

DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE *Mycoplasma gallisepticum* (MG)

DIOGO HEPP¹, KELI CRISTINA DOS SANTOS SIMÕES¹, ANDRÉ SALVADOR KAZANTZI FONSECA², VAGNER RICARDO LUNGE³, MARICARMEN GARCIA⁴, EDMUNDO KANAN MARQUES⁵, NILO IKUTA⁶

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo diferenciar cepas de Mycoplasma gallisepticum isolados de perus, galinhas e pássaros ornamentais através da comparação entre seqüências de genes de antígenos de superfície. Analisou-se 10 cepas de referência, 6 isolados de galinhas, 9 isolados de perus e 5 isolados de pássaros ornamentais. Foram escolhidos 3 genes relacionados com antígenos de superfície (citoadesina - MGC1, lipoproteína – LP e a proteína de fase variável - Pvpa) que foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posteriormente seqüenciados. A análise dos 3 genes permitiu diferenciar todas cepas de referência além de estabelecer um estudo filogenético com os distintos isolados. Os isolados de pássaros ornamentais apresentaram alto grau de identidade nas seqüências analisadas e distinção dos MG isolados de perus e galinhas. Foram encontrados 5 isolados de perus e 2 de galinhas que apresentaram, respectivamente, seqüências idênticas às cepas vacinais. Há evidências de que estes isolados possam estar relacionados com cepas vacinais, de uso freqüente

¹Acadêmico (a) do Curso de Biologia – Bolsista do PROICT/ULBRA

²Simbios Biotecnologia – Canoas - RS - Brasil

³Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

⁴Poultry Disease Research Center - University of Georgia - Athens - GA - USA

⁵Professor do Programa de Pós-Graduação de Diagnóstico Genético Molecular (PPGDGEM)

⁶Professor – orientador do Curso de Biologia/ULBRA

na avicultura comercial. Os demais isolados não apresentaram identidade entre si ou mesmo com as cepas de referência formando os demais padrões descritos.

Palavras chave: *Mycoplasma gallisepticum*, diferenciação molecular, PCR.

ABSTRACT

Mycoplasma gallisepticum (MG) isolates from turkeys, hens and songbirds (house finch) were differentiated by comparison of surface antigens sequences. A polymerase chain reaction (PCR) procedure was used to amplify citoadesine (MGC1), lipoprotein (LP) and the phase-variable antigen (Pvpa) from 10 MG reference strains, and 20 field isolates. The sequence analysis of these three genes allowed to easily differentiate 10 reference MG strains, and phylogenetic analysis was performed for all MG isolates. All house finch isolates presented a high degree of identity, and showed to be a distinct MG group. Five isolates from turkeys and 2 isolates from hens presented identical sequences to two MG reference strains. These strains were closely related to vaccine strains frequently used in commercial poultry. The remaining 13 MG field isolates did not presented sequence identity between themselves or with reference strains, forming diverse phylogenetic groups.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, molecular differentiation, PCR

INTRODUÇÃO

Os micoplasmas são os menores e mais simples procariontes, geralmente encontrados como parasitas celulares, estando envolvidos em grande número de doenças nos animais e no homem (Woese, 1987). O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é um patógeno que infecta perus e galinhas e pode provocar quadros respiratórios severos, resultando em diminuição no ganho de peso e na produção de ovos, além dos custos adicionais em tratamentos com antibióticos e quimioterápicos.

O controle da doença é baseado na erradicação de MG e manutenção do status livre através de um controle severo de biossegurança. O diagnóstico é uma importante

ferramenta para o controle e erradicação. Atualmente realiza-se o monitoramento sistemático dos lotes através de testes sorológicos e sua confirmação é feita através de isolamento ou por testes baseados na Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (Nascimento *et al.*, 1991; Lauerman *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 1996).

