

Genotipificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis* através de métodos moleculares



Cintia Simoni, Luiza Amaral de Castro, Sérgio Ceroni da Silva
Laboratório de Biologia Molecular Aplicada/FAVET/UFRGS



INTRODUÇÃO

A pleuropneumonia suína, causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae*, e a doença de Glässer, causada pela bactéria *Haemophilus parasuis*, são enfermidades amplamente distribuídas no rebanho suíno mundial. Cada um destes agentes possui 15 sorotipos, que podem apresentar reações cruzadas em testes diagnósticos, numa mesma espécie, dificultando a sorotipificação. A determinação do sorotipo e da origem da cepa causadora de um dado surto é fundamental na promoção da profilaxia. O objetivo deste trabalho é o de padronizar técnicas de biologia molecular que visam genotipificar o *A. pleuropneumoniae* e o *H. parasuis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quantificação do DNA

DNA extraído das amostras dos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e de *H. parasuis* foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm em GeneQuant 1300. A quantidade de DNA utilizada em cada reação foi de 100 ng/ μ L.

RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Foram utilizados os primers OPG-10 e OPG-19 (Integrated DNA Technologies) [1]. Cada reação, em um volume final de 25 μ L, continha 2,5 μ L de tampão de PCR 10x, 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase e 0,2 mM de dNTPs. As concentrações dos primers OPG-10 e OPG-19 usadas foram de 2,5 pmol/ μ L e 4,6 pmol/ μ L, respectivamente. As concentrações de MgCl₂ foram testadas variando de 0,5 mM a 3,0 mM. Os ciclos de amplificação foram realizados a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 34°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 2 minutos. As temperaturas ótimas de hibridização foram de 34°C para o OPG-10 e 36°C para o OPG-19. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 70 V, em tampão TBE 1x por 3 horas.

ERIC-PCR (REP-PCR)

Essa técnica é baseada na amplificação por PCR de sequências de consenso presentes em elementos palindrômicos repetitivos (REP-repetitive extragenic palindromic) [2, 3]. Cada reação, em um volume total de 25 μ L, continha 2,5 μ L de tampão de PCR 10x, 3 mM de MgCl₂, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTPs e 20 pmol de cada um dos primers. Os ciclos de amplificação consistiam de 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2,5 minutos, com extensão final de 72°C por 20 minutos. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 70 V em tampão TBE 1x por 3 horas. Também foram separados em gel de poliacrilamida 5%.

RESULTADOS

RAPD

As tentativas iniciais de padronização da técnica evidenciaram que a mesma possui uma baixa reprodutibilidade (Figura 1). Em vários experimentos, amostras em duplicata divergiam quanto ao padrão de amplicons obtidos. Somente os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* foram testados.

ERIC-PCR

Em um experimento inicial foi utilizado o DNA do sorotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* em duplicata e com primers em concentração igual a 50 pmol/reação. Em um segundo

experimento, a concentração dos primers foi diminuída para 20 pmol/reação, gerando um padrão de amplificação consistente. Quando aplicada na obtenção de amplicons a partir do DNA dos sorotipos 1 a 14 de *A. pleuropneumoniae*, foi possível obter um padrão de amplificação inequívoco para o DNA de cada um dos sorotipos analisados (Figura 2).

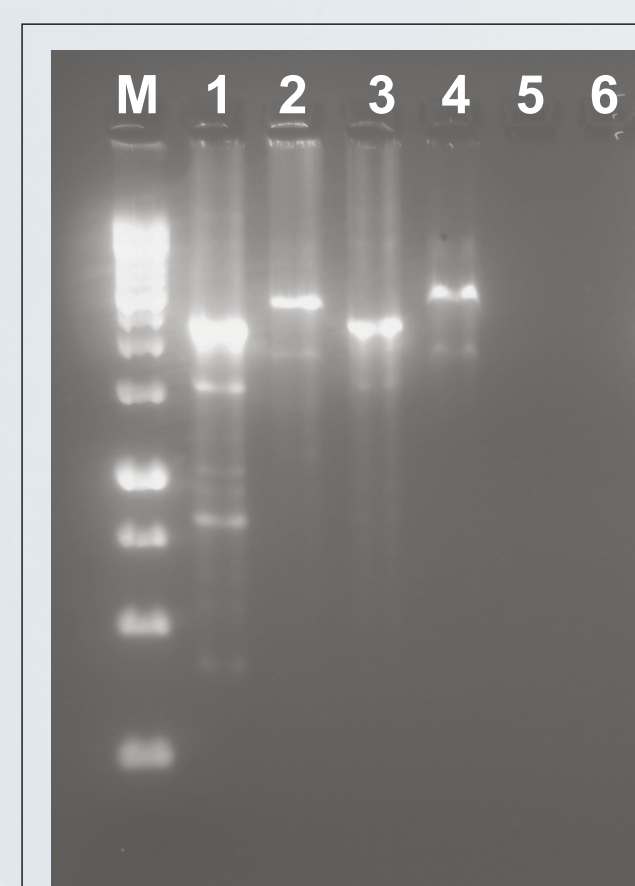


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de amplicons obtidos pela aplicação da técnica de RAPD ao DNA de *A. pleuropneumoniae*.

M: marcador de peso molecular (ladder de 250 pb), Caneletas 1 e 2: sorotipo 1 com DNA diluído em 1:10; Caneletas 3 e 4: sorotipo 1 com DNA diluído em 1:5; Caneletas 5 e 6: controles negativos. Em todas as amostras foi utilizado o primer OPG-19.

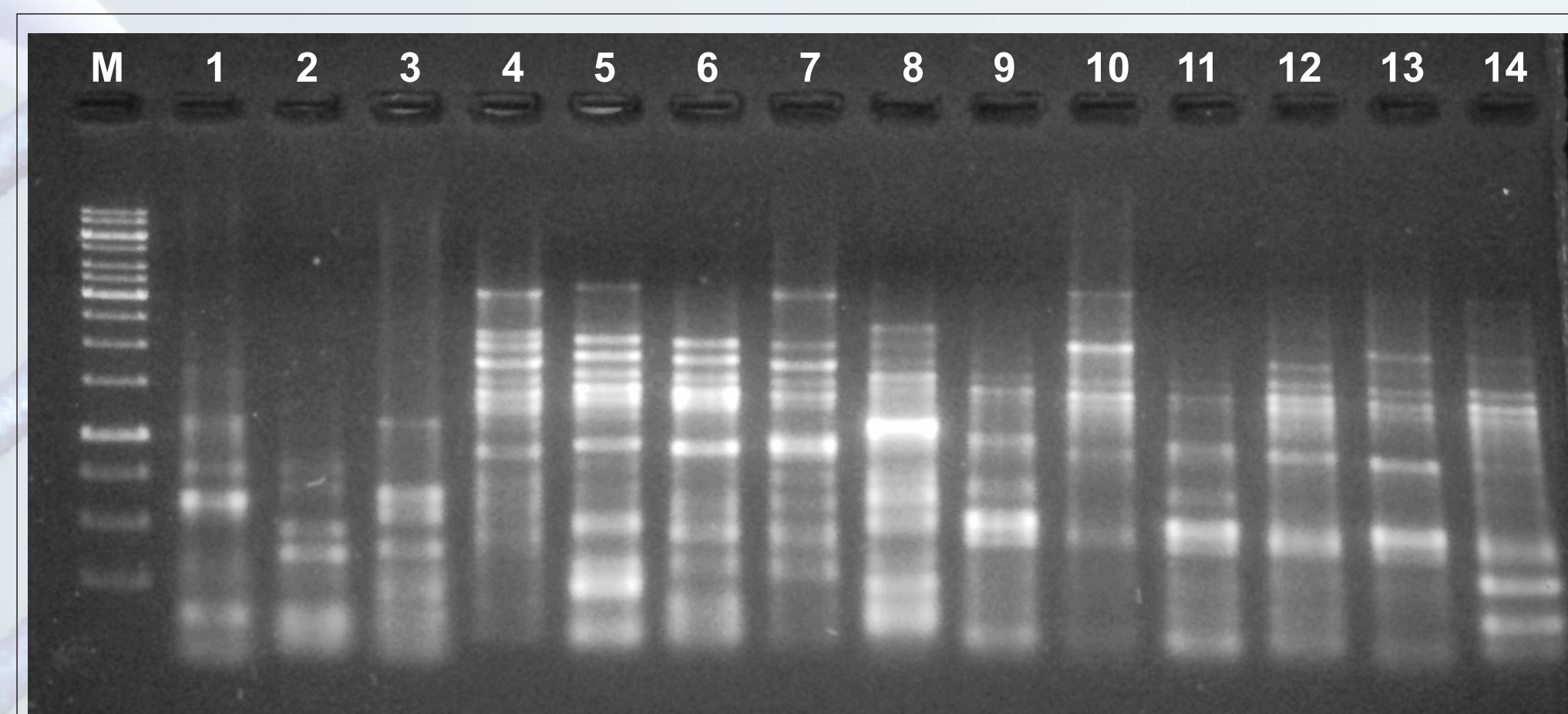


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amplicons obtidos pela aplicação da técnica de ERIC-PCR ao DNA de *A. pleuropneumoniae*.

M: marcador de peso molecular (ladder de 250 pb); 1 a 14: amplicons obtidos a partir do DNA dos sorotipos 1 a 14, respectivamente, de *A. pleuropneumoniae*.

DISCUSSÃO

Neste estudo, o método de RAPD demonstrou baixa reprodutibilidade. Pela aplicação do ERIC-PCR, os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* puderam ser diferenciados, sendo que a técnica apresentou boa reprodutibilidade. Na continuidade da pesquisa, os padrões de amplicons obtidos pela técnica de ERIC-PCR quando aplicada ao DNA de amostras de campo serão comparadas entre si e entre os sorotipos padrão. De maneira complementar, também será determinada por PCR a presença dos genes que codificam para as toxinas Apx das diferentes amostras [4]. Ainda resta testar os sorotipos de *H. parasuis* e aplicar o método em amostras não sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis*, para determinar a efetividade do método na diferenciação das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SILVEIRA, C.L.V. Genotipificação de amostras sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de RAPD. Tese de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- VERSALOVIC *et al.*, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acid Research*, v.19, n. 24, p.6823-6831, 1991.
- VAN DER STOEP, A.O. Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis*. Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.
- BECK *et al.*, RTX toxins genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains, *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.11, p. 2749-2754, 1994.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e UFRGS