

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

INTRODUÇÃO

O *Actinobacillus pleuropneumoniae* é o agente da pleuropneumonia suína, doença infecto-contagiosa amplamente distribuída no rebanho suíno mundial e de importância econômica significativa, podendo afetar suínos suscetíveis de várias idades. O agente possui 15 sorotipos conhecidos, os quais podem apresentar reações cruzadas em testes diagnósticos, dificultando a sorotipificação [1]. A determinação do sorotipo de ocorrência em um dado surto e/ou região é importante na promoção da profilaxia, mas não é a única exigência para um efetivo controle. Em razão da diversidade genética e das diferenças na virulência entre as amostras, mesmo em amostras de um mesmo sorotipo, é necessário o desenvolvimento de métodos que possam diferenciar as amostras isoladas a campo em diferentes surtos da doença. O objetivo deste trabalho é o de desenvolver e padronizar técnicas de biologia molecular, visando a genotipificação de isolados de *A. pleuropneumoniae*. Dentre as técnicas disponíveis, o ERIC-PCR é uma das mais promissoras. Essa técnica é baseada na amplificação por PCR de sequências repetitivas altamente conservadas nas regiões intergênicas do genoma bacteriano (ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) [2,3]. O padrão de amplicons gerado pela técnica também deverá permitir minuciosa análise filogenética das amostras isoladas de campo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído usando o Kit QIAmp DNA Mini (Qiagen) e quantificado através do Kit Quant-iT dsDNA HS Assay (Invitrogen), conforme instruções dos fabricantes. A quantidade de DNA utilizada em cada reação foi de 500 pg/ μ L.

ERIC-PCR (REP-PCR)

Cada reação, em um volume final de 25 μ L, continha 2,5 μ L de tampão de PCR 10x, 3 mM de MgCl₂, 2,5 Unidades 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 UltraPure 1,5%, a 85 V (8,5V/cm) em tampão TBE 1x por 3 horas, e fotografados.

Análise Filogenética

Os amplicons das amostras de campo foram analisados pelos softwares Gel-Pro Analyzer e RAPDistance [4]. A partir da matriz binária gerada pelos fragmentos obtidos pela técnica de ERIC-PCR, foram calculadas as distâncias filogenéticas das amostras, através do coeficiente de Nei & Li [5].

RESULTADOS

Em experimentos iniciais, foi utilizado DNA obtido dos sorotipos de referência de *A. pleuropneumoniae* (sorotipos 1 a 14) para estabelecer as concentrações ótimas dos reagentes. Com estas amostras de referência, foi possível obter um padrão de amplificação inequívoco para o DNA de cada um dos sorotipos analisados (Figura 1). Os experimentos iniciais indicaram que, nas condições padronizadas, a técnica apresentou reprodutibilidade quando aplicada em amostras em duplicata. Após esta etapa inicial de padronização, a técnica foi aplicada em 29 amostras de campo obtidas de casos clínicos e isoladas no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA/EMBRAPA). Todas as amostras geraram padrões de amplificação diferenciados, inclusive em amostras de mesmo sorotipo, permitindo a distinção efetiva das diferentes amostras de campo. O padrão de amplicons gerado pelo ERIC-PCR permite a construção de uma matriz binária passível de uma detalhada análise filogenética, impossível de ser feita pela simples inspeção visual do resultado da eletroforese em gel de agarose. Através da análise filogenética realizada, todas as amostras puderam ser identificadas e caracterizadas individualmente, podendo ser agrupadas em sub-populações filogeneticamente relacionadas (Figura 2).

