



## Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do “amplicon” e ajustes no processamento da amostra

Improvement of *Mycoplasma gallisepticum* PCR by amplicon shortening and adjustments in sample processing

Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>1</sup>, Maria da Graça Fichel do Nascimento<sup>2</sup>, Maurício Pinheiro de Vasconcelos<sup>3</sup>, Maria Lúcia Barreto<sup>4</sup>, Juliana Ferreira de Almeida<sup>4</sup>, Carlos Augusto de Martino Campos<sup>5</sup> & Virginia Léo de Almeida Pereira<sup>1</sup>

### RESUMO

A micoplasmose por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) causa enormes prejuízos aos avicultores e, apesar disto, ainda carece de aprimoramento diagnóstico. O diagnóstico molecular, principalmente PCR, tem sido aprimorado pela facilidade em detectar o agente de forma direta e ser um método rápido e eficaz. Neste estudo, desenvolveu-se uma PCR para MG com “amplicon” de 481 pares de base (pb), denominado MG-PCR/481, no qual se utilizou um método simples de processamento das amostras, constituídas de cultivos de diferentes cepas de MG e suabes de traquéia de galinhas poedeiras de um plantel positivo para MG. Esse processamento, que não incluiu a etapa de purificação de DNA, consistiu de tratamento das amostras com uma mistura de dois detergentes não iônicos, digestão com protease e calor. A eficácia do MG-PCR/481, cujos “primers” foram oriundos da porção interna de um fragmento de 732 pb de DNA de MG que havia sido usado previamente para a elaboração do MG-PCR/732, com processamento envolvendo as etapas de extração e purificação. MG-PCR/732 com esse método de processamento foi capaz de detectar consistentemente um número de células de MG equivalente a  $5.4 \times 10^2$  e inconsistentemente, um positivo em cinco tentativas, em se tratando de quantias inferiores. Por outro lado, MG-PCR/481 foi um logarítmico mais sensível que o anterior, sob as mesmas condições. Com suabe de traquéia, em estudo piloto, o MG-PCR/481 com este método de processamento também funcionou, pelo resultado de 70% (7/10) obtido para as aves testadas. O MG-PCR/481 foi mais sensível que o outro com “amplicon” de 732 pares de base (MG-PCR/732), mantendo a mesma especificidade. De acordo com esses resultados, o MG-PCR/481 é apresentado como mais uma opção ao diagnóstico molecular da infecção por MG.

**Descritores:** galinha, micoplasmose, *Mycoplasma gallisepticum*, diagnóstico, PCR, amplicon.

### ABSTRACT

It was developed a *Mycoplasma gallisepticum* (MG) PCR with amplicon of 481 base pairs (bp), referred to as MG-PCR/481, in which it was used a simple processing method for the PCR sampling material. These specimens were represented by MG broth cultures of different strains, and tracheal swabs from layer chickens positive to MG. This processing procedure, which did not include the DNA purification step, consisted of treatment of the specimens with a non-ionic mixture of two detergents, protease digestion and heat. The efficacy of MG-PCR/481, with primers coming from the internal portion of a MG 732 bp DNA fragment was used. This DNA was used, previously, for the development of MG-PCR/732 with sample processing method that included the steps of DNA extraction and purification. MG-PCR/732 with this new processing method was capable of detecting, consistently, MG cell numbers equivalent to  $5.4 \times 10^2$ , but, inconsistently, one out of five trials, in case of smaller cell amounts. On the other hand, MG-PCR/481 was a log more sensitive than the latter, under the same conditions. In a pilot trial with chicken tracheal swabs, MG-PCR/481 with the processing method presented hereon also worked by yielding 70% positivity (7/10) in tested birds. MG-PCR/481 was more sensitive than the other one that yielded a 732 bp amplicon (MG-PCR/732), keeping the same specificity. As to these results, MG-PCR/481 represents one more option to the molecular diagnosis of MG infection.

**Key words:** chicken, mycoplasmosis, *Mycoplasma gallisepticum*, diagnosis, PCR, amplicon.

## INTRODUÇÃO

A micoplasmose por *Mycoplasma gallisepticum* (MG), que causa enormes prejuízos aos avicultores, ainda carece de aprimoramento diagnóstico, o que resulta na demanda por isolamento [8]. A PCR tem sido preferida para aperfeiçoamento [10] por detectar o agente de forma direta, com rapidez e eficácia [1,7,11]. Em estudo pioneiro, uma PCR (“polymerase chain reaction”) para MG com “amplicon” de 732 pares de base (pb) e referida aqui como MG-PCR/732, empregou DNA extraído e purificado de células de MG [11]. O processamento simplificado de material para PCR tem-se utilizado de filtração e/ou purificação de espécimes para a obtenção de DNA, onde o diluente empregado tem sido tampão [1,2,4,6,13]. Com o acondicionamento de espécimes em meio de cultura específico, tende-se a favorecer também o isolamento de micoplasmas, o que pode ser obtido com o uso do meio de Frey, que suporta o crescimento de várias espécies de micoplasmas aviários, incluindo MG e *M. synoviae* (MS) [5,8,9].

Durante estágios precoces ou tardios da infecção por MG, o número de micoplasmas pode ser muito pequeno, resultando em testes PCR falsos-negativos, se um processamento clássico de extração e purificação de DNA dos espécimes [13], onde pode haver perdas de DNA, for utilizado. Isto também pode ser atenuado se uma PCR mais sensível for empregada.

Para tanto, objetivou-se a elaboração de uma PCR com “amplicon” mais curto, visando aumentar a sensibilidade na detecção de MG, aliado a um método de processamento de espécimes para PCR, onde a perda de DNA pela purificação fosse evitada e sem que houvesse prejuízo para o isolamento do MG ou outro micoplasma aviário presentes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Micoplasmas usados na padronização da PCR

Um total de 17 cepas de MG e 16 outras espécies de micoplasmas [16] foram usadas. Dessas cepas de MG, 12 haviam sido descritas antes [7,11] enquanto cinco, são isolados de campo, identificados como tipo MG-F: MG/F-vacina D, MG/F-vacina I<sup>e</sup> e MG/F-Sa45 e tipo MG S6: MG-M35 e MG-M876.

Os micoplasmas utilizados foram cultivados em meio apropriado (Frey completo ou modificado), sendo os cultivos em caldo, obtidos após 24-48 horas em estufa à temperatura de 37°C [9,12]. Somente a cepa MG-S6 foi quantificada em unidade formadora de colônia (UFC), através de 10 diluições decimais seria-

das [12], sendo as alíquotas de cada diluição utilizadas para processamento imediato.

Foram obtidos suabes de traquéia [3] de 10 galinhas de postura, aparentemente saudáveis, mas oriundas de um lote positivo para MG por sorologia e isolamento [15] e com 70 semanas de idade, de um criatório nas proximidades. Os suabes foram postos em tubos de ensaio com 0,5 mL de meio de Frey contendo soro suíno, NAD e vermelho de fenol. Os suabes foram lavados e descartados, e esses volumes de 0,5 mL repassados para novos tubos com 5,0 mL de meio e cultivados conforme descrito. Um volume de 100 µL de cada cultivo foi usado no MG-PCR/481.

### Processamento de espécimes para PCR

Após modificações de métodos de processamento previamente descritos [2,4,6,14] e alguns ensaios com MG-PCR/732, decidiu-se utilizar o seguinte procedimento: 10-15 µL de espécime (cultivo ou lavado de suabes) diluído em igual quantidade de uma mistura de detergente não iônicos (Nonidet P-40<sup>1</sup> e Tween-20<sup>1</sup>) a 0,45% cada, adicionada de uma solução de proteinase K<sup>1</sup> (10mg/mL) em volume equivalente a 10% da mistura de detergente, seguida de calor (56°C /1 hora e 100°C /10 minutos).

### MG-PCR

O MG-PCR/732, produz “amplicon” de 732 pb, cuja comprovação foi feita por uma sonda de 481 pb, gerada pelos “primers” 5'- CGT GGA TAT CTT TAG TTC" CAG CTG C – 3' e 5'- GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T – 3' em PCR, que foram obtidos da porção interna de um fragmento de 732 pb [11]. Esse par de “primers” foi utilizado no MG-PCR/481, cuja especificidade foi testada em 100 µL de cultivo (aproximadamente 10<sup>6</sup> células) de 16 espécies heterólogas de micoplasma, enquanto sua sensibilidade foi testada em 10 µL da diluição 10<sup>-3</sup> (aproximadamente 10<sup>3</sup> células) de cada uma das 17 cepas de MG. Adicionalmente, o MG-PCR/481 foi validado usando-se 10-15 µL do lavado de suabes traqueal de 10 galinhas poedeiras, aparentemente saudáveis, de um lote com diagnóstico positivo para MG.

Um volume de 10 µL de cada diluição decimal da cepa de MG-S6 foi usado no MG-PCR/732 e MG-PCR/481 para se determinar o número mínimo de células capaz de produzir resultado positivo, em cinco repetições. Adicionalmente, outros 10 µL em quatro repetições de cada uma das diluições de MG-S6 foram misturados com 100 µL de cultivo (aproximadamente

$10^6$  células) de *M. synoviae* e *M. gallinaceum* e submetidos ao MG-PCR/732 e MG-PCR/481. Nos casos onde 100 ou 110  $\mu\text{L}$  de espécimes foram usados, os mesmos foram centrifugados em microtubos de 1,5 mL por 15 minutos em centrífuga refrigerada<sup>2</sup> a 18403 xg, sendo o líquido sobrenadante removido em quantidade suficiente para deixar 10-15  $\mu\text{L}$  para processamento e PCR.

Os microtubos de 0,5 mL com a quantidade ideal de cada um tipo de espécime, receberam os reagentes para o PCR em volumes e concentrações, conforme mencionado [11] e foram colocados em termociclador<sup>3</sup>. O teste foi realizado como descrito originalmente [11], mas com o número de ciclos aumentado de 35 para 40. Os produtos ampliados do MG-PCR/481 em volumes de 20  $\mu\text{L}$  foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio.

### RESULTADOS

Em relação ao estudo de sensibilidade comparativa com o MG cepa-S6 para “amplicons” de tamanho maior (732) e menor (481), o número mínimo de células detectado (reação positiva) pelo MG-PCR/732, sob forma consistente, foi de  $5,4 \times 10^2$  (Figura 1), sendo a positividade inconsistente diante de quantidades inferiores de células de MG (um positivo em cinco tentativas), diferente do MG-PCR/481 cuja quantidade mínima de células detectada consistentemente foi de

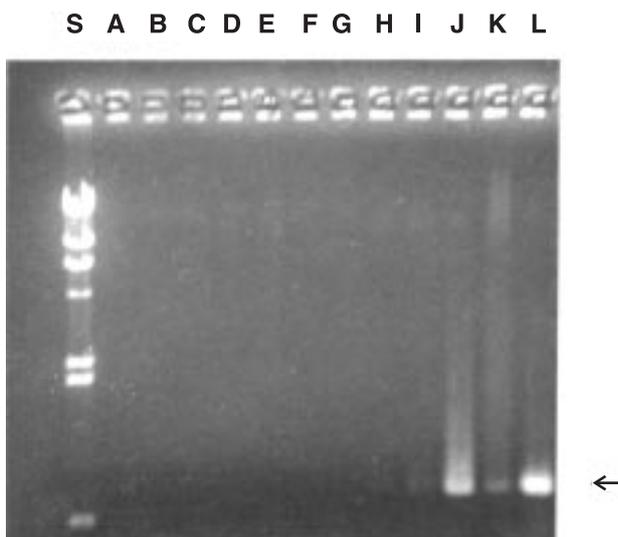
$5,4 \times 10^1$  (Figura 2). Com o presente método de processamento de espécimes para a realização da PCR, observou-se, em relação ao MG-PCR/481, reações positivas para todas as cepas de MG testadas (Figura 3), e reações negativas para todas não-MG (Figura 4).

Das 10 galinhas provenientes de um plantel positivo para MG, por sorologia e isolamento, sete foram positivas para MG no MG-PCR/481, usando-se como espécime o lavado de suabe de traquéia em meio líquido de Frey. A mistura de diluições do MG-S6 com cultivos de espécies de micoplasma heterólogas não interferiu nos resultados do MG-PCR/732 ou MG-PCR/481.

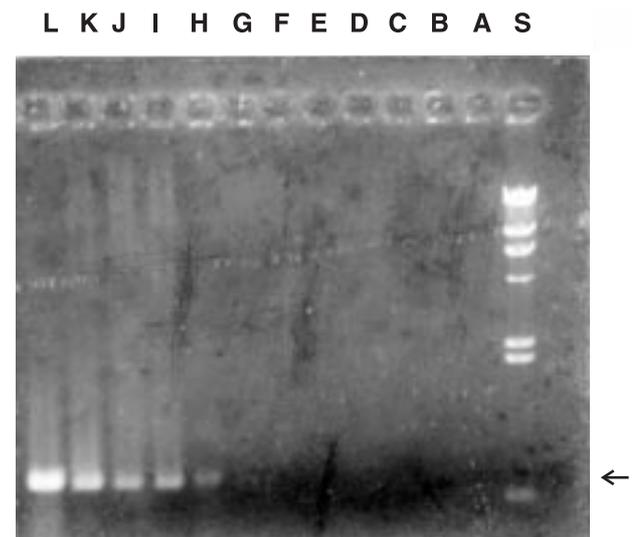
### DISCUSSÃO

O processamento dos espécimes pelo emprego de detergentes, protease e calor destina-se a romper as células de MG e expor suas moléculas de DNA, sendo o aquecimento a  $56^\circ\text{C}$  por 1:00 hora ideal para a ação da proteinase K, enquanto a temperatura de  $100^\circ\text{C}$  por 10 minutos destinou-se à inativação da protease e outras substâncias incompatíveis com a Taq DNA polimerase [6].

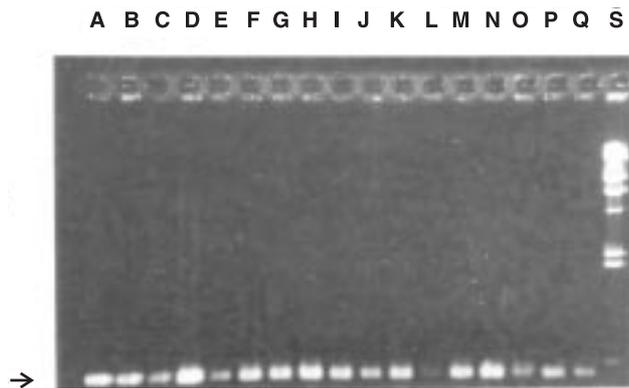
A ausência da etapa de purificação de DNA, nesse método de processamento, não afetou a sensibilidade do MG-PCR/732, a julgar pela elevada sensibilidade, detecção consistente de  $5,4 \times 10^2$  células. A eficácia desse método de processamento pôde ser ava-



