

Evento Submissão: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia

AREA: Microbiologia Veterinária - Divisão K

SUB-AREA: Genética e Bioquímica

ESTABELECIMENTO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Pasteurella multocida*

Autores Raquel, R. ¹, Oliveira Filho, J. X. ², Bellaver, F. A. V. ¹, Servelin, E. C. ³, Silva, G. B. ³, Mores, M. A. Z. ¹, Mores, N. ¹, Klein, C. S. ¹

E-mail do primeiro autor: raquel.rebelatto@embrapa.br

Instituição ¹ Embrapa - Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC - Caixa Postal 21), ² UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS), ³ UNC - Fundação Universidade do Contestado (Concórdia, SC)

Resumo:

A prevalência de lesões pneumônicas sugestivas de *Pasteurella multocida* é alta nos rebanhos de suínos brasileiros. No entanto, pouco se sabe sobre a patogenia desse agente, o que reforça a importância de estudos dos possíveis genes associados à virulência. Assim, o presente estudo teve o objetivo de estabelecer um teste de PCR multiplex para detecção dos genes de virulência *pfhA* (adesão bacteriana), *hgbB* (ligação à hemoglobina) e *toxA* (toxina dermonecrótica) de acordo com ATASHPAZ et al. (2009). Para isto, realizamos dez testes de sensibilidade e três de especificidade analíticas. Para os testes de sensibilidade foram selecionados dois isolados de *P. multocida* pertencentes ao Complexo de Laboratórios de Sanidade e Genética Animal (CLSGA) da Embrapa Suínos e Aves, sendo um positivo para os genes *hgbB* e *pfhA* e outro para *hgbB* e *toxA*. A concentração do cultivo bacteriano foi ajustada para 0,6 de absorbância (540nm) e, posteriormente, foram realizadas diluições seriadas, contagem de UFC e, das mesmas diluições, foi realizada extração de DNA e PCR multiplex. Para os testes de especificidade foram selecionados nove isolados da família *Pasteurellaceae* (*Actinobacillus indolicus*, *A. minor*, *A. pleuropneumoniae*, *A. porcinus*, *A. suis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Haemophilus parasuis*) e dois isolados de contaminantes comuns nas coletas de material clínico (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.*), pertencente ao CLSGA. Destes, foi extraído DNA e realizada PCR multiplex. Quanto à sensibilidade, foram necessárias 107UFC/mL para que detectássemos os três genes simultaneamente por PCR multiplex. No teste de especificidade, todos os isolados da família *Pasteurellaceae* apresentaram bandas de tamanho correspondente ao gene *pfhA* (275pb), apenas *A. suis* não apresentou banda de tamanho correspondente ao gene *hgbB* (499pb) e nenhum isolado apresentou banda de tamanho correspondente ao gene *toxA* (846pb). Não houve *aplicons* com tamanho de bandas correspondentes aos genes pesquisados nos isolados de *S. aureus* e *Streptococcus sp.* Assim, a PCR multiplex foi sensível para detecção dos genes de virulência *hgbB*, *pfhA* e *toxA*, sendo necessárias 107 UFC/mL para detecção simultânea dos três genes. Porém, o teste não foi específico para detecção destes genes em amostras de *P. multocida*, desta forma a extração de DNA não pode ser realizada diretamente de material clínico e sim de cultivo puro.

Palavras-chaves: Genes de Virulência, Especificidade Analítica, *Pasteurella multocida*, PCR Multiplex, Sensibilidade Analítica

Agência Fomento: