

BRUNA TRENTINARO IBIAPINA

Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos

São Paulo

2021

RESUMO

IBIAPINA, B T. **Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos.** 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O desenvolvimento da indústria equina tem aumentado a demanda por testes de verificação de parentesco para fins de registro na raça, os quais são realizados pela análise de regiões microssatélites de repetições curtas (STR). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento exige, atualmente, a análise de 12 marcadores para o painel principal (sendo 9 obrigatórios e 3 a escolher entre outros 8) e 12 marcadores para um painel adicional (a escolher entre possíveis 15). No Brasil há apenas um kit comercial disponível para um painel principal, o qual possui elevado custo, e nenhum kit comercial disponível para o painel adicional. Desta forma, muitos laboratórios são levados a desenvolver seus próprios testes, os quais são realizados utilizando-se várias reações de PCR. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de reações múltiplas (*multiplex*) para cada um dos painéis com custo baixo e alta eficiência. Foi realizada análise *in silico* dos *primers* recomendados pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG), organização responsável pela padronização desses testes, para 17 marcadores do painel principal (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 e VHL20) e para 15 marcadores do painel adicional (TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374 e TKY394), os quais foram testados, quanto a sua eficiência, em formato monoplex e depois em formato *multiplex*. Foram redesenhados *primers* para 11 marcadores STR visando a melhor eficiência do sistema *multiplex* para cada painel. As concentrações de cada *primer* foram ajustadas para obtenção de uma amplificação equilibrada para todos os *loci*. As amostras foram sequenciadas no equipamento ABI 3130XL® (*Applied Biosystems*) e posteriormente analisadas no software Genemapper® v 5.0 (*Applied Biosystems*). Foi desenvolvido parcialmente um sistema *multiplex* com 14 marcadores para o painel principal de genotipagem de equinos (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3 e VHL20), uma vez que o marcador obrigatório HTG10 obteve resultado satisfatório apenas no

formato monoplex, precisando ser testado em uma reação de PCR a parte. Os resultados das 50 amostras analisadas pelo sistema desenvolvido neste estudo, para o painel principal, foram consistentes quando comparados aos do kit comercial *Equine Genotypes*® (*Thermo Fisher Scientific*). Para o painel adicional (série TKY) foi possível o desenvolvimento composto de dois sistemas *multiplex*, um contemplando 8 marcadores (TKY 279, TKY297, TKY301, TKY312, TKY325, TKY337, TKY374 and TKY394) e outro contemplando 5 marcadores (TKY287, TKY321, TKY333, TKY343 and TKY344). Ambos os sistemas reproduziram os resultados das amostras referências provenientes da ISAG e testadas neste estudo. Pode ser concluído que ambos os painéis apresentaram bons resultados para análises, sendo possível desenvolver dois sistemas multiplex, atendendo o objetivo de desenvolver um método de baixo custo a alta eficiência, embora em duas etapas. Mais estudos deverão ser desenvolvidos com a finalidade de reunir em um único sistema multiplex todos os marcadores necessários.

Palavras-chave: Verificação de Parentesco. Microsatélite. Marcadores Genéticos STR.

ABSTRACT

IBIAPINA, B T. **Development and validation of a equine genotyping multiplex kit based on microsatellite marker analysis for individual identification and parentage testing.** 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The development of the modern horse industry has increased the demand for equine parentage tests for pedigree verification, which are based in short tandem repeats (STR) analysis. These tests use 12 STR markers (of which 9 are compulsory and 3 chosen from another 8) for a main panel and other 12 STR (chosen from possible 15) for an additional panel and are regulated by the Ministry of Agriculture, Cattle and Supply (MAPA). There is only one imported commercial kit available in Brazil for the main panel, which it is costly and there are not any commercial kits available for the secondary panel. Thus, many laboratories must customize their own tests, which are performed by several PCR reactions. This work aimed to develop a novel multiplex STR typing system for each panel with low cost and high efficiency. Seventeen primers recommended by ISAG for the main panel (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 and VHL20) and fifteen recommended for the additional panel (TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374 and TKY394) were submitted to *in silico* analysis. Then primers were validated individually and then jointly to test the efficiency of the multiplex system. Eleven primers were redesigned to establish a novel multiplex PCR system for each panel. Primer concentrations were adjusted in order to achieve a well-balanced set of amplicons for all markers. Samples were loaded into ABI 3130XL® Analyzer (Applied Biosystems) and then analyzed in Genemapper® v5.0 software (Applied Biosystems). A single multiplex STR genotyping system was partially developed for the main equine panel containing 14 *loci* (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3 and VHL20) because HTG10 – which is compulsory - only amplified well in a separately PCR reaction. Results from 50 tested samples were concordant between Equine Genotypes® kit (Thermo Fisher Scientific) and the system developed in this study for the main panel. Two multiplex PCR systems were developed for the additional panel, one containing 8 markers (TKY279, TKY297,

TKY301, TKY312, TKY325, TKY337, TKY374 and TKY394) and other containing 5 markers (TKY287, TKY321, TKY333, TKY343 and TKY344). The developed multiplex systems were able to detect all alleles from ISAG reference samples tested in this work. Results indicate that multiplex systems worked well and are cost-effective while performed in 2 PCR reactions for each panel. Further studies are needed to include all markers in a single multiplex PCR reaction.

Keywords: Parentage testing. Microsatellite. STR Genetic Markers.