



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**Implementação da técnica AFLP (Amplified  
Fragment Length Polymorphisms) para a Tipagem  
Molecular de *Listeria monocytogenes***

**Engenharia Biológica e Alimentar  
Relatório do Trabalho de Fim de Curso**

**Ana Maria Martins Leitão**

— ◆ —  
CASTELO BRANCO

2008

## Índice

Índice de figuras

Índice de tabelas

Índice de anexos

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

<b>1. Introdução e objectivos</b> .....	1
<b>2. Listeriose e <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	2
2.1. Taxonomia .....	2
2.2. Morfologia.....	2
2.3. Crescimento e sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> .....	3
2.4. Listeriose .....	5
<b>3. Métodos fenotípicos e moleculares usados na identificação de <i>L. monocytogenes</i></b> .....	7
3.1. Métodos fenotípicos .....	7
3.1.1. Serotipagem .....	8
3.1.2. Fagotipagem .....	9
3.2. Métodos moleculares.....	9
3.2.1. MEE ( <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i> ) .....	10
3.2.2. PFGE ( <i>Pulsed- Field Gel Electrophoresis</i> ).....	10
3.2.3. RAPD ( <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> ).....	11
3.2.4. RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> ).....	11
3.2.5. REA ( <i>Restriction Endonuclease Analysis</i> ) .....	11
3.2.6. Ribotipagem .....	12
3.2.7. AFLP ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i> ) .....	12
3.2.8. PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	14
3.3. Comparação entre os métodos utilizados na tipagem de <i>L. monocytogenes</i> ..	15
<b>4. Material e métodos</b> .....	16
4.1. Culturas bacterianas .....	16
4.2. Obtenção de culturas jovens e identificação de <i>Listeria</i> spp.....	18
4.3. Extracção de ADN.....	20
4.4. Técnica <i>Amplified Fragment Length polymorphisms</i> – AFLP .....	22

4.4.1. Digestão de ADN com <i>Eco</i> RI e ligação dos adaptadores .....	23
4.4.2. Amplificação por Reacção de Polimerização em Cadeia ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> – PCR) .....	24
4.4.3. Electroforese em gel de agarose .....	25
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>27</b>
<b>6. Considerações finais .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>36</b>

Agradecimentos

Anexo I

Anexo II

## Resumo

Neste trabalho foi implementada a técnica de Biologia Molecular *Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)* para a tipagem molecular de estirpes de *Listeria* spp., isoladas maioritariamente de queijo, leite cru e ambiente de queijarias.

A técnica apresentou uma boa reprodutibilidade, facilidade em diferenciar os perfis de *L. monocytogenes* e as outras *Listeria* spp. verificou-se a presença de uma banda em comum com aproximadamente 850 pb.

Foram obtidos os perfis AFLP I, II, II-1, IV-1, IV-1+1, V, V+1, V+1-1, XIV, XV e XIV-1 correspondentes à espécie *L. monocytogenes*, relativamente às espécies *L. innocua* e *L. ivanovii*, foi obtido um perfil, respectivamente XX e XXXX.

Palavras-chave: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*); tipagem molecular; *Listeria monocytogenes*;