

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes*
isoladas de alimentos: Análise crítica das técnicas de
PCR e PFGE e importância para a Saúde Pública**

Gillian Alonso Arruda

Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para fins de obtenção de título de Doutor em Saúde Pública, na área de Serviços de Saúde do Departamento de Prática de Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Leal
Germano

Co-orientador: Prof. Dr. Maria Helena Matté

**São Paulo
2006**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data: 04 de abril de 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a amizade e a importante colaboração dos profissionais:

Laboratório de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Ronalda Silva de Araújo

Milena Dropa

Miriam Lopes da Silva

Laboratório do Instituto Adolpho Lutz

Mônica Cândida Georgete Scola

Laboratório SFDK

Mário Killner

Agradeço ao meu amado esposo pelo apoio e incentivo

William Ma

Agradeço à minha mãe pelo exemplo de persistência e dedicação aos estudos

Norma Alonso Arruda

À Deus pela razão de viver

RESUMO

Arruda GA. Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos: Análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para a Saúde Pública. São Paulo; 2006 [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

Devido à gravidade da manifestação clínica e pelas altas taxas de mortalidade em populações de risco, o controle e a prevenção da listeriose, doença causada pela *L. monocytogenes*, representa um importante desafio às autoridades sanitárias. A dificuldade de recuperar organismos envolvidos nos surtos, a sub-notificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos fatores que retardam ou impedem intervenções em situações de surto. Com o advento da biologia molecular, novas técnicas têm sido empregadas para a identificação e tipificação da *L. monocytogenes*, com o intuito de contribuir com os estudos epidemiológicos e de vigilância sanitária de alimentos. O presente estudo visou confirmar a taxonomia e o perfil genotípico de 31 cepas isoladas de diversos tipos de carne, supostamente identificadas como *L. monocytogenes*, por intermédio das técnicas de Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR), com o emprego de iniciadores de identificação dos genes 16S rRNA e Internalina A e B, para confirmação da espécie. Os resultados indicaram que apenas 20 (65%) das cepas foram confirmadas como sendo da espécie investigada. Foi realizada ainda a avaliação de similaridade nas 20 cepas confirmadas, através da Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), que revelou grande diversidade

genotípica, caracterizada por 18 diferentes perfis, segundo o coeficiente de similaridade de Pearson. Os resultados demonstraram que as técnicas moleculares são de grande utilidade para a identificação e tipificação de *L. monocytogenes*, caracterizando-se como importantes ferramentas epidemiológicas.

Descritores: *Listeria monocytogenes*, PCR, 16S, Internalina, PFGE, Vigilância.

ABSTRACT

Due to the seriousness of clinical manifestations and high rates of mortality of the listeriosis disease in populations at risk, control and prevention of this disease, caused by *L. monocytogenes*, represent an important challenge to sanitation authorities. Difficulties of recovering organisms involved in outbreaks; sub notification; and, the delay in accomplishing conventional analysis are some of the factors that slow-down or even prevent health interventions in outbreak occurrences. With the advent of the molecular biology, new techniques have been employed for identifying and typifying the *L. monocytogenes* aiming at contributing to studies on epidemiology and sanitary surveillance of foods. The present study aimed at ratifying the taxonomy and the genotypic profile of 31 isolated stocks of varied types of meats supposedly identified as *L. monocytogenes* by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) employing identification starters of genes 16 rRNA and A and B Internalin in order to confirm the species. Results indicated that only 20 (65.0%) of the stocks were confirmed as being from the investigated species. Another evaluation of similarity were also carried out along with the 20 stocks ratified through pulsed field gel electrophoresis (PFGE), which disclosed a great genotypic diversity characterized by 18 different profiles, according to the Pearson's similarity coefficient. Results demonstrated that the molecular techniques are very helpful for identifying and typifying the *L. monocytogenes*, characterizing themselves as important epidemiological tools.