O MG tem sido isolado de várias espécies de aves como codornas (*Coturnix coturnix japonica*), faisões (*Phasianus colchicus*) e mais recentemente de pássaros ornamentais com a conjuntivite como *Carpadacus mexicanus* e *Carduelis tristis* (Ley, 1997). Alguns isolados apresentam características distintas quanto à patogenicidade, imunogenicidade e capacidade de transmissão. Testes baseados em PCR, RFLP e RAPD têm possibilitado a detecção específica de cepas

vacinais (Levisohn *et al.*, 1998; Lunge *et al.*, 2000). Porém estas técnicas têm tido aplicação limitada; assim, pouco se conhece quanto a origem e disseminação de um surto (Bencina, 2002).

Este trabalho objetivou caracterizar isolados de *Mycoplasma gallisepticum* provenientes de distintos hospedeiros (perus, galinhas e pássaros ornamentais) e regiões através da comparação entre seqüências de genes de antígenos de superfície (citoadesina – MGC2, lipoproteína – LP e a proteína de fase variável - Pvpa).

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de referência e isolados *Mycoplasma gallisepticum* (MG)

As cepas e isolados utilizados neste trabalho foram obtidas na coleção de cultura do Poultry Diagnostic and Research Center (PDRC) - University of Georgia.

Foram analisadas 10 cepas de referência e 20 isolados de campo.

As cepas de desafio S6 e R foram isoladas respectivamente de perus com sinusite e de galinhas com aerossaculite. A cepa A5969 não é patogênica e foi adaptada ao cultivo *in vitro* para preparo de antígenos. TS-11, F e 6/85 são cepas atenuadas utilizadas na produção de vacinas. As cepas K503, K703 e K730 foram isoladas de galinhas e apresentam características atípicas como baixa patogenicidade, imunogenicidade e capacidade de transmissão. A cepa HF-51 é um isola-

do da Georgia (EUA) em 1998 da ave ornamental *Carpadacus mexicanus* com conjuntivite.

As amostras de campo foram isoladas de distintas regiões dos EUA, entre os anos de 1973 a 1999. Analisou-se 6 isolados de galinhas (K4688C, K4688G, K2101, K4657, K4705 e K4355), 9 isolados de perus (K4421A, K4043, K4423B, K4029, K3944, K4465, K4236, K435 e K4669A) e 5 isolados de pássaros ornamentais com conjuntivite (K4366, K4013, K4094, K3839 e K4409).

Extração de DNA

Foi utilizado o método fenol:clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) para purificação de DNA total. Os isolados mantidos em meio de cultura, foram previamente lavados em tampão fosfato (PBS). Adicionou-se SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na concentração final de 0.5% e 1.0 mg proteinase K/ml (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 1 h a 37°C e posteriormente foi realizada uma extração com fenol seguido por uma extração com clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com etanol e ressuspenso em 50mL de água destilada.

Amplificação de Genes de Superfície

Foram escolhidos 3 genes relacionados com antígenos de superfície (citoadesina - MGC1, lipoproteína – LP e a proteína de fase variável - Pvpa). Estes genes foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (IKUTA, 2000 e LIU, 2001) e analisados em eletroforese em gel de agarose 2%.

Seqüenciamento e análise filogenética

Fragmentos amplificados das 10 cepas de referência norte americanas e 20 isolados de campo foram encaminhados ao "Molecular Genetics Instrumentation Facility" (University of Georgia, Athens, GA) para determinação de seqüência de DNA. As seqüências de ácidos nucléicos e respectivas seqüências preditas de aminoácidos foram analisadas utilizando o programa "Megalign" (DNASTAR, Madison, WI) utilizando o algoritmo Clustal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os antígenos de superfície analisados neste trabalho estão relacionados com os processos de infecção, aderência à célula e resposta imunológica do hospedeiro. As seqüências de cada gene foram comparadas quanto ao polimorfismo.

Análise gene a gene

Os polimorfismos encontrados em cada gene foram diferenciados numericamente. As cepas que apresentaram 100% de identidade foram classificadas num mesmo grupo. As cepas que não possuíam 100% de identidade de DNA, mas seqüências idênticas de aminoácidos, foram classificadas também no mesmo grupo numérico, porém, discriminadas por letras (Quadro 1).

O gene da citoadesina apresentou maior grau de identidade entre as 30 cepas e isolados. Foram

encontradas 7 padrões de seqüências (Quadro 1). Os padrões 1, 2 e 5 formaram grupos, enquanto os demais consistiram de apenas um representante. O padrão 1 agrupou o maior número de cepas e isolados de MGs, sendo que 20 apresentaram mesma seqüência de aminoácidos, três das quais com polimorfismos apenas no DNA. Neste grupo estão incluídas as cepas de referência 6/85, TS 11, R, HF-51 e os MGs de pássaros ornamentais. Os MGs A5969, K435, K4669A e K4705 apresentaram seqüências idênticas de aminoácidos com polimorfismos na comparação do DNA e foram agrupadas no padrão 2. A cepa vacinal F apresentou identidade com a cepa atípica K503 (aminoácidos) sendo classificadas no padrão 5.

As cepa de referência S6 e as atípicas K703 e 730 apresentaram respectivamente os padrões 3, 6 e 7. O isolado de campo K4355, isolado na Califórnia em 1996 apresentou o padrão 4.

Nas seqüências de lipoproteína foram identificadas 13 padrões (Quadro 1), sendo que houve a formação de grupos com padrões 1, 3, 8 e 10. A cepa 6/85 foi agrupada com os 6 isolados de peru (padrão 1) e a TS 11 com os 2 isolados de galinhas (padrão 3). A cepa de referência HF-51 expressou identidade com os isolados de pássaros ornamentais na seqüência de DNA e com outras três cepas nos aminoácidos, incluindo a cepa de referência S6 (padrão 8). A cepa vacinal R apresentou identidade com o isolado de peru K435 (padrão 10). Os demais padrões apresentaram somente 1 representante.

O gene PvpA apresentou o menor grau de conservação entre as cepas analisadas, separando os MGs em 15 padrões (Quadro 1), com a formação dos grupos 1, 5, 6, 7, 9 e 14. A cepa vacinal 6/85 foi agrupada com os 6 isolados de peru (padrão 5) e a cepa TS-11 juntamente com os 2 isolados de galinhas (padrão 7). Os isolados

de pássaros ornamentais apresentaram mesma identidade da cepa de referência HF-51 (padrão 1), sendo que o isolado K3839 apresentou polimorfismo na sequência de DNA (padrão 1b).

A cepa de desafio S6 apresentou 100% de identidade com o isolado de galinha K4355 (padrão 6), a cepa R com K2101 (padrão 9) e a cepa atípica K503 com a K730 (padrão 14).

Quadro 1- Análise global comparando os genes de Adesina, PvpA e Lipoproteína de 30 cepas e isolados de *Mycoplasma galisepiticum*.

CEPAS	HOSPEDEIRO – característica	ORIGEM	Adesina	PVPA	Lipoproteína	Ade+PvpA+Lipo
HF-51	Ornamental	reference strain	1	1	8	1
K4366	Ornamental	Carolina do Sul (1997)	1	1	8	
K4013	Ornamental	Pennsylvania (1995)	1	1	8	
K4094	Ornamental	Tennessee (1996)	1	1	8	
K3839	Ornamental	Maryland (1994)	1	1 b	8	
K4409	Ornamental	Texas (1997)	1	13	8c	2
6-85	Cepa vacinal	Cepa referência	1	5	1	3
K4421A	Peru	Michigan (1997)	1	5	1	
K4043	Peru	Nebraska (1995)	1	5	1	
K4423B	Peru	Michigan (1997)	1	5	1	
K4029	Peru	Nebraska (1995)	1	5	1	
K3944	Peru	Carolina do Norte (1995)	1	5	1	
K4465	Peru	Ohio (1997)	1	5	1	
TS-11	Cepa vacinal	Cepa referência	1	7	3	4
K4688C	Galinha	Carolina do Norte (1999)	1	7	3	
K4688G	Galinha	Carolina do Norte (1999)	1	7	3	
K4236	Peru	Virginia (1996)	1	3	5	5
K2101	Galinha	Colorado (1984)	1b	9	7	6
R	Cepa desafio	Cepa referência	1c	9	10	7
K4657	Galinha	Georgia (1998)	1d	10	2	8
A5969	Cepa não patogênica	Cepa referência	2a	12	4	9
K435	Peru	Georgia (1973)	2b	11	10	10
K4669A	Peru	Colorado (1998)	2c	2	8c	11
K4705	Galinha	Arkansas (1999)	2d	4	9	12
S6	Cepa desafio	Cepa referência	3	6	8b	13
K4355	Galinha	Califórnia (1996)	4	6	8	14
F	Cepa vacinal	Cepa referência	5a	8	6	15
K503	Cepa atípica	Cepa referência	5b	14	11	16
K703	Cepa atípica	Cepa referência	6	15	12	17
K730	Cepa atípica	Cepa referência	7	14	13	18

