

# Detección y diferenciación por PCR de aislados de campo de *Mycoplasma gallisepticum* y 6/85

H. REDONDO<sup>1</sup>\*, I. GIL<sup>1</sup>, B. SANCHEZ<sup>2</sup>, M.J.RODRIGUEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INGENASA, Spain, <sup>2</sup> ROCHE, Spain

\*E-mail: e.redondo@ingenasa.com

---

*Mycoplasma gallisepticum* (Mg) es un agente patogénico que causa importantes pérdidas económicas cada año. Mg causa un cuadro respiratorio crónico en pollos y sinusitis en pavos. Actualmente, existe un gran interés en el tipaje de vacunas y aislados salvajes de Mg. Las vacunas a diferenciar varían según los países y los programas de vacunación. El objetivo de este estudio ha sido la identificación y diferenciación de la cepa vacunal 6/85.

Hasta ahora, el estudio de un único gen no ha sido suficiente para tipificar aislados de *Mycoplasma*. Por tanto, el método no puede ser considerado como una caracterización de la cepa vacunal 6/85. Actualmente, otros genes significativos como RNAr16S, Lp, gapA, pvpA y mgc2, están bajo estudio. Para diferenciar aislados de campo de la vacuna 6/85, INGENASA ha desarrollado dos PCRs basadas en los genes codificantes de la Lipoproteína y la Citoadhesina.

Se diseñó una pareja de oligonucleótidos para cada PCR. - Los primers Lp fueron seleccionados por su sensibilidad y especificidad para detectar *M. gallisepticum* en muestras de campo sin necesidad de enriquecimiento previo. Además, permitían diferenciar algunos patrones mediante sondas, digestión (RFLP) y secuenciación. - Los primers mgc2 se diseñaron para amplificar una región del genoma que tiene una deleción en la cepa vacunal 6/85, de manera que el tamaño del fragmento amplificado permitía la diferenciación por migración en gel de agarosa.

Mediante este método encontramos: - cepas salvajes y 6/85 con un 99% de homología en la secuencia del gen Lp, pero diferente secuencia en el gen mgc2 y - otras cepas idénticas a la cepa vacunal 6/85 en todos los análisis realizados, incluyendo el análisis del gen mgc2.

Este método de caracterización de Mg basado en el análisis por secuenciación automática del gen Lp y de forma complementaria, de la longitud del fragmento del gen mgc2 para la detección y diferenciación de la cepa vacunal 6/85, es la mejor opción para diferenciar animales vacunados de aislados de campo, dada la situación española actual y podría ser muy útil en el seguimiento de la situación de las granjas.

---

**Palabras claves:** *Mycoplasma gallisepticum*; 6/85; PCR.

---

*Mycoplasma gallisepticum* (Mg) is a pathogenic agent, which causes important financial losses each year. Mg causes a Chronic Respiratory Disease (CRD) in chickens and sinusitis in turkeys. At present, there is a great interest in typing vaccines and wild type strains of *M. gallisepticum* (Mg). Types of vaccines to be differentiated vary depending on the country and the vaccination programs. The goal of these study was the identification and differentiation of the 6/85 vaccine strain. Up to now, the study of a unique gene has not been enough to carry out the characterization of *Mycoplasma* strains. Therefore it cannot be considered a final characterization method of the 6/85 vaccine strain. Currently, other significant genes such as RNAr 16S, Lp, gapA and pvpA and mgc2, are being studied in order to differentiate field isolates from the 6/85 vaccine. INGENASA has worked on the development of two PCRs based on the Lipoprotein and the Cytoadhesing protein genes. We designed a pair of primers for each PCR as follows: -the Lp primers were selected to have high sensitivity and specificity to detect the *M. gallisepticum* in field samples without previous growing. Additionally, they allowed differentiating same patterns by probes and RFLP digestion and sequencing.- the mgc2 primers were selected close to a deletion in the 6/85 mgc2 DNA, with a size suitable to be differentiated

by agarose gel migration. The Mg characterization method used at present is based on the analysis by automatic sequencing of Lp and by fragment length analysis of *mgc2* genes, as a complementary way for detection and differentiation of the 6/85 vaccine. Using these methods we have found: a) wild-type strains showing the same genetic sequences as the 6/85 vaccine strain in the Lp gene, 99% homology, and different sequence on the *mgc2* gene and b) other strains identical to the 6/85 vaccine strain in all the tests carried out, including the analysis of the gene *mgc2*. We have found that concerning Spanish situation, the length analysis of the 6/85 gene fragment described is the best option to differentiate vaccinated animals from field isolates. Therefore, this method could be very useful to follow up the situation on the farm.

---

**Keywords:** *Mycoplasma gallisepticum*; 6/85; PCR.

## Introducción

*Mycoplasma gallisepticum* (Mg) desarrolla sintomatología respiratoria crónica en pollos y sinusitis en pavos. Como consecuencia de la infección primaria, aparecen infecciones secundarias por *E. coli* y/o virus. El control de esta enfermedad se basa en la erradicación de los micoplasmas y el mantenimiento de un estatus de animales libres de micoplasma entre los reproductores y sus crías. Para ello, se realiza periódicamente un análisis serológico de una muestra representativa del lote. Entre las pruebas serológicas más utilizadas está la aglutinación rápida en placa, que detecta anticuerpos precozmente después de la infección; como contrapartida, aparecen falsos positivos ante infecciones producidas por estafilococos, si la muestra de suero está contaminada, incluso si se ha congelado. Además, existen cepas de Mg poco invasivas, que tardan en desencadenar una reacción inmunológica. Todo esto indica que es necesario confirmar mediante técnicas directas, sobre todo mediante detección del ácido nucleico, la presencia del patógeno.

Existe una amplia variabilidad entre cepas de Mg que se puede poner de manifiesto mediante el análisis directo por distintas técnicas: electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas de micoplasma, análisis con enzimas de restricción en geles de agarosa de productos amplificados por PCR, por hibridación con sondas de ADN específicas frente a la secuencia de RNA ribosomal y por ensayo inmunoenzimático (ELISA), principalmente. Posteriormente se ha aumentado la sensibilidad con ensayos basados en técnicas de amplificación por PCR mediante la RADP-PCR o Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) también llamada Arbitrary Primed PCR (AP-PCR).

Las nuevas tecnologías de biología molecular permiten determinar si el micoplasma vacunal se encuentra en los tejidos respiratorios del ave, por lo que la combinación de estas técnicas y las vacunas, son instrumentos muy útiles en el control de las infecciones de micoplasma en avicultura.

El uso de vacunas vivas apatógenas, NOBILIS MG 6/85 (MSD animal Health) y ts11 (Merial), permite disminuir considerablemente las pérdidas de producción. Para ello, es necesario poder diferenciar cepas vacunales de cepas infectivas de algún modo. En concreto y debido a los últimos estudios al respecto, sería muy interesante diferenciar el patrón molecular de la vacuna 6/85 con respecto a otras vacunas y cepas de campo. En el presente trabajo hemos desarrollado una PCR sobre el gen Lp, cuyos amplificadores son susceptibles de ser analizados por restricción enzimática o secuenciación que, unido al método de detección-tipificación por tamaños sobre el gen *mgc2*, consideramos aporta una información muy valiosa en el seguimiento y diferenciación de la cepa vacunal 6/85 frente a otros aislados de Mg.

## Material y métodos

### Cepas

Para la puesta a punto del método de detección se utilizaron la cepa vacunal F (suministrada por cortesía del Prof. P. Villegas, PDRC, Universidad de Georgia), la cepa vacunal 6/85 (MSD Animal Health) y la cepa ts11 (Merial).

### **Preparación de las muestras.**

Para la extracción del ADN, se utilizó un método muy sencillo basado en choque térmico. Las cepas vacunales se resuspendieron en 300 µl de sus respectivos estabilizantes, se centrifugó 10 minutos a 12000 xg, se procedió a lavar 3 veces el pellet resultante con 1 ml de PBS centrifugando 5 minutos. Tras el último lavado se resuspendió el pellet en 25 µl de PBS. Las cepas se sometieron a un choque térmico durante 10 minutos a 100°C y a continuación se pasaron a hielo 10 minutos. Por último, se centrifugaron 2 minutos a 16000 xg pasando el sobrenadante a otro tubo. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Para el aislamiento de ADN de aislados de campo se partió de torundas impregnadas en la mucosa traqueal, resuspendidas en PBS, o cortes de tejido de tráquea. El ADN fue extraído con el kit MagMax TM Total Nucleic Acid Extraction Kit de AMBION (Fisher Scientific).

### **Selección de oligonucleótidos para detección.**

Se han realizado numerosas aproximaciones con el fin de poder diferenciar las cepas vacunales entre sí. Es especialmente importante distinguir la cepa 6/85 del resto de cepas vacunales y de las muestras de campo. Se han encontrado diferencias resaltables entre las cepas vacunales, por diversas técnicas moleculares, en los genes *Lp* de lipoproteína (cepa R, **AY556072**) en *ts11*, 6/85, F, S6, A5969 y en los genes *mgc2* de adhesina (cepa R, **AY556228**) en las cepas mencionadas anteriormente. En todas las aproximaciones que se han realizado y que se detallan a continuación se han utilizado las cepas vacunales descritas (6/85, *ts-11* y cepa F) además de muestras de campo positivas a Mg.

Para la elección de los oligonucleótidos dentro de las secuencias seleccionadas se realizaron los alineamientos de las cepas vacunales 6/85, *ts-11* y F, utilizando el software DS-Gene® v1.5. Después del análisis del alineamiento de las secuencias se eligió, en cada caso, la mejor opción para realizar la detección/o tipificación diferencial de cada una de las vacunas, entre sí, y con respecto a muestras de campo.

### **Amplificación sobre el gen *Lp***

Teniendo en cuenta la secuencia consenso de las cepas analizadas en los alineamientos, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

- *MG Lp f*: Oligonucleótido directo que empieza en la posición 1 desde el ATG inicial,
- *MG Lp r*: Oligonucleótido reverso que termina en la posición 476.

El fragmento amplificado tiene un tamaño de 476 pb.

La amplificación por PCR se realizó mediante el kit comercial Taq polimerasa recombinante (Invitrogen®).

### **PCR *Lp*.**

Se utilizaron tubos de 200 µl (Eppendorf PCR Clean). La premix de PCR presentó las siguientes condiciones finales en un volumen de 50 µl por muestra: 20 mM Tris HCl (pH=8.4), 50 mM KCl Buffer PCR 1 x (Invitrogen), 200 µM dNTP's (Invitrogen), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200 ng primer *MG Lp f* y 200 ng primer *MG Lp r*, 5U DNA taq polimerasa recombinante (Invitrogen), 3 µl ADN (conteniendo entre 50-500 ng). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C 5', con 94°C 1', 50°C 1' y 72°C 1', 35 ciclos, y una extensión final de 72°C 7'.

### **Amplificación sobre el gen *mgc2* (adhesina).**

Sobre las secuencias alineadas del gen *mgc2*, para las diferentes cepas vacunales, se han diseñado un par de oligonucleótidos que amplifican una zona que tiene la particularidad de ser variable, es decir, la secuencia en su tramo final presenta el oligonucleótido reverso en diferentes posiciones, por lo que el fragmento al que da lugar después de la amplificación, tiene una longitud diferente dependiendo de la cepa de la que se trate.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

- *mgc2 2F*: Oligonucleótido directo que empieza en la posición 311 desde el comienzo de la secuencia.
- *mgc2 2R*: Oligonucleótido reverso variable, que terminando en la posición 574 para la cepa (R), es variable para (6/85), (*ts-11*) y (F).

El fragmento amplificado es variable entre las cepas vacunales desde 230-296 pb. La amplificación por PCR se realizó mediante el kit comercial Taq polimerasa recombinante (Invitrogen®).

La premix de PCR presentó las siguientes condiciones finales en un volumen de 50 µl por muestra: 20 mM Tris HCl (pH=8.4), 50 mM KCl Buffer PCR 1 x (Invitrogen), 200 µM mezcla dNTP's (Invitrogen), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200 ng primer mgc2 2F y 200 ng primer mgc2 2R, 5U DNA taq polimerasa recombinante (Invitrogen), 3 µl ADN (50-500 ng), el resto hasta 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Las condiciones de termociclación fueron las siguientes: 95°C 3', con 94°C 30'', 58°C 30'' y 72°C 1', 35 ciclos y una extensión final de 72°C 7'.

#### **Análisis de las secuencias amplificadas y comprobación de los amplicones.**

Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa NuSieve® 3:1 (Cambrex Bio Rockland, S.A.) al 1.5% y teñido con Gel Red y fotografiado. Se realizó una purificación de los amplificados, en este caso en el propio gel, mediante el kit comercial GENECLEAN turbo (Biogen®). El amplificado purificado libre de restos de los reactivos de la amplificación, fue secuenciado mediante una reacción de amplificación basada en el método de Sanger utilizando terminadores dideoxi (ddNTPs). El sistema de secuenciación automática utilizado fue el ABI 373 (Applied Biosystems®). El análisis de las secuencias amplificadas se realizó mediante el software DS-Gene® v1.5 a partir de los resultados obtenidos del secuenciador. Para la identificación del tipo de micoplasma se utilizó el banco de datos del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> y se realizó un BLAST, es decir, se enfrentó la secuencia al banco de datos, el cual ofrece todos los posibles alineamientos de todas las secuencias publicadas que se parecen a la secuencia problema y calcula un porcentaje de homología.

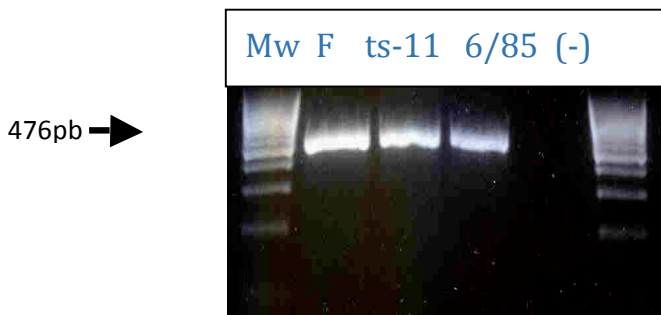
#### **RESULTADOS**

Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa NuSieve® 3:1 (Cambrex Bio Rockland, S.A.) al 1.5% y teñido con Gel Red.

#### **Aproximación sobre el gen Lp (lipoproteína).**

- **Amplificación de la región diana**

La amplificación del fragmento de 476 pb correspondiente al gen Lp de Mg se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Amplificados del fragmento del gen Lp.

Tal y como se ha comentado antes tras la amplificación de los fragmentos correspondientes a cada una de las cepas vacunales se procedió a la secuenciación de los mismos.

- **Análisis de las secuencias.**

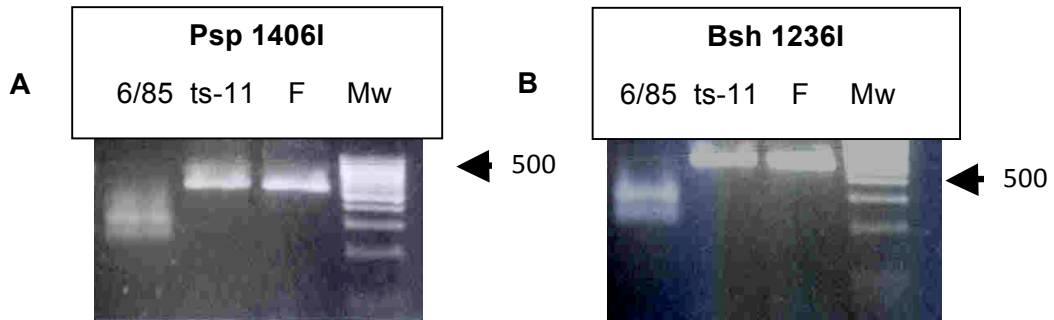
El análisis de los amplificados vacunales (6/85, F, y ts-11) generó unos alineamientos mediante BLAST con una identidad y similitud muy elevadas. La primera opción en el alineamiento corresponde, en cada caso, con cada una de las cepas utilizadas como control. De esta forma mediante PCR de detección, secuenciación e identificación en el alineamiento por BLAST, es posible reconocer a cada una de las vacunas si procedieran de muestras de campo. El análisis de la secuencia de muestras de campo mostró que existen cepas con un 99% de homología con la cepa 6/85. Con el fin de eludir la secuenciación y agilizar los resultados, se estudiaron los cambios dentro de esta secuencia para

realizar el mismo tipo de análisis mediante otro método más rápido, RFLP, que se describe a continuación.

### RFLP sobre gen Lp.

#### Análisis de dianas. Digestión con Bsh1236I y Psp1406I.

La secuencia analizada presentó mutaciones puntuales que generan, en este caso, una diana Bsh 1236I (CGCG, c->t), en 6/85 (c->t) en la posición 208 de las secuencias alineadas, mientras que las cepas ts-11 y F, no la presentan. Figura 3A. Del mismo modo, la cepa vacunal 6/85 presenta también otro cambio que genera una diana Psp1406I (AACGTT, a->c) en la posición 213 (a->c), que tampoco aparece en las cepas F y ts-11. Figura 2.



**Figura 2.** La cepa 6/85 se digiere con los dos enzimas, mientras que las cepas F y ts-11 no lo hacen con ninguno de los enzimas.

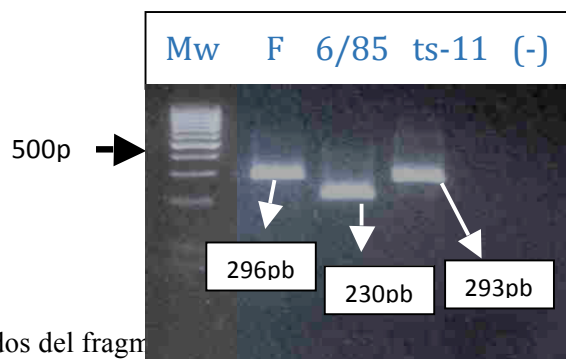
Se han estudiado 78 cepas de campo en las que se ha analizado mediante BLAST la presencia de dianas de restricción a Psp 1406I y Bsh 1236I simultáneas, como sucede en la vacuna 6/85; el 15% de ellas (13 cepas) tienen ambas dianas, por lo que no es un método definitivo para la tipificación de cepas vacunales (6/85) y de campo, sino complementario a otros.

#### Aproximación sobre el gen *mgc2* (adhesina).

Posteriormente se empezó a trabajar sobre el gen *mgc2* teniendo en consideración los trabajos como los de Kleven, en los estudios de Garcia M et al. 2005 y Hong Y. et al. 2005, en el que se estudia entre otros, el gen *mgc2* como un método útil de tipificación y diferenciación de vacunas tales como la 6/85 y cepas de campo.

- **Amplificación de la región diana.**

**PCR *mgc2*.** Tal y como se comentó anteriormente, la detección de Mg en el gen *mgc2*, presenta una particularidad, que es la amplificación diferencial de cada una de las vacunas basada en diferencias de tamaño de los fragmentos amplificados. El fragmento amplificado, por tanto, es variable entre las cepas vacunales desde 230-296 pb.



**Figura1.** Amplificados del fragmento de la región diana de las vacunas.

- **Análisis de las secuencias.**

Tras la amplificación de los fragmentos correspondientes a cada una de las cepas vacunales se procedió a la secuenciación de los fragmentos. El análisis de los amplificados vacunales (6/85, F, y ts-

11) en el gen *mgc2*, generó unos alineamientos mediante BLAST con similitud a las mismas cepas de *Mycoplasma gallisepticum* descritas para los genes de Lp (lipoproteína), pero en este caso para los genes *mgc2*.

En este caso en las bases de datos también aparecían secuencias similares a la vacuna 6/85.