Descriptors: *Listeria monocytogenes*, PCR, 16S, Internalin, PFGE,
Sanitary Surveillance.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Importância na Saúde Pública	2
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Quadro Clínico	7
1.3.1 Septicemia	7
1.3.2 Infecção do Sistema Nervos Central	7
1.3.3 Endocardite	8
1.3.4 Gastroenterite.....	8
1.3.5 Infecção Localizada.....	8
1.3.6 Infecção na GestaçãO	9
1.4 Características	11
1.4.1 Taxomia	11
1.4.2 Ação Intracelular	14
1.4.3 Fontes	16
1.4.4 Formas de TransmissãO.....	18
1.4.5 Análise de Risco.....	21
1.5 Fatores de Virulência e Patogenia	23
1.6 Caracterização Fenotípica e Genotípica	24
1.6.1 Métodos Fenotípicos	24
1.6.2 Métodos Genotípicos	27
1.7 Aplicação dos Métodos Moleculares para o Estudo da Espécie <i>L. monocytogenes</i>	29
1.7.1 Eletroferese em Campo Pulsado (PFGE).....	29
1.7.2 ReaçãO em Cadeia Polimerase (PCR)	33
1.7.2.1 RAPD	37
1.7.2.2 AmplificaçãO de Grupos Repetitivos.....	41
2. Objetivos	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3. Material e Métodos.....	44
3.1 ObtençãO das Cepas	44
3.2 ConfirmaçãO de <i>Listeria monocytgenes</i> utilizando PCR	46

3.2.1 Extração do DNA genômico.....	46
3.2.2 Confirmação da Espécie por PCR	47
3.2.3 PCR para Confirmação da Presença do Gene Internalina AB.....	49
3.2.4 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	51
4. Resultados	55
4.1 Extração do DNA.....	55
4.2 Confirmação da espécie por PCR	55
4.2.1 Confirmação da Taxonomia pela Presença dos Genes 16S rRNA e Internalina	55
4.3 PFGE.....	60
4.3.1 Análise da Similaridade das Cepas de Alimentos Estudados.....	60
4.3.2 Análise de Similaridade das Cepas Controle.....	62
4.3.3 Análise de Similaridade do Total de Cepas Estudadas e Controle	63
5. Discussão	67
5.1 Confirmação da Espécie por PCR.....	67
5.1.1 Resultados Moleculares não Confirmaram a Identificação da Análise Microbiológica Convencional	67
5.1.2 Discussão dos Resultados do PCR para Identificação do Gene 16S rRNA.....	69
5.1.3 Discussão dos Resultados por PCR para identificação dos Genes Internalina A e B.....	70
5.2 Discussão sobre os Resultados da Diversidade pelo PFGE	72
5.2.1 Discussão da Análise de Similaridade das cepas de Alimentos Estudadas	73
5.2.2 Análise de Similaridade das Cepas Controle.....	77
5.2.3 Análise de Similaridade do Total de Cepas Estudadas e Controle	79
6. Conclusão	82
7. Considerações Finais.....	85
8. Referências	91

ANEXOS

1 – INTRODUÇÃO

Apesar dos progressos da ciência, tecnologia de produção de produtos alimentícios, as enfermidades causadas por patógenos de origem alimentar continuam representando problemas significativos para a saúde pública e para a economia mundial (Laciar e col. 1999).

De acordo com registros da Organização Mundial da Saúde (OMS), são detectados, anualmente, nos países em desenvolvimento, mais de um bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos, dos quais 5 milhões são fatais. A contaminação bacteriana dos alimentos é uma das causas primordiais destes casos. Estima-se que apenas de 1 a 10% dos casos sejam computados nas estatísticas oficiais. (Pellicer e col. 2002)

Segundo Jorge e col. 2001 foram internados nos hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS) ou com ele conveniados, 908.900 casos de doenças infecciosas ou parasitárias, representando 7,6% do total de hospitalizados.

Os produtos de origem animal estão intimamente ligados à ocorrência de toxinfecções, constituindo riscos importantes em saúde pública. Produtos de origem animal como carne, ovos, leite, contaminados na origem que tenham sofrido contaminação durante sua elaboração, contribuem decisivamente para a incidência de infecções, geralmente de natureza diarreica. (Jorge e col. 2001; Germano & Germano 2001; Rocourt e col. 2003).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

