

DUPLEX-PCR COMBINADO COM ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR ECONÔMICA DE MEMBROS DO COMPLEXO RICKETTSIA PARKERI

IX Reunião Anual de Iniciação Científica da UFRRJ (RAIC 2021/2022) e III Reunião Anual de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (RAIDTec 2021/2022) - UFRRJ, 0ª edição, de 15/05/2023 a 19/05/2023
ISBN dos Anais: 978-65-5465-041-0

SILVA; Ariel Souza da¹, MCINTOSH; Douglas², FURTADO; Tassia Torres³

RESUMO

RESUMO Riquetsias são agentes causadores de doenças em animais e humanos. A doença febril associada à espécie *R. parkeri*, relatada nos últimos quinze anos, recebeu atenção limitada em virtude de alguns fatores, sendo um deles a dificuldade de distinção das múltiplas variedades genéticas das cepas pertencentes à espécie. Tais variedades foram identificadas no Brasil e em outros países da América Latina. Os altos custos do sequenciamento de DNA inviabilizam as avaliações do grande número de amostras que estudos abrangentes requerem. A técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE) promove uma identificação eficaz de polimorfismos de nucleotídeo em amplicons gerados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e é menos onerosa que técnicas baseadas em sequenciamento, o que a torna uma técnica alternativa possível. Assim, o presente trabalho, associado ao projeto PVV1766-2020 (Sisgen 1091), teve como objetivo desenvolver e validar um protocolo capaz de solucionar a questão da identificação de membros de cepas da espécie *R. parkeri*, permitindo a continuidade de estudos relacionados. Os objetivos específicos envolveram a identificação de regiões de polimorfismo em sequências ompA e ompB representantes de cada membro; a produção de “primers” para amplificação das regiões identificadas; o desenvolvimento de ensaios de PCR simplex e duplex; e a avaliação da capacidade do DGGE para identificação diferencial. Devido às limitações impostas pela pandemia de COVID-19, o estudo foi realizado virtualmente. As sequências que codificam ompA e ompB foram retiradas do banco de dados “GenBank” e avaliadas usando o programa Sequencer(V.5.4.6). Foram identificados polimorfismos e regiões conservadas para o desenho de primers, que foi executado com o software Primer3(V.4.0). Foram realizadas simulações das etapas envolvidas na otimização das reações de PCR de forma remota. Uma abordagem semelhante foi adotada em reuniões que examinaram a parte teórica da técnica de DGGE. A análise bioinformática permitiu levantamento satisfatório de sequências para ompA e ompB. Os “primers” selecionados produzem amplicons em condições apropriadas para ensaios duplex. Embora a realização da parte experimental não tenha sido possível, a capacidade discriminatória do DGGE, para análises com a aqui proposta, foi previamente demonstrada em diversos estudos. Assim, prevê-se que o estudo continuado fornecerá uma plataforma sólida para análise em larga escala de cepas de *R. parkeri* e espécies relacionadas, gerando informações essenciais em relação à bioecologia desses microrganismos, bem como para políticas de gerenciamento de doenças. Diante das restrições de acesso ao laboratório, os objetivos foram cumpridos parcialmente. Porém, as etapas preliminares foram satisfatórias e, com o retorno à normalidade, está sendo possível a realização da parte experimental. O uso de reuniões virtuais permitiu discussões estruturadas acerca da teoria por trás dos métodos práticos, além de promover boa compreensão de ferramentas de bioinformática. Assim, o trabalho pôde fornecer subsídios para auxiliar a continuidade de estudos associados ao diagnóstico molecular de patógenos.

PALAVRAS-CHAVE: rickettsioses, identificação diferencial, técnicas moleculares

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ariel@ufrrj.br
² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pus972@yahoo.co.uk
³ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tassiafurtado@yahoo.com.br

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ariel@ufrj.br
² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pus972@yahoo.co.uk
³ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tassiafurtado@yahoo.com.br