



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2015
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Avaliação da diversidade de Enterococos faecalis isolados de amostras de fezes de lobos marinhos por PCR-RAPD
<b>Autor</b>	LEONARDO ALMANSA CARDOSO
<b>Orientador</b>	ANA PAULA GUEDES FRAZZON

## Avaliação da diversidade de *Enterococcus faecalis* isolados de amostras de fezes de animais marinhos por PCR-RAPD.

Leonardo Almansa Cardoso e Ana Paula Guedes Frazzon. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Enterococcus faecalis* são bactérias membros da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais. A diferenciação entre as espécies de micro-organismos através de métodos baseados apenas em propriedades fenotípicas não proporcionam um potencial de resolução satisfatório. Estes métodos são incapazes de detectar alterações no genoma bacteriano, que podem ocorrer em uma mesma espécie via aquisição de plasmídeos ou mutações genéticas espontâneas, sem que haja alteração do fenótipo. A tecnologia RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) permite a análise de polimorfismo molecular ao possibilitar a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas, além de ser uma das ferramentas muito utilizadas para análise genética detalhada de um grande número de isolados e fornecer informações para a avaliação de diversidades inter e intra-específicas. Como já demonstrado com estudos utilizando o RAPD, esta é uma tecnologia bastante acessível, além de reprodutível. O oligonucleotídeo iniciador M13 tem sido utilizado para estudos de variabilidade genética de enterococos isolados de amostras clínicas e alimentares. O objetivo do estudo foi o de investigar a variabilidade genética de *E. faecalis* oriundos de cinco amostras de fezes de lobos-marinhos da espécie *Arctocephalus australis*, pela técnica de RAPD-PCR. Foram selecionados 81 *E. faecalis* previamente coletados de amostras fecais de *A. australis* encontrados mortos no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, durante o monitoramento da equipe do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR-UFRGS). Todos os isolados foram previamente avaliados quanto à suscetibilidade antimicrobiana frente a dez antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, norfloxacina, nitrofurantoína, tetraciclina e vancomicina), e quanto a quatro genes de virulência (*ace*, *gelE*, *cylA* e *asa*). A extração do DNA total foi realizada pelo método de lise físico-química e a confirmação da espécie foi verificada pela reação de PCR empregando oligonucleótidos específicos para *E. faecalis*. A análise da diversidade pela técnica de RAPD-PCR foi baseada utilizando o oligonucleotídeo iniciador M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'). O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 1x de tampão de PCR (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 2,4 µM de oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 1U de *Taq* DNA polimerase *platinum* (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 segundos a 37 °C e 1 min a 72 °C; e 5 min a 72 °C. As reações de amplificação foram repetidas separadamente para cada uma das amostras a fim de verificar a reprodutibilidade da técnica de RAPD-PCR. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 80V por 60 minutos em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) (Ludwig Biotecnologia) em tampão TAE 1X. O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o software Kodak Digital Science™ DC120. O padrão de fragmentos de DNA foi analisado através do programa Gel-Pro Analyzer. Foram observados fragmentos de DNA de pesos moleculares entre 2200 a 910 pares de bases. No momento, estão sendo construídas as matrizes com base na presença ou ausência dos fragmentos de DNA, que serão utilizadas para obtenção do índice de similaridade de Jaccard e construção de um dendrograma, sendo a estatística estabelecida pelo programa PAST.exe. Ao final, pretende-se avaliar os dados gerados pelo RAPD-PCR e correlacioná-los com os resultados de suscetibilidade antimicrobiana e genes de virulência.