os meses de maio e setembro de 2023, em cada uma das propriedades e empresas de exportação, totalizando 36 amostras.

DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA

A determinação da microbiota ocorreu por *metabarcoding* com a região alvo do gene 16S para a caracterização da população bacteriana. Uma amostra composta foi obtida para cada propriedade (Pn) e cada empresa de exportação (En) a partir da pesagem de 100 g de amostra obtida em cada uma das repetições. A amostra composta foi submetida à moagem em moedor elétrico (Botini, Brasil). O equipamento foi higienizado e as partes móveis que entraram em contato com as amostras foram autoclavadas a 121 °C por 15 minutos entre uma moagem e outra.

Após moagem, procedeu-se à extração de DNA a partir de 500 mg de amostra com DNeasy PowerSoil DNA kit (Qiagen) e quantificação do Nanodrop (Thermo). A região V3-V4 do 16S rDNA foi amplificada com os primers 341F e 805R. Os amplicons foram sequenciados em plataforma Illumina NextSeq 1000 com layout paired-ends 2 x 300bp. Os arquivos de sequenciamento no formato fastq foram importados para a pipeline QIIME2 v.2022.2 (Bolyen et al., 2019). O programa cutadapt (Martin, 2011) foi utilizado para remover os primers das sequências, seguido de *denoising*, *merging*, remoção de sequências químicas e obtenção de *Amplicon Sequence Variants* (ASVs), usando DADA2 (Callahan et al., 2016). Em seguida, o conjunto de ASVs foi filtrado para remover sequências de baixa frequência (menos de 10 ocorrências). A classificação das ASVs foi conduzida utilizando um algoritmo de aprendizagem de máquina do tipo Naive-Bayes supervisionado (Bokulich et al., 2018), que foi implementado a partir da biblioteca *scikit-learn*, em linguagem Python. Esse algoritmo foi previamente treinado com segmentos V3-V4 de genes 16S rRNA, obtidos do banco de dados SILVA (versão 138) (Quast et al., 2012), para fornecer a probabilidade da ASV pertencer a um grupo taxonômico.

As curvas de rarefação foram obtidas usando a função *rarecurve* do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020) no ambiente R (R core team 2023). As abundâncias relativas de ASVs foram representadas em gráficos de barras empilhadas, construídos usando o pacote *ggplot2* (Wickham, 2016) no ambiente R. Quando necessário, as abundâncias relativas foram transformadas aplicando raiz quadrada, de modo a reduzir a influência de táxons dominantes e facilitar a interpretação gráfica.

DETECÇÃO DE SALMONELLA

A detecção de *Salmonella* spp. ocorreu pelo método PCR em tempo real, utilizando o kit iQ-Check *Salmonella* spp. II (Bio-rad, EUA). Dez porções de 25 g de cada amostra foram transferidas para 10 frascos contendo 225 mL de água peptonada tamponada (BPW) e incubada a 37 °C por 18 ± 2 horas para o enriquecimento. Após enriquecida, uma alíquota de 1 mL de cada frasco para obtenção de uma amostra composta. Uma alíquota de 100 µL da amostra composta foi submetida à extração de DNA pela adição de reagente de lise (Reagente A, Bio-rad, EUA), seguida de homogeneização, incubação em termobloco (97 °C/15 minutos), homogeneização e centrifugação. O material extraído foi submetido à PCR após adição da solução de amplificação (Reagente C, Bio-rad, EUA), primers e sondas fluorescentes (Reagente B, Bio-rad, EUA). O mesmo procedimento foi realizado para os controles positivos e negativos (Reagentes D e E, Bio-rad, EUA). A análise procedeu em termociclador (CFX96, Bio-rad, EUA) e os dados processados pelo software CFX Manager IDE (Bio-rad, EUA). Para cada amostra composta com resultado positivo, o mesmo procedimento foi repetido para os dez frascos contendo a amostra enriquecida.

A *Salmonella* sp. foi quantificada pela técnica do número mais provável em uma diluição única de 10 x 25 g (250 g) para as amostras de pimenta-do-reino e 5 x 25 g (125 g) para amostras ambientais de solo, água e resíduo (Blodgett, 2010).

