

V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

DESENVOLVIMENTO DE UM CONTROLE MOLECULAR INTERNO PARA VALIDAR A TÉCNICA DE TIPIFICAÇÃO DE HAEMOPHILUS PARASUIS

AUTOR PRINCIPAL: Débora Zini Baldasso

CO-AUTORES: Gabriela C. Paraboni Frandoloso, Simone Ramos Prigol, Marcelo Weiss, Luiz Carlos Kreutz.

ORIENTADOR: Rafael Frandoloso.

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo - UPF

INTRODUÇÃO

Haemophilus parasuis é uma bactéria Gram-negativa comumente encontrada no trato respiratório superior de suínos e agente etiológico da Doença de Glässer. *H. parasuis* é classificado fenotipicamente em 15 sorovares e dividido em três grupos de acordo com o seu grau de virulência. A reação em cadeia da polimerase multiplex (PCRm) descrita por Howell et al., 2015, é utilizada para tipificar molecularmente este patógeno em razão de existirem genes e regiões genéticas muito específicas dentro do locus que codifica a biossíntese da cápsula de *H. parasuis*. Neste trabalho, apresentamos o desenvolvimento de um controle molecular interno desenhado para validar a técnica de PCRm, uma necessidade para aumentar a confiabilidade, linearidade e interpretação dos resultados desta técnica entre laboratórios que prestam este diagnóstico molecular.

DESENVOLVIMENTO:

O DNA genômico dos 15 sorovares de referência de *H. parasuis* foi extraído mediante kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA) a partir de um cultivo bacteriano de 18 horas em meio líquido (BHI suplementado com NAD e glicose). Os DNAs extraídos dos diferentes sorovares foram quantificados por nanoespectrofotometria e ajustados a 20 ng/μL. Logo, uma reação de PCR específica para cada sorovar foi formulada com 25 μL de GoTaq Green Master mix (Promega, USA), 400 ng de primers diretos e indiretos específico para cada sorovar (Tabela 1), 100 ng de DNA genômico alvo e água de PCR até completar um volume de 50 μL. A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada mediante o seguinte programa de termociclagem: desnaturação inicial do DNA a 94°C durante 5 min., seguindo de 30

V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



ciclos compreendendo desaturação de DNA a 94°C durante 30 seg., anelamento dos primers a 58°C por 30 seg., extensão a 72°C durante 60 seg., e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados mediante eletroforese de DNA em gel de agarose 2% e, após confirmados, foram diretamente clonados dentro do vetor pGEM[®]-T-Easy (Promega, USA). Para tal, 25 ng de cada fragmento de DNA foi misturado com 50 ng de vetor, 10 µL de tampão de reação 2X, 1 µL de T4 DNA ligase e água de PCR até completar o volume de 20 µL. A reação foi incubada a 22°C durante 3 horas e após, toda a ligação foi transformada em células quimicamente competentes (*Escherichia coli* - TOP10). Os clones resultantes foram confirmados através de PCR mediante prévia extração de DNA plasmidial utilizando o kit Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega, USA). Por fim, 20 ng de cada plasmídeo contendo um fragmento clonado específico foi utilizado para validar a reação de PCR utilizada no protocolo de tipificação molecular de *H. parasuis*. Todos os fragmentos de DNA clonados representativos dos 15 sorovares de *H. parasuis* além do fragmento confirmatório de gênero e espécie, foram amplificados com sucesso utilizando a reação de PCR completa da PCRM (mistura de 30 oligonucleotídeos). Os tamanhos dos produtos dos genes amplificados foram confirmados com sucesso através de um gel de DNA baseado em uma matriz de 2% de agarose. Estes resultados demonstram a utilidade do conjunto de plasmídeos desenvolvidos para compor um controle positivo interno da reação de tipificação de *H. parasuis*. Este controle proporcionará ao biólogo molecular (i) uma comprovação de que a reação de PCRM está corretamente formulada, e (ii) facilitará a interpretação dos resultados de tipificação, ao promover uma rápida comparação entre o tamanho do fragmento de DNA amplificado a partir do DNA genômico da amostra alvo (cepa clínica isolada de um animal com Doença de Glässer), e os diferentes tamanhos dos fragmentos de DNAs representativos dos 15 sorovares de referências de *H. parasuis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Infecções produzidas pelo *H. parasuis* são cada vez mais frequentes na suinocultura global. A tipificação molecular de *H. parasuis* é um diagnóstico de extrema importância para definir a estratégia de prevenção da Doença de Glässer através do uso de vacinas comerciais e autógenas. Neste trabalho apresentamos o desenvolvimento de um controle molecular interno desenhado para validar e facilitar a interpretação dos resultados da tipificação molecular de *H. parasuis* através da PCR multiplex.

REFERÊNCIAS

Fransoso R, Martinez-Martinez S, Rodriguez-Ferri EF, Gutierrez-Martin CB. Comparison of real-time PCR and culture isolation in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Letters in applied microbiology*. 2012;54(2):149- 52.

V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



Howell KJ, Peters SE, Wang J, Hernandez-Garcia J, Weinert LA, Luan SL, et al. Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(12):3812-21

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.

ANEXOS

TABELA 1. Descrição dos primers utilizados para o desenvolvimento dos controles internos da PCRm para tipificação de *H. parasuis*

Gene	Sequência primer direto	Sequência primer indireto	Sorovar	Tamanho do produto (pb)
<i>funB</i>	CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC	GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	1	180
<i>wzx</i>	CTAACAAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGTG	GGCACTGAATAAGGGATAATTGTACTG	2	295
<i>glyC</i>	CATGGTGGTTATCCTGACTTGGCTGT	TCCACATGAGGCCGCTTCTAATATACT	3	650
<i>wciP</i>	GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG	CTTCCACAACAGCTCTAGAAACC	4	320
<i>wcwK</i>	CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG	CCATACATCTGAATTCCTAAGC	5 ou 12	450
<i>gltI</i>	GATTCGGATGATTTTTGGCTGACGGAACG	CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC	6	360
<i>funQ</i>	CTCCGATTCATGTTTTCTATGTGG	CGATAAACCATAACAATTCCTGGCAC	7	490
<i>scdA</i>	GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG	CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG	8	650
<i>funV</i>	AGCCACATCAATTTAGCCTCATCA	CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC	9	710
<i>funX</i>	GGTGACATTTATGGGCGAGTAAGTC	GACCTGTCATCAATAACAATCTTAAGACG	10	790
<i>amtA</i>	CCATCTCTTAACTAATGGGACTG	GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG	11	890
<i>gltP</i>	GCTGGAGGAGGTGAAAGAGGTGGTAC	CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	13	840
<i>funAB</i>	GCTGGTTATGACTATTTCTTTTCGCG	GCTCCCAAGATTAACCACCAGCAAG	14	730
<i>funI</i>	CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC	CCTATATCATTTGTTGGATGTACG	15	550
HPS_219690793	ACAACCTGCAAGTACTTATCGGGAT	TAGCCTCTGTCTGATATCCCACG	todos	275