

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

() Resumo

() Relato de Caso

USO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE E AEROMONOSE.

AUTOR PRINCIPAL: Bruno Amarante da Luz Dias

CO-AUTORES: Ana Paula Andreolla, Letícia Gressler, Luiz Carlos Kreutz

ORIENTADOR: Luis Carlos Kreutz

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

O diagnóstico definitivo de doenças animais é importante para a compreensão dos aspectos epidemiológicos da infecção e para definir critérios de controle e profilaxia. E, para as zoonoses, é importante para a saúde pública. Para diversas infecções, como a Toxoplasmose, infecção amplamente disseminada em várias espécies animais, os métodos de diagnóstico tradicionais dependem da inoculação de material em animais de laboratório. E, para a Aeromonose, importante infecção de peixes e humanos, os procedimentos de caracterização são subjetivos e avaliam características bioquímicas da bactéria. Assim, é importante desenvolver novos métodos de diagnóstico, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual amplifica de forma exponencial fragmentos definidos do material genético do patógeno. Nesse estudo, desenvolvemos primers específicos para o *Toxoplasma gondii* e para a *Aeromonas hydrophila* e avaliamos a sensibilidade da PCR na detecção do material genético de cada um dos micro-organismos.

DESENVOLVIMENTO:

Para avaliar os primers e a sensibilidade de detecção da PCR, foram utilizadas amostras de DNA do *T. gondii* e da *A. hydrophila*. O DNA de ambos os patógenos foi extraído utilizando-se um kit comercial, quantificado em nanoespectrofotometro e diluído em água destilada estéril. Os primers TOX4 e TOX5 (Homan et al., 2000) foram utilizados para amplificação do genoma do *T. gondii*, e os primers AhHemF e AhHemR foram utilizados para amplificação do genoma da *A. hydrophila*. Para avaliar a especificidade

III SEMANA DO CONHECIMENTO

30-31 DE OUTUBRO
2016

e sensibilidade dos primers para *T. gondii*, uma amostra de DNA do patógeno foi diluída em água destilada estéril, e as concentrações de cada fração foram mensurada e testadas na PCR. Foram testadas as seguintes diluições: 6.51; 3.26; 1.63; 0.81; 0.40; 0.20; 0.1; 0.05 ng/ul. Para *A. hydrophila*, a bactéria foi cultivada overnight e após suspensão até uma diluição de 0.1 à 600nm. Após, fez-se diluições seriadas (fator 10) até a diluição de 10⁻⁸ e, de cada diluição, retirou-se 100 ul para semeadura em ágar e incubação à 37°C por 24 h, visando determinar o número de colônias, e 100 ul para a extração de DNA, pelo método de ebulição, visando avaliar a sensibilidade da PCR e compará-la com a semeadura. O conteúdo de DNA de cada amostra foi mensurado por espectofotometria. A reação de PCR para toxoplasmose foi feita em uma mistura de 25 ul contendo 0,5 ul (10 mM) de cada primer, 12,5 ul de master mix 2x Hot Start (DNA express®), 10,5 ul de água para PCR e 1 ul de DNA nas concentrações citadas acima. A amplificação foi realizada em um termociclador MJ RESEARCH PTC – 150 MiniCycler nas seguintes condições: 7 min. à 94°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min. à 94°C, para desnaturação, 1 min. a 55°C, para anelamento dos primers, 1 min. à 72°C, para extensão e, ao final 10 min. de incubação à 72°C para extensão final. Para a Aeromonose, a reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 ul contendo 0,5 ul (10 mM) de cada iniciador, 12,5 ul de master mix 2x Hot Start (DNA express®), 8,5 ul de água para PCR e 2 ul de DNA. A amplificação foi realizada em um termociclador MJ RESEARCH PTC – 150 MiniCycler nas seguintes condições: 95°C por 5min para desnaturação inicial, 40 ciclos de 94°C para desnaturação por 1min. Após a amplificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose (1%), submetidos à eletroforese por 35 minutos a 90 V, e visualizados em luz ultravioleta e documentados por meio de fotodocumentador Amersham Imager 600.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Nesse estudo demonstramos a amplificação do material genético do *T. gondii* e da *A. hydrophila*. Embora não tenhamos avaliado o método clássico de diagnóstico do *T. gondii*, acreditamos que o método de diagnóstico molecular seja equivalente ou até mais sensível. Em relação à *A. hydrophila*, a detecção por PCR foi mais sensível, pois amplificamos fragmento de DNA específico em uma amostra negativa no isolamento tradicional. Ambos os testes serão avaliados com amostras clínicas.

REFERÊNCIAS:

ASPINALL TV, MARLEE D, HYDE JE, SIMS PFG. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction - food for thought? *Int J Parasitol.* 2002;32:1193-9.

BASTIEN, Patrick. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, [s.l.], v. 96, p.205-215, abr. 2002.

DUBEY, J. P.. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. ed. Beltsville: Crc Press, 2010. 336 p.

HILL D, DUBEY JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:634-40.

Universidade e comunidade
em transformação

3 a 7 DE OUTUBRO
2016

III SEMANA DO CONHECIMENTO

HOMAN, W.I et al. Identification of a 200- to

J.M. Janda, S.L. Abbott. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection.
Clin. Microbiol. Rev., 23 (2010), pp. 35–73

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): 1608020976.

ANEXOS: