

Caracterização genotípica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por PCR Quadruplex

Sousa, João Pedro Melo de^{1*}; Araújo, Jamile Bezerra de²; Ximenes, Lidiane Viana²; Monteiro, Jomar Patrício³; Faccioli-Martins, Patrícia Yoshida⁴

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma das doenças infecciosas bacterianas que mais gera prejuízo aos produtores de ovinos e caprinos. Causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, essa doença pode ser identificada pela formação de abscessos nos linfonodos de equinos e pequenos ruminantes. Suas cepas podem ser classificadas em dois biovars, Equi ou Ovis, que além de distinguirem o hospedeiro de origem, são diferenciados pela capacidade ou não de reduzir nitrato. Os isolados dessa bactéria são identificados e caracterizados por aspectos morfológicos e por testes bioquímicos convencionais. No entanto, devido à proximidade taxinômica do biovar, a identificação somente por testes fenotípicos não é totalmente confiável. De acordo com a literatura os isolados de pequenos ruminantes são biovar Ovis, consequentemente, não devendo possuir a capacidade de reduzir nitrato, contudo, foram encontrados entre os isolados de *C. pseudotuberculosis* da Coleção de Microrganismos Patogênicos a Caprinos e Ovinos (CMPCO), algumas cepas que apresentaram capacidade de reduzir nitrato. Dessa forma, torna-se importante associar à rotina da coleção a caracterização genotípica dos acessos, para que a confirmação da espécie e do biovar seja feita por técnica biomolecular. Até o momento foram utilizados 44 isolados pertencentes a CMPCO que foram recuperados de criotubos congelados a -70°C , o DNA foi extraído de pellet obtido a partir de caldo cérebro-coração com 0,1% de Tween 80[®] após crescimento bacteriano por 24 horas a 37°C . Foi utilizado o protocolo do próprio kit de extração PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit, na qual foi realizado o preparo dos lisados com 180 μL de tampão de lisozima contendo 20 mg/mL de lisozima fresca, seguido de um banho-seco a 37°C por 30 minutos e adicionado 20 μL de Proteinase K repetindo o processo anterior a 55°C por 30 minutos. A eficiência da extração foi confirmada pela quantificação de DNA em microespectrofotômetro IQuant e por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. A quantidade de DNA obtido variou de 6 a 26 ng/ μL . A partir da análise das primeiras extrações-teste, foi possível avaliar a importância da lisozima para

extração de DNA de bactérias Gram-positivas na quebra da parede celular de peptidoglicano. Outro ponto importante observado, foi a variação da quantidade de DNA extraído, resultante das etapas de homogeneização dos pellets realizadas com maior cautela, permitindo que a extração fosse realizada com maior eficiência. Os próximos passos são a padronização da PCR multiplex, ainda não realizada por conta da pandemia.

Termos para indexação: Linfadenite caseosa, *C. pseudotuberculosis*, extração de DNA, biovares

Suporte Financeiro: Embrapa.

¹ Aluno de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA, bolsista BICT/FUNCAP/Embrapa.

² Técnico da Embrapa Caprinos e Ovinos.

³ Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos.

⁴ Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Orientadora.

*Apresentador (a) do trabalho: pedromelooficial@gmail.com