



Diagnóstico Laboratorial da Peeira (*Dichelobacter nodosus*)

Catarina Albuquerque

Mestranda em Biologia Molecular e Genética
Faculdade de Ciências da Universidade de
Lisboa (FCUL/UL) 2018/2019
Instituto Nacional de Investigação Agrária e
Veterinária (INIAV)



Etiologia da Peeira

Dichelobacter nodosus

agente causador



Peeira



- Gravidade da doença está dependente da virulência das estirpes de *D. nodosus*.

Dermatite
contagiosa



Peeira

Etiologia da Peeira

*Fusobacterium
necrophorum*

Bactéria oportunista

Envolvida
na Peeira

Patologia
Polimicrobiana

Hipóteses de
modo de ação

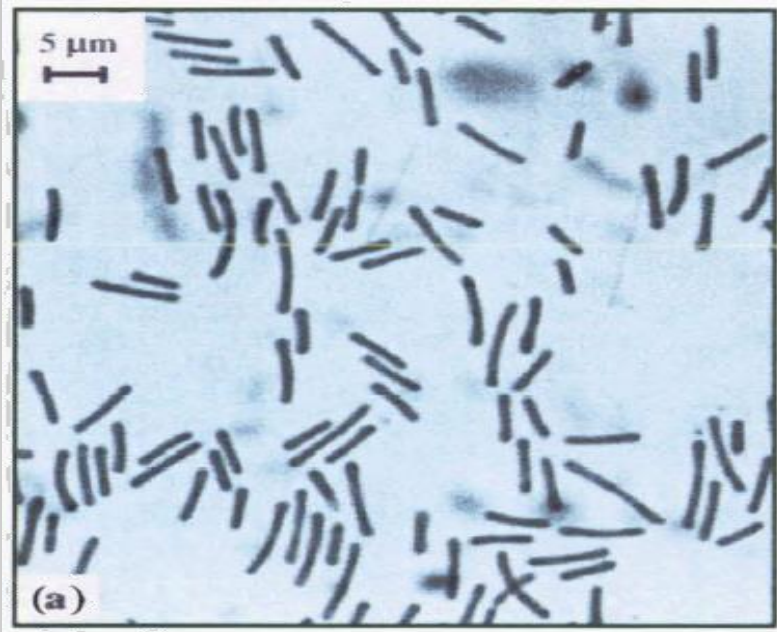
Patogénico secundário

ou

Iniciador da doença



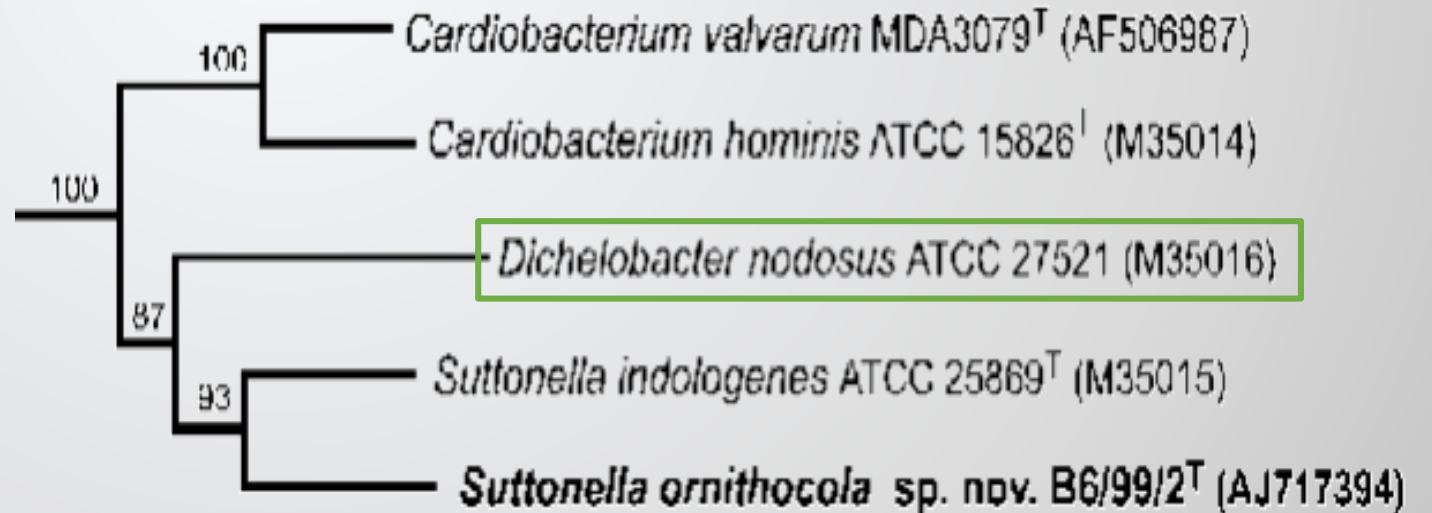
Dichelobacter nodosus



Única espécie pertencente ao género *Dichelobacter* e parte da família *Cardiobacteriaceae*

- **Bactéria gram-negativa anaeróbica**

- Genoma pequeno (1.3 Mb)
- Coloniza a epiderme interdigital de ovinos
- Forma de bastonete com 3 a 6 μm de comprimento
- 1 a 1,7 μm de diâmetro
- Fímbrias nas extremidades



Dichelobacter nodosus: virulência

Estirpes de
D. nodosus

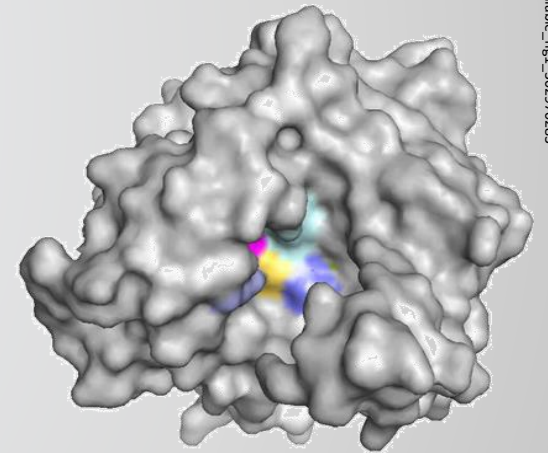
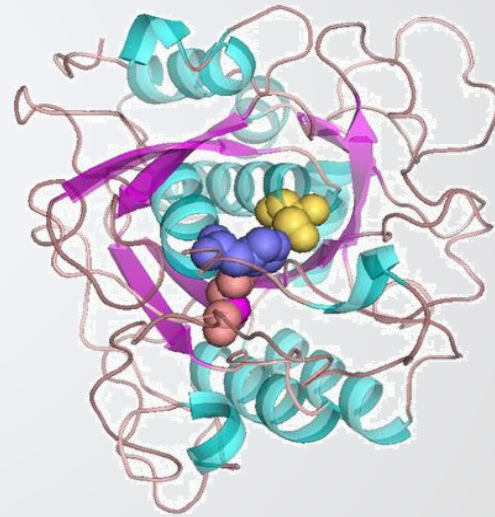


Benignas: versão mais moderada da doença

Virulentas: versão mais agressiva da doença

Principais fatores
de virulência

- Fímbrias do tipo IV
- Protéases extracelulares



- As ilhas genómicas **vap** e **vrl** estão preferencialmente associadas com isolados virulentos.

Dichelobacter nodosus: protéases extracelulares

AprV5/B5: Protéase acídica isoenzima 5

AprV2/B2: Protéase acídica isoenzima 2

BprV/B: Protéase básica

**Protéases serina
extracelulares**

Importante fator de virulência

**Protéase
acídica 2**

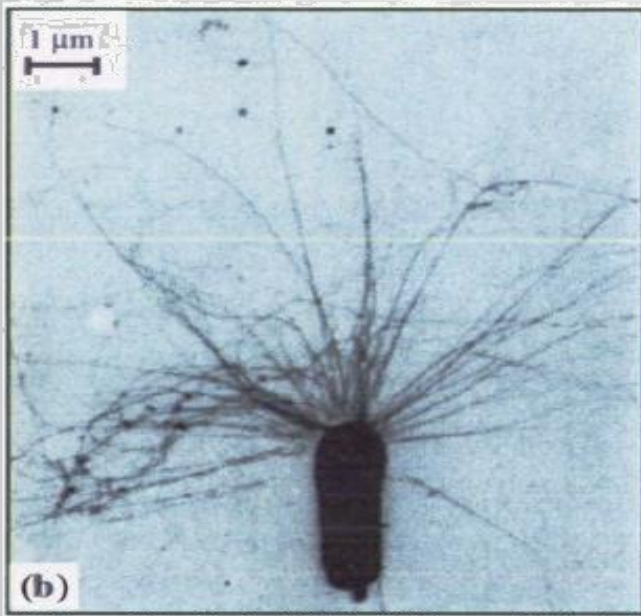
Gene *aprV2* – protéase
termoestável (AprV2)

Gene *aprB2* – protéase
termolábil (AprB2)

