

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS DE *Streptococcus equi* EM SUBSPÉCIES *equi* E *zooepidemicus*

JÉSSICA MARQUES OBELAR RAMOS¹; ILUSCA SAMPAIO FINGER²; CARLOS
EDUARDO WAYNE NOGUEIRA³; FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴; MATHEUS
COSTA DA ROSA⁵; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – jessicaobelar@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ilusca-finger@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – nogueira@ufpel.edu.br

⁴ Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – Matheus.costa.rosa@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A adenite equina é uma enfermidade bacteriana infecto-contagiosa causada por *Streptococcus equi*, subsp. *equi*, (*S. equi*) e afeta o trato respiratório superior de equinos de todas as idades, principalmente animais jovens (MORAES et al, 2009). Essa bactéria é classificada como β hemolítica (por causar lise total nas hemácias) e é pertencente ao grupo C de Lancefield (classificação de acordo com a composição do polissacarídeo C presente na parede celular) (MORAES et al, 2009). O controle desta enfermidade torna-se de grande importância para o agronegócio brasileiro por ser uma doença caracterizada por apresentar baixa letalidade, mas alta morbidade, acarretando grandes prejuízos econômicos pela perda de desempenho de animais com valor zootécnico elevado e custos com tratamento e mão de obra veterinária (MORAES et al, 2009).

O diagnóstico precoce é de grande importância assim como a prevenção de doenças infecciosas nessa espécie (AINSWORTH & BILLER, 2000). Para isso é necessária a diferenciação da *S. equi*, subsp. *equi* de *S. equi*, subsp. *zooepidemicus* (*S. zoo*), utilizando-se por vezes testes bioquímicos de fermentação de açúcares (KOWALSKI, 2000). Tal diferenciação bioquímica das subespécies deve-se a capacidades das cepas de fermentarem ou não açúcares como a lactose, sorbitol e trealose. *S. equi*, subsp. *equi*, não fermenta nenhum desses carboidratos, *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*, fermenta lactose e sorbitol (KUWAMOTO et al., 2001; EUZEBY, 2005).

Porém, cepas atípicas de *S. equi*, subsp. *equi*, fermentadoras de trealose, sorbitol e/ou lactose foram descobertas e caracterizadas (GRANT et al., 1993). Devido a problemas como estes, os métodos mais específicos, como o de caracterização molecular, vêm sendo estudados (MORAES et al, 2009).

A proteína M é de especial importância dentre os fatores de virulência da enfermidade, sendo uma proteína de membrana, com atividade antifagocítica e de aderência, presente em algumas cepas de *Streptococcus* (TIMONEY & MUKHTAR, 1993). Durante dez anos GALÁN & TIMONEY (1988) compararam cepas de *S. equi*, subsp. *equi*, isoladas, nos Estados Unidos e na Europa e puderam assim concluir que existe somente um tipo de proteína M específica dessa subespécie, denominada SeM.

Assim como a proteína SeM é específica de *S. equi*, subsp. *equi*, existem outras duas moléculas, sendo elas exotoxinas, exclusivas desta cepa. São elas a Seel e a SeeH. Tais toxinas foram levadas em consideração para a criação de *primers* que reconhecem a sequência nucleotídica codificadora de cada uma delas. Com estes *primers* é possível amplificar por PCR os respectivos fragmentos de DNA, permitindo a diferenciação das subespécies (ALBER et al, 2004).

Levando-se em consideração as vantagens de maior especificidade e de menor tempo de realização da técnica de PCR em relação aos testes bioquímicos, o objetivo do trabalho foi padronizar uma técnica de PCR para a diferenciação de cepas de *S. equi*, subsp. *equi*, e *S. equi*, subsp. *zooepidemicus*.

2. METODOLOGIA

Obtenção das cepas e cultivo bacteriano

As cepas bacterianas foram obtidas da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As cepas foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) a uma temperatura de 37 °C, durante 16 horas. O cultivo bacteriano foi utilizado para extração do DNA e realização da PCR.