Os resultados positivos para PCR foram confirmados pelo método de cultura em placas, conforme ISO 6579-1:2017 (ISO, 2007). Colônias típicas e atípicas, obtidas após enriquecimento seletivo e cultivo em placas, foram submetidas a testes bioquímicos pelo método API 20E (API 20E, Biomeritux, Franca) e à reação de aglutinação com antissoros polivalentes (Probac, São Paulo, Brasil). Isolados, positivos para *Salmonella* foram enviados ao laboratório de referência do Instituto Adolfo Lutz para sorotificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curvas de rarefação foram geradas para verificar a adequação do esforço de sequenciamento entre amostras com diferentes volumes de dados (Figura 1). O comportamento assintótico observado em todas as amostras confirmou que a profundidade de sequenciamento foi suficiente para capturar a maior parte da diversidade bacteriana e que a obtenção de dados de sequenciamento adicionais não aumentaria substancialmente o número de táxons observados.

A técnica de *metabarcoding* envolve amplificação *in vitro* do alvo genético, utilizando PCR, e sequenciamento de alto rendimento (HTS), portanto, é comum que o volume de dados gerados para cada amostra não seja constante (Weiss et al., 2017). Isso resulta em amostras com diferentes profundidades (volume de dados) de sequenciamento e pode introduzir vieses analíticos. Por exemplo, uma amostra com um número significativamente maior de sequências após o sequenciamento pode parecer artificialmente mais rica em diversidade microbiana, não porque sua comunidade é de fato mais diversa, mas porque o volume maior de dados aumentou a probabilidade de detecção de táxons pouco abundantes. A rarefação corrige esse desequilíbrio, minimizando os vieses técnicos e contribuindo para que as diferenças observadas reflitam variações biológicas e não artefatos do sequenciamento (Hong et al., 2022).

A diversidade baseada no número de gêneros de bactérias por amostra (Figura 2) revelou uma elevada riqueza de táxons, com centenas de gêneros distintos identificados em cada amostra de pimenta-do-reino. A normalização desses valores pela soma das frequências por amostra indicou que a diversidade de gêneros não se deve apenas à profundidade de sequenciamento, mas também reflete a composição heterogênea das comunidades bacterianas. Dessa forma, a *metabarcoding* permitiu a caracterização simultânea de múltiplos táxons, possivelmente incluindo aqueles de difícil cultivo ou ainda não cultiváveis (Knight et al., 2018). Isso evidencia a abrangência da técnica para exploração profunda das comunidades bacterianas, um resultado dificilmente atingível por métodos tradicionais de cultivo microbiológico ou utilizando técnicas bioquímicas.