Análise conjunta dos genes Citoadesina, Lipoproteína e PvpA

A comparação final das cepas foi realizada através do alinhamento das seqüências de aminoácidos dos três genes que permitiu a diferenciação de todas as cepas de referência (Quadro 1). A análise filogenética caracterizou o grau de semelhança dos diferentes padrões encontrados (Figura 1) e três grandes clados se formaram:

Padrões 1, 2, 3, 5, 11, 12, 13 e 14.

Padrões 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 15

Padrões 16, 17 e 18

Os MG foram classificados em 18 padrões, sendo que 3 formaram grupos (padrões 1, 3 e 4).

O padrão 1, agrupou os isolados provenientes de pássaros ornamentais com conjuntivite (K4366, K4013, K4094, K3839 e K4409) e cepa de referência HF-51. O isolado K4409 (padrão 2) diferiu dos MGs de padrão 1, por uma deleção

de 170 pares de bases em PvpA (dados não demonstrados). Estes dados indicam que os isolados de pássaros ornamentais são distintos das cepas e isolados de galinhas e perus.

O padrão 3 formado pelos isolados K3944, K4029, K4043, K4421A, K4423B e K4465 apresentaram seqüências idênticas à cepa vacinal 6/85. Estes MGs foram isolados de perus entre 1995 e 1997 em diferentes Estados Norte Americanos. Outro caso onde houve identidade entre cepa vacinal e isolados de campo foram os MGs com padrão 4. Os isolados de galinhas K4688C e K4688G, obtidos de uma mesma região em 1999 apresentaram padrão da cepa vacinal TS-11. Informações referentes a estes surtos indicam possível relação com cepas vacinais de uso freqüente na avicultura comercial.

As cepas atípicas K503, K703 e K730 (padrões 16, 17 e 18), formaram um clado distinto dos demais, corroborando suas características distintas. Os demais isolados não apresentaram identidade entre si ou mesmo com as cepas de referência, formando os demais padrões descritos.

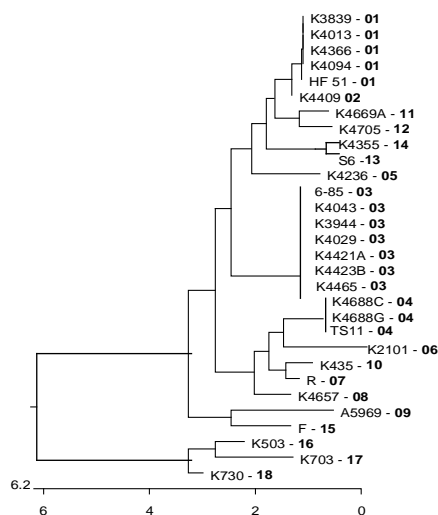


Figura 1 - Filogenia de cepas e isolados de MG, baseada na análise conjunta das seqüências preditas de aminoácidos dos genes de adesina, lipoproteína e PvpA.

CONCLUSÕES

A comparação dos seqüenciamentos de genes relacionados a antígenos de superfícies é parâmetro eficiente para a discriminação de cepas de *Mycoplasma gallisepticum*. Os genes analisados mostraram possuir diversas regiões com polimorfismos capazes de distinguir cepas e identificar sua proximidade filogenética. A análise conjunta dos três genes demonstrou ser mais eficiente que a análise individual destes.

O seqüenciamento de isolados de MG disponibiliza informações referentes à constituição genética destes microorganismos e abre caminho para o desenvolvimento de novos métodos de diferenciação e controle.