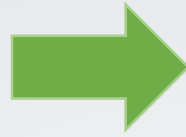
Estirpes Virulentas

Estirpes Benignas

Dichelobacter nodosus: fímbrias

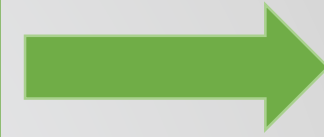


Fímbrias do tipo IV



Estruturas proteicas compostas por uma única proteína FimA

Codificada pelo

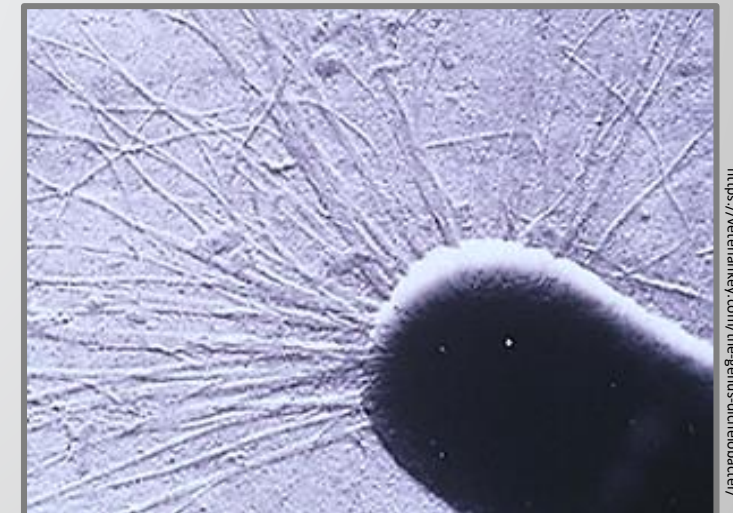


Gene *fimA*

- Região amino-terminal altamente conservada
- Localização polar na superfície da célula
- Resíduo N-metilfenilalanina no N-terminal

Necessárias para:

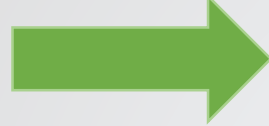
- Motilidade “twitching”
- Aderência a células epiteliais do hospedeiro
- Secreção de protéases extracelulares
- Transformação natural



Dichelobacter nodosus: serogrupos

10 Serogrupos de *D. Nodosus* (A-I e M)

Baseados na



Diversidade estrutural das fímbrias



Classe I: A, B, C, E, F, G, I e M

Classe II: D e H

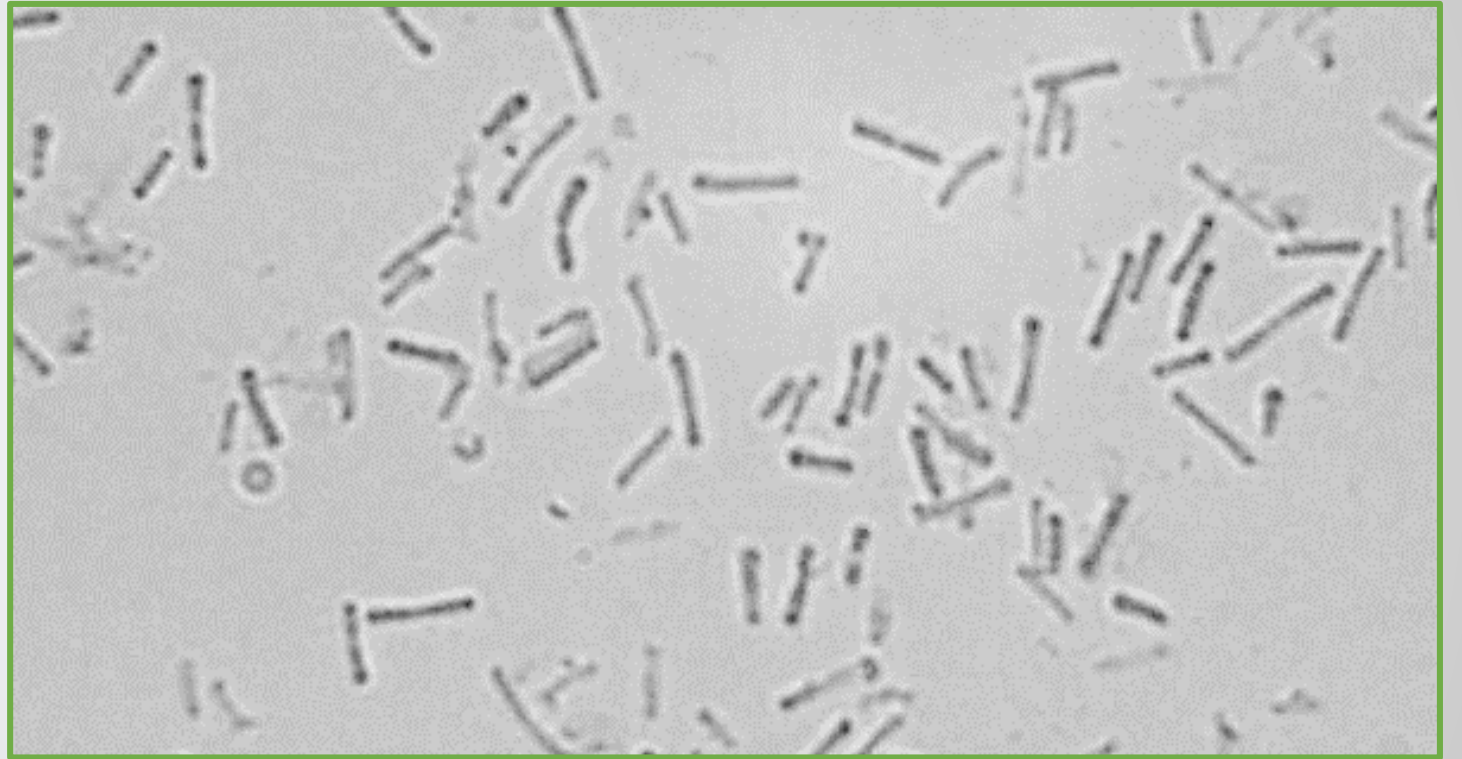
Class I



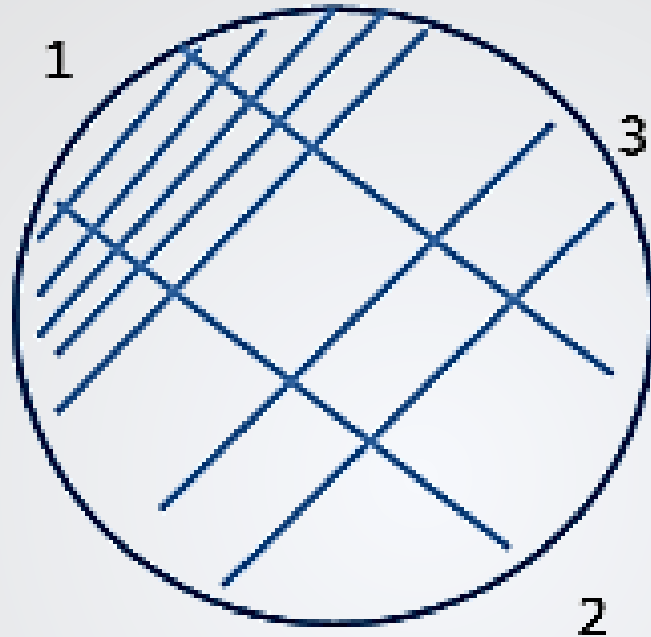
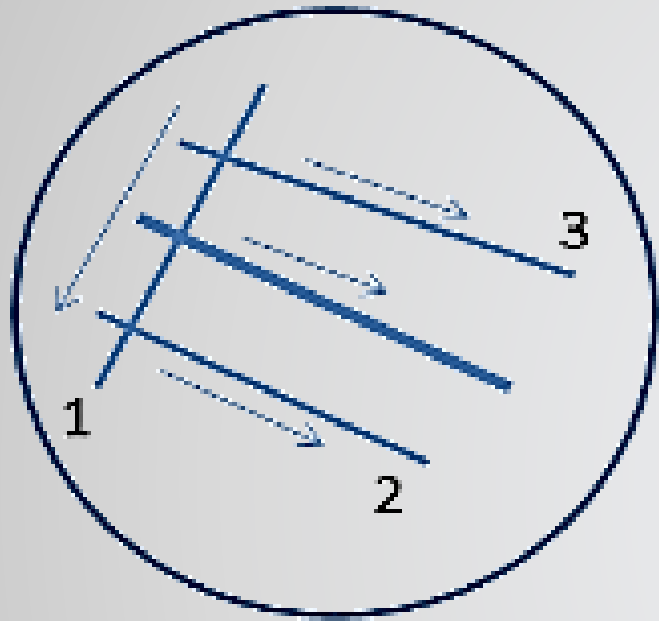
Class II



