

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp. POR PCR EM TEMPO REAL-HRM

DIAGO DUTRA LIMA¹; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN²; BRUNA GAROFALI SIMONE DRABER³; STHÉPHANI ALVES BRANCO CAMARGO⁴; NATÁLIA MACHADO RAHAL⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – bruna.draber@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – rahal.natalia@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Micoplasmas são bactérias da classe Mollicutes, caracterizadas pela ausência de parede celular, tamanho reduzido (200 a 300 nm), genoma pequeno, variando de 580 kb (*Mycoplasma genitalium*) a 1.360 kb (*Mycoplasma penetrans*) (NICHOLAS *et al.*, 2008; CASWAELE E ARCHAMBAUL, 2008). Essas características limitam a biossíntese tornando-os dependentes da relação parasita-hospedeiro para a síntese de metabólitos essenciais (RAZIN *et al.*, 1998; LANA O *et al.*, 2023). Na medicina veterinária, esses microrganismos parasitam diversos hospedeiros, como mamíferos e répteis, e várias espécies de *Mycoplasma* possuem importância clínica, por estarem associados a doenças como infecções respiratórias, mastite, conjuntivite, anemia, artrite e aborto (MCAULIFFE *et al.*, 2004; BÜRKI; FREY; PILO, 2015; NICHOLAS *et al.* 2008).

Para a identificação molecular de espécies de *Mycoplasma*, realiza-se análise por sequenciamento do gene 16S do RNA ribossômico (16S rDNA). No entanto, esse método também é demorado e caro (JEFFERY *et al.*, 2007; SYKES, 2023). Por isso, há uma tendência em pesquisas para desenvolver métodos de diagnóstico mais eficientes para a detecção dos agentes. O padrão-ouro do diagnóstico de diversas doenças é o PCR em tempo real, devido a sua sensibilidade alta, porém ainda não há um padrão-ouro documentado para o diagnóstico de *Mycoplasma* spp. em felinos domésticos, também não há uma metodologia elucidada e reprodutível para a detecção e diferenciação de espécies dos microrganismos (SYKES, 2023).

A PCR-HRM é uma técnica molecular que combina a PCR em tempo real com a análise de curva de dissociação de alta resolução. Um corante fluorescente intercalante permite monitorar a fusão da dupla fita de DNA em tempo real. A variação na curva de melting reflete diferenças na sequência, tornando o PCR-HRM uma ferramenta sensível, rápida e sem necessidade de sondas ou eletroforese para observar diferenças nas sequências de DNA (AZARI *et al.*, 2019; NIKODEM, *et al.* 2021).

Essa metodologia já foi utilizada para a diferenciação e tipagem de cepas de *Mycoplasma* spp., porém foram métodos desenvolvidos para amostras específicas, não sendo validados a extrapolação para espécies de outros hospedeiros, como felinos e caninos domésticos (JEFFERY *et al.* 2007; REBELO; PARKER; CAI, 2011; AZARI *et al.*, 2019). Portanto, nesse estudo teve como objetivo mostrar as análises iniciais para a prova de conceito da criação de um novo diagnóstico molecular para *Mycoplasma* spp., utilizando a técnica de PCR em tempo real com HRM, com um único conjunto de primers para o gene 16S rDNA.

2. METODOLOGIA

Amostras de DNA de *Mycoplasma* spp. foram cedidas por pesquisadores que realizaram diagnóstico prévio a partir de amostras clínicas. Amostras de *Mycoplasma haemofelis*, e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* foram fornecidas por Dallmann *et al.* (2025), e amostras de *Mycoplasma flocculare* e *Mycoplasma hyopneumoniae* foram fornecidas por Jorge *et al.* (2014), totalizando quatro amostras a serem incluídas no teste.

Para o desenho dos primers, visando distinguir as espécies de *Mycoplasma*, 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.

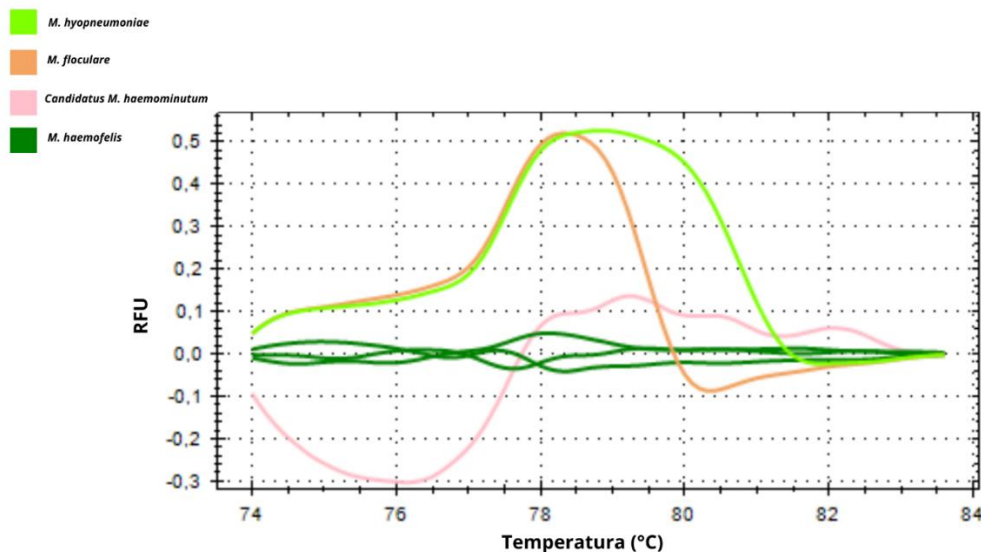
Para evitar a formação de dímeros e reações ineficientes, as propriedades termodinâmicas e interações primer-primer serão avaliadas usando os softwares Oligo-Explorer v1.2 e Oligo-Analyzer v1.1.2 (Gene Link™, EUA), e Sequence Manipulation Suite (Bioinformatics.org). A especificidade dos primers e se eles anelam no genoma dos hospedeiros foi aferida utilizando a ferramenta Primer-BLAST do NCBI. Os primers selecionados foram sintetizados pela Sigma-Aldrich.

A PCR em tempo real com HRM foi realizada no termociclador CFX Opus 96 (BIO-RAD Inc. CA, EUA), utilizando os primers desenvolvidos. As sequências não serão descritas neste trabalho por questões de confidencialidade e propriedade intelectual. A reação foi preparada utilizando 5 µL de GoTaq qPCR MasterMix (PROMEGA Inc, WI, EUA), 10 µM de cada primer, 25 ng de DNA amostral, e o volume completado a 10 µL com água livre de DNases. As temperaturas de termociclagem foram: 95 °C por 2 minutos, seguido por 45 repetições de 95 °C por 15 segundo e 53,5 °C por 45 segundos, a curva de dissociação foi feita de 65 °C até 95 °C, com incrementos de 0,1 °C a cada 2 segundos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As quatro amostras foram diferenciadas pelas curvas de HRM com sucesso (Figura 1).

Figura 1. Curva de diferenciação de HRM, utilizando *M. haemofelis* como valor de referência. Verde claro: *M. hyopneumoniae* – Laranja claro: *M. flocculare* – Rosa claro: *Candidatus M. haemominutum* – Verde: *M. haemofelis*. Gerado pelo Bio-rad Precision Melt Analysis.



Kamyngkird *et al.* (2017) utilizou do PCR convencional para a diferenciação de *M. haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum*, necessitando de eletroforese para confirmar o resultado. Utilizando a técnica aqui proposta, seria possível diferenciar as espécies sem precisar desta última etapa de confirmação.

O uso da técnica de PCR em tempo real-HRM é flexível, pois não necessita de reagentes a mais além dos corantes intercalantes de DNA de 3ª geração, como o EvaGreen, podendo discernir produtos diferentes baseando-se no tamanho, concentração de citosina e guanina e complementaridade da sequência. Nesse estudo foi utilizado o corante BrightGreen, que também alcança bons níveis de saturação e já foi utilizado para a realização de HRM por Zollo *et al.* (2021) para a diferenciação de SARS-CoV-2.