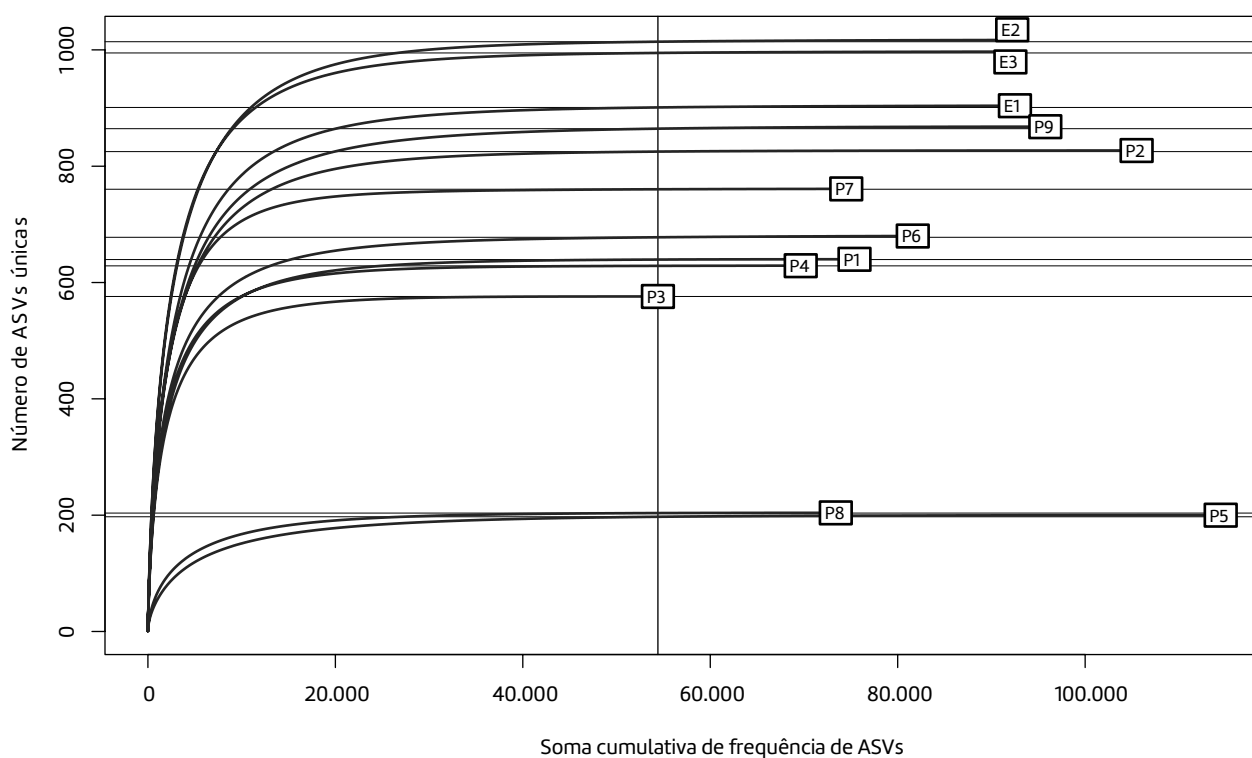


Figura 1 – Curvas de rarefação da relação entre o número de ASVs observadas e o volume de dados de sequenciamento para a região V3-V4 do gene 16S rRNA. Linhas horizontais em cinza representam o número máximo de ASVs detectado em cada amostra. A linha vertical indica a profundidade mínima de sequenciamento (amostra P3 com 54.415).

Fonte: Elaborado com dados de sequenciamento do DNA no software R.

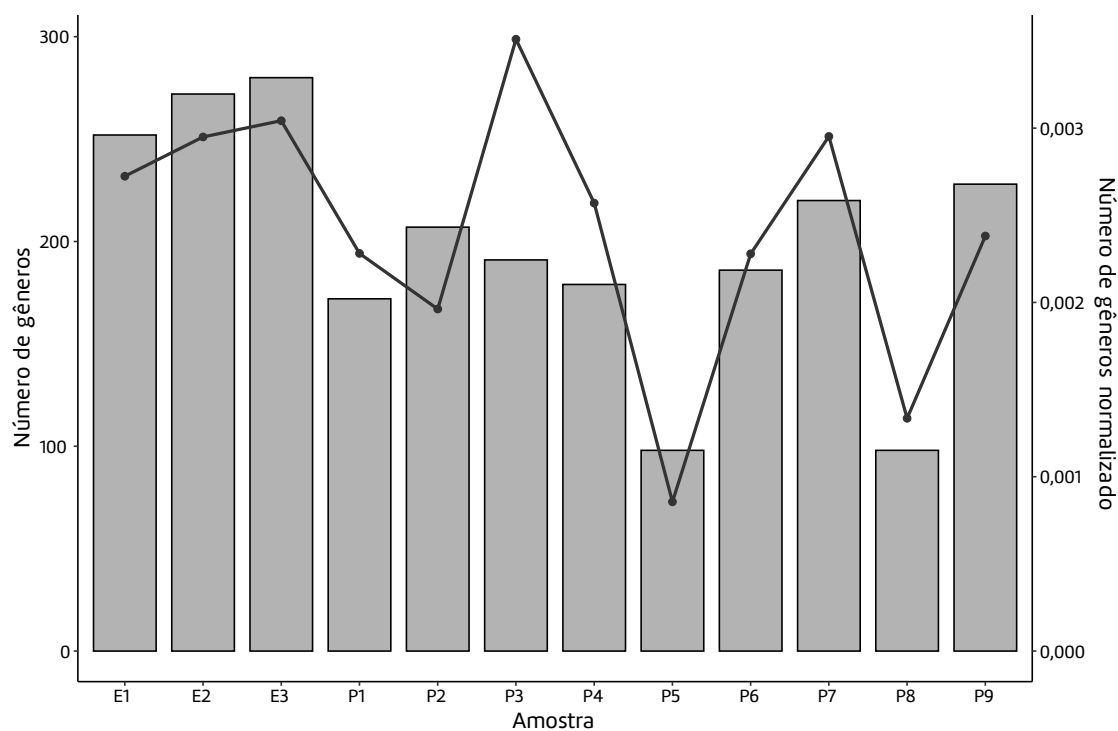


Figura 2 – Número total de gêneros de bactérias detectados por amostra (barras, eixo y à esquerda) e valores normalizados pela soma das frequências dos gêneros de cada amostra (pontos, eixo y à direita).

Fonte: Elaborado com dados de sequenciamento do DNA no software R.

