



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

MOLECULAR TYPING
OF *Listeria monocytogenes*

Engenharia das Ciências Agrárias – Ramo Animal

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Jorge Gonçalo Caldeira Nunes de Matos

—◆—
CASTELO BRANCO

2003

Index

Introduction	1
1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1. Historical and epidemiological facts.....	3
1.2. Physical and biochemical characteristics.....	5
1.3. Growth and survival characteristics.....	6
1.4. Distribution in the enviroment and food products	7
1.5. Molecular characteristics	9
1.6. Control of Listeriosis	11
2. Molecular techniques used for identification and fingerprinting of <i>L. monocytogenes</i>	13
2.1. Real-time Polymerase Chain Reaction (TaqMan®).....	14
2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	15
3. Materials and Methods	17
3.1. Cultures and Bacteria	17
3.2. DNA extraction.....	18
3.3. Molecular techniques applied on the extracted DNA	19
3.3.1. Identification of <i>L. monocytogenes</i> hly gene fragment using real time	19
PCR assay	19
3.3.2. Molecular fingerprinting by AFLP analysis	20
3.4. Analysis by AFLP pattern and bioinformatics.....	21
3.4.1. Electrophoresis gels and AFLP patterns	21
3.4.2. Bioinformatics analysis.....	21
4. Results	22
4.1. Identification of isolates by Real Time PCR	22
4.2. AFLP patterns	25
4.3. Analysis of gels using Bioinformatics	33
5. Discussion	37
6. References	40
Appendix I	
Appendix II	

Resumo

Neste projecto foram aplicadas duas técnicas de biologia molecular (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP e Real Time Polymerase Chain Reaction - R-T PCR). Foram usadas 78 estirpes de *Listeria monocytogenes*, isoladas em Portugal, de modo a tentar recolher mais informação sobre as mesmas para possíveis futuros estudos de epidemiologia e ecologia.

De acordo com os resultados do R-T PCR, 37 estirpes eram *L. monocytogenes*. Por análise visual foram identificados nove padrões de AFLP para as estirpes de *L. monocytogenes*, nomeadamente 1, I+1, II, IV, V, VII+1, IX, X-2 e X. As estirpes de *L. innocua* e *L. seeligeri* apresentaram dois e três padrões de AFLP, respectivamente.

O dendrograma obtido através do programa informático Bionumerics®, agrupou as estirpes de acordo com os padrões de AFLP obtidos por análise visual.

Palavras-chave: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism); tipagem molecular; *Listeria monocytogenes*; R-T PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction)