

Ensaio da reacção em cadeia de polimerase para a detecção de *Mycoplasma mycoides mycoides* (Mmm), a partir de amostras clínicas procedentes da província do Namibe, Angola

Samo Daniel¹; Atilio Pini², Flavio Sacchini², Andrea Di Provio², Massimo Scacchia², Yaima Burgher³ y Evelyn Lobo³

¹ Departamento Provincial do Instituto dos Serviços de Veterinária da Huíla, ANGOLA

² Instituto Zooprofilactico Sperimentale (IZS), Centro de Referência da OMSA para o diagnóstico da PPCB, Teramo, ITÁLIA,

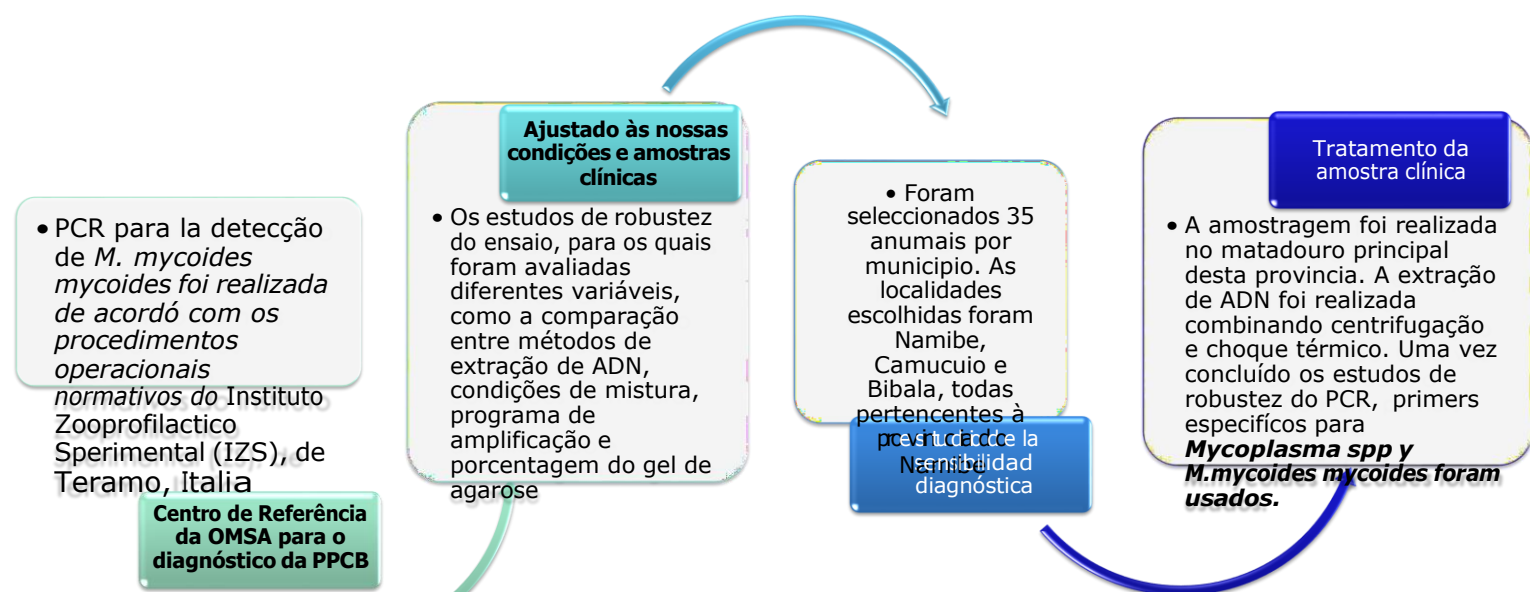
³ MYCOLAB, Laboratório de referência da OMSA para o diagnóstico de micoplasmas, CENSA, Mayabeque, CUBA.

E-mail para correspondência: samodaniel72@gmail.com

Introdução

A peripneumonia contagiosa dos bovinos (PPCB), é uma doença infectocontagiosa que cursa de forma aguda, subaguda ou crónica causada por *Mycoplasma mycoides mycoides* (Mmm). Doença endémica e reemergente de maior importância na produção pecuária do oeste, centro e este da África. Em Angola, é reconhecida como a doença de maior impacto sanitário, económico e social e, as províncias mais afectadas são Huíla, Namibe, Cunene, Cuando Cubango e Benguela. O diagnóstico rotineiramente se realiza desde o ponto de vista clínico e não se tem a confirmação do agente circulante. O presente trabalho tem como **objectivo** colocar ao ponto um ensaio de reacção em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de *Mycoplasma mycoides mycoides*, a partir de exsudados de pulmão com lesões compatíveis com a PPCB.