A análise da composição taxonômica das amostras indicou variabilidade de táxons mais abundantes nas comunidades microbianas analisadas (Figura 3). Gêneros de menor abundância relativa foram agrupados na categoria “Outros”, refletindo a presença de uma fração bacteriana menos dominante, mas ainda relevante. Observou-se que proporção considerável de sequências foram classificadas como “Indeterminado”, ou seja, são provenientes de bactérias ainda desconhecidas ou para as quais não foi possível fazer a atribuição taxonômica

confiável por limitações da técnica. A descrição geral da estrutura da comunidade bacteriana fornece uma visão abrangente sobre os principais grupos presentes em cada condição avaliada, bem como grupos menos representativos. Esses resultados são fundamentais em estudos de microbiotas, pois permitem identificar padrões de dominância, possíveis bioindicadores e direcionar análises mais aprofundadas sobre o papel ecológico ou funcional dos grupos predominantes.

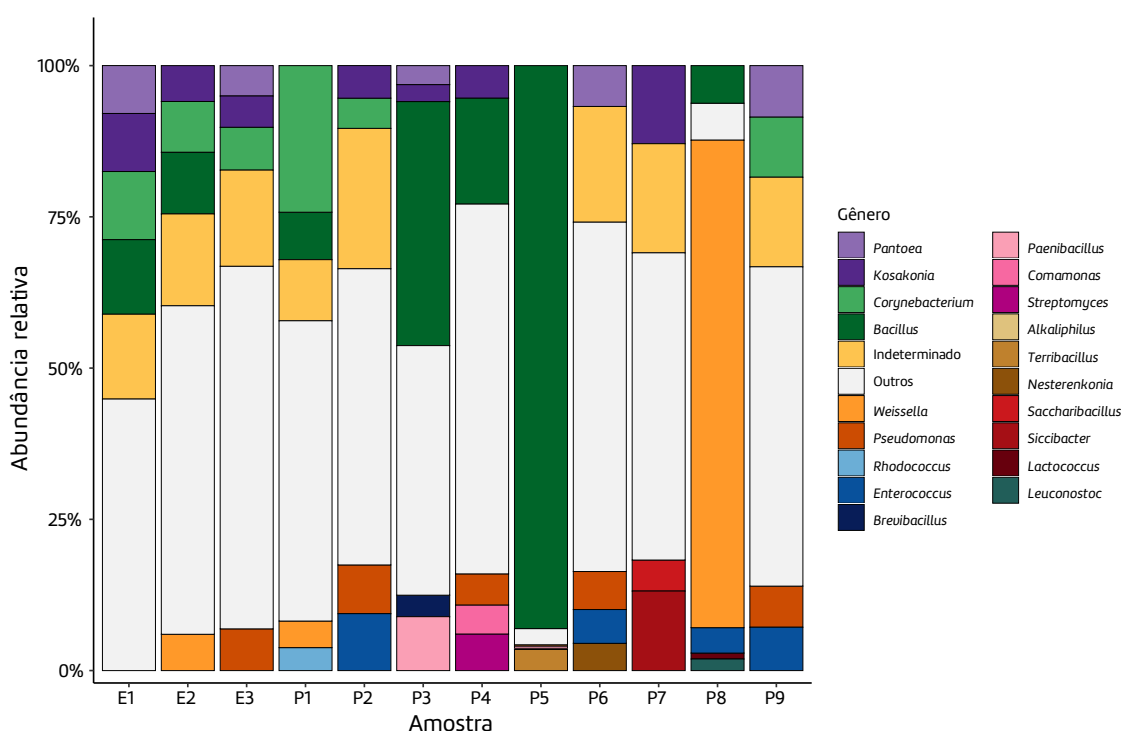


Figura 3 – Visão geral dos gêneros de bactérias mais abundantes detectados por amostra. As barras empilhadas referem-se à abundância relativa, ou seja, o quociente da frequência do gênero e da soma total das frequências dos gêneros em cada amostra.

Fonte: Elaborado com dados de sequenciamento do DNA no software R.

A proposta deste estudo consistiu em contribuir para detecção de possíveis patógenos alimentares, tais como *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. e outras bactérias entéricas, além de permitir a caracterização geral da microbiota bacteriana. Em conjunto, isso auxilia no entendimento da qualidade microbiológica dos alimentos e pode ser usado para aprimorar práticas de manejo da cultura, manipulação e armazenamento da pimenta-do-reino ao longo da cadeia produtiva.

No que tange aos patógenos alimentares comumente encontrados em pimenta-do-reino (György et al., 2021; Ogur, 2022), foi possível detectar diversos gêneros de *Clostridium* (Figura 4), incluindo *Clostridium sensu stricto* 1,

gênero que contém a espécie patogênica *Clostridium perfringens*. Além disso, bactérias entéricas, representadas pelos gêneros *Escherichia*, *Shigella*, e o gênero *Staphylococcus* foram detectados em praticamente todas as amostras avaliadas. Sequências referentes ao gênero *Salmonella* e à espécie *Bacillus cereus*, descritas como possíveis contaminantes em pimenta-do-reino, não foram detectadas por *metabarcoding*.