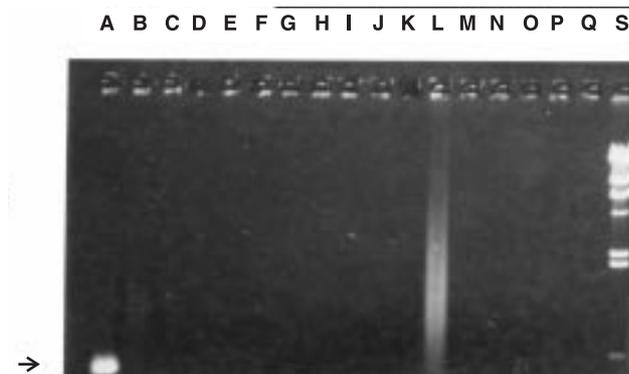
**Figura 1.** Gel de agarose das amplificações (“amplicons”) por PCR de cultivo de MG-S6 em volume de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição decimal decrescente, iniciando com  $5,4 \times 10^5$  (poços de L a A). Poço S, representa o peso molecular padrão, fago Lâmbda cortado com Hind III. A seta indica o peso molecular correspondente a amplificação do MG-PCR com 732 pb.



**Figura 2.** Gel de agarose das amplificações (“amplicons”) por PCR de cultivo de MG-S6 em volume de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição decimal decrescente, iniciando com  $5,4 \times 10^5$  (poços de L a A). Poço S, representa o peso molecular padrão, fago Lâmbda cortado com Hind III. A seta indica o peso molecular correspondente a amplificação do MG-PCR com 481 pb.



**Figura 3.** Gel de agarose das amplificações do MG-PCR/481 em 10 µL (aproximadamente  $10^3$  células) de cada uma das 17 cepas de MG. Poços A = F-K810; B = F2F10; C = F-Connecticut; D = F-AA; E = F(g99); F = Vacina D; G = F-vacina I; H = Sa45; I = S6 (208); J = PG31; K = A5969; L = R; M = Fg38; N = F-Wichmann; O = V503; P = M35 e Q = M876. Poço S, representa o peso molecular padrão, do Fago Lâmbda cortado com Hind III. A seta indica o peso molecular da amplificação correspondente a 481 pb.



**Figura 4.** Gel de agarose das amplificações do MG-PCR/481 em 100 µL (aproximadamente  $10^6$  células) de cada uma das 16 espécies não-MG de *Mycoplasma* (Poços B a Q). Poço A, PCR em 10 µL (aproximadamente  $10^3$  células) de MG-S6 (208). B = *M. synoviae* cepa WVU1853; C = *M. pullorum* CKK; D = *M. gallinaceum* DD; E = *M. glycophilum* 486; F = *M. gallopavonis* WR1; G = *M. gallinarum* PG16; H = *M. iners* PG30; I = *M. cloacale* 383; J = *M. anseris* 1219; K = *M. meleagridis* 17529; L = *M. iowae* 695; M = *M. lipofaciens* R171; N = *M. anatis* 13 40; O = *M. columborale* MMP4; P = *M. columbinum* MMP1 e Q = *M. columbinasale* 694. A seta indica o peso molecular correspondente a amplificação de 481 pb.

liada também pela sensibilidade do MG-PCR/481 de  $5.4 \times 10^1$  células de MG. A reação positiva do MG-PCR/481 em menor quantidade de células que o MG-PCR/732, sem afetar a sua especificidade, alia-se a idéia de que a PCR com “amplicon” mais curto está relacionada com maior sensibilidade, mas em se tratando de

fragmentos de DNA homólogos, conforme resultados deste estudo, que empregou “primers” oriundos da porção interna da sequência de DNA que gerou o MG-PCR/732 [11].

A especificidade do MG-PCR/481 ao ser comprovada pela ausência de amplificação, em se tratando de micoplasmas heterólogos, é encorajadora, pois micoplasmas não patogênicos, bem como outros estreitamente relacionados ao MG, como o *M. synoviae*, estão frequentemente presentes em espécimes clínicos [15].

Não houve necessidade de comprovação dos “amplicons”, das amostras de MG e espécimes de traqueia de galinhas, gerados pelo MG-PCR/481 e somente visualizados em gel de eletroforese, em virtude dos “primers” aqui utilizados e seus produtos de amplificação já terem sido submetidos à hibridação com sonda de DNA específico em “Southern blot”, anteriormente [11].

