



Simpósio de Integração Acadêmica

“Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável”

SIA UFV 2023



Determinação da curva de crescimento dos isolados UFV01 e UFV02 de *Mycoplasma hyopneumoniae* por densidade óptica em espectrofotômetro, pH e qPCR

Julia Cristine Dias Louzada (julia.louzada@ufv.br); Fernanda S. Marks (fernanda.marks@ufv.br); Leonardo T. Toledo (Leonardo.teofilo@ufv.br); Caio A. Diamantino (caio.diamantino@ufv.br); Luiz F. L. de Souza (luizlino.pigpork@gmail.com); Fábio A. F. Rodrigues (fabio.feresbioufv@gmail.com)

Palavras-chaves: Pneumonia, quantificação, curva padrão

Introdução

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) é o agente primário da pneumonia enzoótica suína. O microrganismo é encontrado principalmente na superfície da mucosa da traqueia, brônquios e bronquíolos de suínos, porém seu cultivo e isolamento se caracteriza por ser fastidioso e de crescimento lento (Calus et.al, 2010). A quantificação rápida e precisa e o entendimento da curva de crescimento bacteriano *in vitro* é de extrema importância para as práticas laboratoriais de pesquisa e industrial. As técnicas clássicas de quantificação, como a contagem padrão em placa e mensuração de turbidez não são empregadas para Mhyo devido as suas características de crescimento.

Objetivos

O objetivo é avaliar a curva de crescimento dos isolados UFV01 e UFV02 e a correlação de três técnicas: leitura por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, mensuração do pH, e qPCR.

Material e Método

Os isolados foram reativados em meio Friis 1x contendo vermelho de fenol em três passagens seguidas. Após a terceira passagem, os isolados foram diluídos em uma proporção de 1:20 (inóculo x meio Friis) em tubos tipo falcon no volume de 50 ml. Diariamente, durante 10 dias, foi retirado uma alíquota de 4 ml para mensuração do seguido de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 λ. Para a qPCR, o DNA foi extraído de uma alíquota de 500µl das amostras utilizando Fenol-Chloroformio e eluído em 50µl de água DNase free. O DNA foi submetido a reação de qPCR, utilizando os primers sense 5'-TAAGGGTCAAAGTCAAAGTC3' anti-sense 5'-AAATTTAAAAGCTGTTCAAATGC-3' e sonda 5'-FAM-AACCAGTTTCCACTTCATCGCC-3'-BHQ2-3'. A curva padrão foi construída a partir de uma clonagem com célula competente TOP10, sendo diluída de forma seriada de 10⁹ até 10¹. A eficiência da reação de qPCR foi de 100 %; R² de 0,994; e slope de -3,323. Para a reação foi utilizado 10µL de Master mix Go taq®; 1µL de cada par de primer; 0,6µL da sonda; 2,7µL de água e 2µL de DNA da amostra, totalizando 20µL. A reação se deu com desnaturação por 3 min a 95°C, 39 ciclos a 95°C for 15s e um ciclo de anelamento/extensão 55,7°C for 1 min. Os dados foram compilados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos erros; e o teste de Levene, para verificação da homogeneidade de variâncias e posteriormente submetidos ao teste de correlação de Spearman.

Resultados e Discussão

O pH do isolado UFV01 variou de 7,95 a 6,52, o número de cópias de DNA/µl foi de 9,13E+01 até 7,00E+07 e a DO foi de 1,805 para 0,415. Já para isolado UFV02, o pH foi de 7,94 para 6,57; o número de cópias de DNA/µl foi de 3,09E+03 para 3,09E+03 e a DO variou de 1,802 a 0,468. Os valores de correlação entre as variáveis pH x qPCR foi de -0,939 e -0,961; pH x DO foi de 0,973 e 0,982 e qPCR x DO foi de -0,925 e -0,967, respectivamente para UFV01 e UFV02, como descritos na tabela 1 e 2.

Matriz de Correlações

		pH	qPCR	OD
pH	Rho de Spearman	—	—	—
	gl	—	—	—
	p-value	—	—	—
qPCR	Rho de Spearman	-0.939	—	—
	gl	20	—	—
	p-value	< .001	—	—
OD	Rho de Spearman	0.973	-0.925	—
	gl	20	20	—
	p-value	< .001	< .001	—

Tabela 1 - Dados referentes a variação de pH, número de cópias de DNA e densidade óptica da cepa UFV01

Matriz de Correlações

		qPCR	OD	pH
qPCR	Rho de Spearman	—	—	—
	gl	—	—	—
	p-value	—	—	—
OD	Rho de Spearman	-0.967	—	—
	gl	18	—	—
	p-value	< .001	—	—
pH	Rho de Spearman	-0.961	0.982	—
	gl	18	18	—
	p-value	< .001	< .001	—

Tabela 2 - Dados referentes a variação de pH, número de cópias de DNA e densidade óptica da cepa UFV02

Conclusões

Pode-se concluir que os isolados apresentam curva de crescimento semelhantes e de que as variáveis testadas apresentam alta correlação entre si.

Bibliografia

- Calus, D., Maes, D., Vranckx, K., Villareal, I., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2010). Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *Journal of Microbiological Methods*, 83(3), 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.09.001>

Apoio financeiro e Agradecimento



Pós-Graduação
Medicina Veterinária