



XI MICTI

Campus São Bento do Sul

Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar

IV IFCULTURN

PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS EM CEPAS PASTEURELLA MULTOCIDA ISOLADAS DE SUÍNOS: AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

STUDY OF MACROLIDE RESISTANCE GENES IN PASTEURELLA MULTOCIDA STRAINS ISOLATED FROM PIGS: EVALUATION OF THE NUCLEIC ACID EXTRACTION PROTOCOL

Autores: Larissa Rafaeli IZOLAN, Marcella Zampoli TRONCARELLI, Eliete GRIEBELER, Diogenes DEZEN.

Identificação autores: Bolsista PIBITI/CNPq/IFC; Co-autora IFC-Campus Concórdia; Co-autora IFC-Campus Concórdia; Orientador IFC- Campus Concórdia.

RESUMO

Em estudo prévio realizados pelo nosso grupo, observou-se elevado índice de resistência à Eritromicina de cepas de *Pasteurella multocida*. A resistência a Eritromicina está associada aos genes *erm(42)*, *msr(E)* e *mph(E)*, os quais podem ser detectados através da PCR. Entretanto, uma etapa que determina o sucesso ou a falha na realização da PCR, é extração de ácidos nucleicos. Neste sentido, este trabalho avaliou um protocolo de extração de DNA para *P. multocida*. Para isso, o DNA de 90 cepas foi extraído pelo método clorofórmio/álcool-isoamílico. O produto resultante foi avaliado por métodos quantitativos e qualitativos e apresentou resultados satisfatórios.

Palavras-chave: PCR; *P. multocida*; extração de DNA.

ABSTRACT

In a previous study conducted by our group, a high Erythromycin resistance index of *Pasteurella multocida* strains was observed. Resistance to Erythromycin is associated with *erm(42)*, *msr(E)* and *mph(E)* genes, which can be detected by PCR. However, one step that determines the success or failure to perform PCR is nucleic acid extraction. In this sense, this work evaluated a DNA extraction protocol for *P. multocida*. For this, the DNA of 90 strains was extracted by the chloroform / alcohol-isoamylic method. The resulting product was evaluated by quantitative and qualitative methods and presented satisfactory results.

Keywords: PCR; *P. multocida*; DNA extraction.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As principais enfermidades de causa infecciosa que afetam rebanhos suínos são causadas por patógenos respiratórios e entéricos. Dentre os agentes bacterianos envolvidos nas infecções respiratórias, a *Pasteurella multocida* é considerada um dos principais agentes infecciosas nas criações de suínos (FILHO,





2001).

Como forma de controle da *P. multocida* a terapia antimicrobiana tem sido amplamente utilizada; entretanto, muitas drogas vêm tornando-se ineficazes, devido ao aumento de resistência do agente aos antimicrobianos. (BOROWSKI et al, 2002; HERES, 2009). Muitos genes de resistência aos antimicrobianos vem sendo descobertos em plasmídeos, integrons e transposons, e a ampla utilização de antimicrobianos resulta na seleção de micro-organismos resistentes. (HUNT et al, 2000; BOROWSKI et al, 2002; KEHRENBURG, 2003).

Em pesquisa anterior realizada pelo nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Veterinária do IFC – Campus Concórdia, determinou-se o perfil de sensibilidade de 141 cepas de *P. multocida*, isoladas de suínos com quadros de problemas respiratórios. Este estudo revelou que 89% das cepas foram resistentes à eritromicina, um antimicrobiano da classe dos macrolídeos (dados não publicados).

A resistência bacteriana aos macrolídeos está associada a três genes: *erm(42)*, *msr(E)* e *mph(E)* (DESMOLAIZE et al. 2011; KADLEC et al. 2011). Portanto, a técnica de PCR pode ser empregada para detectar tais genes de resistência. Entretanto, uma etapa que antecede a realização da PCR é extração de ácidos nucleicos, a qual pode interferir diretamente nos resultados da técnica, uma vez que a presença de contaminantes ou a degradação dos ácidos nucleicos obtidos pode levar a resultados falsos negativos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi de avaliar um protocolo de extração de DNA para *P. multocida*, visando a posterior realização do PCR para os genes de resistência deste micro-organismo.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 90 amostras de *P. multocida*, isoladas de suínos com quadro clínico de pneumonia, entre os anos de 2007 à 2016, provenientes da região de Concórdia, SC. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Centro de Diagnóstico em Sanidade Animal (CEDISA), Concórdia-SC, e permaneceram armazenadas a -80°C até a realização da técnica de extração de DNA.