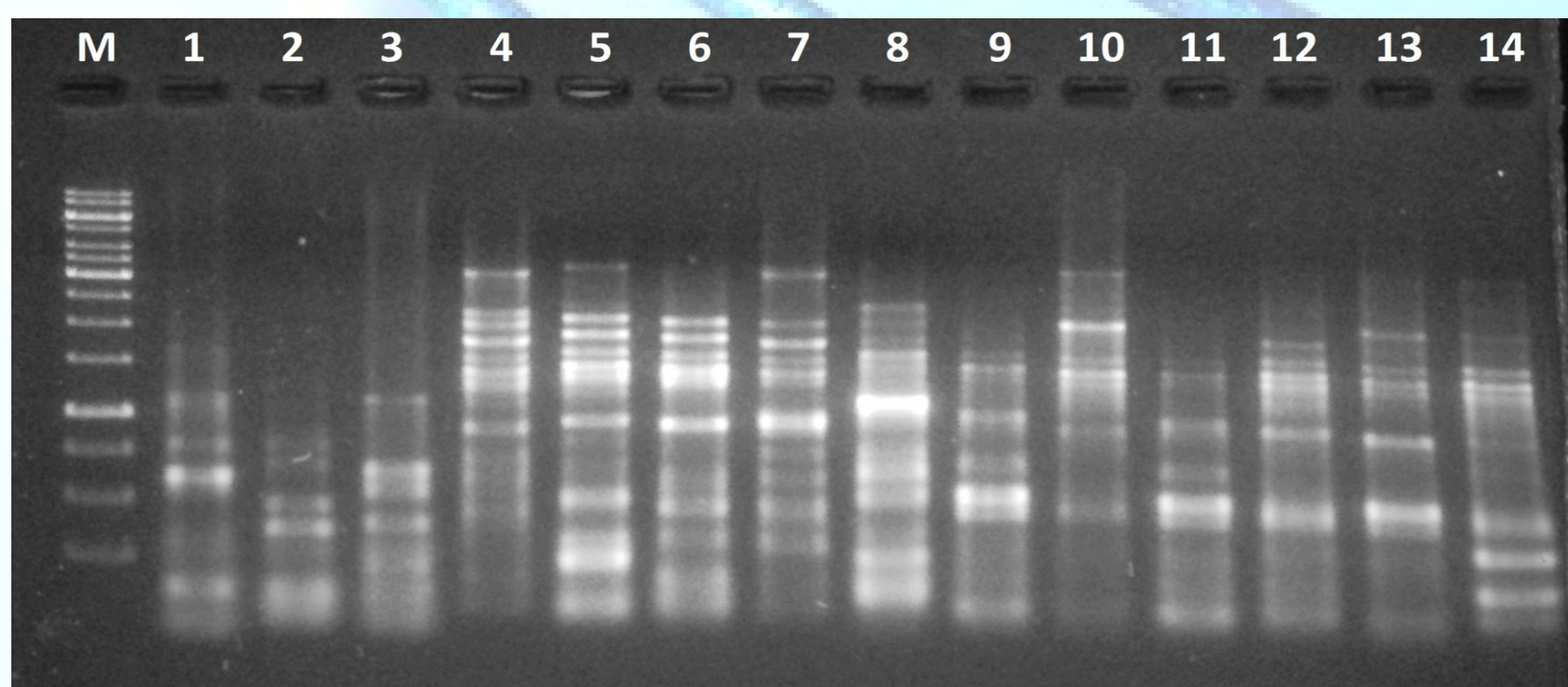


Figura 1.: Eletroforese em gel de agarose 1,2% de amplicons obtidos pela aplicação da técnica de ERIC-PCR ao DNA de *A. pleuropneumoniae*. M: marcador de peso molecular (ladder de 250 pb); 1 a 14: amplicons obtidos a partir do DNA dos sorotipos 1 a 14, respectivamente, de *A. pleuropneumoniae*.

CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados, conclui-se que a técnica ERIC-PCR permite a diferenciação efetiva de amostras isoladas de campo de *A. pleuropneumoniae*. A partir dos resultados obtidos, é possível a realização de estudos epidemiológicos mais detalhados do agente no nosso meio. As informações extraídas serão relevantes para o entendimento da doença, com reflexos práticos

nas medidas de controle e prevenção. Outro ponto chave no controle do agente através do ERIC-PCR é a possibilidade de rastrear as cepas isoladas em cada surto, principalmente em granjas de controle por vacinação e granjas que alcancem, ou busquem alcançar, a erradicação da doença. A pesquisa alcançou seus objetivos na diferenciação dos isolados, porém, outros métodos devem ser pesquisados e padronizados para auxiliar a sorotipificação e a genotipificação do agente. Entre eles podemos citar a identificação dos genes que codificam para as toxinas Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins) e a técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que podem agregar informações importantes na rastreabilidade e genotipificação do agente [6].