Extração de DNA

O DNA das cepas bacterianas foi extraído utilizando o kit de extração de DNA *Bactéria GenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) e o produto da extração de DNA foi utilizado na PCR.

PCR

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa VectorNTI e sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (Tabela 1). Estes *primers* amplificam os genes que codificam para as proteínas SodA, SeeH, Seel e SeM, as quais são características de *S. equi*, sendo a SodA também encontrada em *S. zoo*. O *primer* SodA reconhece as duas subespécies mencionadas, já os *primers* SeeH e Seel reconhecem apenas as cepas de *S. equi*.

Para realização da PCR, foi utilizado o Kit PCR Master Mix (Promega), o qual contém 50 units/ml de Taq DNA polymerase, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂ e os *primers* a uma concentração de 10 pmol/µl.

O termociclador utilizado foi o PTC-100® Peltier Thermal Cycler, para realização da PCR foi utilizado um programa com uma ciclagem de 95°C, para desnaturação primária e após ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 90 s, durante 35 vezes. Após mais 5 min a 72°C e 10 min a 4°C.

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos *primer* utilizados e respectivas cepas as quais os *primers* são específicos.

<i>Primer</i>	Sequência nucleotídica	Específico a cada cepa
SodA f	CAG CAT TCC TGC TGA CAT TCG TCA GG	Reconhece <i>S. equi</i> e <i>S. zoo</i>
SodA r	CTG ACC AGC CTT ATT CAC AAC CAG CC	Reconhece <i>S. equi</i> e <i>S. zoo</i>
SeeH f	AGC ATG ATT CTA ACT TAA TTG AAG CCG	Específico de <i>S. equi</i>
SeeH r	TAG CAT GCT ATT AAA GTC TCC ATT GCC	Específico de <i>S. equi</i>
Seel f	GAA GGT CCG CCA TTT TCA GGT AGT TTG	Específico de <i>S. equi</i>
Seel r	GCA TAC TCT CTC TGT CAC CAT GTC CTG	Específico de <i>S. equi</i>
SeM f	AAG GTA CCT AGT TTT CTT TGC GTT TAG G	Específico de <i>S. equi</i>
SeM r	GGA ATT CAT GTT TTT GAG AAA TAA C	Específico de <i>S. equi</i>

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando amostras de DNA de *S. equi* e *S. zoo*, obteve-se a amplificação do gene que codifica a superoxide dismutase A (SodA) (235 pb) com a utilização do *primer* SodA tanto em *S. equi* quanto em *S. zoo*. Isso acontece porque ambas subespécies possuem o gene codificador de superoxide dismutase A.

Quando analisadas as amostras com *primers* Seel, observou-se que houve amplificação apenas do DNA de *S. equi* na técnica de PCR, uma vez que este *primer* reconhece a sequência nucleotídica codificadora da toxina Seel específica da subespécie *S. equi*. Isto pode ser concluído uma vez que, na análise da amostra de DNA de *S. zoo*, não se observa a amplificação do gene *Seel* (520 pb).

Analisando as seguintes amostras, vemos que o *primer* SeeH apenas possibilitou amplificação a partir do DNA de *S. equi*, *primer* esse que possibilita a amplificação do gene codificador da supertoxina *SeeH* (503 pb). Novamente, observa-se a amplificação do gene apenas no DNA de *S. equi*, por essa supertoxina também ser específica de *S. equi*. Percebe-se isso quando analisada a amostra com DNA de *S. zoo*,

A amostra na qual foi utilizado o *primer* SeM, que reconhece a sequência nucleotídica codificadora do gene da proteína M, foi utilizada como controle. Explica-se isso pelo fato deste gene estar presente apenas em *Streptococcus equi* subsp. *Equi*, uma vez que tal proteína é específica desta cepa. Sendo assim, os resultados obtidos com a amplificação dos outros genes específicos de *S. equi* (*SeeH* e *Seel*) corroboram com o resultado obtido com a amplificação do gene controle *SeM*.

