

CAPÍTULO 8

Otimização das técnicas de PCR e RFLP para o gene *tbpA* de *Haemophilus parasuis*

Catia Silene Klein
Virgínia Santiago Silva
Raquel Rebelatto
Catuscia Locatelli
Luiz Carlos Bordin

Introdução

A Doença de Glässer (DG) afeta, especialmente, suínos jovens, desde a creche, mas ocorre também nas fases de crescimento e terminação, causando morte por poliserosite, poliartrite, meningite e, principalmente, refugagem dos animais sobreviventes. Está relacionada à ocorrência de estresse nos animais e as infecções agudas são esporádicas, porém, após a ocorrência da circovirose, têm se tornado uma doença emergente em todo o mundo. Também, tem sido demonstrado que a DG está envolvida com Complexo de Doenças Respiratórias em Suínos (PRDC), resultante da combinação de vários agentes virais e bacterianos (KIM et al., 2003; FLECK e SNELSON, 2004; MORÉS, 2005). Os prejuízos causados pela DG são ocasionados por mortalidade, definhamento e refugio de leitões sobreviventes, além da depreciação da carcaça e gastos com medicamentos (SOBESTIANSKY et al., 1999).

O agente causal da DG é o *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), uma bactéria fastidiosa, cujo isolamento bacteriológico tradicional (IBT) e cultivo, a partir de amostras clínicas de suínos, nem sempre é possível devido, principalmente, ao uso indiscriminado de antibiótico, à coleta e ao transporte das amostras de forma inadequada. Resultados negativos no cultivo não necessariamente indicam ausência do agente no rebanho, que devido às exigências de cultivo e a métodos laboratoriais pouco sensíveis, têm dificultado o correto diagnóstico da doença quando não é possível comprovar a presença do agente no material patológico de suínos com sinais clínicos da doença. Outra limitação está no desconhecimento do sorotipo quando não há o isolamento bacteriano ou, mesmo havendo, poucos laboratórios disponibilizam esta metodologia. Para otimizar o isolamento bacteriano, é recomendável que a coleta do material para diagnóstico laboratorial seja feita de forma estéril, em vários locais (órgãos), a partir de animais com a doença característica e de preferência em estado febril.

Amostras de *H. parasuis* podem ser isoladas como habitante natural do trato respiratório superior dos suínos, uma vez que existe uma grande variabilidade na patogenicidade dos isolados, não sendo apenas diferenças no sorotipo, mas também entre os isolados do mesmo sorotipo. De acordo com as indústrias, a demanda por vacina para controle da DG é elevada, e a obtenção de um produto eficaz é difícil devido a essa variedade genotípica e fenotípica entre os isolados. Contudo, a falta de dados epidemiológicos no Brasil faz com que as vacinas utilizadas aqui sejam compostas por sorotipos baseados em dados de prevalência de outros países, tornando menos eficaz e eficiente o uso do produto. Um estudo de ocorrência de *H. parasuis* e de prevalência de sorotipos realizado no Brasil em 1997 reflete apenas a situação da região sudeste, mas registra um elevado número de amostras não sorotipáveis e a presença de mais de um sorotipo no mesmo rebanho.

A determinação dos sorotipos prevalentes em determinada região ou país é importante para estudos epidemiológicos e imunológicos, além de servir para direcionar a produção de vacinas e efetuar a prevenção e controle dos surtos da DG no Brasil. Atualmente, são conhecidos 15 sorotipos padrão de *H. parasuis*, que diferem na virulência, porém a maioria dos laboratórios de diagnóstico fornece somente o IBT e a caracterização taxonômica dos isolados. O sorotipo presente no rebanho é um indicativo quanto à capacidade de virulência do agente, propiciando diagnóstico e controle mais precisos, mesmo existindo variações quanto à virulência em isolados clínicos pertencentes ao mesmo sorotipo. Entretanto, a produção de soros hiperimunes sorotipo-específicos e de boa qualidade é extremamente difícil e laboriosa. Assim, as técnicas moleculares são alternativas modernas e mais apropriadas que fornecem o perfil molecular de cada isolado.

Diversas técnicas sorológicas e moleculares têm sido recomendadas para caracterização e identificação do sorotipo ou de um determinado perfil genético em isolados clínicos de *H. parasuis*, mas até o momento a técnica molecular RFLP foi a que apresentou os melhores resultados na caracterização dos sorotipos ou genotípica dessa bactéria.

Objetivos

- Otimizar e estabelecer a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene *tbpA* para detecção de *H. parasuis* diretamente de amostras clínicas e em isolados bacterianos provenientes de suínos;
- Otimizar e estabelecer a técnica de RFLP a partir dos produtos amplificados pela PCR para o gene *tbpA*, conforme descrito por De La Puente Redondo et al. (2003).

Resultados

PCR de isolado bacteriano

Inicialmente, foi realizada a otimização da PCR para o gene *tbpA*, para isolados em amostras padrão dos 15 sorotipos de *H. parasuis*, conforme descrito por De La Puente Redondo (2003), com amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1.9 kb (Figura 1). Os produtos de PCR amplificados para o gene *tbpA* de todos os 15 sorotipos padrão foram sequenciados e analisados com o programa BLAST. As sequências apresentaram homologia acima de 95% com as sequências de *H. parasuis* depositadas no GeneBank confirmando a amplificação específica do produto.

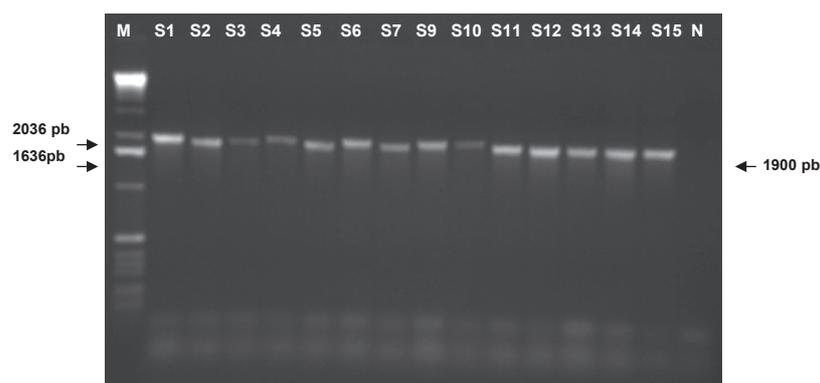


Figura 1. Resultado da PCR para o gene *tbpA* das amostras padrão de *Haemophilus parasuis*. (M) marcador, (S1 a S15) DNA das amostras sorotipo padrão 1 a 15, N (controle negativo)

A fim de determinar a especificidade analítica do teste, foram feitos dez ensaios, em dias alternados, com outros patógenos do trato respiratório dos suínos: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), *A. indolicus*, *A. porcinus*, *A. minor*, *A. suis*, *Bordetella bronchiseptica* (Bb) e *Pasteurella multocida*. O teste de especificidade analítica apresentou amplificação inespecífica para *B. bronchiseptica* e *A. pleuropneumoniae*, mas com tamanho diferente do produto de *H. parasuis*, desta forma, não interferindo na interpretação do resultado (Figura 2). No teste de sensibilidade, foi determinado como limite mínimo de detecção do *H. parasuis* a necessidade de $2,38 \times 10^9$ UFC/ mL.

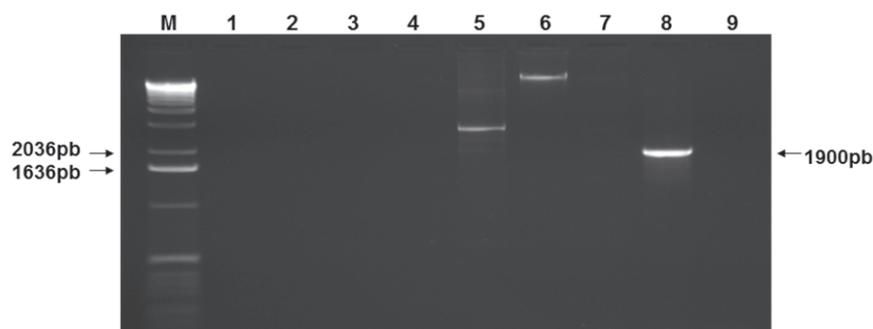


Figura 2. Marcador (M), *A. indolicus* (1), *A. porcinus* (2), *A. minor* (3), *A. suis* (4), *A. pleuropneumoniae* (5), *B. bronchiseptica* (6), *P. multocida* (7), controle positivo *H. parasuis* S1(8) e controle negativo (água)

Para fins de validação da PCR, foram feitas coletas de amostras de suínos em dez granjas com problemas respiratórios. Em duas destas granjas foram sacrificados animais para coleta de amostras clínicas que, após cultivo, foram confirmados resultados positivos para seis amostras pelo IBT e pela PCR dos isolados. Das demais oito granjas, não foram sacrificados animais, mas foram feitas coletas de suabes nasais e de tonsilas. De cada animal, foram feitos *pool* dos suabes, e estes cultivados em caldo TB para posterior IBT e extração de DNA (24 e 48h de cultivo). Dessas oito granjas, nenhum IBT foi positivo e apenas nove amostras do caldo TB (24h de cultivo) apresentaram resultados positivos para PCR. Estes resultados confirmam o uso de antibiótico que

impediram o cultivo para IBT e para posterior extração de DNA.