O resultado encontrado no estudo diverge do relatado por Sané et al. (2024), que identificaram predominância de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* ao analisar a diversidade bacteriana de amostras de especiarias comercializadas no Senegal. Essa diferença pode ser devido à maior contaminação natural das

amostras comercializadas no local do estudo, justificada pelas falhas em boas práticas de higiene relatadas pelos autores. Além disso, a metodologia utilizada por eles foi o sequenciamento completo do gene 16S, diferente do *metabarcoding* utilizado nesse estudo, que sequenciou

apenas parte do gene 16S. O sequenciamento completo do gene 16S pode ter contribuído para aumentar a eficiência de detecção dos patógenos nas amostras comercializadas em Senegal.

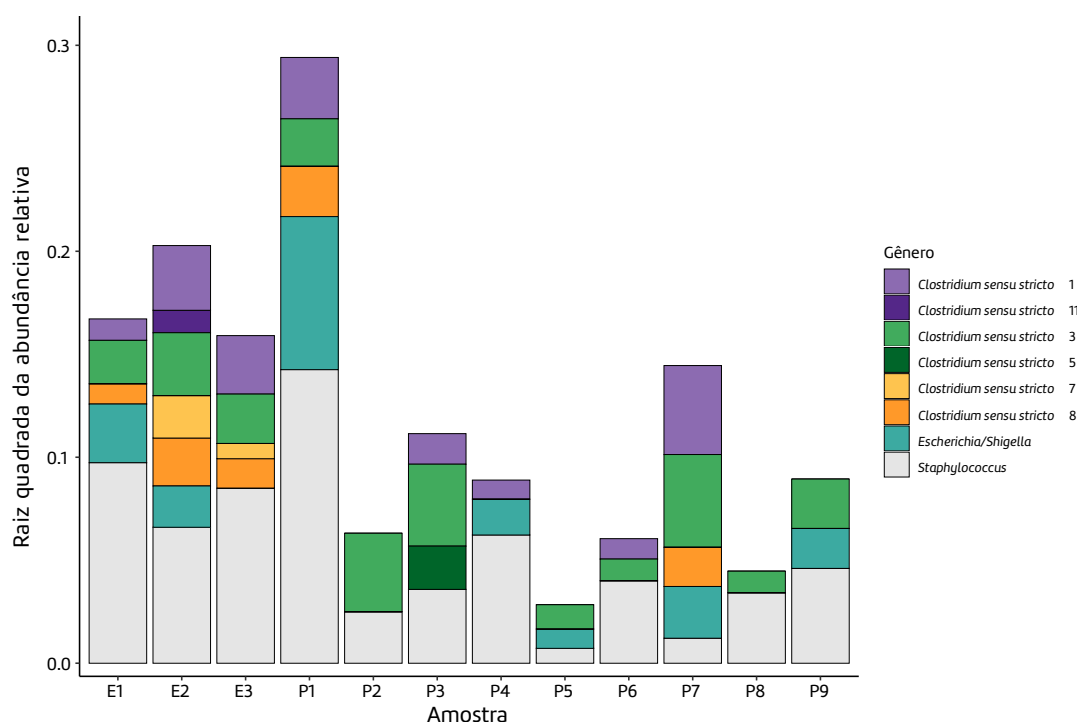


Figura 4 – Abundância relativa de possíveis patógenos alimentares detectados nas amostras de pimenta-do-reino. As barras empilhadas referem-se à abundância relativa, quociente da frequência do gênero e da soma total das frequências dos gêneros em cada amostra. Os valores de abundância relativa foram transformados aplicando raiz quadrada para aprimorar a visualização.

Fonte: Elaborado com dados de sequenciamento do DNA no software R.

Salmonella spp. foi detectada pelo método qPCR em 30,5% (11/36) das amostras de pimenta-do-reino coletadas no Espírito Santo, no Brasil, sendo oito delas oriundas de propriedades rurais (n=27) e três de empresas de exportação (n=9). Sete das nove propriedades e duas das três empresas de exportação apresentaram, pelo menos, uma amostra positiva para *Salmonella* sp. A contagem do patógeno foi baixa em todas as amostras positivas, variando entre 0,004 NMP/g e > 0,092 NMP/g, o que dificulta sua detecção, especialmente para avaliação de grandes lotes, como é o caso da pimenta-do-reino.