A comparação das seqüências determinou que os isolados de pássaros ornamentais são relacionados entre si e distintos dos isolados de perus e galinhas, e sugerem não se tratar de infecções cruzadas entre as espécies avaliadas. Por outro lado, os grupos formados pela comparação entre os genes indicam a presença de isolados no campo possivelmente relacionados com cepas vacinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASEGGIO, N.; GLEW, M. D.; MARKHAM, P. F.; WHITHEAR, K. G.; BROWNING, G. F. 1996. Size and genomic location of the pMGA multigene family of *Mycoplasma gallisepticum*. **Microbiology**, v. 142, p.1429-1435, 1996.

BENCINA, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. **Avian Pathology**, v. 31, n.6, p.535-547. 2002.

BOGUSLAVSKY, S.; MENAKER, D.; LYSNYASKY, I.; LIU, T.; LEVISOHN, S.; ROSENGARTEN, R.; GARCIA, M.; YOGEV, D. Molecular Characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* *pvpA* Gene which Encodes a Putative Variable Cytachesis Protein **Infection and Immunity**, v.68, p.3956-3964, 2000.

CHARLTON, B. R.; BICKFORD, A. A.; WALKER, R. L.; YAMAMOTO, R. Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.158-161, 1999.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.39, p.729, 1995.

GARCIA, M.; JACKWOOD, M. W.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Diseases**, v.39, p.606-616, 1995.

GARCIA, M.; ELFAKI, M. G.; KLEVEN, S. H. Analysis of the variability in expression of *Mycoplasma gallisepticum* surface antigens. **Veterinary Microbiology**, v.42, p.147-158, 1995.

IKUTA, N.; GARCIA, M.; FONSECA, A. S. K.; LUNGE, V. R.; MARQUES, E. K. KLEVEN, S. Diferenciação molecular de cepas de referência e isolados de *Mycoplasma gallisepticum*. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, supl.2, p.104, 2000.

KEMPF, I. DNA amplification methods for

diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.45, n.3, p.373-386, 1997.

KLEVEN, S. H. Epidemiological studies of *Mycoplasma gallisepticum* using restriction endonuclease analysis. **Zentralblatt für Bakteriologie**, suppl. 20, p.494-499, 1990.

LAUERMAN, L.H.; HOERR, F.J.; SHARPTON, S.; SHAH, M.; VANSANTEN, V.L. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v. 37, p.827-834, 1994.

LEVISOHN, S.; GERCHMAN, I.; LEY, D.H.; GEVA, Z.; WEISMAN, Y. Application of molecular diagnostic methods to track environmental infection of poultry breeding flocks by *Mycoplasma gallisepticum*. **IOM Letters**, v.5, p. 75, 1998.

LEY, D. H.; MCLAREN, J. M.; MILES, A. M.; BARNES, H. J.; FRANZ, G. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts/11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry, and identification by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Avian Diseases**, v. 41, p.187-194, 1997.

LEY, D.H.; BERKHOFF, E.; LEVISOHN, S. Molecular Epidemiologic Investigations of *Mycoplasma gallisepticum* Conjunctivitis in Songbirds by Random Amplified Polimorphic DNA Analyses. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.375-380, 1997.

LIU, T.; GARCIA, M.; LEVISOHN, S.; YOGEV, D.; KLEVEN S.H. Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene

pvpA among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and its Application in Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.1882-1888, 2001.

LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K.; GARCIA, M.; KLEVEN, S.; MARQUES, E.K.; IKUTA, N. Development and application of a PCR-RFLP methodology for strain identification of *Mycoplasma gallisepticum* from commercial poultry flocks. In: ANNUAL MEETING OF THE SOUTHERN CONFERENCE ON AVIAN DISEASES, 41.; ANNUAL MEETING OF THE SOUTHERN POULTRY SCIENCE SOCIETY, 21., 2000, Atlanta. **Abstracts...** Atlanta, GA, 2000. p.25. Abstract 116.

NASCIMENTO, E.R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K.R.; TAIT, R.C. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.35, p.62-69, 1991.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Sprig Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SILVEIRA, R.M.; FIORENTIN, L.; MARQUES, E.K. Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* diagnosis. **Avian Diseases**, v. 40, n.1, p. 218-222, 1996.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.