Além destes testes, e devido à falta de amostras isoladas de granjas com sinais clínicos da DG, foram retiradas 204 amostras de *H. parasuis* provenientes de vários estados do Brasil, mantidas em estoque na bacterioteca do laboratório da Embrapa Suínos e Aves desde 1990. Destes isolados, apenas 112 (54,9%) estavam viáveis e foram feitas extrações de DNA do cultivo bacteriano para posterior PCR. De 112 amostras, 99 apresentaram resultados positivos (88,39%), confirmando com os testes bioquímicos. Os outros 13 isolados foram negativos para PCR de *H. parasuis*.

PCR de amostra clínica

A mesma metodologia, da PCR para isolados de *H. parasuis*, foi aplicada em amostras clínicas (fragmentos de pulmão e de coração, suabes e líquidos de articulação, da cavidade torácica e abdominal), provenientes de suínos *Specif Pathogen Free* (SPF) inoculados experimentalmente com amostras avirulenta ou de baixa, de média e de alta virulência e com resultados de reisolamento bacteriano, ou seja, amostras sabidamente positivas. Após inúmeras tentativas com diferentes protocolos de extração de DNA *in house* (métodos por fervura, choque térmico, sílica/isotiocianato de guanidina, tampão de lise genômica e fenol-clorofórmio), bem como utilizando cinco métodos comerciais disponíveis (kits completos), nenhuma destas metodologias resultou em amplificação de fragmento por PCR.

Além disso, três amostras de tecido pulmonar (previamente conservadas em ultrafreezer -70°C), com prévio isolamento bacteriológico positivo, foram descongeladas e submetidas a novo pré-cultivo em meios de cultura nos caldos BHI, TB e LB, para enriquecimento e posterior extração do DNA bacteriano a partir do caldo com os diferentes métodos de extração (*kits* comerciais e as técnicas de fenol-clorofórmio, calor e choque térmico). Como resultado da PCR, houve amplificação somente em uma amostra a partir do pré-cultivo em caldo TB, com três

diferentes métodos de extração de DNA: calor, fenol-clorofórmio e um *kit* comercial. Nova tentativa de IBT também foi realizada e não houve crescimento.

Caracterização genotípica por RFLP em isolados clínicos

As análises por RFLP foram feitas a partir do produto de 1,9KB do gene *tbpA* amplificado por PCR das amostras padrão de *H. parasuis*. Utilizamos DNA dos 15 sorotipos e estes apresentaram os seguintes resultados: para a enzima *Ava* I, não foi possível identificar corretamente o sorotipo 11; para a enzima *Taq* I, não foi possível identificar corretamente os sorotipos 7 e 11; e para a enzima *Rsa* I todas as amostras apresentaram bandas fracas e difusas, dificultando a interpretação dos perfis conforme descrito em De La Puente Redondo et al. (2003). Os demais sorotipos clivados com as enzimas *Taq* I e *Ava* I apresentaram resultados compatíveis, porém a análise final comparativa das três clivagens dificultou a interpretação do grupo de sorotipo específico para cada amostra.

De La Puente Redondo et al. (2003) identificaram 12 perfis de clivagem entre os sorotipos padrão de *H. parasuis* por meio da combinação dos perfis de RFLP das três enzimas (na ordem *Taq* I, *Ava* I e *Rsa* I): AAA, BBB, CCC, BAD, DBE, BAF, ECG, BAH, BAI, BAA, EAF, BBJ, sendo cinco perfis com *Taq* I, três com *Ava* I e dez com *Rsa* I, possibilitando a diferenciação de 11 sorotipos de *H. parasuis*. Os sorotipos 5, 12, 14 e 15 apresentam o mesmo perfil, não sendo possível a diferenciação entre eles (Figura 3). Porém, no mesmo trabalho, foram identificados 33 perfis entre os isolados de casos clínicos, indicando que existe elevada diversidade genética mesmo entre os isolados do mesmo sorotipo.