Esta técnica já foi utilizada para a análise, diagnóstico e diferenciação de espécies de *Mycoplasma* spp. Azari *et al.* (2021) a empregaram para identificar espécies em amostras de bovinos e suínos com doenças respiratórias, detectando *M. bovis* em todas as amostras bovinas positivas e, nas suínas, *M. hyosynoviae*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *Mycoplasma* não cultiváveis ("uncultured"). Rebelo *et al.* (2011) e Jeffrey *et al.* (2007) também utilizaram o método, este último para diferenciar estirpes de *M. synoviae* com base em uma única diferença de pares de base (pb) em sequências de 400 pb, distinguindo estirpes australianas das norte-americanas.

Um ponto importante que encontramos em nossas pesquisas, é que não há estudos até o momento que utilizem a técnica de PCR em tempo real-HRM para espécies de interesse em felinos, ou que foque em micoplasmas hemotrópicos. Portanto, a técnica pode ser de interesse para a evolução no estado da arte do diagnóstico para *Mycoplasma* spp., pois demonstra-se sensível, rápida e reprodutível, permitindo a diferenciação entre estirpes e espécies de *Mycoplasma* (JEFFERY *et al.* 2007; REBELO; PARKER; CAI, 2011; AZARI *et al.* 2019; NIKODEM *et al.*, 2021).

4. CONCLUSÕES

A PCR em tempo real com HRM foi uma ferramenta eficaz na diferenciação das quatro espécies analisadas, *M. haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *M. flocculare* e *M. hyopneumoniae*. A técnica pode ser usada para

a diferenciação de espécies diferentes do microrganismo, e diferentes hospedeiros. Há necessidade de outras padronizações e testes para consolidar o presente teste de diferenciação, para isso DNA sintético será utilizado futuramente para a prova de contexto de outras espécies de *Mycoplasma*, além de análises moleculares em maior número de amostras clínicas.

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.
- BÜRKL, S.; FREY, J.; PILO, P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1-2, p. 15–22, ago. 2015.
- DALLMANN, P. R. J. *et al.* *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in domestic cats from Pelotas, RS: molecular detection and risk factors. **Brazilian Journal of Microbiology**, Santa Maria, v. 56, p. 2163–2168, 2025. Recebido em 16 de julho de 2024; aceito em 4 de junho de 2025; publicado em 23 de junho de 2025.
- HOWARD, C. J.; TAYLOR, G. Immune responses to mycoplasma infections of the respiratory tract. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 10, n. 1, p. 3–32, out. 1985.
- JEFFERY, N. *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** (Reading, England), v. 153, n. Pt 8, p. 2679–2688, 1 ago. 2007.
- JORGE, S. *et al.* The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S. I.], v. 37, n. 4, p. 229–236, 2014.
- LANAO, Andrea E. *et al.* *Mycoplasma* Infections. Miami Florida: **Statpearls**, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536927/>.
- MCAULIFFE, L. *et al.* Molecular Epidemiological Analysis of *Mycoplasma bovis* Isolates from the United Kingdom Shows Two Genetically Distinct Clusters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4556–4565, out. 2004.
- NICHOLAS, R *et al.* *Mycoplasma* Diseases of Ruminants. [s.l.] **CABI**, 2008. 36
- NIKODEM, D. *et al.* High Resolution Melting Analysis (HRM-PCR) - method and its application. **Postepy Biochemii**, v. 67, n. 1, p. 54–58, 31 mar. 2021.
- PARKER, A. M. *et al.* A review of mycoplasma diagnostics in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 3, p. 1241–1252, 19 abr. 2018.
- RAZIN, S *et al.* Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1 dez. 1998
- REBELO, ANA RITA *et al.* Use of high-resolution melting curve analysis to identify *Mycoplasma* species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 932–936, 19 ago. 2011.
- SYKES, J. E. **Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat** 5th edition. 5th. ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2023.
- ZOLLO, *et al.*, SARS-CoV-2 subgenomic N (sgN) transcripts in oro-nasopharyngeal swabs correlate with the highest viral load, as evaluated by five different molecular methods. **Diagnostics**, Basel, v. 11, n. 2, p. 288, 2021.