

El uso de reacciones de PCR anidadas mejora la tipificación genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de diferentes muestras clínicas

The use of nested PCR reactions improves genetic typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different clinical samples

REBAQUE, F.¹, LUCCHESI, P. M. A. ², AMBROGI, A.¹, TAMIOZZO, P. J.¹

¹Universidad de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Departamento Patología Animal. ²CIVETAN, UNCPBA, CICPBA, CONICET, Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias.

RESUMEN

Identificar distintos genotipos de *Mycoplasma hyopneumoniae* es importante para estudiar y entender mejor algunos aspectos epidemiológicos de la enfermedad que éste produce. La metodología de MLVA (*Multiple-Locus Variable-number tandem-repeats Analysis*) sería la más adecuada para la tipificación del patógeno a partir de muestras clínicas. El objetivo del presente trabajo fue diseñar PCR anidadas para los loci VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) P97, H4 y H5 con la finalidad de obtener pruebas de mayor sensibilidad analítica. Para evaluarlas se analizaron muestras de ADN positivas para *M. hyopneumoniae* en paralelo con una PCR convencional para cada locus y se compararon las proporciones de positivos con cada formato. Dada la mayor sensibilidad de las reacciones desarrolladas en el presente estudio, se recomienda utilizar reacciones anidadas de estos loci para la tipificación de *M. hyopneumoniae* en muestras clínicas, y realizarlas en conjunto con la PCR anidada para el locus P146 previamente informada.

Palabras clave: (*Mycoplasma hyopneumoniae*), (genotipos), (muestras clínicas), MLVA, P97, P146, H4, H5.

Correspondencia *e-mail*: Pablo Tamiozzo topo.vet@gmail.com

Fecha de recepción: 30-11-2016

Fecha de aceptación: 22-06-2017

ABSTRACT

It is important to identify distinct *Mycoplasma hyopneumoniae* genotypes to improve the study and understanding of some epidemiological aspects of the disease it produces. MLVA (*Multiple-Locus Variable-number tandem-repeats Analysis*) methodology would be the most adequate for typing this pathogen from clinical samples. The objective of the present study was to design nested PCR assays for VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) loci P97, H4, and H5 with the aim to obtain a high analytical sensitivity. To evaluate them, DNA samples positive for *M. hyopneumoniae* were analyzed by the nested PCR assays in parallel to conventional PCR assays, and the proportion of positive results with each approach were compared. Taking into account the higher sensitivity of the PCR assays developed in this study, it was concluded that the recommended approach to type *M. hyopneumoniae* from clinical samples – even when they contain a low load of the agent– is to perform nested PCR assays for these loci, along with the other one previously informed for P146.

Keywords: (*Mycoplasma hyopneumoniae*), (genotypes), (clinical specimens), MLVA, P97, P146, H4, H5.

INTRODUCCIÓN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una enfermedad respiratoria crónica de los cerdos ¹¹ de alto impacto económico en la producción porcina de nuestro país y el mundo. Reconocer distintos genotipos del microorganismo es importante ya que permitiría entender mejor algunos aspectos epidemiológicos que redundarían en un mejor control de la NEP. Tal variabilidad ha sido informada utilizando distintas técnicas moleculares ⁵⁻⁷, de las cuales el análisis de las repeticiones en tándem de número variable en múltiples loci (MLVA, por sus siglas en inglés) ha sido señalado como el más adecuado para la tipificación del patógeno a partir de muestras clínicas ¹².

El desarrollo y/o adaptación de estas técnicas con una gran sensibilidad analítica es ideal ya que permitiría la identificación de perfiles genéticos del agente a partir de muestras con baja carga del microorganismo, lo que resulta en la posibilidad de tomar muestras clínicas poco invasivas. Así, la utilización de la técnica de PCR anidada sería

de elección para trabajar con material clínico, dada su elevada sensibilidad.

Debido a que dentro del amplio repertorio de regiones polimórficas propuesto por de Castro *et al.*², los loci P146, P97, H4 y H5 han sido señalados como los más polimórficos ^{2, 12} y dado que nosotros ya hemos informado sobre el desarrollo de una PCR anidada para la región R3 del locus P146 ⁸ que ha permitido la tipificación genética del agente a partir de muestras clínicas ^{8, 10}, el objetivo del presente trabajo fue diseñar PCR anidadas para los loci P97, H4 y H5 con la finalidad de obtener pruebas de mayor sensibilidad analítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina), de acuerdo con las normas internacionales del Consejo Internacional de Organizaciones de las Ciencias Médicas (CIOMS).

En distintos experimentos se amplificaron mediante reacciones de PCR estándar y PCR

anidadas tres regiones VNTR altamente polimórficas de los loci: P97, H4, H5 a partir de diferentes tipos de muestras. Todas las muestras habían sido positivas a la PCR anidada considerada tamiz, que se utiliza de rutina en el Laboratorio de Patología Animal-FAV-UNRC para la detección de *M. hyopneumoniae*¹.

Previo al análisis de las muestras y con el fin de estimar la sensibilidad de las PCR de tres loci analizados, se hicieron cinco diluciones en base 10 del ADN de una cepa pura (*M. hyopneumoniae* 232) con una concentración inicial de 207,87 ng/μl, que fueron amplificadas por ambos formatos de PCR utilizando los cebadores y condiciones propias de cada loci que se detallan en cada experimento.

Experimento 1: VNTR R1 del locus P97

Se trabajó con un total de 48 muestras de ADN de distintos orígenes [23 muestras provenientes de seis bacterinas comerciales contra *M. hyopneumoniae*, 14 muestras de lavados bronquio-alveolares (LBA) y 11 muestras de hisopados nasales (HN)]. Las muestras fueron amplificadas independientemente por una PCR convencional y otra anidada. La primera, considerada la PCR estándar, utilizando los cebadores y condiciones descritas por de Castro *et al.*² para el locus P97R1. La segunda, una PCR anidada utilizando en la primera ronda de amplificación esos cebadores y condiciones, y en la segunda utilizando los cebadores y condiciones descritas por Vranckx *et al.*¹² para el mismo locus con las siguientes condiciones de ciclado: 95°C por 5 min de desnaturalización inicial, 35 ciclos de 95°C por 45 seg (desnaturalización), 52°C por 45 seg (*annealing*) y 72°C por 45 seg (extensión), con una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Al igual que en los experimentos que se describen a continuación, se comparó la proporción de muestras positivas a la PCR estándar *vs* la PCR anidada usando el programa Epidat 4.1

Experimento 2: VNTR H4

En este caso se trabajó con 21 muestras de ADN de distintos orígenes (6 de bacterinas comerciales de *M. hyopneumoniae*, 11 de LBA y 4 de HN). Para la PCR estándar, se utilizaron los cebadores y condiciones descritas por de Castro *et al.*² para el locus H4. En la primera ronda de amplificación de la PCR anidada se utilizaron dichos cebadores y condiciones, y en la segunda ronda, los informados por Vranckx *et al.*¹².

Experimento 3: VNTRs R1/R2 del locus H5

Para el desarrollo de una PCR anidada de los VNTRs del locus H5, se diseñaron cebadores para la primera ronda de amplificación y se determinaron las condiciones para la misma. Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Primer3 (v. 0.4.0), tomando como base las secuencias del gen H5 de tres cepas de *M. hyopneumoniae* disponibles en el GenBank (secuencias codificantes MHJ0662 de la cepa J, mhp683 de la cepa 232 y MHP0662 de la cepa 7448). Los cebadores diseñados fueron: H5TAM-F 3'-GCAAAAATAGGTAAGGGGTCAA-5' y H5TAM-R3'-TTTGATTTTGCCTGGGAAGT-5'. La especificidad de los cebadores fue evaluada *in silico* utilizando Primer-BLAST e *in vitro* amplificando ADN de: *M. hyopneumoniae* (cepa 232), cepas vacunales de dos bacterinas comerciales contra el agente, *Mycoplasma gallisepticum* (cepa X95), *Mycoplasmas ynoviae* (cepa WVU), *Mycoplasma mycoides* (V. myc PG1), *Mycoplasma hyorhinis* (cepa BTS-7) y cepas de campo de *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense*. Las condiciones de amplificación fueron: 30 μL de volumen final, con 5 μL de ADN templado, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada cebador, 3 mM de MgCl₂, buffer de PCR 1X (provisto con la Taq polimerasa) y 2,5 U Taq polimerasa (T-Plus ADN polimerasa, Inbio-Highway), bajo las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguida 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.

