

IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS) PARA A TIPAGEM MOLECULAR DE *LISTERIA* SPP.

Ana Maria Leitão⁽¹⁾, Carlos Gaspar dos Reis⁽²⁾, Ana Sofia Pedroso⁽¹⁾,
Patrícia Dinis⁽³⁾, Cristina Santos Pintado⁽²⁾



RESUMO

Com este trabalho foi possível implementar na ESACB a técnica de biologia molecular *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), com vista à tipagem molecular de culturas de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp., as quais tinham sido isoladas maioritariamente de queijo, leite cru e ambiente de uma queijaria.

A técnica apresentou uma boa reprodutibilidade e poder discriminatório para *Listeria monocytogenes*

e *L. innocua*. Relativamente à espécie *L. ivanovii*, obtiveram-se perfis com um reduzido número de bandas. Verificou-se a presença de uma banda com aproximadamente 850 pb, comum às amostras estudadas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

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

1 - INTRODUÇÃO

A listeriose é uma zoonose de origem alimentar de grande gravidade cujo agente é a bactéria *Listeria monocytogenes*, única espécie do género *Listeria* considerada patogénica para o Homem. Apesar da listeriose estar associada a uma baixa morbidade, apresenta uma elevada mortalidade (20-40%), ocorrendo sobretudo em grupos de risco bem definidos, como grávidas e os seus fetos, recém-nascidos, idosos e adultos com um sistema imunitário deprimido por medicação ou doença crónica. Os alimentos de maior risco são os alimentos “prontos a comer”, os alimentos

armazenados a temperaturas de refrigeração durante longos períodos e os alimentos que suportam o crescimento de *L. monocytogenes* (Guerra e Bernardo, 2004).

L. monocytogenes é um organismo omnipresente no ambiente ao qual o homem é exposto frequentemente (Donnelly, 2001). Pode ser encontrada no solo, na matéria vegetal, fezes dos animais, detritos, silagem e na água (Nogva *et al.*, 2000).

A utilização de metodologias de tipagem a nível fenotípico e molecular permite comprovar as relações

entre as estirpes isoladas dos alimentos e as obtidas dos pacientes.

Vários métodos moleculares têm sido testados com o objectivo de serem aplicados na tipagem de *L. monocytogenes*, nomeadamente: MEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), REA (*Restriction Endonuclease Analysis*), Ribotipagem (*Graves et al., 1999*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (*Guerra et al., 2002*).

No caso concreto da técnica AFLP, esta foi desenvolvida por Vos *et al.* (1995) para a análise do genoma de plantas e tem sido aplicada com sucesso na tipagem de bactérias Gram – positivas e Gram – negativas (*Jansen et al., 1996; Vogel et al., 2001*).

A técnica AFLP envolve três etapas. Na primeira etapa é feita a digestão do DNA com uma ou mais enzimas de restrição seguido da ligação de oligonucleótidos (adaptadores específicos de cadeia dupla) em todos os locais de restrição dos fragmentos. Na segunda etapa é feita a amplificação selectiva por PCR utilizando-se *primers* (oligonucleótidos de cadeia simples) que se ligam por complementaridade aos adaptadores associados aos fragmentos de restrição. A amplificação de todos os fragmentos de restrição impediria na prática a sua visualização após electroforese, dado o seu elevado número. Por este motivo, amplifica-se apenas um subconjunto de fragmentos de restrição utilizando *primers* aos quais se adicionam na extremidade 3' uma ou mais bases. Tal permite reduzir em 1/4 o número de fragmentos amplificados, por cada base adicionada (*Nuez e Carrillo, 2000*).

Na terceira etapa faz-se a separação por electroforese dos fragmentos amplificados. O gel resultante proporciona um elevado número de bandas por amostra, o que garante normalmente a detecção de muitos polimorfismos. O gel AFLP analisa-se com base na presença ou ausência de bandas, as quais correspondem a fragmentos amplificados.

As principais vantagens dos AFLPs são a capacidade de obter um número elevado de polimorfismos num espaço de tempo relativamente curto, sendo ainda, ao contrário dos RAPDs, marcadores muito reprodutíveis.

Em síntese, este tipo de marcador molecular é um método poderoso que permite a obtenção da “impressão digital” do DNA microbiano em estudos que têm por objectivo a vigilância epidemiológica de *L. monocytogenes* e a definição de vias de contaminação de alimentos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - CULTURAS BACTERIANAS

Foram usadas 31 culturas de *Listeria* spp., das quais 18 de *L. monocytogenes*, 9 de *L. innocua* e 4 de *L. ivanovii*, isoladas a partir de queijo, leite cru de ovelha, zaragatoas efectuadas numa queijaria e fitas que envolvem os queijos. Onze destas culturas provieram da Colecção de Culturas de *Listeria* spp. do Laboratório de Microbiologia da ESACB (LMESACB) e, dado terem sido anteriormente tipadas por AFLP, foram usadas para testar a reprodutibilidade da técnica. As restantes culturas foram isoladas na Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa (CPQBB) (n = 15) e no Laboratório de Microbiologia da ESACB (n = 5).

