

# ***Avaliação de sensibilidade de três sistemas para a detecção de Mycoplasma gallisepticum pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)***

DIEGO HEPP<sup>1</sup>

KELI CRISTINA DOS SANTOS SIMÕES<sup>1</sup>

THAÍS DA ROCHA BOEIRA<sup>2</sup>

ANDRÉ SALVADOR KAZANTZI FONSECA<sup>2</sup>

VAGNER RICARDO LUNGE<sup>3</sup>

EDMUNDO KANAN MARQUES<sup>4</sup>

NILO IKUTA<sup>5</sup>

## **RESUMO**

*Foram analisados neste trabalho três sistemas para detecção molecular de Mycoplasma gallisepticum (MG) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dois sistemas são baseados em amplificações únicas (genes de proteínas de superfície GapA e mgc2) e um sistema no formato nested-PCR (gene GapA). A sensibilidade analítica foi avaliada pela detecção de diluições seriadas de cepa vacinal e pela análise de 44 amostras clínicas provenientes de swabs de galinhas e perus. A nested-PCR apresentou maior sensibilidade aos sistemas de amplificação única tanto na diluição de vacina quanto nas amostras clínicas.*

**Palavras-chave:** Mycoplasma gallisepticum, sensibilidade, PCR.

---

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biologia/ ULBRA - Bolsista PROICT/ ULBRA

<sup>2</sup> Simbios Biotecnologia

<sup>3</sup> Professor do Curso de Medicina Veterinária e do PPG em

Diagnóstico Genético Molecular/ ULBRA

<sup>4</sup> Professor do PPG em Diagnóstico Genético Molecular/ ULBRA

<sup>5</sup> Professor – Orientador do Curso de Biologia e PPG em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (ikuta@ulbra.br)

## ABSTRACT

Three *Mycoplasma gallisepticum* (MG) polymerase chain reactions (PCRs) that target surface protein genes *gapA* and *mgc2*, and a nested PCR (*GapA*) were compared in this work. Analytical sensitivity was evaluated by detection of dilutions of vaccine strain and analysis of 44 clinical samples (swabs from turkeys and chickens). The nested-PCR showed to be more sensitive than single amplification PCRs in the vaccine dilution and clinical samples evaluations.

**Key words:** *Mycoplasma gallisepticum*, sensibility, PCR.

## INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é um importante patógeno de galinhas e perus, sendo responsável por grandes perdas econômicas na avicultura industrial. A infecção por MG apresenta uma grande variedade de manifestações como Doença Respiratória Crônica (DRC) e aerossaculite. As aves infectadas apresentam baixa conversão alimentar, queda na produção de ovos e altas taxas de mortalidade (BOGUSLAVSKY et al., 2000).

O controle da doença em lotes comerciais é baseado na erradicação e manutenção do *status* livre deste patógeno por meio de medidas de biossegurança. O monitoramento dos lotes é realizado utilizando-se testes sorológicos como a soroaglutinação rápida (SAR), inibição da hemoaglutinação (HI) e testes de ELISA. O teste confirmatório preconizado é o isolamento bacteriano, sendo um procedimento dispendioso, demorado e tecnicamente de difícil execução (RAZIN, YOGEV & NAOT, 1998).

Com os progressos na biologia molecular, diversos genes de proteínas de superfície têm sido descritos e testes moleculares baseados nestes alvos foram apresentados como testes

confirmatórios (KLEVEN et al., 2004). Entretanto, há pouca informação disponível comparando a sensibilidade dos mesmos em amostras clínicas (GARCIA et al., 2005), sendo que a sensibilidade destes testes é um fator importante para a sua escolha e utilização no controle do MG nos lotes de aves.

Este estudo foi realizado com o objetivo de comparar a sensibilidade de três procedimentos para detecção molecular de MG, os quais amplificam regiões de genes codificadores de proteínas de superfície deste patógeno (genes *mgc2* e *GapA*).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram utilizadas as seguintes amostras na análise de sensibilidade dos sistemas de amplificação: cepa vacinal ts-11 (utilizada para a preparação de diluições seriadas de base 5, em água) e 44 *swabs* provenientes de galinhas e perus de diferentes lotes comerciais (previamente diagnosticadas como MG positivas).