Una vez confirmada la especificidad y luego de determinar la sensibilidad, se trabajó con 57 muestras de LBA que fueron amplificadas con la PCR estándar utilizando los cebadores y condiciones descriptos por de Castro *et al.*² y una PCR anidada, utilizando en la primera ronda de amplificación los cebadores H5TAM-F/H5TAM-R bajo las condiciones arriba descriptas y en la segunda ronda de amplificación los cebadores y condiciones descriptos por de Castro *et al.*² utilizando como templado 2 μ L del producto de la primera reacción.

RESULTADOS

Para los tres loci analizados, la sensibilidad de la PCR anidada fue mayor a la PCR estándar (tabla 1). En el caso de P97 y de H4, la PCR anidada fue capaz de detectar una dilución más que la PCR estándar, siendo la sensibilidad de la PCR anidada equivalente a una concentración en la muestra de 2,08 ng de ADN de *M. hyopneumoniae*/ μ L para P97 y de 0,21 ng de ADN/ μ L para H4. En el caso de H5, el uso de la PCR anidada permitió detectar hasta dos diluciones más (0,02 ng/ μ L) respecto a la PCR estándar (tabla 1).

Tabla 1. Límite de detección de las PCR estándar y anidadas para los loci P97, H4 y H5 utilizando diluciones en base 10 de ADN de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

Loci	Reacción	Diluciones base 10 ADN <i>M. hyopneumoniae</i> cepa 232					
		puro	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
		207,8 ng/ μ L	20,8ng/ μ L	2,08 ng/ μ L	0,21 ng/ μ L	0,02 ng/ μ L	0,002 ng/ μ L
P97	Estándar	+	+	-	-	-	-
	Anidada	+	+	+	-	-	-
H4	Estándar	+	+	+	-	-	-
	Anidada	+	+	+	+	-	-
H5	Estándar	+	+	+	-	-	-
	Anidada	+	+	+	+	+	-

La mayor sensibilidad de las PCR anidadas se observó de igual modo en el análisis de las muestras clínicas ya que su uso permitió la amplificación de una mayor proporción de muestras que fue

estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para H4 y H5. En las tablas 2 y 3 se muestra la proporción de positivos para cada tipo de muestra y el total para P97 y H4 respectivamente.

Tabla 2. Proporción de muestras donde se obtuvo amplificación para el VNTR R1 P97 con la PCR estándar (cebadores descriptos por de Castro *et al.* 2006) vs PCR anidada (cebadores descriptos por de Castro *et al.*² +Vranckx *et al.*¹²). * $p = 0,057$

Muestra	PCR estándar	PCR anidada
Bacterinas	3/23	8/23
LBA	10/14	11/14
HN	0/11	4/11
TOTAL	13/48*	23/48*

REACCIONES DE PCR ANIDADAS PARA TIPIFICACIÓN GENÉTICA DE *M. HYOPNEUMONIAE***Tabla 3.** Proporción de muestras donde se obtuvo amplificación para el VNTR H4 con la PCR estándar (cebadores descriptos por de Castro *et al.*²) vs PCR anidada (cebadores descriptos por de Castro *et al.*²- Vranckx *et al.* ¹²).* $p = 0,049$ (IC95% - 0,555 -0,017).

Muestra	PCR estándar	PCR anidada
Bacterinas	3/6	5/6
LBA	10/11	11/11
HN	1/4	4/4
TOTAL	14/21*	20/21*

Respecto al locus H5, los cebadores diseñados fueron específicos *in silico e in vitro* puesto que no amplificaron en otras muestras que no fueran *M. hyopneumoniae*. La PCR estándar detectó 16/57 muestras de LBA, mientras que la PCR anidada detectó 35/57 ($p = 0,0007$ [IC95% - 0,523 -0,144]).

Los productos de PCR de los tres loci fueron secuenciados y este análisis confirmó la especificidad de la PCR anidada.