O método qPCR mostrou-se sensível para detecção do patógeno, identificando sua presença mesmo em baixas contagens na amostra. Resultados positivos foram obtidos após 24h, 18h e 6h para extração do DNA e análise qPCR, apresentando maior agilidade quando comparado aos métodos baseados em cultura, que demoram em torno de sete dias. O kit comercial utilizado,

iQ-Check *Salmonella* spp. II, possui validação como método alternativo a ISO 6579-1:2017 (Afnor, 2024), mostrando-se muito eficaz na triagem para isolamento do patógeno de amostras sem inoculação e possibilitou a análise de um maior número de amostras em curto espaço de tempo, otimizando trabalho. Com isso, foi possível aumentar o tamanho da amostra analisada, o que melhorou a sensibilidade de detecção do patógeno em grãos de pimenta-do-reino. Ressalta-se ainda que foi possível obter, ao menos, um isolado *Salmonella* sp. para cada amostra com qPCR positivo.

Embora o método qPCR tenha sido eficiente na detecção do gênero *Salmonella*, a metodologia utilizada não foi capaz de identificar os sorotipos presentes na amostra. Diante desse desafio, realizou-se o isolamento a partir das amostras enriquecidas oriundas de frascos com PCR positivo. Foram obtidos 17 isolados, que foram submetidos à tipificação por sorologia para identificação. Os principais sorotipos identificados foram: Javiana (6),

Agona (2), Cerro (2), Euston (2), Saintpaul (2), Typhimurium (2) e Mbandaka (1), todos pertencentes à espécie *Salmonella enterica* subespécie I. Será realizado, no futuro, o sequenciamento do genoma completo desses isolados, com o intuito de estabelecer suas relações filogenéticas e identificar a presença de genes de virulência e resistência a antibióticos.

A abordagem *metabarcoding* não detectou a presença do patógeno nas amostras, o que pode ser justificado pela sua ocorrência em baixas contagens. A detecção de sequências depende da presença de fragmentos do seu genoma, que é proporcional a sua contagem nas amostras. Membros pouco abundantes geram poucas leituras de sequenciamento, que podem ser perdidos na análise (Grützke *et al.*, 2019). O enriquecimento parcial da amostra para patógenos, antes da análise, pode ajudar a superar esse problema, no entanto, pode introduzir um viés em direção a espécies fáceis de cultivar e de rápido crescimento, afetando a abundância ou a qualidade do DNA de uma espécie específica em uma amostra (Billington; Kingsbury; Rivas, 2022). Uma alternativa para aprimorar a detecção de patógenos, como a *Salmonella*, é utilizar outra abordagem metagenômica. Grützke *et al.* (2019), constatam que o sequenciamento 16S rDNA resultou em altos desvios da composição esperada da amostra em nível de gênero e espécie e não detectou diversas espécies patogênicas, indicando que o sequenciamento *shotgun* seria o mais adequado para detecção de espécies, estimativa de abundância, montagem de genoma e caracterização de espécies. Patógenos alimentares normalmente estão presentes em baixas contagens nos alimentos, se o foco da abordagem metagenômica for detectar esse grupo de microrganismo, é relevante conduzir um enriquecimento microbiológico antes de proceder com a utilização de métodos de detecção metagenômica *shotgun* ou *metabarcoding*, de modo a aumentar a sensibilidade dessas técnicas para detecção desses patógenos (Bradford *et al.*, 2024).

CONCLUSÃO

O qPCR e a metagenômica são técnicas promissoras na detecção de patógenos alimentares que podem, futuramente, aumentar a eficiência do controle da qualidade e na segurança dos alimentos ofertados à população. As aplicações potenciais dessas técnicas para segurança de alimentos são vastas e incluem uma caracterização abrangente da composição microbiana e avaliação de segurança microbiológica em alimentos.

