

DESIGN DE PRIMERS PARA O DIAGNOSTICO DE *Mycoplasma spp.*

DIAGO DUTRA LIMA¹; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN²; NATÁLIA MACHADO RAHAL³; STHÉPHANI ALVES BRANCO CAMARGO⁴ KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – rahal.natalia@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – sthephanicamargo@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasmas são bactérias que não possuem parede celular e pertencem à família Mycoplasmataceae, extremamente pequenos e fazem parte de um grupo maior da classe Mollicutes, que inclui outras bactérias como Ureaplasmas, Acholeplasmas, Spiroplasmas e os recém-classificados Haemoplasmas (NICHOLAS, 2004; CASWELL E ARCHAMBAULT, 2008; GAUTIER-BOUCHARDON, 2018; LANAO; CHAKRABORTY; PEARSON-SHAVER, 2022).

Na medicina veterinária, muitas espécies de *Mycoplasma* são de grande importância clínica, pois causam várias doenças em animais, como infecções respiratórias, mastite, conjuntivite, anemia, artrite e aborto (BÜRKI; FREY; PILO, 2015; MCAULIFFE et al., 2004; NICHOLAS; FOX; LYSNYANSKY, 2016; GAUTIER-BOUCHARDON, 2018). Não está bem elucidado o comportamento das espécies para infecção de seus hospedeiros e são escassos os trabalhos envolvendo identificação direta desses microrganismos (isolamento em meios de cultura, esfregaço de sangue periférico e técnicas moleculares), além disso *Mycoplasma spp.* já foram encontradas em humanos imunossuprimidos. (SYKES; CHALKER, 2023)

Para identificar as espécies de *Mycoplasma* de importância veterinária, os pesquisadores comumente utilizam o isolamento em meios seletivos específicos. No entanto, *Mycoplasma spp.* são geralmente exigentes, com um crescimento lento, tornando seu isolamento em cultura pura um processo desafiador e demorado (JEFFERY et al., 2007; GAUTIER-BOUCHARDON, 2018). Dessa forma, a utilização de técnicas moleculares, como PCR em tempo real representa um teste confiável de alta sensibilidade para a detecção de *Mycoplasma spp.* Para a identificação de espécies de *Mycoplasma* se realiza análise da sequência do gene 16S do RNA ribossômico (rDNA), utilizada para a diferenciação de *Mycoplasma spp.* (JEFFERY et al. 2007; GHORASHI; NOORMOHAMMADI; MARKHAM, 2010; REBELO; PARKER; CAI, 2011; AZARI et al., 2019).

Logo, nesse trabalho buscamos desenvolver primers para a detecção e diferenciação de *Mycoplasma spp.* as diferentes espécies do microrganismo, em diferentes hospedeiros de interesse veterinário, que têm como alvo o gene 16S rDNA.

2. METODOLOGIA

Para o desenho dos primers, visando distinguir as espécies de *Mycoplasma spp.*, o banco de dados GenBank, do National Center of Biotechnology Information (NCBI), foi utilizado para obtenção das sequências de DNA referentes ao gene

16S rDNA de *Mycoplasma* spp. As sequências selecionadas, essas descritas na tabela 1, analisadas e alinhadas utilizando o software Mega11 (Tamura, Stecher, and Kumar, 2021), o consenso das sequências da mesma espécie de microrganismo foi anotado, e posteriormente utilizado no mesmo software escolhendo um ponto promissor para os primers. O produto de PCR será predito e analisado pelo software AmpliFx (Inst Neurophysiopathol, Marseille, France). Para evitar a formação de dímeros e reações ineficientes, as propriedades termodinâmicas e interações primer-primer foram avaliadas usando os softwares Oligo-Explorer v1.2 e Oligo-Analyzer v1.1.2 (Gene LinkTM, EUA), e Sequence Manipulation Suite (Bioinformatics.org). A especificidade dos primers e se eles anelam no genoma dos hospedeiros será aferida utilizando a ferramenta Primer-BLAST do NCBI. Os primers selecionados serão sintetizados pela Sigma-Aldrich (Merck KgaA, EUA).

Tabela 1: Espécies, hospedeiros e código das sequências no GenBank utilizados.

Espécie	Hospedeiro	Número de depósito GenBank
<i>Mycoplasma arginii</i>	Bovino; Canino; Felino; Ovino	M24579.1.
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	Bovino; Equino; Ovino	U44766.1; LC158834.1; AB680687.1.
<i>Mycoplasma bovis</i>	Bovino; Ovino	NR 102850.2.
<i>Mycoplasma canis</i>	Bovino; Canino	AF340023.1; AB680678.1; MZ221174.1; AB848714.1.
<i>Mycoplasma edwardii</i>	Canino; Felino	U73903.1; JX843737.1.
<i>Mycoplasma fastidiosum</i>	Equino	NR 024987.1; NR 024987.1; AF125878.1.
<i>Mycoplasma flocculare</i>	Suíno	L22210.1; X62699.1.
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Canino; Felino	MZ221173.1; MZ221172.1; MZ221170.1.
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Bovino; Felino	KY709688.1; EU145745.1.
' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '	Bovino; Felino	MW598403.1; EU285281.1; AM691834.1; AY297712.1; AY529634.1.
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Suíno	Y00149.1; E02783.1.
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	Suíno	AF465777.1; U26730.1.
<i>Mycoplasma maculosum</i>	Canino	AB680679.1; AF221116.1.
<i>Mycoplasma molare</i>	Canino	AF412985.1; AF221116.1; AB680679.1.
' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> '	Canino; Felino	DQ464425.1; DQ464424.1.

3. RESULTADOS

Devido ao futuro depósito de patente, os pares de primers selecionados não serão descritos nos resultados. Utilizando as ferramentas descritas foi possível desenvolver primers dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos pelos softwares, que não anelam de forma funcional nos hospedeiros e com produto de PCR ótimo para as futuras análises. Como perspectiva futura buscamos utilizar esses primers desenvolvidos na padronização de diagnósticos moleculares para *Mycoplasma* spp.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, desenvolvemos primers específicos para a detecção e diferenciação de diferentes espécies de *Mycoplasma* spp., utilizando o gene 16S rDNA como alvo. Com isso, nosso trabalho contribui para o avanço no diagnóstico molecular de *Mycoplasma* spp. em animais de interesse veterinário. Os primers não foram descritos no estudo devido a futuros depósitos de patentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZARI, Ania Ahani et al.. High-resolution melting curve analysis: a novel method for identification of mycoplasma species isolated from clinical cases of bovine and porcine respiratory disease. **Tropical Animal Health And Production**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 1 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-019-02098-4>.

BÜRKI, Sibylle; FREY, Joachim; PILO, Paola. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Microbiology**, [S.L.], v. 179, n. 1-2, p. 15-22, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.024>.

CASWELL, Jeff L.; ARCHAMBAULT, Marie. *Mycoplasma bovispneumonia in cattle*. **Animal Health Research Reviews**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 161-186, dez. 2007. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1466252307001351>.

GAUTIER-BOUCHARDON, Anne V.. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 6, n. 4, p.[S.L.], 27 jul. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0030-2018>.

GHORASHI, Seyed A. et al.. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. **Microbiology**, [S.L.], v. 156, n. 4, p. 1019-1029, 1 abr. 2010. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.031351-0>.

JEFFERY, Nathan et al. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. **Microbiology**, [S.L.], v. 153, n. 8, p. 2679-2688, 1 ago. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/005140-0>.

LANAO, Andrea E. et al.. ***Mycoplasma Infections***. Miami Florida: Statpearls, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536927/>. Acesso em: 30 maio 2023.

MCAULIFFE, Laura et al.. Molecular Epidemiological Analysis of *Mycoplasma bovis* Isolates from the United Kingdom Shows Two Genetically Distinct Clusters. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 4556-4565, out. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.42.10.4556-4565.2004>.

NICHOLAS, Robin A.J.; FOX, Larry K.; LYSNYANSKY, Inna. Mycoplasma mastitis in cattle: to cull or not to cull. **The Veterinary Journal**, [S.L.], v. 216, p. 142-147, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.08.001>.

PARKER, Alycia M. et al. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 1241-1252, 19 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.15135>.

REBELO, Ana Rita; PARKER, Lois; CAI, Hugh Y. Use of high-resolution melting curve analysis to identify Mycoplasma species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 932-936, 19 ago. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638711416846>.

SYKES, Jane E.; CHALKER, Victoria J.. Mycoplasma Infections. In: SYKES, Jane E.. **Greene's Infectious Diseases of the dog and the cat**. 5. ed. Davis (Ca): Elsevier, 2023. p. 2264-2292.