

ISSN 1980-6841
Julho, 2019

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 134

Anais da XI Jornada Científica - Embrapa São Carlos

Editores Técnicos

Alexandre Berndt
Ana Rita de Araujo Nogueira
Lea Chapaval Andri
Marcelo Mattos Cavallari
Manuel Antônio Chagas Jacinto

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2019

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3411-5600

Fax: (16) 3361-5754

www.embrapa.br/pecuaria-sudeste

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alexandre Berndt

Secretária-Executiva: Simone Cristina Méo Niciura

Membros: Ane Lisye F. G. Silvestre, Maria Cristina Campanelli Brito,

Milena Ambrósio Telles, Mara Angélica Pedrochi

Comitê PIBIC - Embrapa Pecuária Sudeste

Alexandre Berndt – Coordenação

Ana Rita de Araujo Nogueira

Lea Chapaval Andri

Juliana Gonçalves Costa

Manuel Antônio Chagas Jacinto

Marcelo Mattos Cavallari

Maria Cristina Campanelli Brito

Silvia Helena Piccirillo Sanchez

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

1ª edição online – 2019

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Embrapa Pecuária Sudeste

J82xi Jornada Científica Embrapa – São Carlos, SP.

Anais / editores técnicos, Alexandre Berndt, Ana Rita de Araújo Nogueira, Lea Chapaval Andri, Marcelo Mattos Cavallari, Manoel Antônio Chagas Jacinto. - São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste: Embrapa Instrumentação, 2019.

70 p. – (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, ISSN 1980-6841; 134).

1. Jornada científica – Evento. I. Berndt, Alexandre. II. Nogueira, Ana Rita de Araújo. III. Andri, Lea Chapaval. IV. Cavallari, Marcelo Mattos. V. Jacinto, Manoel Antônio Chagas. VI. Título. VII. Série.

CDD 21 630.72

© Embrapa 2019

Padronização de extração de DNA a partir de intestino delgado de bezerros para futuros estudos da composição microbiota intestinal

Bruna Moraes Estella¹, Lea Chapaval Andri², Wilson Malagó Júnior², Teresa Cristina Alves²,
Talita Barban Bilhassi³

¹Aluno de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista - UNICEP, São Carlos, SP. Bolsista Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; brunamrse@gmail.com;

²Pesquisador(a) Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP;

³Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

A diarreia de bezerros é a principal causa de perdas econômicas e acarreta cerca de 2% de mortalidade em bezerros. Enteropatógenos de origem bacteriana, viral e parasitária (protozoários) podem estar envolvidos, isolados ou em associação, na causa de diarreia em bezerros, com destaque para *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, rotavírus, coronavírus e protozoários dos gêneros *Eimeria spp.* e *Cryptosporidium spp.* Este projeto teve por objetivo padronizar a extração de DNA de amostras de intestino delgado destes mesmos bezerros para futuros ensaios de PCR quantitativo, com a finalidade de mapear a presença de agentes infecciosos em bezerros de leite, afetados pela diarreia. A técnica de PCR quantitativo permite identificar e quantificar cada um dos patógenos envolvidos na diarreia bovina, e ainda, abordar simultaneamente a presença de mais de um patógeno. Segmentos de dois centímetros de comprimento foram retirados das três regiões do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de bezerros machos da raça Holandesa, com sintomas de diarreia, oriundos do rebanho da Fazenda Canchim. O DNA dos três segmentos intestinais foi extraído a partir de 25 mg de tecido, não lavado, utilizando o “DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Group)”. Foram testados dois tempos de incubação para a etapa de lise celular, 6 horas e 16 horas. O DNA foi avaliado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo e quantificado no “Nano Drop™ ND1000 Spectrophotometer - ThermoFischer Scientific”. Observou-se maior rendimento nas extrações das amostras com tempo de incubação de 16 horas. Para a avaliação da viabilidade da amplificação foi utilizada a PCR convencional com primers para GAPDH de bovinos (Percin et al., 2007), FW 5' - GCGTGAACCACGAGAAGTATAA - 3' e RV 5' - CCCTCCACGATGCCAAAGT - 3' e DNA 16s ribossomal bacteriano (Klindworth et al., 2013), “S-D-Bact-0341-b-S-17” e “S-D-Bact-0785-a-A-21”, respectivamente FW 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG - 3' e RV 5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC - 3'. Uma das amostras com aparência de degradação “smear”, mas com material visível na altura da banda de DNA genômico, 69-jejuno; outra com forte banda de DNA genômico e sem aparência de degradação, 77-íleo, e a última com banda de intensidade moderada de DNA genômico e sem aparência de degradação “smear”, 93-jejuno. A reação foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 200 ng de DNA, 12,5 µL do tampão taq DNA polimerase “Master Mix Red (Ampliqon)” e 10 pMol de cada primer. O ensaio se mostrou promissor para a obtenção de DNA genômico de boa qualidade a partir destes tecidos. Os ensaios de PCR do GAPDH bovino e do 16s bacteriano validaram a utilização do kit para a extração simultânea de DNA de intestino e de bactérias. O método de extração usado permitiu o isolamento de um DNA livre de contaminações que poderiam inibir a reação de PCR. Cadastro SisGen nº A4AF0D5.

Apoio financeiro: Embrapa

Área: Ciências Biológicas

Palavras-chave: bezerros; diarreia; DNA; PCR