As manchas, em faixas, observadas nos géis de reação da PCR, visualizadas em gel de agarose por eletroforese e corado com brometo de etídio, são facilmente diferenciadas das bandas de DNA ampliadas especificamente, podendo ter sido causadas por impurezas, devido a falta da etapa de purificação durante o processamento [11].

#### CONCLUSÕES

Em virtude da eficácia do MG-PCR/481, observou-se, uma relação entre redução do tamanho do “amplicon” e o subsequente aumento da sensibilidade da PCR, o que pode aumentar a chance diagnóstica da infecção por MG em aves.

Conforme o método de processamento exposto, ficou comprovado que a etapa de purificação, que pode incorrer em perda de DNA, pode ser suprimida sem afetar a eficácia da PCR para o diagnóstico da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* (MG).

**Agradecimentos.** Ao CNPq e à FAPERJ, pelos recursos concedidos.

#### NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Sigma Chemical Co., P.O. Box 4508, MO, USA.

<sup>2</sup>Centrífuga Refrigerada, marca ALC, modelo PK121R, com rotor angular para microtubos, Itália.

<sup>3</sup>Termociclador MJR-100 Life Science, São Paulo, SP.

#### REFERÊNCIAS

- 1 **Arrand J.E. 1987.** Preparation of nucleic acid probes. In: Hames B. D. & Higgins J. (Eds). *Nucleic acid hybridization. A practical approach*. Oxford: IRL Press, pp.17-45.
- 2 **Bernet C.M., Garret B., Barbeyrac D., Bebear C. & Bonnet J. 1989.** Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 2492-2496.
- 3 **Branton S.L., Gerlach H. & Kleven S.H. 1984.** *Mycoplasma gallisepticum* isolation in layers. *Poultry Science*. 63: 1917-1919.
- 4 **Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J & White T.J. 1990.** *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press Inc., 482p.
- 5 **Jordan F.T.W. 1983.** Recovery and identification of avian mycoplasmas. In: Tully J. G. & Razin S. (Eds). *Methods in Mycoplasmaology. Diagnostic mycoplasmaology*. v. 2. London: Academic Press Inc., pp. 69-79.
- 6 **Kawasaki E.S. 1990.** Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (Eds). *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press Inc., pp.146-152.
- 7 **Khan M.I., Kirkpatrick B.C. & Yamamoto R. 1989.** *Mycoplasma gallisepticum* species and strain-specific recombinant DNA probes. *Avian Pathology*. 18: 135-146.
- 8 **Nascimento E.R. 2000.** Micoplasmoses. In: Macari M. & Berchieri Jr. A. (Eds). *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, pp. 217-240.
- 9 **Nascimento M.G.F. & Nascimento E.R. 1986.** Infectious sinusitis in coturnix quails in Brazil. *Avian Diseases*. 30: 228-230.
- 10 **Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Nascimento M.G.F. & Barreto M.L. 2005.** Avian mycoplasmosis update. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 7: 1-9.
- 11 **Nascimento E.R., Yamamoto R., Herrick K.R. & Tait R.C. 1991.** Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*. 35: 62-69.
- 12 **Rodwell A.W. & Whitcomb R.F. 1983.** Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. In: Razin S & Tully J.G. (Eds). *Methods in mycoplasmaology. Mycoplasma Characterization*. v.1. London: Academic Press Inc., pp.185-196.
- 13 **Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989.** *Molecular cloning. A laboratory manual*. v.1. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratories, pp.1.21-1.43.
- 14 **Van Eys G.J.M., Gravekamp C., Gerritsen M.J., Quint W., Cornelissen M.T.E., Ter-Schegget J. & Terpstra W.J. 1989.** Detection of *Leptospiras* in urine by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 2258-2262.
- 15 **Yoder Jr. W. H. 1991.** *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Calneck B. W., Barnes H. J., Beard C. W., Reid W. M. & Yoder Jr. H.W. (Eds). *Diseases of poultry*. 9th edn. Ames: Iowa State University Press, pp.198-212.
- 16 **Zhao S. & Yamamoto R. 1990.** Recombinant DNA probes for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*. 34: 709-716.