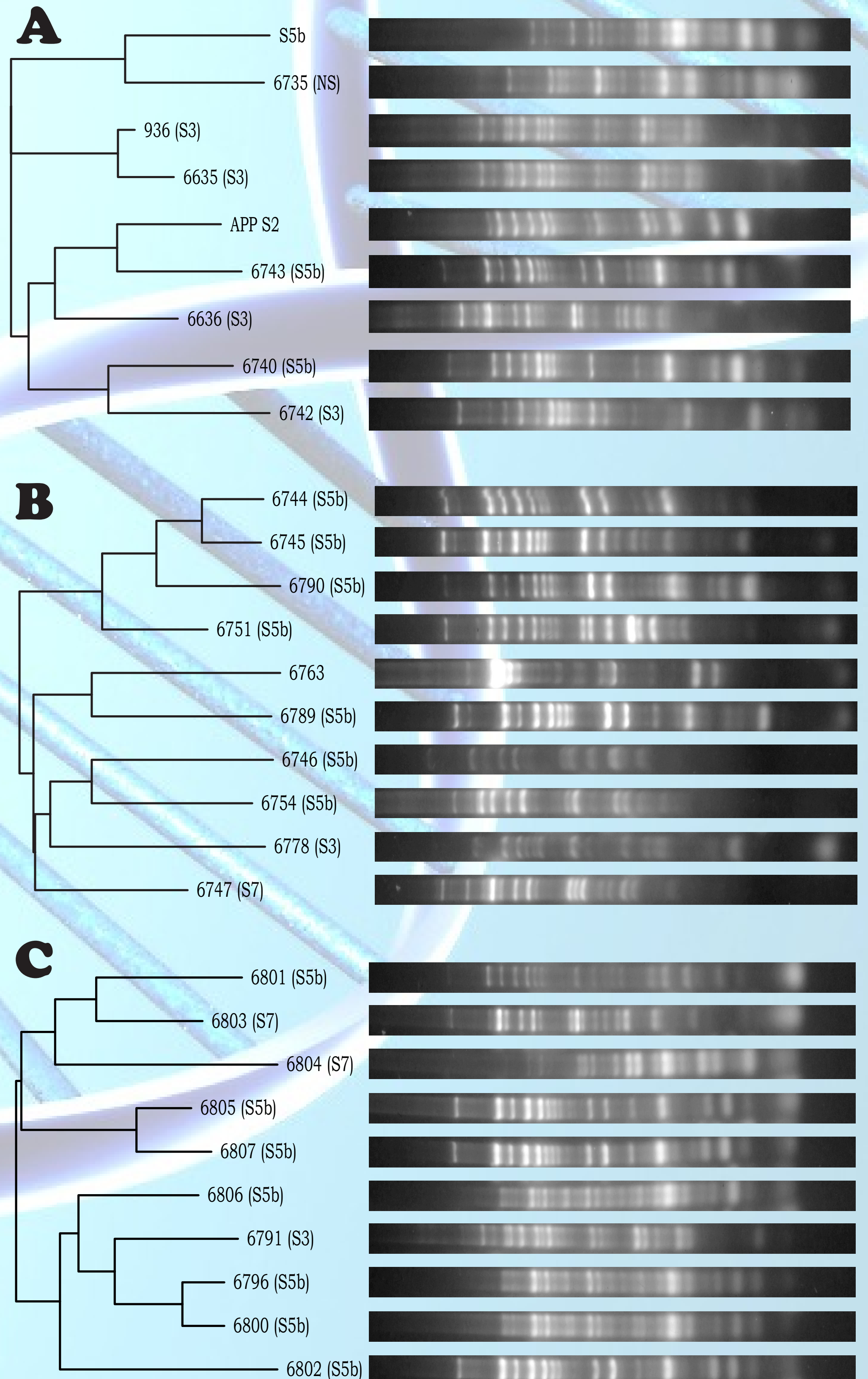


Figura 2.: Análises filogenéticas das 29 amostras de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Esquerda: árvore filogenética obtida a partir da matriz binária gerada pelos amplicons do ERIC-PCR.

Direita: eletroforese em gel de agarose Ultra-Pure 1,5% dos amplicons.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Haesebrouck, F.; Chiers, K.; Van Overbeke, I.; Ducatelle, R.; *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection, *Veterinary Microbiology*, vol 58, p. 239 – 249, 1997.
- [2] VERSALOVIC et al., Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of figerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acid Research*, v.19, n. 24, p.6823-6831, 1991.
- [3] 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.
- [4] Armstrong J.S., Gibbs A.J., Peakall R. and Weiller G. (1994) The RAPDistance Package <http://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance> or <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>
- [5] NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *National Academy of Sciences of the United States of America Proceedings*, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- [6] 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.