Pesquisa de
D. nodosus



Método cultural



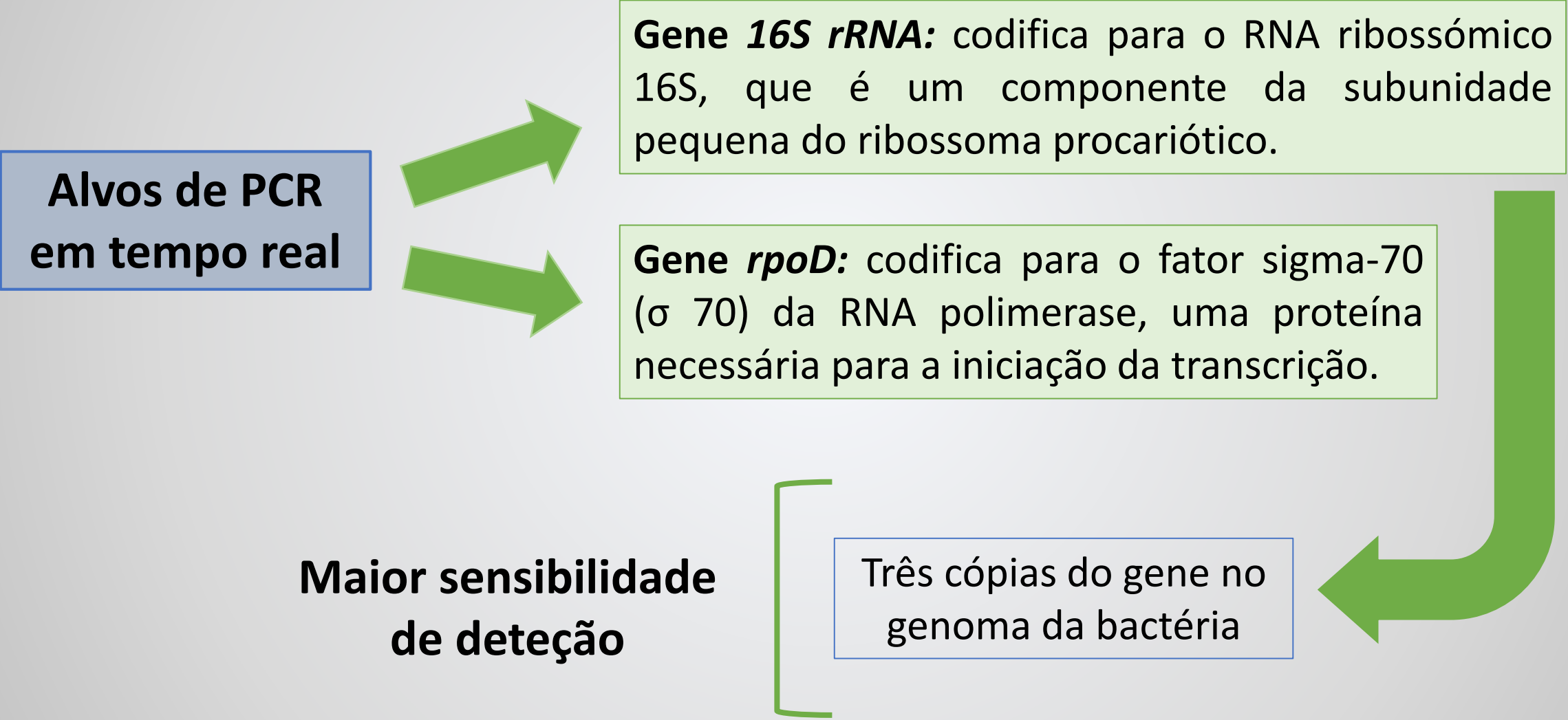
Condições para crescimento

- Condições anaeróbicas
- Incubação a 37°C
- 3-4 dias de incubação



Método molecular: PCR em tempo real

Alvos de PCR
em tempo real



Gene 16S rRNA: codifica para o RNA ribossômico 16S, que é um componente da subunidade pequena do ribossoma procariótico.

Gene *rpoD*: codifica para o fator sigma-70 (σ 70) da RNA polimerase, uma proteína necessária para a iniciação da transcrição.

**Maior sensibilidade
de detecção**

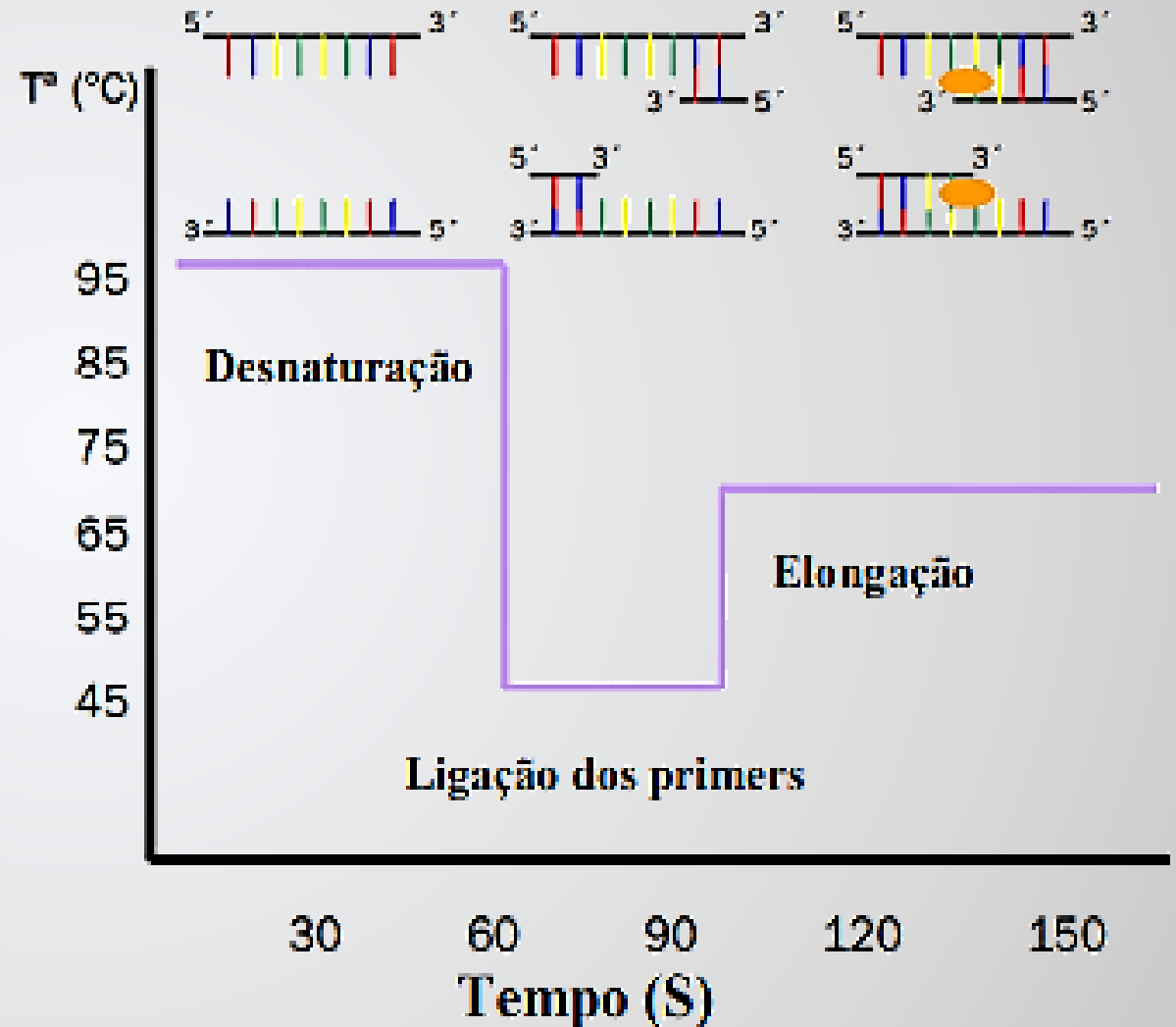
Três cópias do gene no
genoma da bactéria

Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

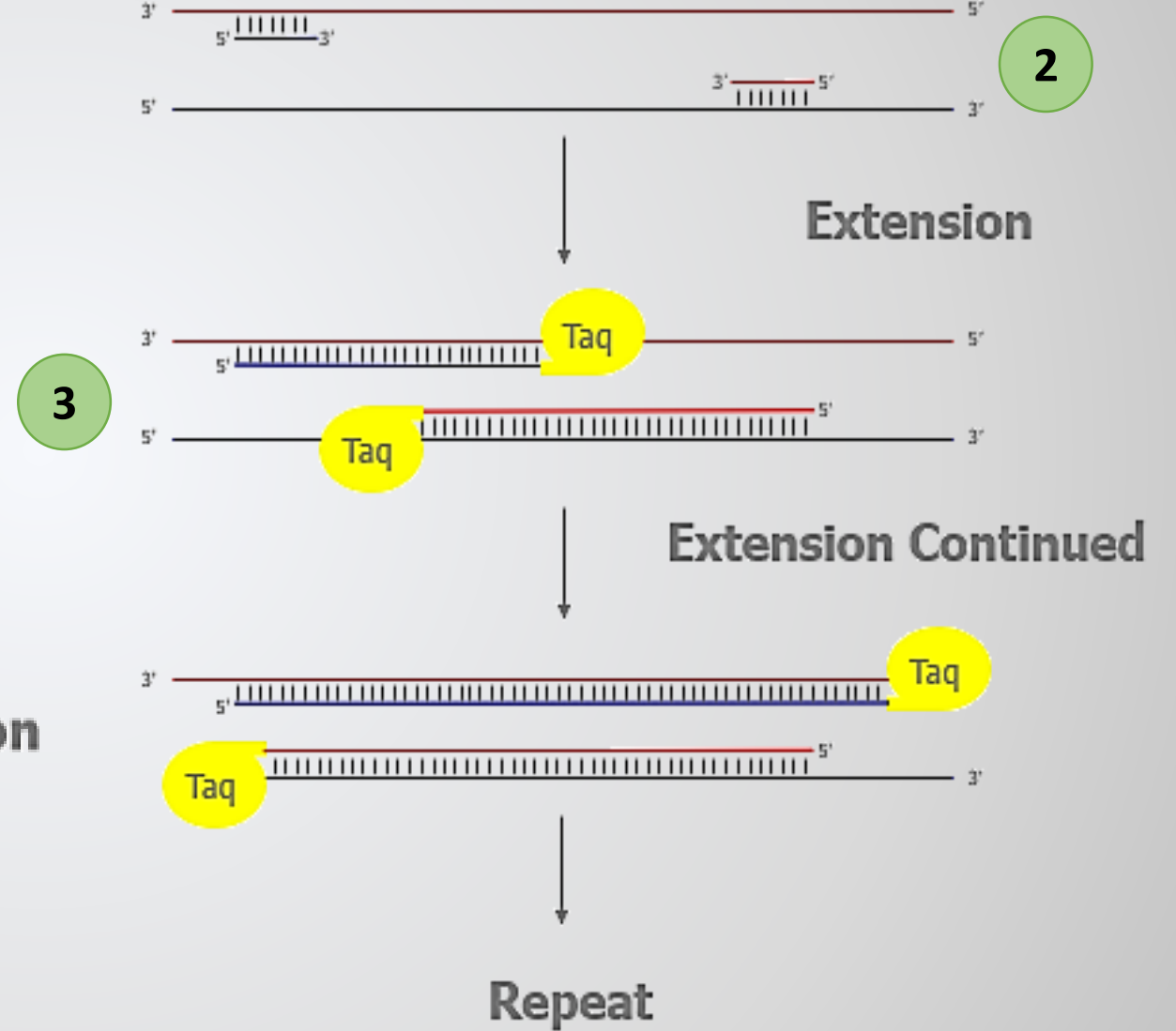
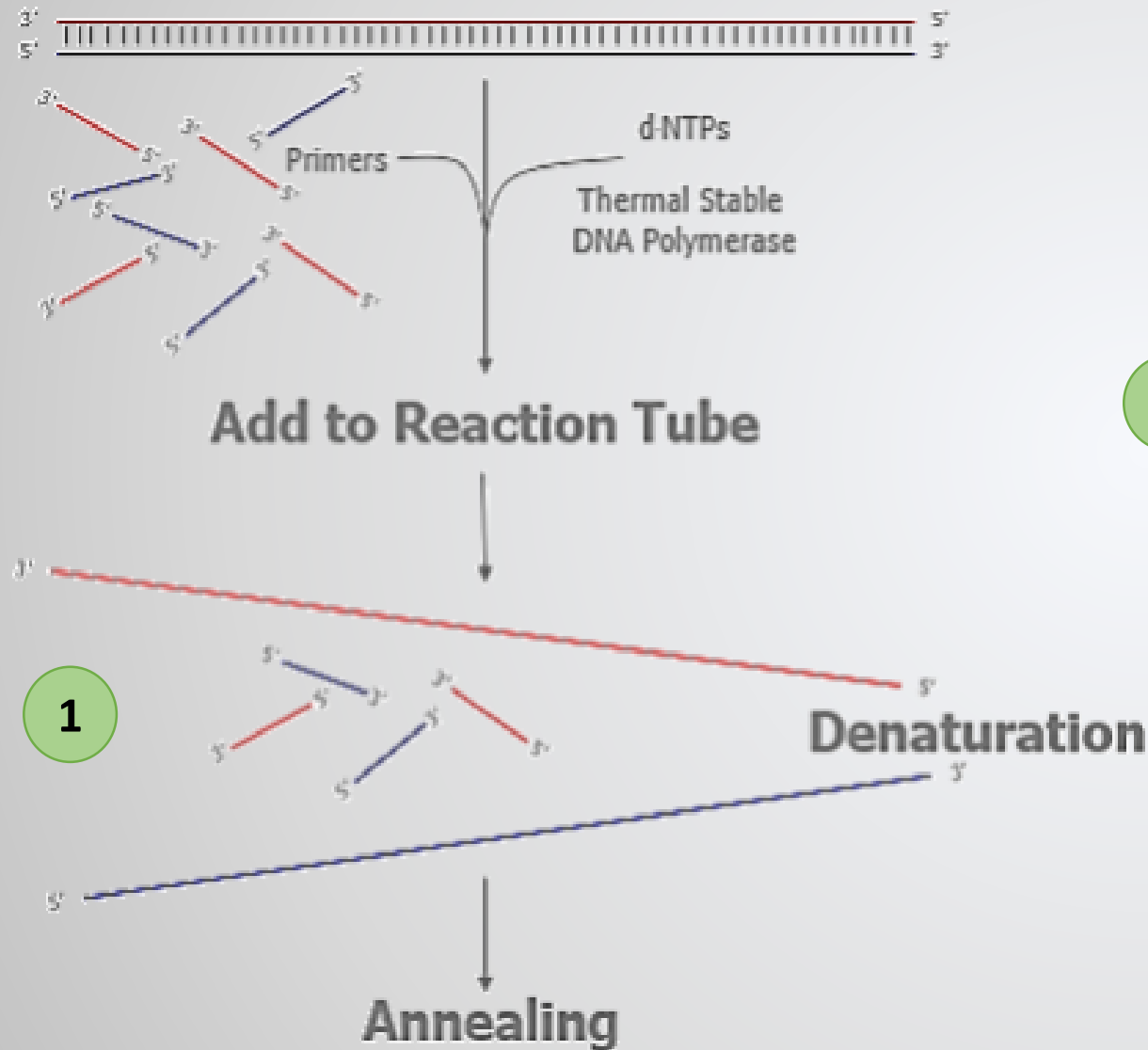
Amplificação de uma região específica de DNA de interesse

Necessário:

- DNA molde
- Primers específicos
- Deoxinucleótidos trifosfato ou dNTPs (dATPs, dTTPs, dCTPs e dGTPs)
- *Taq* Polimerase (DNA Polimerase termoestável)
- Iões de magnésio



Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



PCR em Tempo Real

Amostra de DNA



PCR em Tempo Real

Métodos de fluorescência



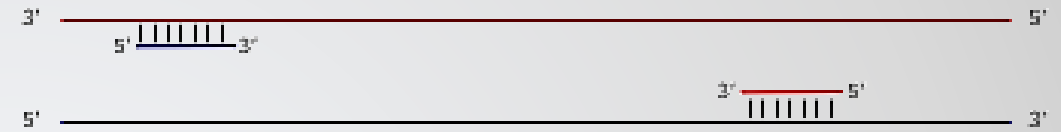
Corantes intercalantes
(ex. SYBR Green)

Sondas de
sequência específica

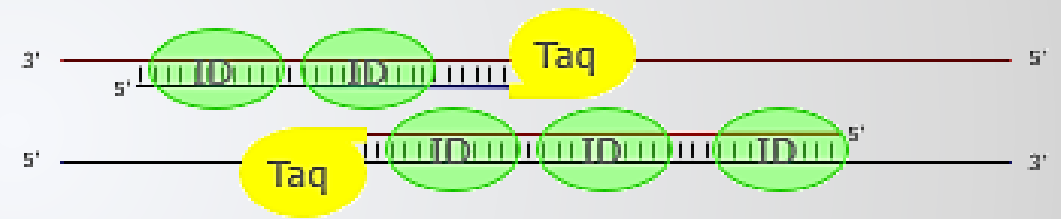


Intercalam-se em
qualquer cadeia
dupla de DNA
(não-específico)

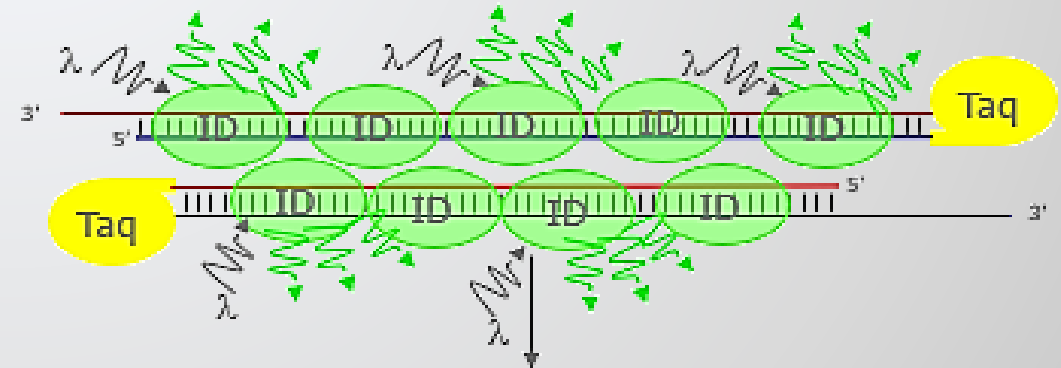
Corantes intercalantes (ex. SYBR Green)