No entanto, para que elas se tornem uma prática rotineira, sensível e confiável alguns desafios devem ser superados, como a dificuldade de detecção de táxons em menor abundância, a baixa resolução taxonômica em nível de espécie e a possibilidade de vieses relacionados à amplificação por PCR, utilizando gene 16S rRNA. Diante das limitações postas sobre as metodologias disponíveis para detecção e identificação de patógenos, a integração de diferentes abordagens – moleculares e tradicionais – é a melhor alternativa para obter uma análise mais robusta e completa na avaliação de risco e vigilância para garantia da segurança microbiológica de alimentos.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Mariana Barboza Vinha e Inorbert de Melo Lima participaram da concepção e do delineamento do estudo, condução dos experimentos, coleta e análise dos dados, bem como da redação inicial do manuscrito. Túlio Morgan contribuiu para a análise estatística dos dados, interpretação dos resultados e revisão crítica do conteúdo intelectual do artigo. Larissa Bernardino Moro atuou no acompanhamento experimental, organização do banco de dados e revisão do manuscrito. Destaca-se ainda que Inorbert de Melo Lima e Mariana Barboza Vinha participaram da concepção do estudo, interpretação dos resultados, redação e revisão crítica do manuscrito, além da supervisão geral da pesquisa. Jairo Pinto de Oliveira contribuiu para a interpretação dos resultados e revisão crítica do manuscrito. Servio Tulio Alves Cassini participou da concepção do trabalho, interpretação dos dados e revisão final do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do artigo e concordam com a sua submissão.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes) (TO 167/2021) pelo apoio financeiro e à Secretaria da Agricultura do Estado do Espírito Santo (Seag) pelo apoio.

REFERÊNCIAS

AFNOR. **Certify the analytical performances of test kits – *Salmonella* spp.** Disponível em: <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/salmonella-spp/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

- ASHTON, P. M.; NAIR, S.; PETERS, T. M.; BALE, J. A.; POWELL, D. G.; PAINSET, A.; TEWOLDE, R.; SCHAEFER, U.; JENKINS, C.; DALLMAN, T. J.; PINNA, E. M.; KATHIE A GRANT, K. A. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing. **PeerJ**, n. 4, e1752, 2016. DOI: 10.7717/peerj.1752.
- BILLINGTON, C.; KINGSBURY, J. M.; RIVAS, L. Metagenomics Approaches for Improving Food Safety: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 85, n.3, p. 448–464, 2022. DOI: 10.4315/JFP-21-301.
- BLODGETT, Robert. Apêndice 2: Número mais provável de diluições em série. **Bacteriological analytical manual**. Silver Spring: Food and Drug Administration, 2010. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- BOKULICH, N. A.; KAEHLER, B. D.; JAI RAM RIDEOUT, J. R.; DILLON, M.; BOLYEN, E.; KNIGHT, R.; HUTTLEY, G. A.; CAPORASO, J. G. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 2018. DOI:10.1186/s40168-018-0470-z.
- BOLYEN, E., RIDEOUT, J.R., DILLON, M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.
- BRADFORD, L. M.; YAO L.; ANASTASIADIS C.; COOPER A. L.; BLAIS B.; DECKERT A.; REID-SMITH R.; LAU C.; DIARRA M. S.; CARRILLO C.; WONG A. Limit of detection of *Salmonella* ser. Enteritidis using culture-based versus culture-independent diagnostic approaches. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 12, 2024. DOI: 10.1128/spectrum.01027-24.
- BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 2019, n. 249, p. 96, 26 de dez. 2019.
- BRASIL. Instrução Normativa 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 2022, n. 126, p. 235, 2022.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016. DOI: 10.1038/nmeth.3869.
- COMPSON, Z. G.; MCCLENAGHAN, B.; SINGER, G. A. C.; FAHNER, N. A.; HAJIBABAEI, M. Metabarcoding From Microbes to Mammals: Comprehensive Bioassessment on a Global Scale. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, 2020. DOI: 10.3389.
- ELNEKAVE E.; HONG S. L.; LIM S.; JOHNSON T. J.; PEREZ A.; ALVAREZ J. Comparing serotyping with whole-genome sequencing for subtyping of non-typhoidal salmonella enterica: A large-scale analysis of 37 serotypes with a public health impact in the usa. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 9, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1099/mgen.0.000425.
- GRÜTZKE J.; MALORNY B.; HAMMERL J. A.; BUSCH A.; TAUSCH S. H.; TOMASO H.; DENEKE C. Fishing in the soup – pathogen detection in food safety using metabarcoding and metagenomic sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1805, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01805.
- GYÖRGY, É.; LASLO, É.; ANTAL, M.; ANDRÁS, C. D. Antibiotic resistance pattern of the allochthonous bacteria isolated from commercially available spices. **Food Science and Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 4550–4560, 2021. DOI: 10.1002/fsn3.2433.
- HONG, J., KARAOZ, U., DE VALPINE, P., FITHIAN, W. To rarefy or not to rarefy: Robustness and efficiency trade-offs of rarefying microbiome data. **Bioinformatics**, v. 38, n.9, p. 2389–2396, 2022. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac127.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of the food chain: Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. ISO 6579-1:2017. Geneva: ISO, 2017.
- KNIGHT, R.; VRBANAC, A.; TAYLOR, B. C. et al. Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 410–422, 2018. DOI: 10.1038/s41579-018-0029-9.
- LEHMACHER, A.; BOCKEMUHL, J.; ALEKSIC, S. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. **Epidemiology and Infection**, v. 115, p. 501, 1995. DOI: 10.1017/s0950268800058660.
- MARTIN, Marcel. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011.
- MATOSINHOS, F. C. L.; OLIVEIRA, I. H. T.; SILVA, J. R.; CARLOS, G. A.; FAULA, L. L.; MOL, M. P. G.; VALENZUELA, V. C. T. Statistical correlation between microscopic and microbiological parameters in ground black pepper (*Piper nigrum* L) sold in Minas Gerais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 79, p. 1785, 2020.
- OGUR, S. Microbiological Quality and Safety of Some Dried Spices Obtained from Markets, Spice Shops and Homes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2022220315>.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECES, E.; WAGNER, H. (2020). vegan: Community Ecology Package (R package version 2.5–7) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 4 jul. 2025.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 590–596, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- RICKE, S. C.; KIM, S. A.; SHI, Z.; PARK, S. H. Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 313–327, 2018. DOI: 10.1111/jam.13888.
- SADURSKI, J.; POLAK-BERECKA, M.; STANISZEWSKI, A.; WAŚKO, A. Step-by-Step Metagenomics for Food Microbiome Analysis: A Detailed Review. **Foods**, v. 13, n. 2216, 2024. DOI: 10.3390/foods13142216.
- SAGOO, S. K.; LITTLE, C. L.; GREENWOOD, M.; MITHANI, V.; GRANT, K. A.; MCLAUCHLIN, J.; DE PINNA, E.; THRELFALL, E. J. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 39–43, 2009. DOI: 10.1016/j.fm.2008.07.005.
- SANÉ, S.; DIOUARA, A. A. M.; COUNDOUL, S. et al. A metagenomic assessment of bacterial community in spices sold open-air markets in Saint-Louis, Senegal. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-65756-0.