Amostras dos sorotipos padrão	Enzimas de restrição			Grupo
	<i>TaqI</i>	<i>AvaI</i>	<i>RsaI</i>	
H. parasuis H409 (sorotipo 1)	A	A	A	I (AAA)
H. parasuis H410 (sorotipo 2)	B	B	B	II (BBB)
H. parasuis H411 (sorotipo 3)	C	C	C	III (CCC)
H. parasuis H412 (sorotipo 4)	B	A	D	IV (BAD)
H. parasuis H413 (sorotipo 5)	D	B	E	V (DBE)
H. parasuis H780 (sorotipo 6)	B	A	F	VI (BAF)
H. parasuis H643 (sorotipo 7)	E	C	G	VII (ECG)
H. parasuis H494 (sorotipo 8)	B	A	H	VIII (BAH)
H. parasuis H553 (sorotipo 9)	B	A	I	IX (BAI)
H. parasuis H555 (sorotipo 10)	B	A	A	X (BAA)
H. parasuis H465 (sorotipo 11)	E	A	F	XI (EAF)
H. parasuis H425 (sorotipo 12)	D	B	E	V (DBE)
H. parasuis H793 (sorotipo 13)	B	B	J	XII (BBJ)
H. parasuis H792 (sorotipo 14)	D	B	E	V (DBE)
H. parasuis H790 (sorotipo 15)	D	B	E	V (DBE)

Figura 3. Perfil de RFLP dos sorotipos padrão (De La Puente Redondo et al. (2003))

Cento e vinte e um (121) isolados de campo de *H. parasuis*, provenientes de suínos com sinais clínicos da DG de diversas regiões do Brasil e pertencentes à bacterioteca da Embrapa Suínos e Aves, foram submetidos à amplificação por PCR para o gene *tbpA*. Após confirmação da amplificação do fragmento de 1,9kb, foi realizada a técnica de RFLP, utilizando as enzimas de restrição *Taq I*, *Ava I* e *Rsa I*, a fim de confirmar e caracterizar o perfil genotípico e determinar o sorotipo desses isolados. Na Figura 4 apresentamos foto de uma clivagem de 15 isolados de campo com a enzima *Taq I*.

Desse total, seis isolados (4,95%) foram caracterizados quanto ao sorotipo e grupo pertencente pela técnica de RFLP de acordo com os perfis descrito por De La Puente Redondo et al. (2003). Os sorotipos identificados foram: um isolado sorotipo 2 e pertencente ao Grupo II

(perfil BBB); um isolado sorotipo 6 e pertencente ao Grupo VI (perfil BAF); um isolado sorotipo 8 e pertencente ao Grupo VIII (perfil BAH) e três isolados sorotipo 11 e pertencentes ao Grupo XI (perfil BBJ).

Nas amostras discutidas a seguir, onde consta asterisco (*) como resultado de clivagem, esse indica que não foi possível a identificação do perfil relacionado ao sorotipo para a enzima correspondente devido à geração de grande número de bandas de clivagem e da pouca intensidade das mesmas, dificultando a interpretação do resultado. Oito amostras apresentaram perfil sugestivo de pertencer ao sorotipo 1 e Grupo I (perfil AAA), sendo quatro com perfil AA* e quatro com perfil A*A. De acordo com a Figura 3, estas amostras só podem ser caracterizadas como pertencentes ao sorotipo 1.

Onze isolados apresentaram perfil sugestivo de pertencer ao sorotipo 2 (perfil BBB) ou 13 (BBJ) e Grupo II ou XII, respectivamente, isso porque apresentaram perfil BB*, não sendo possível a identificação do perfil para *Rsa I*, que é a enzima que diferencia estes sorotipos e Grupos.

Quatro isolados apresentaram perfil para o sorotipo 3 e Grupo III (perfil CCC), sendo três com perfil C*C e um CC*. Como não há outro perfil similar, é muito provável que estes isolados sejam, de fato, pertencentes ao sorotipo 3.

Vinte e oito isolados apresentaram perfil compatível com o Grupo V (perfil DBF), ao qual pertencem os sorotipos 5, 12, 14 e 15 e que não podem ser diferenciados por esta metodologia de RFLP. Nove destes isolados têm perfil D*E e outros 19 têm perfil DB*. Neste caso, mesmo que as clivagens com as enzimas *Ava I* e *Rsa I* tivessem produzido os perfis corretamente, não haveria possibilidade de diferenciar os sorotipos dentro do Grupo V.