Extension

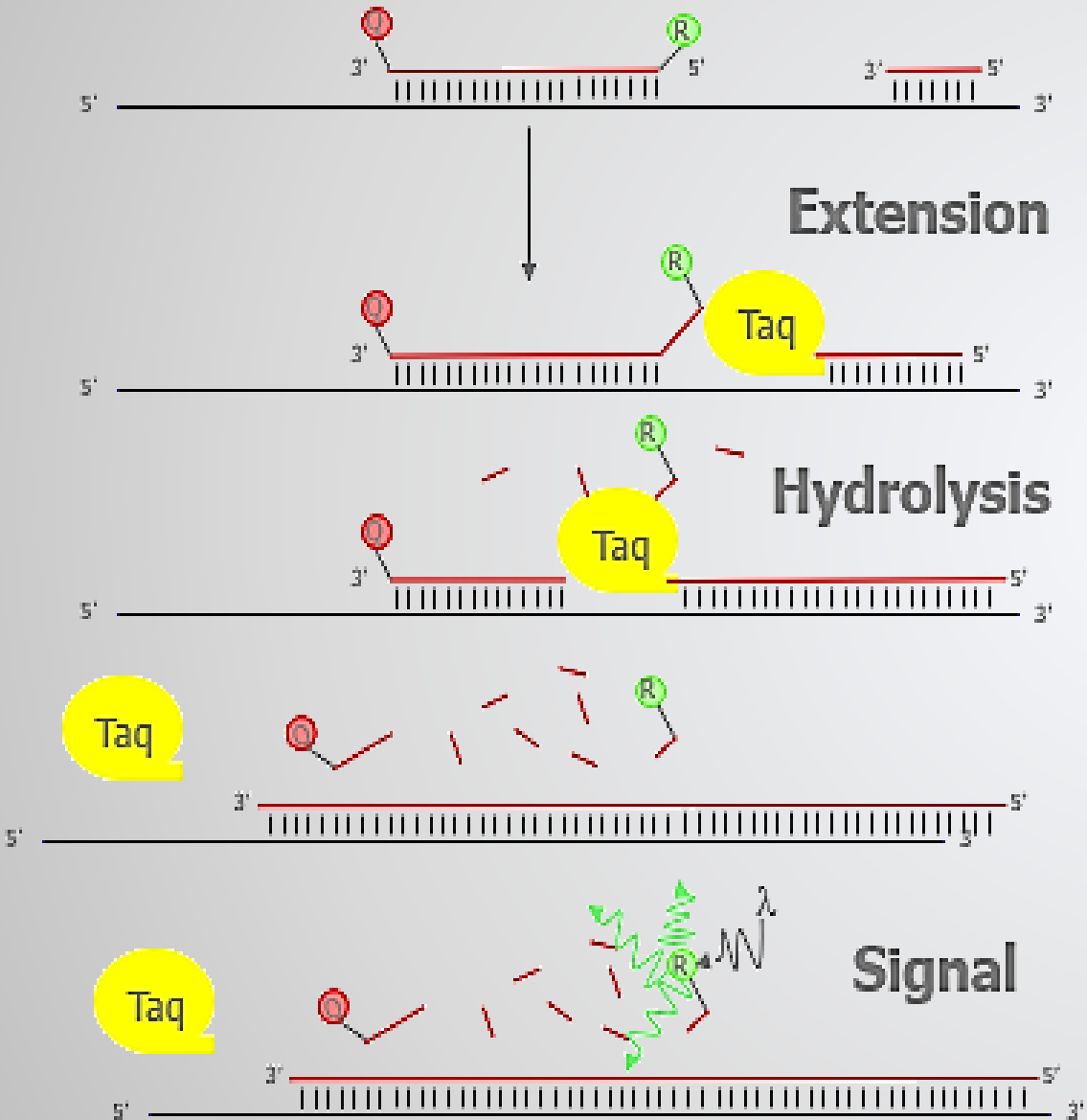


Apply Excitation
Wavelength



Repeat

PCR em Tempo Real



Sondas específicas fluorescentes

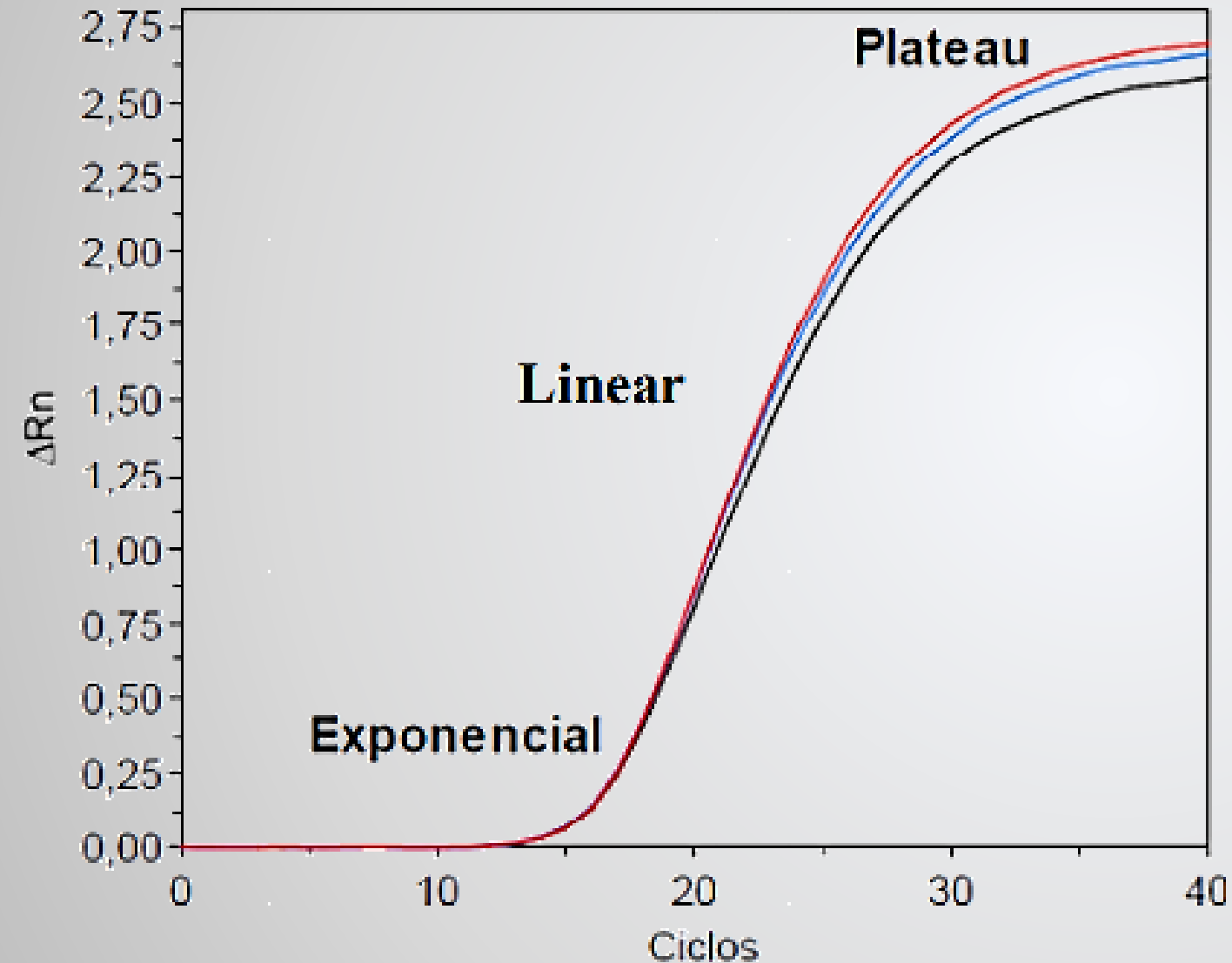


- Molécula “Reporter”: emite energia
- Molécula “Quencher”: absorve energia

Proximidade quebrada pela Taq Polimerase

Emissão de fluorescência

PCR em Tempo Real



Fase Exponencial



Eficiência é 100%.
Reação é extremamente específica e precisa.

- A partir da Fase Linear a eficiência de reação é variável entre amostras.

PCR em tempo real

“Threshold”