SZÚCS, V.; SZABÓ, E.; LAKNER, Z.; SZÉKÁCS, A. National seasoning practices and factors affecting the herb and spice consumption habits in Europe. **Food Control**, v. 83, p. 147–156, 2018. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.04.039.

TRAN, M.; SMURTHWAITE, K. S.; NGHIEM, S.; CRIBB, D. M.; ZAHEDI, A.; FERDINAND, A. D.; ANDERSSON, P.; KIRK, M. D.; GLASS, K.; LANCAR, E. Economic evaluations of whole-genome sequencing for pathogen identification in public health surveillance and health-care-associated infections: a systematic review. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 11, p. e953–e962, 2023. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00180-5.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento de Execução 2019/1793. Relativo ao aumento temporário dos controlos oficiais e às medidas de emergência que regem a entrada na União de determinadas mercadorias provenientes de certos países terceiros. **Jornal Oficial da União Europeia**: L 277/89, 29 out. 2019.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento de Execução 2021/2246. Altera o Regulamento de Execução (UE) 2019/1793 relativo ao aumento temporário dos controlos oficiais e as medidas de emergência que regem a entrada na União de determinadas mercadorias provenientes de certos países terceiros. **Jornal Oficial da União Europeia**: L 453/5, 17 dez. 2021.

WEISS, S.; XU, Z. Z.; PEDDADA, S.; AMIR, A.; BITTINGER, K.; GONZALEZ, A.; LOZUPONE, C.; ZANEVELD, J. R.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; BIRMINGHAM, A.; HYDE, E. R.; KNIGHT, R. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, v. 5, n. 27, 2017. DOI: 10.1186/s40168-017-0237-y.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estimates of the global burden of foodborne diseases**: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015. Geneva: WHO, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565165>. Acesso em: 9 jul. 2025.

WICKHAM, H. (2016). **ggplot2: Elegant graphics for data analysis**. Springer. Disponível em: <https://ggplot2.tidyverse.org>. Acesso em: 4 jul. 2025.

ZHANG, G.; HU, L.; POUILLON, R.; TATAVARTHY, A.; DOREN, J. M. V.; KLEINMEIER, D.; ZIOBRO, G. C.; MELKA, D.; WANG, H.; BROWN, E. W.; STRAIN, E.; BUNNING, V. K.; MUSSER, S. M.; HAMMACK, T. S. Prevalence of salmonella in 11 spices offered for sale from retail establishments and in imported shipments offered for entry to the United States. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 11, p. 1791–1805, 2017. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-072.