Para a extração do DNA, utilizou-se protocolo previamente descrito (DOYLE



& DOYLE, 1987), com modificações descritas a seguir. Resumidamente, as cepas de *P. multocida* criopreservadas foram semeadas em ágar sangue ovino a 5% e incubadas a 37°C/ 24 h. As colônias resultantes foram ressuspensas em caldo BHI, até a obtenção de turvação equivalente ao grau 5 na escala MacFarland. Coletou-se 300 uL da cultura ressuspensa, adicionou-se 300 uL de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1) e incubou-se em banho-maria a 56°C/ 30min. Após, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm/ 10 min., o sobrenadante foi coletado e 900 uL de etanol 70% gelado foi adicionado. Em seguida, centrifugou-se os microtubos a 13.500 rpm/ 20 min., deprecou-se o sobrenadante e os microtubos foram colocados em estufa a 56°C para sua completa evaporação do etanol. O *pellet* resultante foi ressuspensa em 100 uL de água ultrapura estéril, homogeneizado e estocado a -20°C até sua utilização.

Para determinar a concentração e a qualidade do DNA recuperado, utilizou-se as metodologias descritas a seguir. A concentração do DNA foi determinada no equipamento Qubit 2.0 utilizando o kit Qubit dsDNA BR assay, seguindo as recomendações do fabricante. As razões entre as leituras das absorvâncias 260/280 nm foram obtidas no equipamento BioDrop. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A média e desvio padrão da concentração do DNA recuperado e da razão 260/280, foram de 4,5±8,4 ng/uL e 1,86±0,2, respectivamente. Na análise visual dos géis de agarose, as amostras não apresentaram sinais de degradação.

A quantidade DNA recuperada se mostrou adequada para os protocolos de PCR que serão aplicados e a razão 260/280 obtida indica que a qualidade do DNA é aceitável, uma vez que valores iguais ou superiores a 1,8 indicam um elevado grau de pureza do DNA recuperado, diminuindo desta forma a possibilidade da interferência de contaminantes na PCR. O grau de pureza de amostras de DNA é avaliado pela razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm, valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteínas, o que pode levar a inibição das



reações de PCR (REGITANO, 2001; LEE et al., 2010). Associado à isto, não se observou sinais de degradação do DNA, o que poderia resultar na inibição da amplificação dos produtos de PCR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise de parâmetros quantitativos e qualitativos, conclui-se que o protocolo de extração de ácidos nucleicos testado se mostrou adequado. Ressalta-se que a padronização da técnica de PCR, para os genes de interesse, encontra-se em andamento.

REFERÊNCIAS

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S.. N.; RAZIA, L. E.; COUTINHO, T. A. Padrão de Resistência Antimicrobiana de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em pulmões de Suínos. *Revista da FZVA*, v.9, p.104-110, 2002.

DESMOLAIZE, B.; ROSE, S.; WILHELM, C.; WARRASS, R.; DOUTHWAITE, S. Combinations of macrolide resistance determinants in field isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, p. 4128–4133, 2011.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

FILHO, J. X. O. Estudo da Patogenia e Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico da Pateurelose pneumônica em suínos. 2014. 123p. Tese (Doutorado - Área de concentração em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

HERES, T. S. Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos. 2009. 64p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LEE, J. H.; PARK, Y.; CHOI, J. R.; LEE, E. K.; KIM, H. S. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal*, Seoul, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2010.

KADLEC, K.; MICHAEL, G. M.; SWEENEY, M.T.; BRZUSZKIEWICZ, E.; LIESEGANG, H., DANIEL, R.; WATTS, J. L.; SCHWARZ, S. Molecular basis of



macrolide, triamilide, and lincosamide resistance in *Pasteurella multocida* from bovine respiratory disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 55, n. 5, p. 2475–2477, 2011.

KEHRENBERG, C.; THAM, N. T. T.; SCHWARZ, S. New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 9, p. 2978–2980, 2003.

HUNT, M. L.; ADLER, B.; TOWNSEND, K. M. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, v. 72, n. 1-2, p. 3-25, 2000.

REGITANO, L. C. A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. eds. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p. 180-186.