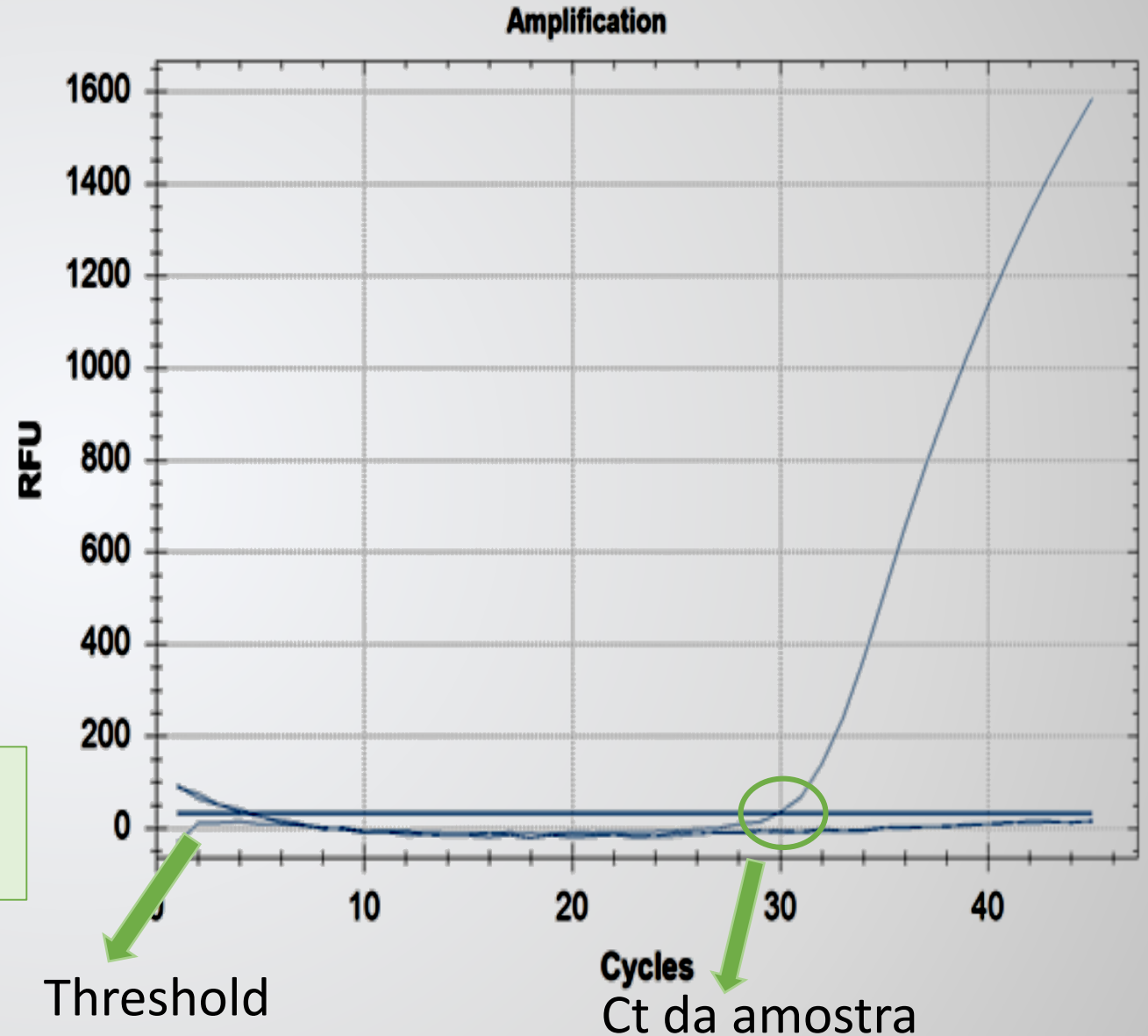
Valor de sinal de fluorescência que reflete um aumento de produto significativo

Valor “Ct”



Número de ciclos necessário para o sinal de fluorescência ultrapassar o “threshold”

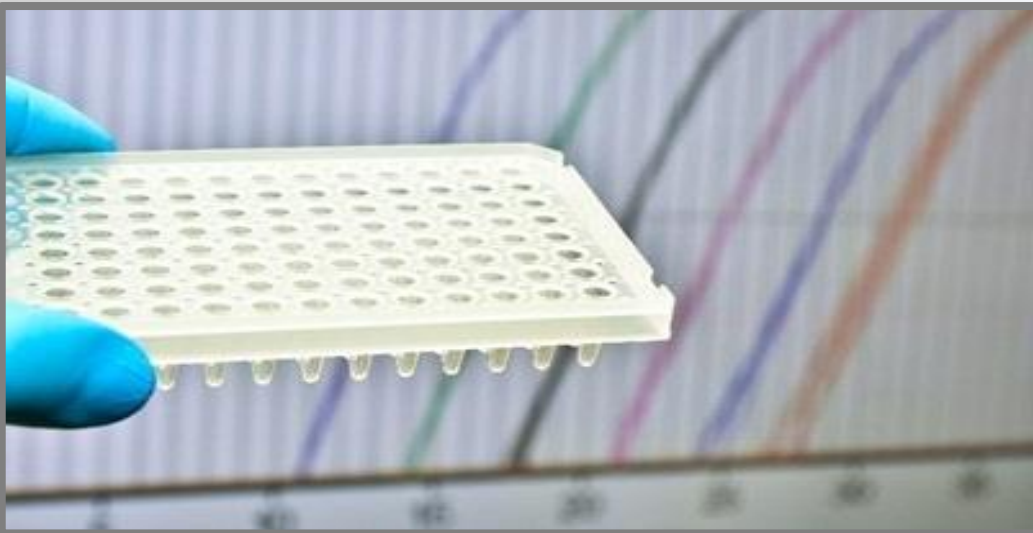
Amostras com a mesma quantidade de DNA inicial apresentam o mesmo valor Ct.



Vantagens e aplicações de PCR em Tempo Real

Vantagens de PCR em tempo real

- Recolha de dados na fase exponencial
- Aumento do sinal de fluorescência é proporcional ao número de fragmentos gerados
- Não é necessário processamento pós-PCR
- Maior sensibilidade



Aplicações de PCR em tempo real

- Quantificação de expressão de genes
- Genotipagem
- Detecção de agentes patogénicos
- Quantificação de vírus
- Entre outros

Determinação de virulência



Atividade elastase e termostabilidade

Estirpes Benignas



Protéase acídicas termolábeis AprB2
codificadas pelo gene *aprB2*

Estirpes Virulentas



Protéase acídicas termoestáveis AprV2
codificadas pelo gene *aprV2*

Diferença de um
aminoácido na
proteína madura

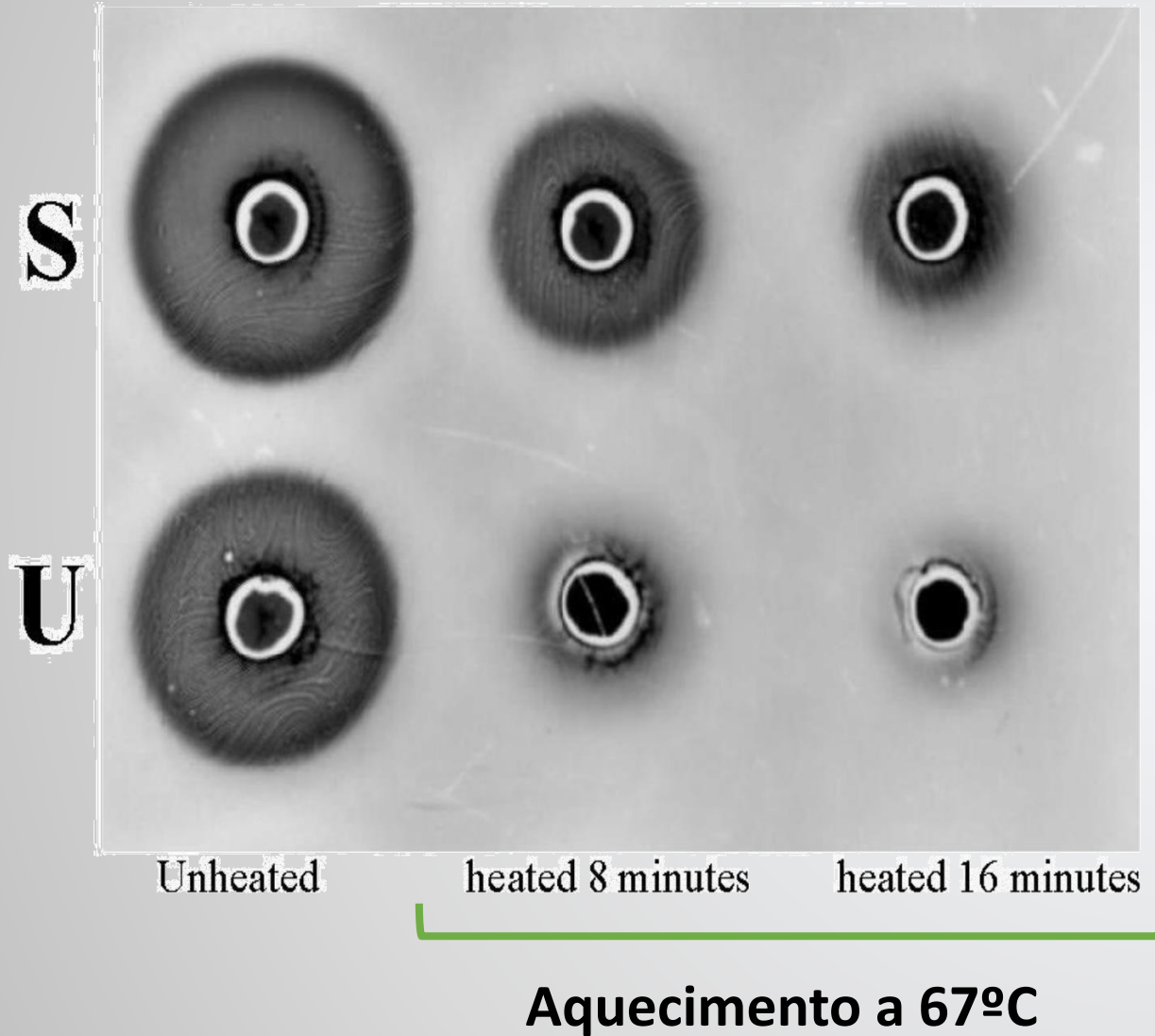
**Essencial para a
formação de lesões
no casco**



Alteração na sequência de
aminoácidos vai definir a
atividade elastase



Teste do “Gel de Gelatina”