Em muitos isolados, a clivagem realizada neste experimento gerou um perfil desconhecido e ainda não descrito, impossibilitando a caracterização de acordo com a metodologia proposta por De La Fuente Redondo

et al. (2003). Nestes casos, o resultado da enzima foi registrado com um ponto de interrogação (?), porém não registramos o tamanho desses fragmentos, o que deveria ter sido realizado no ato da leitura do resultado. De todos os isolados, 50 possuem este perfil não identificado entre os descritos (A, B, C, D e E) para a enzima *Taq* I. Além desses, apenas um isolado apresentou perfil não identificado para a enzima *Rsa* I e dois isolados para *Taq* I e *Ava* I.

Em apenas um isolado, foi identificado o perfil ?AI, que tem o sorotipo 9 (perfil BAI) como sendo o único similar a este. A enzima *Taq* I gerou um fragmento visível (perfil ?), mas não característico dos perfis descritos por De La Puente Redondo et al. (2003), sendo assim, é muito provável que este perfil seja correspondente a outro sorotipo ainda não identificado e que possua perfil de clivagem similar ao do sorotipo 9.

No total, 62 isolados (51,24%) não puderam ser caracterizados, nem mesmo como provável sorotipo ou Grupo. Estes apresentaram diferentes perfis, sendo seis com perfil conhecido para a enzima utilizada, mas a combinação dos resultados das três enzimas não relacionou aos perfis conhecidos, tendo sido três AAI e três CCJ. Dos outros 56 isolados, 28 tem perfil ?B*, 11 perfil ?A*, três perfil ?C*, dois perfil ?BD, dois perfil ??*, um perfil ?BC, um perfil ?BF e um perfil ?**.

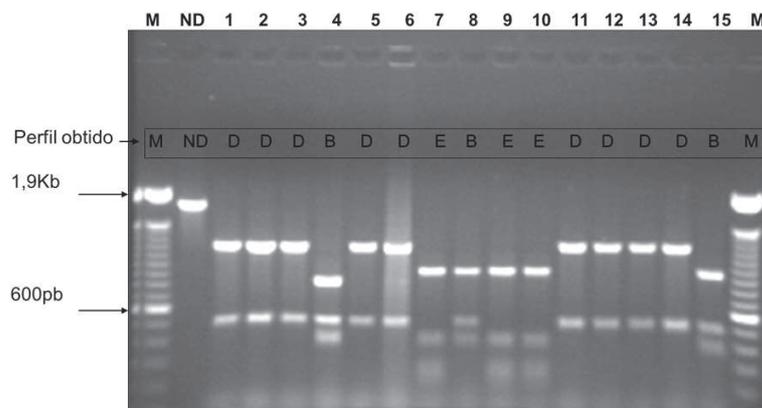


Figura 4. RFLP de 15 amostras de campo utilizando a enzima *Taq* I. Marcador 100 pb (M), amostra não digerida (ND)

Conclusões e perspectivas

Os resultados obtidos nestes experimentos apresentaram divergências em relação às metodologias descritas e publicadas por outros autores. Entretanto, podem ser úteis no sentido de repensarmos nas metodologias utilizadas e na diversidade genética encontrada na mesma espécie de microrganismo.

Este projeto teve um período de 36 meses de execução, porém as exigências de cultivo, as dificuldades encontradas na obtenção de material de animais com sinais clínicos e as divergências na otimização das metodologias, tendo como base publicações validadas, gerou enorme esforço e inúmeras repetições. Entretanto, ainda assim, não alcançamos resultados suficientemente explicáveis, necessitando de sequência nesta linha de trabalho e a elaboração de novos projetos de pesquisa.

Apresentaremos algumas considerações gerais a respeito desses resultados e as perspectivas para a continuidade dessa linha de pesquisa na Embrapa Suínos e Aves.

PCR de amostra clínica

Os resultados indicaram que, provavelmente, apenas uma das três amostras clínicas congeladas manteve a bactéria *H. parasuis* viável e que *H. parasuis* não resiste ao congelamento em tecido, o que dificultou a realização de outros ensaios e a repetição dos métodos utilizados que necessitavam de cultivo bacteriano. Sendo assim, ficou evidente a necessidade da realização de extração de DNA da amostra clínica previamente ao congelamento. Além disso, há necessidade de investigar outras possibilidades de pré-cultivo para aumentar a quantidade de células bacterianas na amostra a ser analisada, uma vez que a sensibilidade da PCR é baixa.

