

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA NUEVA PCR ANIDADA (nPCR) PARA ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

Tamiozzo, P.J.*^{1,3}; Lucchesi, P.M.A.^{2,3}; Ambrogi, A¹

1-Departamento Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km 601. Río Cuarto. Córdoba. República Argentina. 2-Lab. Inmunoquímica y Biotecnología-Fac. Cs. Veterinarias-UNCPBA Paraje Arroyo Seco s/n, Tandil, Prov. Bs As. República Argentina. CONICET. 3- CONICET- *e-mail: ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha informado que el análisis de la secuencia que codifica para una posible adhesina (P146) es útil para determinar la diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp). Para ello, Mayor *et al.* (2007) compararon una región del gen *p146* amplificada por PCR (200 pb aprox.) que incluye una porción codificante de repeticiones de serina. De acuerdo a ensayos en nuestro laboratorio, la PCR arriba citada es incapaz de amplificar material genético a partir de muestras de hisopado nasal, en cambio es capaz de hacerlo a partir de muestras de lavado bronquial. Dada la necesidad de obtener los resultados rápidamente (para estudios de brotes), y sin sacrificar animales (muchas veces valiosos) resulta necesario contar con pruebas sensibles. Por ello el objetivo del presente trabajo fue desarrollar y evaluar una nPCR que permita la posterior caracterización de Mhp en muestras con escasa cantidad de ADN como son los hisopados nasales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de cebadores y condiciones de la PCR: Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Primer3, tomando como base las secuencias del gen *p146* de las 3 cepas de Mhp disponibles en el GenBank (J, 232, 7448). Los cebadores que se diseñaron fueron: MhT146F 3'-GCTGGGATAAGCGATACCAA-5' y MhT146R 3'-GCTTCCATGTTTGGCATT-5'. Además se evaluó la especificidad de los cebadores mediante PCR *in silico*. Se realizó la nPCR *in vitro* utilizando como cebadores externos los informados en este estudio, y como cebadores internos los descritos por Mayor *et al.* (2007). Las condiciones de la primera reacción fueron las siguientes: en un volumen final de 30 μ l con 3 μ l de ADN templado, 200 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada cebador, 3mM de MgCl₂ y 2,5 U Taq polimerasa (Invitrogen, Argentina). Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min seguido por 35 ciclos de 94°C por 2 min (desnaturalización), 56°C por 2 min (*annealing*) y 72°C por 2 min (extensión), con una extensión final de 72°C por 10 min. La segunda reacción fue realizada tomando 2 μ l del producto de la primera reacción con las mismas condiciones y cebadores descritos por Mayor (2007). Para evaluar la especificidad, fueron sometidos a la PCR ADN de los siguientes microorganismos: Mhp cepa 232, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 2, 8, 1-9-11, 3-6, 7, cepas de campo de: *Escherichia coli* (1), *Haemophilus parasuis* (4), *Streptococcus suis* (3) *Pasteurella multocida* (2), *Bordetella bronchiseptica* (1), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Mycoplasma gallisepticum* (X95), *M. synoviae* (WVU), *M. mycoides* (V. myc PG1) y *M. hyorinis* (BTS-7). Para estimar la sensibilidad se hicieron diluciones 1-10 de ADN de cepa pura (Mhp 232) con una concentración inicial de 207,87 ng/ μ l. Además fueron analizadas 7 muestras de lavado bronquial y 19 muestras de hisopado nasal en las que previamente se había detectado Mhp por nPCR

según el protocolo de Calsamiglia *et al.* (1999). Las muestras se analizaron por PCR convencional (Mayor *et al.*, 2007) y por la nPCR propuesta en este estudio y luego se infirió sobre dos proporciones independientes (Epidat 3.1).

RESULTADOS

Tanto la primera como la segunda reacción fueron específicas para Mhp ya que ningún otro patógeno amplificó, y tampoco se encontró coincidencia en el alineamiento de los cebadores con las secuencias disponibles en el GenBank no pertenecientes a Mhp. Mediante PCR *in silico* se obtuvieron amplicones de 1161, 1167 y 1233 bp con las cepas de Mhp J, 232, 7448, respectivamente. La nPCR fue capaz de detectar hasta la dilución 10⁻³ (207,87 pg/ μ l de ADN). La figura 1 muestra los amplicones según la dilución en base 10.

Figura 1. Producto de ambos formatos de PCR en diluciones 1-10. MW: 100pb. Tamaño de la banda entre 200 y 300 pb.

PCR convencional (Mayor 2007)	nPCR descrito en este estudio
	
MW puro 10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³	MW puro 10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³

El cuadro 1 muestra los resultados de lavado bronquial e hisopado nasal de ambos formatos de PCR. Se obtuvo un valor de p=0.0261 al comparar las muestras de hisopado nasal de ambas PCRs.

Cuadro 1. Ambos tipos de muestras procesadas por los 2 formatos de PCR.

MUESTRA	PCR Mayor (2007)	nPCR (Este estudio)
Hisopado nasal	0/19	6/19
Lavado bronquial	7/7	7/7

DISCUSION

Tanto el alineamiento de cebadores mediante PCR *in silico* como las pruebas con los diferentes patógenos demuestran que la nPCR es específica para Mhp. Respecto a la sensibilidad, si bien la cantidad mínima de ADN detectada es mayor a otros nPCR (Calsamiglia *et al.*, 1999) y ambos formatos de PCR fueron amplificaron hasta la dilución 10⁻³, el nPCR mostró bandas más definidas. En las muestras clínicas procesadas se evidencia la mayor sensibilidad de la nPCR con respecto a la PCR de Mayor *et al.* (2007), ya que fue capaz de detectar una mayor cantidad de positivos en muestras de hisopado nasal (p<0.05). La nPCR propuesta permite trabajar con muestras de hisopado nasal, lo cual es más rápido que trabajar con lavados bronquiales sin tener que sacrificar animales permitiendo realizar estudios de brote casi de manera simultánea al mismo.

BIBLIOGRAFÍA

Mayor *et al.* 2007. Vet Res 38(3):391-8.
Calsamiglia *et al.* 1999 J Vet D Invest 11(3): 246-251.