Medição da produção e termoestabilidade das protéases



Baseada no conhecimento de

Maior termoestabilidade em protéases de estirpes virulentas

- **Estirpes virulentas:** mantém atividade proteolítica após 16 minutos a 67°C
- **Estirpes benignas:** não mantém atividade proteolítica

Teste da Elastase

Medição temporal e quantitativa da atividade das protéases



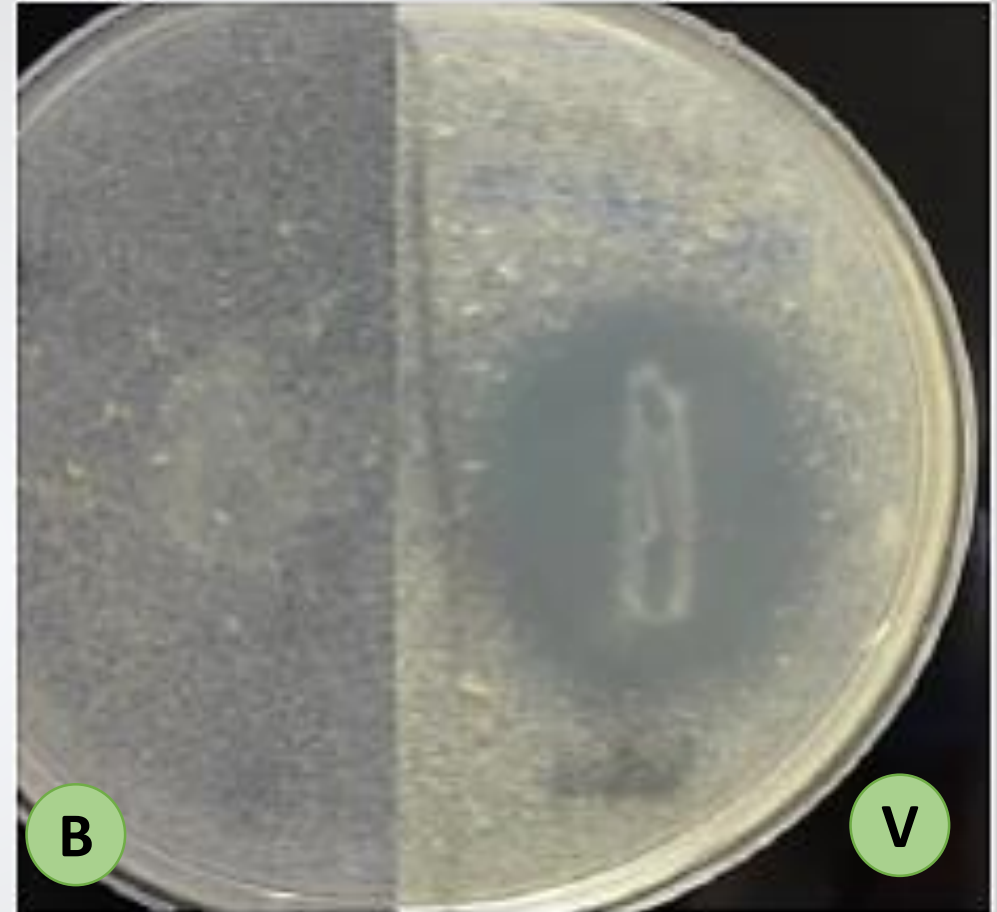
Baseada na

Atividade elastase das protéases



Dependente de

Diferença de um aminoácido nas protéases AprV2 e AprB2

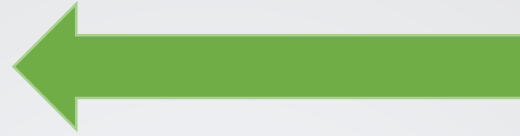


- **Estirpes virulentas:** há digestão das partículas de elastina (“zona de clearance”)
- **Estirpes benignas:** não há digestão da elastina

PCR em tempo real

Deteção e discriminação alélica de *aprV2* e *aprB2*

PCR em tempo real competitivo

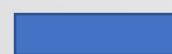


- 1 par de primers com homologia para *aprV2* e *aprB2*
 - 2 sondas específicas
- Sonda FAM:** específica para *aprV2* (estirpes virulentas)
Sonda VIC: específica para *aprB2* (estirpes benignas)