### **Análisis de aislados de campo**

En INGENASA desde el año 2000 se han analizado un total de 1462 muestras para presencia de *Mycoplasma gallisepticum*. De ellas 271 (18.53%) fueron positivas y 1191 (81.47 %) negativas. Dentro de este resultado hay que resaltar que el 100% de las muestras procedentes de reproductoras resultaron negativas. De las muestras positivas a Mg, un 10.7 % del total resultaron similares a 6/85 en alguno de los análisis realizados. En aquellos casos en los que se hicieron sobre las muestras positivas los dos tipos de análisis descritos en el presente trabajo, se observó que, mientras el análisis sobre secuencia Lp daba homología de 99% en las muestras positivas de granjas vacunadas con algún problema respiratorio, sólo algunas de esas muestras rendían el patrón de tamaño *mgc2* para 6/85.

## **Discusión**

El método de amplificación de Mg sobre el gen Lp o sobre el gen *mgc2*, posibilitaría la identificación de la cepa 6/85 con respecto a las cepas F y ts-11. No obstante, su utilización en el campo para tipaje tiene sus limitaciones, puesto que tanto en el análisis *mgc2* como del gen Lp de manera individual, existen cepas con altísima identidad de secuencia respecto a 6/85. El tamaño correspondiente al amplificado del gen *mgc2* en la vacuna 6/85 (230pb), según su análisis en las bases de datos, también se pueden encontrar en cepas de campo.

En el presente estudio hemos comprobado que tanto la PCR Lp como *mgc2* son suficientemente sensibles y específicas para detectar cualquier aislado de *Mycoplasma gallisepticum* en el campo y que no dan reacción cruzada con otros *Mycoplasmas* de aves, por lo que cualquiera de ellas sería útil para la detección. En cuanto a su uso para tipificación en el campo podemos encontrar dos situaciones:- cepas salvajes y 6/85 con un 99% de homología en la secuencia del gen Lp, pero diferente secuencia en el gen *mgc2* y - otras cepas idénticas a la cepa vacuna 6/85 en todos los análisis realizados, incluyendo el análisis del gen *mgc2*.

Teniendo en consideración los alineamientos teóricos de la vacuna 6/85 con la base de datos de NCBI y los resultados obtenidos en el campo, para la identificación de la vacuna 6/85 en cada uno de los análisis (Lp y *mgc2*), esperaríamos la misma identificación mediante BLAST en Lp y *mgc2*, el mismo patrón de restricción en el gen Lp. Si se tienen en cuenta sólo los datos encontrados en el campo durante estos años, el tamaño del fragmento *mgc2* es un resultado indicativo de que estamos en presencia de la vacuna 6/85.

Puesto que hasta el momento no se ha descrito ningún gen que sea el responsable de patogenicidad del *Mycoplasma gallisepticum*, ninguna de las técnicas publicadas hasta el momento se considera una técnica definitiva para la tipificación. Dada la situación española actual, este método de caracterización de Mg basado en el análisis por secuenciación automática del gen Lp y análisis de la longitud del fragmento del gen *mgc2* para la detección y diferenciación de la cepa vacunal 6/85, es la mejor opción para diferenciar animales vacunados de aislados de campo y resulta muy útil en el seguimiento de la situación de las granjas.

## **Referencias**

**EVANS J.D., LEIGH S.A.** (2008) Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. *Avian Diseases*, **52**:491-7.

**FAN, H. H., KLEVEN, S.H. AND JACKWOOD, W.** (1995) Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary Primers to Strain Identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, **39**:729-735.

**GARCÍA M, IKUTA N, LEVISOHN S, KLEVEN SH.** (2005) Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Diseases*, **49**:125-32.

**HONG Y, GARCIA M, LEVISOHN S, SAVELKOUL P, LEITING V, LYSNYANSKY I, LEY DH, KLEVEN SH.** (2005) Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Diseases*, **49**:43-49.

**KHALIFA R. · EISSA S. · EL-HARIRI M. · REFAI M.** (2014) Sequencing Analysis of *Mycoplasma gallisepticum* Wild Strains in Vaccinated Chicken Breeder Flocks. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **24**:98-104.

**KLEVEN, S. H.** (1990) Epidemiological studies of *Mycoplasma gallisepticum* using restriction endonuclease analysis. *Zentralbl. Bakteriol. Supp.* **20**:494-499.

**RHOADES, K. R., PHILLIPS, M. AND YODER H.W.** (1974) Comparison of strains of *Mycoplasma gallisepticum* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Diseases*, **18**:91-96.