## Extração de ácidos nucléicos

A purificação de ácidos nucléicos foi realizada através da técnica de extração em sílica (adaptada do método descrito por Boom et al., 1990). Cada *swab* foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5mL contendo 1mL de mix de lise, e incubado a 60°C por 10 minutos. Após a incubação, 500mL deste mix de lise foi transferido para outro tubo. Para a extração das vacinas, 100mL de amostra foi transferida para um tubo contendo 400mL de mix de lise e submetida à incubação. 20mL de suspensão de sílica foram adicionados aos tubos, com posterior incubação a temperatura ambiente por 10 minutos (agitando por inversão a cada 2 minutos). Após a incubação os tubos foram lavados 2 vezes com solução de lavagem, 2 vezes com etanol 75% e uma vez com etanol absoluto (150µL de cada um). Os tubos secaram em termobloco a 60°C por 10 minutos e as amostras foram separadas da sílica com 50mL de solução eluidora.

## Amplificação

A seqüência e o tamanho do produto de amplificação dos primers utilizados nos diferentes métodos para detecção de DNA de MG avaliados, estão demonstrados na tabela 1. Os sistemas de amplificação única consistem em um par de primers baseados nos genes *mgc2* (sistema 1) e *Gap A* (sistema 2), e são utilizados em amplificações nas seguintes condições: 94°C por 3 min seguidos de 50 ciclos de 94°C por 20s; 60°C por 40s; 72°C por 60s; e extensão final de 72°C por 5 min. O sistema de amplificação no formato *nested-PCR* (sistema 3) utiliza dois pares de primers baseados no gene *GapA*: os externos são utilizados em uma reação de amplifi-

cação de 20 ciclos, e os internos em uma reação de amplificação de 35 ciclos. As condições da primeira e segunda amplificação são as mesmas utilizadas no sistema de amplificação única. Todos estes procedimentos da PCR utilizaram eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de seus produtos de amplificação.

## Avaliação da sensibilidade

A sensibilidade analítica dos três sistemas de amplificação foi determinada a partir do DNA genômico extraído de uma diluição seriada de base 5 da cepa vacinal ts-11 (preparada em água) até o ponto 1/3.125.000. Foram utilizados os pontos a partir da diluição 1/1.000, em avaliações paralelas nos três sistemas de amplificação. O limite de detecção da PCR foi considerado a diluição mais elevada da vacina na qual um produto detectável de PCR foi observado.

Por outro lado, a sensibilidade diagnóstica dos sistemas foi determinada a partir da comparação entre os resultados da análise paralela de 44 amostras clínicas provenientes de *swabs* de traquéia de galinhas e perus.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da sensibilidade analítica ou limite de detecção obtidos a partir de diluições da vacina ts-11, estão demonstrados na figura 1. O sistema 1 apresentou sensibilidade para a detecção de vacinas diluídas até 1.000 vezes; enquanto o sistema 2 até 25.000 vezes e o sistema 3 até 125.000 (tabela 2).

A tabela 3 expressa o resultado da sensibilidade, obtido através da avaliação de amostras clínicas, onde o sistema 1 detectou 41 amostras clínicas, o sistema 2 positivou 38 e o sistema 3 detectou todas as 44 amostras, tendo portanto 100% de sensibilidade.

A avaliação dos diferentes sistemas de amplificação demonstrou que estes apresentam diferenças na sensibilidade, tanto na avaliação a partir de diluições de vacina, quanto na análise de amostras clínicas. Estas diferenças podem ter origem na escolha da região utilizada como alvo ou no formato escolhido para cada sistema de amplificação.

Muitos métodos de amplificação de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidos para detecção de MG e são utilizados como parte de testes de rotina em vários laboratórios. Com o aumento do uso da PCR como ferramenta para identificação de lotes infectados com MG, considera-

mos importante comparar métodos disponíveis que foram desenvolvidos para este fim.