Controlos



Estirpe Virulenta
Estirpe Benigna



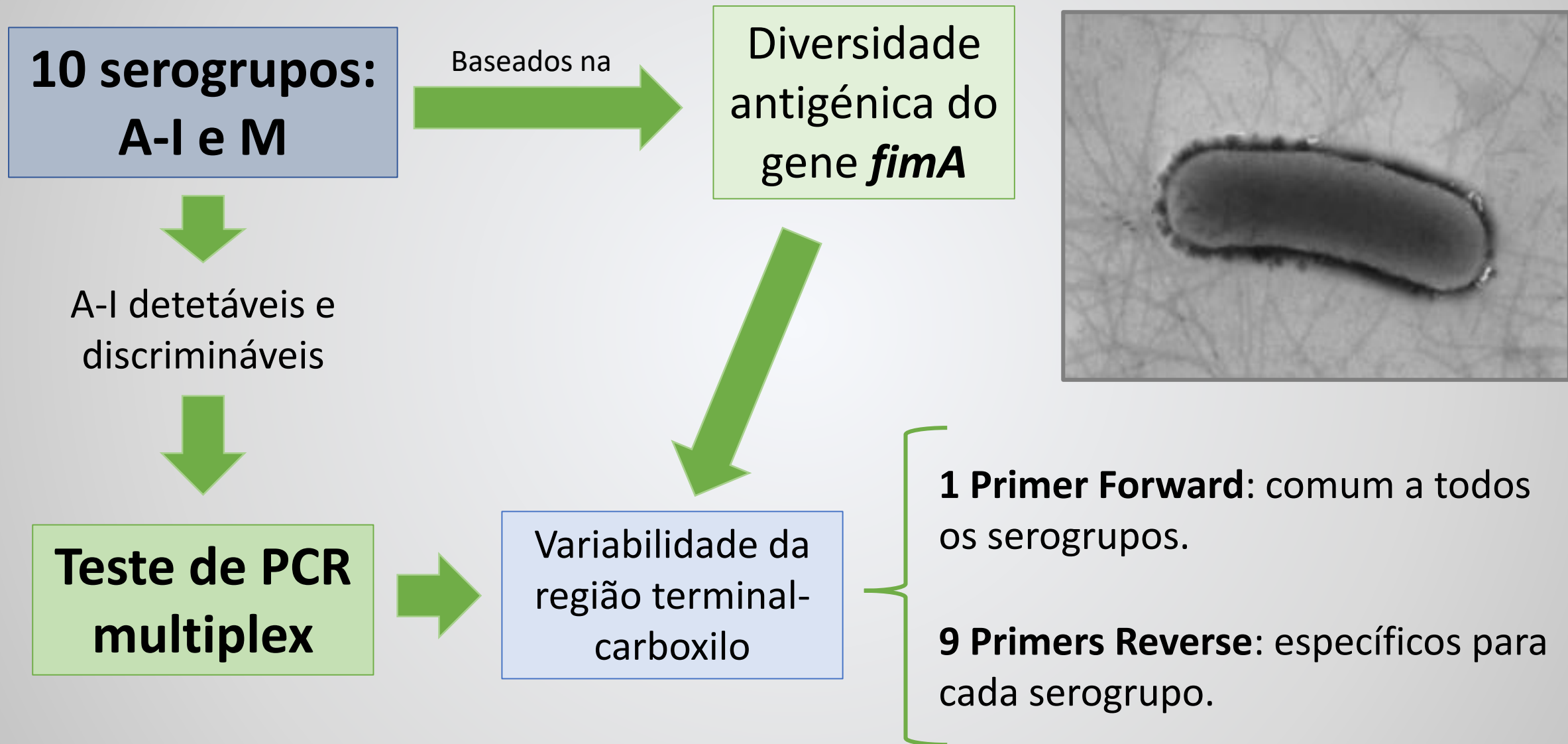
Água bidestilada



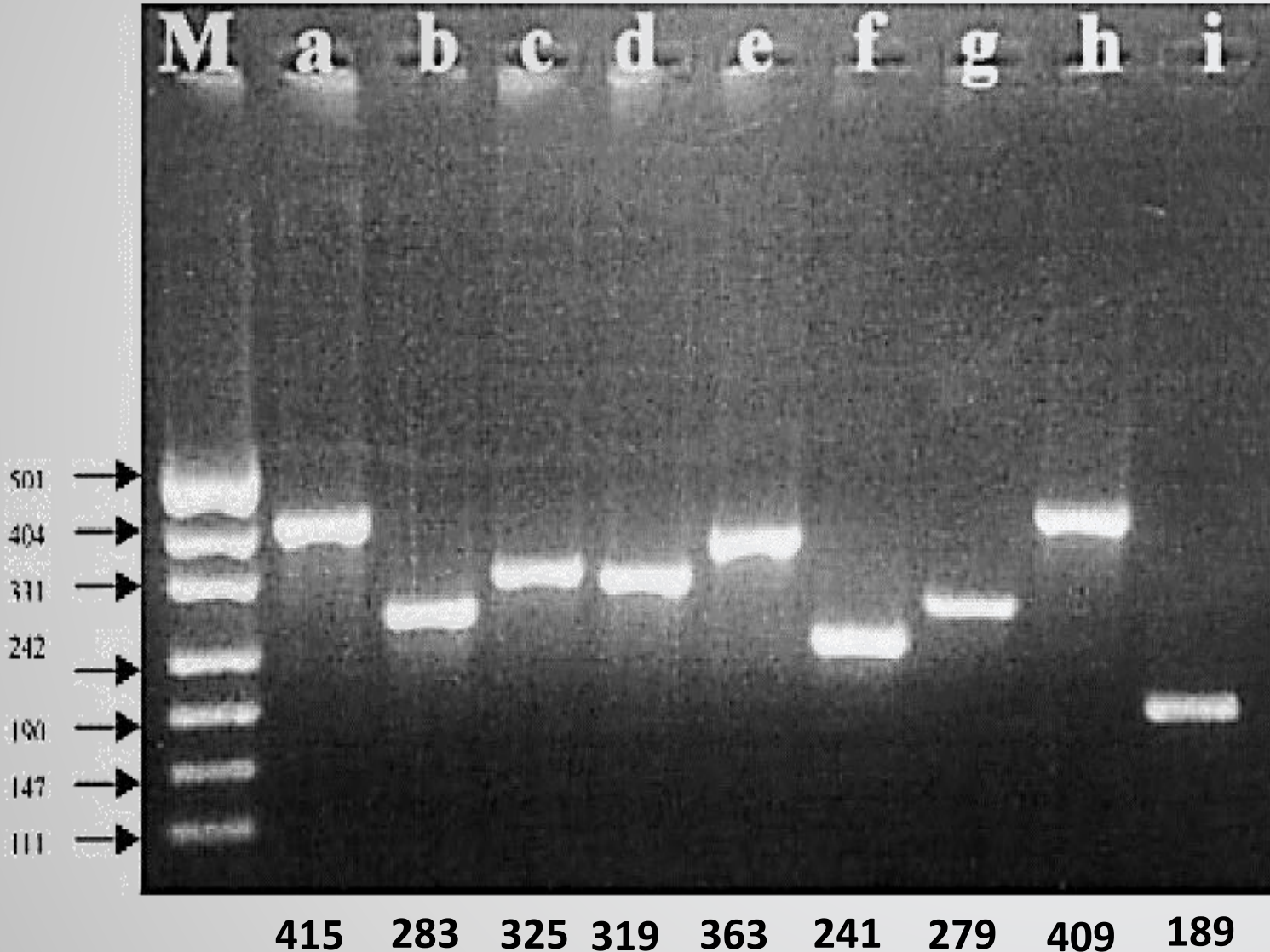
Determinação de serogrupos



Determinação de serogrupos de *D. nodosus*



Determinação de serogrupos de *D. nodosus*



Eletroforese em gel de agarose

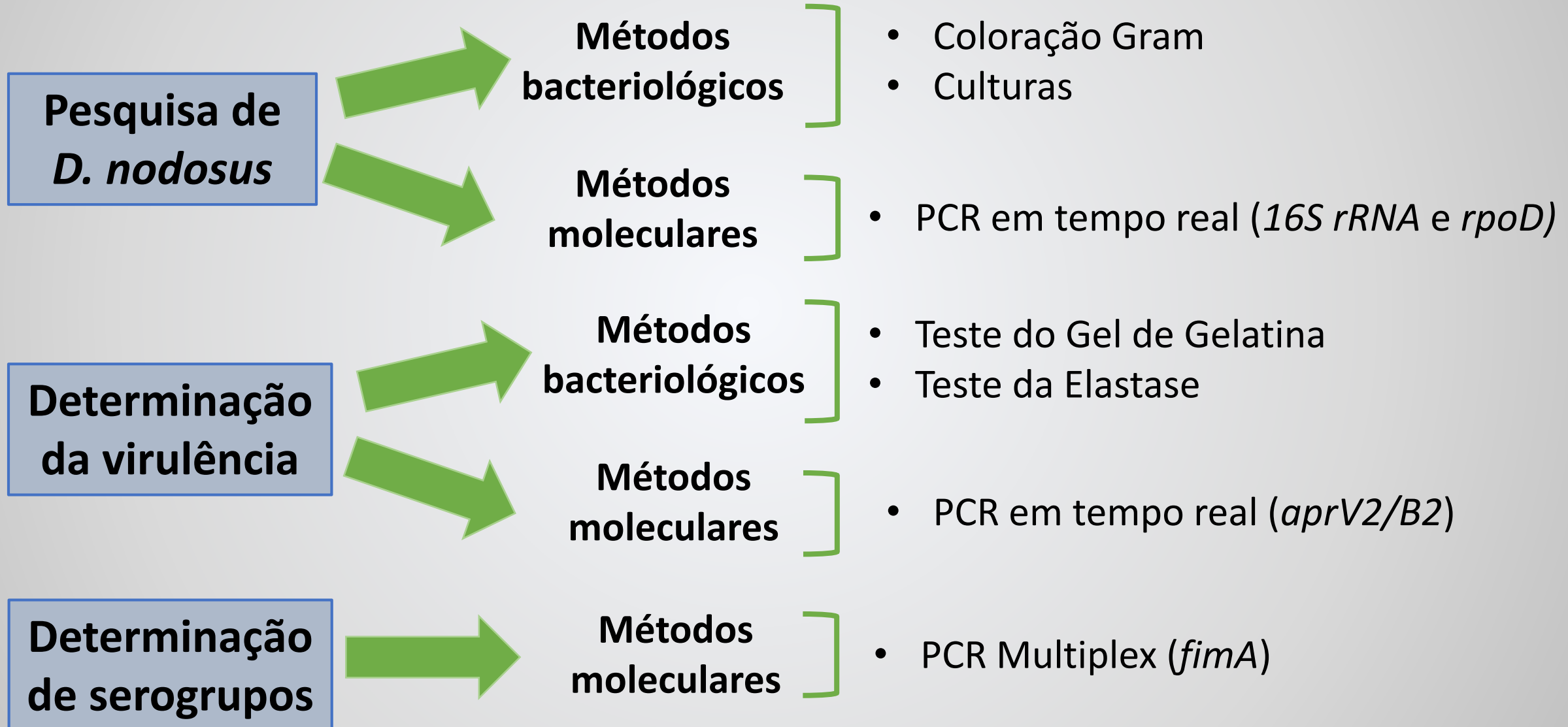


Bandas de diferentes tamanhos



Deteção dos produtos de PCR de cada um dos 9 serogrupos

Métodos de pesquisa e caracterização de *D. nodosus*



Referências

- Stäuble, A., Steiner, A., Frey, J. and Kuhnert, P. (2014). Simultaneous Detection and Discrimination of Virulent and Benign *Dichelobacter nodosus* in Sheep of Flocks Affected by Foot Rot and in Clinically Healthy Flocks by Competitive Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), pp.1228-1231.
- Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., Egerton, J.R., (2002). Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of *D. nodosus* in sheep with footrot prior to vaccination. *Molecular and Cellular Probes* 16, 285–296.
- Ghimire, S., Egerton, J., Dhungyel, O., Joshi, H., (1998). Identification and characterisation of serogroup M among Nepalese isolates of *Dichelobacter nodosus*, the transmitting agent of footrot in small ruminants. *Veterinary Microbiology* 62, 217–233
- Kennan, R.M., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., Egerton, J.R. & Rood, J.I. (2001). The type IV fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion, and natural competence. *Journal of Bacteriology*, 183(15), pp. 4451-8.
- Witcomb, L.A., Green, L.E., Kaler, J., Ul-Hassan, A., Calvo-Bado, L.A., Medley, G.F., Grogono-Thomas, R., Wellington, E.M.H., (2014). A longitudinal study of the role of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* load in initiation and severity of footrot in sheep. *Preventive Veterinary Medicine* 115, 48–55.
- Egerton, J.R., Roberts, D.S. & Parsonson, I.M. (1969). The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. I. Histological study of the bacterial invasion. *Journal of Comparative Pathology*, 79, pp. 207-216.
- Frosth S, Sletteameås JS, Jørgensen HJ, Angen Ø, Aspan A (2012) Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. *Acta Vet Scand* 54:6.
- McPherson, A.S., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., (2017). Evaluation of Genotypic and Phenotypic Protease Virulence Tests for *Dichelobacter nodosus* Infection in Sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 55, 1313–1326.
- Wani, A.H., Sharma, M., Salwan, R., Singh, G., Chahota, R., Verma, S., (2016). Cloning, Expression, and Functional Characterization of Serine Protease *Aprv2* from Virulent Isolate *Dichelobacter nodosus* of Indian Origin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180, 576–587.
- Wani, S.A., Samanta, I., (2006). Current understanding of the aetiology and laboratory diagnosis of footrot. *The Veterinary Journal* 171, 421–428.
- Zhou, H., n.d. (2001) Genetic variation in *Dichelobacter nodosus* fimbriae 214.
- Sanchez, A. C. (2012) Identificación y Cuantificación de Especies del Género *Merluccius* Mediante la Utilización de PCR a Tiempo Real
- La Fontaine, S., Rood, J.I., 1996. Organization of ribosomal RNA genes from the footrot pathogen *Dichelobacter nodosus*. *Microbiology* 142, 889–899.
- Billington, S. J. , 1996. Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*. *FEMS Microbiology Letters* 145 (1996) 147-156