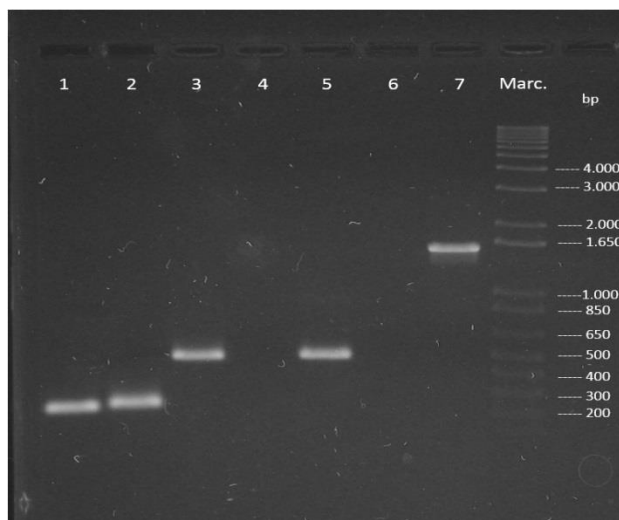


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR, utilizando os *primers* SodA, Seel, SeeH e SeM. 1 – Amplificação do gene SodA a partir do DNA de *S. equi*; 2 - Amplificação do gene SodA a partir do DNA de *S. zoo*; 3 -Amplificação do gene Seel a partir do DNA de *S. equi*; 4 – Não amplificação do gene Seel a partir do DNA de *S. zoo*; 5 - Amplificação do gene SeeH a partir do DNA de *S. equi*; 6 – Não amplificação do gene SeeH a partir do DNA de *S. zoo*; 7 -Amplificação do gene SeM a partir do DNA de *S. equi*, Controle + da PCR; Marc – Marcador de peso molecular 1kb (Integrated DNA Technologies).

4. CONCLUSÕES

Com este estudo pudemos concluir que a técnica de PCR pode ser utilizada na diferenciação entre as cepas estudadas. Estes resultados podem sugerir a utilização da PCR como técnica de diagnóstico para identificação do *S. equi*, subsp. *equi*, agente etiológico da Adenite Equina. Quando comparamos a PCR com testes bioquímicos, utilizados em rotinas laboratoriais para a identificação e diferenciação de cepas, pode-se perceber que a PCR possui algumas vantagens, tais como custo-benefício e o curto período para obtenção dos resultados, em torno de 24 h. Estas vantagens permitem o rápido diagnóstico da cepa infectante, possibilitando com que os veterinários entrem com o tratamento adequado, diminuindo possíveis perdas econômicas causadas pela enfermidade. No entanto mais estudos precisam ser realizados para que a PCR venha substituir os testes bioquímicos na diferenciação de cepas bacterianas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, D.M.; BILLER, D.S. Sistema respiratório. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.229-230.

ALBER, J. et al. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification and Differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *Equi*. **J. Vet. Med.** Berlin, B 51, 455–458, 2004.

EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de bactériologie vétérinaire**. Acessado em 28 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/equi.html>.

GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Immunologic and genetic comparison of *Streptococcus equi* isolates from the United States and Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.6, p.1142-1146, 1988.

GRANT, S.T. et al. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v.133, p.215-216, 1993.

KOWALSKI, J.J. Mecanismo da doença infecciosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna eqüina**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2000. p.54-56.

KUWAMOTO, Y. et al. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**, v.12, n.2, p.47-49, 2001.

MORAES, C. M. et al. Adenite equina: sua etiologia, diagnóstico e controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1944-1952, set, 2009.

TIMONEY, J.F.; MUKHATAR, M.M. The protective M proteins of the equine group C streptococci. **Veterinary Microbiology**, n.37, p.389-395, 1993.