Caracterização genotípica por RFLP em isolados clínicos

A visualização das bandas de clivagem nem sempre é muito clara e a grande quantidade de perfis gerados pela enzima *Rsa* I é mais um complicador na identificação correta do perfil. Uma alternativa para melhorar a visualização das bandas é o uso de gel de poliacrilamida em substituição ao gel de agarose. Porém, por não haver tempo hábil e não ser objeto deste experimento, não foi testado nesta proposta de projeto. É importante salientar que a melhor visualização é resultante de alterações no sítio de clivagem da amostra, mas auxilia na correta visualização e identificação dos resultados dando suporte à divergência do perfil em relação padrão proposto por De La Fuente Redondo et al. (2003).

Os resultados divergentes podem indicar não apenas a presença de novos sorotipos, mas de outros perfis para os sorotipos já existentes, pertencentes a isolados com mutações genotípicas que resultaram em outros sítios de clivagens pela mesma enzima, mas não presentes nas amostras analisadas por De La Fuente Redondo et al (2003). Sob este aspecto, nossos achados não inviabilizaram o resultado científico deste trabalho, e indicam que as técnicas utilizadas até o momento não possibilitaram a correta caracterização sorológica e nem molecular dos isolados.

A caracterização genotípica somente foi possível por meio da clivagem de produtos amplificados a partir de isolados bacterianos, uma vez que a partir de amostras clínicas não houve amplificação pela PCR, assim, impossibilitando a clivagem. Porém, todos os isolados, discordantes ou que não resultaram em caracterização conforme a técnica proposta, precisam de novos testes para as três enzimas já utilizadas, como ensaio de repetição, bem como há necessidade de estudo para utilização de outras enzimas que auxiliem e possibilitem a caracterização dos mesmos.

Outras metodologias moleculares também têm sido utilizadas como ferramentas para caracterização de isolados de *H. parasuis*, mesmo não relacionando a identificação do sorotipo. Assim, esses estudos demonstram a importância da caracterização genotípica em isolados de *H. parasuis* obtidos de amostras clínicas para obtenção de dados e posteriores estudos epidemiológicos para o controle da DG no Brasil a fim de determinar a prevalência de sorotipos e/ou de perfil molecular das cepas circulantes.

As técnicas/metodologias utilizadas não funcionaram conforme o esperado e descrito nos artigos científicos, levando à necessidade de fazer vários ajustes e repetições, na tentativa de aperfeiçoar adequadamente a metodologia descrita e já publicada anteriormente. No entanto, os resultados não foram conclusivos, inviabilizando a implantação dessas metodologias até o momento, sendo possível a implantação apenas da técnica de PCR para isolados bacterianos. Parcialmente, a técnica de RFLP a partir de isolados precisa ser melhorada, necessitando de ajustes a serem feitos em projetos futuros, em parcerias já existentes ou em vias de elaboração com outras instituições. Nos projetos futuros, há intenção de realização de *Pulsed Field* (PFGE) e de ERIC-PCR para melhor caracterização destes isolados de casos clínicos.

Principais publicações

KLEIN, C. S.; REBELATTO, R.; LOCATELLI, C.; BELLAVER, F. A. V. Uso de fingerprint por RFLP para caracterização de grupo de sorotipo em isolados de *Haemophilus parasuis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009. Porto de Galinhas. **Anais...** São Paulo: SBM, 2009.

KLEIN, C. S.; BELLAVER, F. A. V.; LOCATELLI, C. Otimização de teste de PCR para caracterização de *Haemophilus parasuis* em isolados bacterianos NAD –dependentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009. Porto de Galinhas. **Anais...** São Paulo: SBM, 2009.

Referências

DE LA PUENTE REDONDO, V. A.; NAVAS MÉNDEZ, J.; GARCÍA DEL BLANCO, N.; LADRÓN BORONAT, N.; GUTIÉRREZ MARTÍN, C. B.; RODRÍGUEZ FERRI, E. F. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 253-262, 2003.

FLECK, R.; SNELSON, H. Doenças Respiratórias – Uma atualização nas medidas de controle do *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. p. 55-58.

KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v. 166, p. 252-256, 2003.

KIELSTEIN, P.; RAPP-GABRIELSON, V. J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 862-865, 1992.

MORÉS, N. Impacto econômico da circovirose na produção de suínos. In: AVESUI 2005, Florianópolis. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. p. 9-13.

OLIVEIRA, S.; GALINA, L.; PIJOAN, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 495-501, 2001.

SOBESTIANSKY, J. (Ed.). **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3 Impressos do Especiais, 1999, 464 p.