Para a obtenção de culturas puras e jovens de *Listeria* usou-se o meio TSYEA (*Tryptona Soya Yeast Extract Agar*) e uma incubação a 37°C durante 18 a 24 horas. À excepção das culturas crioconservadas da Colecção de Culturas, todas as restantes culturas foram submetidas às seguintes provas para identificação: teste da catalase, coloração de Gram, detecção da â-hemólise, crescimento em meio ALOA e caracterização bioquímica usando uma galeria API-*Listeria* (BioMérieux).

2.2 - EXTRACÇÃO DE DNA

A extracção de DNA bacteriano foi efectuada a partir de culturas jovens e puras, utilizando o kit *Mo Bio UltraClean Microbial DNA Isolation* (BioMérieux, Inc., USA).

2.3 - DIGESTÃO DE DNA COM *ECO* RI, LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES E REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Num microtubo colocou-se 20µl de água ultra pura (Invitrogen), 5µl de DNA microbiano, 2µl de enzima de restrição *Eco* RI (10U/µl, Metabion), 4µl de *Eco* AD1 (10µM, Metabion, 5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3'), 4µl de *Eco* AD2 (10µM, Metabion, 5'- AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'), 1µl de T4 DNA Ligase (100U/µl, Bioron) e 4µl de 10 × T4 DNA Ligase Buffer (Bioron), num volume final de 40µl.

A digestão do DNA e a ligação de adaptadores foram realizadas no termociclador (Biometra, Tgradiente),

fazendo-se a incubação a 37°C durante 90 minutos, seguida da inativação da enzima a 80°C durante 10 minutos e do arrefecimento a 4°C.

Para a reacção PCR foi utilizado 5µl de DNA digerido e diluído. A diluição foi efectuada através da adição de 8µl de água ultra pura com 2µl de DNA digerido. A mistura PCR, com um volume final de 50µl, continha: 5µl de DNA digerido e diluído, 15µl de água ultra pura, 5µl de primer Eco R1G (10 µM, Metabion, 5' - GAC TGC GTA CCA ATT CG - 3'), 25µl de DyNazyme II (PCR master Mix Finnzymes). A mistura DyNazyme II contém: DNA Polimerase (0,04 U/µl), 1,5 mM MgC⁻¹₂ e 200 µM dNTPs.

A mistura final foi submetida a um processo de desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos sucessivos com a seguinte sequência: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C. Após os 35 ciclos, seguiu-se um passo final a 4°C.

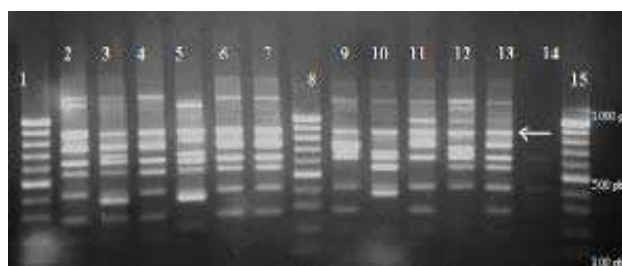
2.4 - ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5 %. A cada 50 µl de amostra foi adicionado 10µl de *gel loading solution* (Ladpuffer DNAI, Applichem) e 15 µl desta mistura foi pipetada em cada poço. Utilizou-se como termo de comparação o marcador 100 pb DNA Ladder (Bioron, 10 µl, 50 ng/ µl). Um poço por gel foi ainda preenchido com água ultra pura estéril, constituindo o controlo negativo. Após separação electroforética, o gel foi colocado em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) durante 20 minutos, foi observado em transiluminador UV e fotografado com câmara digital devidamente adaptada.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

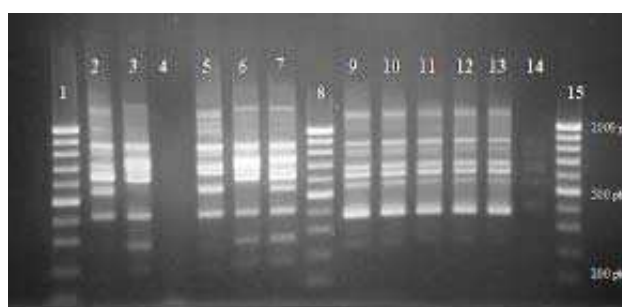
A partir das diferentes amostras de DNA foram obtidos 3 géis (Figuras 1, 2 e 3).

Cada perfil molecular AFLP foi analisado tendo em conta o número de bandas e os respectivos pesos. A estimativa do tamanho dos fragmentos correspondentes a cada banda foi feita por análise comparativa com os fragmentos do marcador, uma vez que para estes os pesos moleculares são conhecidos e funcionam como referência.



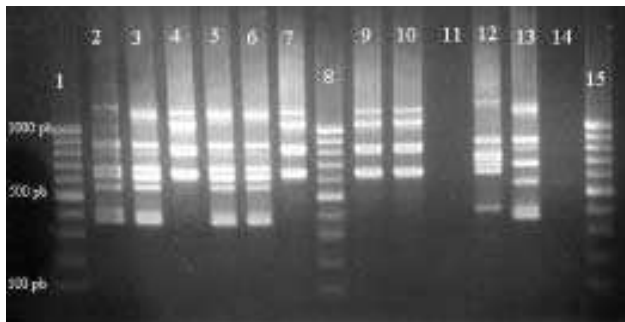
Perfil	N.º	Espécie	Culturas
1,8,15		Marcador	
2		<i>L. monocytogenes</i>	PM6/04
3		<i>L. monocytogenes</i>	D15/00
4		<i>L. monocytogenes</i>	M44/95
5		<i>L. innocua</i>	D3/00
6		<i>L. monocytogenes</i>	CP85/04
7		<i>L. monocytogenes</i>	CP86/04
9		<i>L. monocytogenes</i>	M52/95
10		<i>L. monocytogenes</i>	D6/00
11		<i>L. monocytogenes</i>	M37/95
12		<i>L. monocytogenes</i>	M38/95
13		<i>L. monocytogenes</i>	M39/95
14		Controlo negativo	

Figura 1. Perfis AFLP obtidos para culturas de *L. monocytogenes* (n=10) e *L. innocua* (n=1).



Perfil	N.º	Espécie	Culturas
1,8,15		Marcador	
2		<i>L. monocytogenes</i>	Queijo fresco/ 08 ⁽¹⁾
3		<i>L. monocytogenes</i>	Z28/08 ⁽²⁾
4		<i>L. monocytogenes</i>	Queijo mistura/ 08 ⁽¹⁾
5		<i>L. monocytogenes</i>	SO253/06 ⁽¹⁾
6		<i>L. monocytogenes</i>	10/05 ⁽¹⁾
7		<i>L. monocytogenes</i>	SO302/02 ⁽¹⁾
9		<i>L. innocua</i>	Z48/08 ⁽²⁾
10		<i>L. innocua</i>	Z4/08 ⁽²⁾
11		<i>L. innocua</i>	Z47/08 ⁽²⁾
12		<i>L. innocua</i>	Z3/08 ⁽²⁾
13		<i>L. innocua</i>	Fita suja/08 ⁽²⁾
14		Controlo negativo	

Figura 2. Perfis AFLP obtidos para culturas de *L. monocytogenes* (n=6) e *L. innocua* (n=5). ⁽¹⁾ Isoladas no LMESACB; ⁽²⁾ Isoladas na CPQBB.



Perfil	N.º	Espécie	Culturas
1,8,15		Marcador	
2		<i>L. monocytogenes</i>	Queijo mistura/ 08 ⁽¹⁾
3		<i>L. innocua</i>	Z6/08 ⁽²⁾
4		<i>L. ivanovii</i>	L10/ 08 ⁽²⁾
5		<i>L. innocua</i>	Z9/08 ⁽²⁾
6		<i>L. innocua</i>	Z1/08 ⁽²⁾
7		<i>L. ivanovii</i>	L8/08 ⁽²⁾
9		<i>L. ivanovii</i>	L1/08 ⁽²⁾
10		<i>L. ivanovii</i>	L2/08 ⁽²⁾
11		<i>L. innocua</i>	Z4/08 ⁽²⁾
12		<i>L. monocytogenes</i>	Z7/08 ⁽²⁾
13		<i>L. innocua</i>	F1/08 ⁽²⁾
14		Controlo negativo	

Figura 3. Perfis AFLP obtidos para culturas de *L. monocytogenes* (n=2), *L. innocua* (n=5) e *L. ivanovii* (n=4). ⁽¹⁾ Isolada no LMESACB; ⁽²⁾ Isoladas na CPQBB.

Da análise dos resultados verificou-se a existência de 13 perfis AFLP diferentes. Confirma-se para todos os perfis AFLP das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*, a existência de um fragmento comum com aproximadamente 850 pb (seta na Figura 1), tal como já tinha sido descrito anteriormente (Pintado *et al.*, 2007).

No perfil número 4 da Figura 2 e no perfil número 11 da Figura 3 não se visualizam fragmentos nos géis, uma vez que se presume ter havido erro durante a preparação da mistura para amplificação.