A comparação entre as sensibilidades destes três métodos demonstrou que o sistema 3 (*nested-PCR*) é o mais sensível para a detecção de MG, tanto na avaliação a partir de diluições de cepa vacinal como na avaliação de amostras clínicas. Apesar disso, os sistemas 1 e 2 apresentam como vantagem sobre o sistema 3 o fato de serem mais rápidos e envolverem menor manipulação, já que se trata de amplificações únicas.

A sensibilidade analítica mostrou que a PCR baseada no gene *GapA* (sistema 3) foi 5x mais sensível que o sistema 2 e 125x mais sensível que o sistema 1. A sensibilidade diagnóstica demonstrou que o sistema 3 apresenta 100% de sensibilidade e os sistemas 1 e 2, 93,2% e 86,4% respectivamente.

**Projeto financiado:** Finep e Fapergs

**Tabela 1 - Seqüência dos primers e tamanho do amplicon.**

Primers	Seqüência	Gene	Tamanho produto PCR (bp)
mgc2 2F	5' CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACA 3'	<i>mgc2</i>	300
mgc2 2R	3' TAAACCCACCTCCAGCTTATTTC 5'		
myc 3F <sup>A</sup>	5' TCARCGTTTCTAAGATTCCTTTTG 3'	<i>gapA</i>	332
myc 4R <sup>A</sup>	3' GCATCAAACCAGTAAATTCTTGG 5'		
myc 5F <sup>B</sup>	5' TTCTAGCGCTTTARCCCTAAACCC 3'		
myc 6R <sup>B</sup>	3' CTTGTGGAACAGCAACGTATTTCG 5'		

<sup>A</sup> Nested-PCR - primers externos

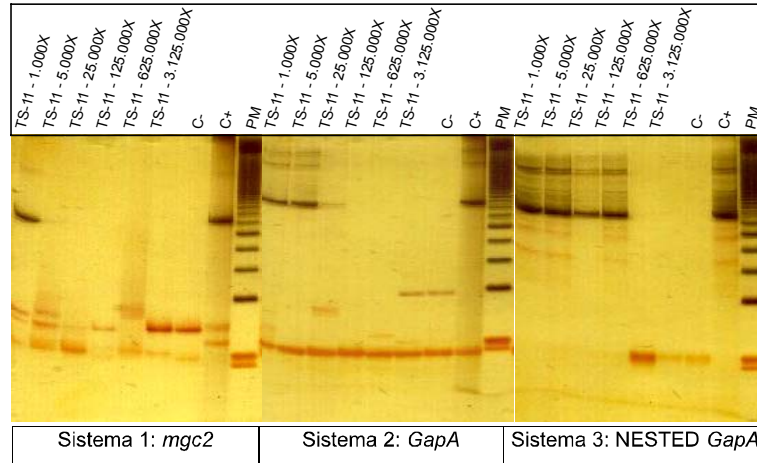
<sup>B</sup> Nested-PCR - primers internos

**Tabela 2 - Sensibilidade dos sistemas de amplificação em diluição de cepa vacinal.**

Sistema	Sensibilidade
Sistema 1 ( <i>mgc2</i> )	1.000X
Sistema 2 ( <i>GapA</i> )	25.000X
Sistema 3 (NESTED <i>GapA</i> )	125.000X

**Tabela 3** - Sensibilidade dos sistemas de amplificação em amostras clínicas.

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
Positivos	41	38	44
Negativos	3	6	0
Total	44	44	44



**Figura 1** - Avaliação da sensibilidade dos três sistemas de amplificação em diluições de cepa vacinal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASEGGIO, N.; GLEW, M. D.; MARKHAM, P. F.; WHITHEAR, K. G.; BROWNING, G.F. 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

Cytachetin Protein. *Infection and Immunity*, v.68, p.3956-3964, 2000.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p. 495-503, 1990.

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.
- GARCÍA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. **Avian Diseases**, v.49, p.125-132, 2003
- 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.103, 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 fur Bakteriologie Suppl.**, v.20, p.494-499, 1990.
- OPENGART K. N.; ROWLAND G. N.; WALLNER-PENDLETON E. Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolates from Turkeys. **Avian Diseases**, v.48, p.562-569, 2004.
- 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, Georgia, 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. New York: 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.