DISCUSIÓN

La identificación de distintos perfiles genéticos de *M. hyopneumoniae* resulta muy útil para estudios epidemiológicos enfocados a identificar el origen de brotes, evaluar la transmisión aérea ³, determinar infección o reinfección y evaluar programas de saneamiento de granjas porcinas⁹. Contar con técnicas muy sensibles permitiría realizar estos estudios a partir de muestras poco invasivas, sin complicadas maniobras semiológicas y sin necesidad de sacrificar animales en las granjas, hecho que está siendo regulado por la Comunidad Económica Europea en lo que respecta a bienestar animal.

Los loci P97, P146, H4 y H5 son altamente polimórficos ² y son adecuados para la tipificación por MLVA de *M. hyopneumoniae* a partir de muestras clínicas ¹². Incluso un reciente estudio demostró un alto poder discriminatorio analizando sólo los loci P97 y P146 ⁴. Sin embargo, la incorporación de otros dos loci como H4 y H5 convierte a esta herramienta de tipificación en más robusta. En un trabajo previo, desarrollamos una reacción de PCR

anidada para el locus P146, que fue útil para la tipificación genética de *M. hyopneumoniae* en piaras de nuestro país ⁸ y también para la tipificación y posterior comparación de los perfiles genéticos de cepas vacunales y muestras de LBA de cerdos de distintas piaras ¹⁰.

Las reacciones anidadas, adaptadas y/o desarrolladas en el presente trabajo para los loci P97, H4 y H5 fueron más sensibles que las PCR estándar para los mismos loci desarrolladas por de Castro *et al.*². Esto aumenta las posibilidades de tipificar al agente a partir de muestras con escasa cantidad de ADN de *M. hyopneumoniae*, incluso en infecciones subclínicas, pudiéndose analizar muestras clínicas poco invasivas como hisopados nasales.

CONCLUSIÓN

Dado el alto grado de polimorfismo de los loci P97, P146, H4 y H5 y la mayor sensibilidad de las reacciones adaptadas y desarrolladas en el presente estudio, además de la previamente informada para P146, consideramos que la tipificación de *M. hyopneumoniae* utilizando reacciones anidadas de estos cuatro loci es la técnica recomendada cuando se analizan muestras clínicas, incluso cuando éstas posean una baja carga del agente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calsamiglia, M.; Pijoan, C.; Trigo, A. Applications of a nested- polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet. Diag. Inv. 1999; 1: 246-51.

REBAQUE, F.; LUCCHESI, P. M. A.; AMBROGI, A. & TAMIOZZO, P. J.

2. de Castro, L.A.; Rodrigues Pedroso, T.; Kuchiishi, S.S. et al. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet. Microbiol.* 2006; 116: 258-69.
3. Dee, S.; Otake, S.; Oliveira, S.; Deen, J. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* 2009; 40 (4): 39.
4. Dos Santos, L.F.; Sreevatsan, S.; Torremorell, M.; et al. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Vet. Microbiol.* 2015; 175:374-81.
5. Nathues, H.; Grosse Beilage, E.; Kreienbrock, L.; Rosengarten, R.; Sperser, J. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet. Microbiol.* 2011; 152:338-45.
6. Stakenborg, T.; Vicca, J.; Butaye, P.; et al. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 2005; 109 (1-2): 29-36.
7. Stakenborg, T.; Vicca, J.; Maes, D.; et al. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 66 (2): 263-75.
8. Tamiozzo, P.; Lucchesi, P.M.A.; Ambrogi, A. Diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas de Argentina [*Mycoplasma hyopneumoniae* genetic diversity in swine farms from Argentina]. *InVet.* 2011; 13:27-35.
9. Tamiozzo, P.; Lucchesi, P.M.A.; Ambrogi, A. Monitoring for *Mycoplasma hyopneumoniae* before and after a partial depopulation program using a typing scheme based on the polyserine repeat motif of p146. *J. Swine Health Prod.* 2013; 21: 309-12.
10. Tamiozzo, P.; Zamora, R.; Lucchesi, P.M.A. et al. MLVA typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and field strains. *Vet. Rec. Open.* 2015; 2:e000117.
11. Thacker, E.; Minion, C. *Mycoplasmosis. Diseases of Swine, 10th Edition.* Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2012.
12. Vranckx, K.; Maes, D.; Calus, D.; et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:2020-3.