Por comparação entre os géis obtidos na *Health Protection Agency* (HPA) (Pintado *et al.*, 2007) e o primeiro gel obtido neste estudo (Figura 1), o qual inclui estirpes previamente tipadas por AFLP, verificou-se existir uma boa reprodutibilidade da técnica.

As culturas estudadas da espécie *L. ivanovii*, representadas pelos perfis número 4, 7, 9 e 10 na Figura 3, apresentam perfis AFLP iguais e facilmente distinguíveis dos restantes. O reduzido número de bandas obtidas com a tipagem de *L. ivanovii* indica um baixo poder discriminatório para esta espécie, aspecto que terá de ser melhorado em trabalhos futuros. Estes perfis correspondem a DNA de 4 culturas de *L. ivanovii*, provenientes de 4 amostras de leite cru de ovelha de um único produtor. O facto de apresentarem o mesmo perfil AFLP reforça a ideia de que se tratou da mesma fonte de contaminação.

Apesar de terem sido efectuadas várias zaragoas nesta exploração produtora de leite, com vista à identificação da fonte de contaminação, os resultados da pesquisa de *L. ivanovii* foram negativos.

Os perfis 9, 10, 11, 12 e 13 da Figura 2 correspondem ao mesmo tipo molecular e dizem respeito a estirpes de *L. innocua* isoladas do ambiente da queijaria (máquina de lavar os queijos e máquina de lavar as fitas que são colocadas nos queijos) e de fitas sujas. Estes dados sugerem uma associação entre a contaminação da casca dos queijos e das fitas que os envolvem, implicando a máquina de lavar os queijos e a máquina de lavar as fitas neste processo de contaminação.

4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tipagem molecular por AFLP das 31 culturas estudadas permitiu definir 13 perfis AFLP diferentes com base na detecção de bandas polimórficas.

A técnica descrita neste trabalho provou ser reprodutível e mostrou ter um bom poder discriminatório para *L. innocua* e *L. monocytogenes*, confirmando tratar-se de uma ferramenta com interesse prático na discriminação de culturas de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp. e no estabelecimento de vias de descontaminação.

Como propostas de trabalho futuro sugere-se a utilização de um marcador diferente, que permita determinar os pesos dos fragmentos de DNA acima de 1000 pb, e a melhoria do poder discriminatório para a tipagem de culturas de *L. ivanovii*.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se à Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa, em Idanha-a-Nova, pela participação financeira e à Escola Superior Agrária de Castelo Branco pela disponibilização de instalações e equipamentos.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Donnelly, C. W. 2001. *Listeria monocytogenes*: A Continuing Challenge. *Nutrition Reviews*. 59: 183-194.
- Graves, L. M., B. Swaminathan e S. B. Hunter. 1999. Subtyping *Listeria monocytogenes*, p. 279-297 in E. T. Ryser e E. H. Marth (eds.), *Listeria*, listeriosis, and food safety. Marcel Dekker. Nova - Iorque.
- Guerra, M. M. e F. A. Bernardo. 2004. O risco da listeriose e a identificação do perigo – revisão. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 550:69-76.

- Guerra, M. M., F. Bernardo e J. McLauchlin. 2002. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology*. 25: 456-461.
- Jansen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau e K. Kersters. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*. 142: 1881-1893.
- Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, e D. Lillehaug. 2000. Application of 59-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4266 - 4271.
- Nuez, F., J. M. Carrillo. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editorial de la UPV. Valencia.
- Pintado C. M. B. S., M. A. A. S. Ferreira, K. A. Grant, R. Halford-Maw, M. D. Hampton, J. McLauchlin. 2007. Investigation of routes of contamination and persistence of *Listeria monocytogenes* in ewe's-milk cheese processing plants in Portugal. ISOPOL XVI – The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis”, 20-23 March, Savannah, Georgia, USA
- Vogel, B. F., H. H. Huss, B. Ojeniyi, P. Ahrens e L. Gram. 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2586 - 2595.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kulper e M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407 - 4414.

- (1) Licenciadas em Engenharia Biológica e Alimentar.
- (2) Professores Adjuntos da Escola Superior Agrária do IPCB.
- (3) Responsável pela Qualidade na Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa, Idanha-a-Nova.

MESTRADO
em Fruticultura Integrada

HORÁRIO
 Semanas-íntimas: 14:00 às 17:00 e 17:30 às 20:30
 Sábados: 9:30 às 13:00 e 14:30 às 18:30

CANDIDATURAS
 1 de Julho a 11 de Setembro de 2009

COORDENADOR DE CURSO
 Professor Doutor João Pedro Luz

COMISSÃO CIENTÍFICA
 António Ramos (Prof. Coordenador)
 João Pedro Luz (Prof. Coordenador)
 Paulo Gomes (Prof. Adjunto)