Materiais e métodos:



Resultados:

Estudos de robustez do PCR verificando as combinações de método de extração, condições de mistura, programa e porcentagem de gel de agarose

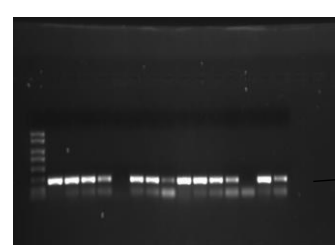


Figura 1. Electroforese em gel de agarose a 1% com programa do CENSA e método de extração utilizando o Kit Wizard. Linha 1. Marcador PM 100pb. Linha 2. ADN de *M. arginini* puro, Linha 3. ADN de *M. arginini* diluição 1:10, Linha 4. ADN de *M. arginini* diluição 1:100, Linha 5. ADN de *M. arginini* diluição 1:1000 controlo PBS, Linha 6. ADN de *M. mycoides* puro, Linha 7. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10, Linha 8. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100, Linha 9. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000, Linha 10. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000, Linha 11. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100000, Linha 12. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000000, Linha 13. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000000, Linha 14. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100000000, Linha 15. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000000000, Linha 16. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000000000, Linha 17. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100000000000, Linha 18. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000000000000, Linha 19. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000000000000, Linha 20. controlo negativo, Linha 21. controlo positivo de *M. spp*

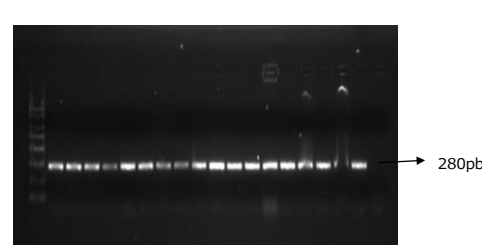


Figura 2. Electroforese em gel de agarose a 2% com o programa do IZS e método de extração de ADN desenvolvido pelo CENSA. Linha 1. Marcador PM 100pb. Linha 2. ADN de *M. arginini* puro, Linha 3. ADN de *M. arginini* diluição 1:10, Linha 4. ADN de *M. arginini* diluição 1:100, Linha 5. ADN de *M. arginini* diluição 1:1000 controlo PBS, Linha 6. ADN de *M. mycoides* puro, Linha 7. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10, Linha 8. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100, Linha 9. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000, Linha 10. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000, Linha 11. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100000, Linha 12. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000000, Linha 13. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000000, Linha 14. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100000000, Linha 15. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000000000, Linha 16. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000000000, Linha 17. ADN de *M. mycoides* diluição 1:100000000000, Linha 18. ADN de *M. mycoides* diluição 1:1000000000000, Linha 19. ADN de *M. mycoides* diluição 1:10000000000000, Linha 20. controlo positivo, Linha 21. controlo negativo

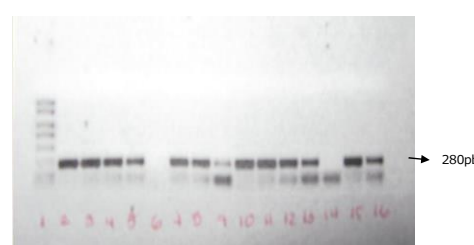


Figura 3. Electroforese em gel de agarose a 1%, método de extração do CENSA e programa do IZS. Linha 1. Marcador PM 100 pb. Linha 2. ADN de *M. arginini* puro, Linha 3. ADN de *M. arginini* diluição 1:10, Linha 4. ADN de *M. arginini* diluição 1:100, Linha 5. ADN de *M. arginini* diluição 1:1000, Linha 6. controlo de água. Linha 7. ADN de *M. spp* puro; Linha 8. ADN de *M. spp* diluição 1:10; Linha 9. ADN de *M. spp* diluição 1:100; Linha 10. ADN de *M. spp* diluição 1:1000; Linha 11. ADN de *M. spp* diluição 1:10000; Linha 12. ADN de *M. spp* diluição 1:100000; Linha 13. ADN de *M. spp* diluição 1:1000000; Linha 14. ADN de *M. spp* diluição 1:10000000; Linha 15. ADN de *M. spp* diluição 1:100000000; Linha 16. ADN de *M. spp* diluição 1:1000000000; Linha 17. ADN de *M. spp* diluição 1:10000000000; Linha 18 e 19. ADN de *M. spp* diluição 1:100000000000; Linha 20. ADN de *M. spp* diluição 1:1000000000000; Linha 21. controlo negativo

PCR para a detecção de *Mycoplasma spp* a partir de amostras clínicas

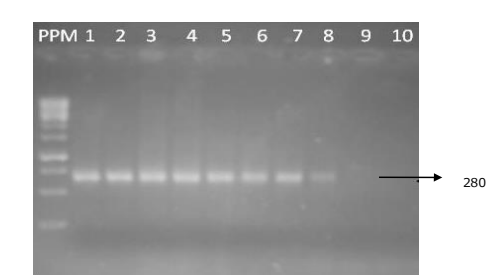


Figura 6. Electroforese em gel de agarose a 1%, com seleção de amostras clínicas positivas a micoplasmas. Linha 1. Marcador PM 100 pb. Linha 2. a 8 ADN de micoplasmas presentes em amostras clínicas, Linha 9. controlo de extração, Linha 10. controlo negativo

PCR para a detecção de *M. mycoides mycoides* a partir de amostras clínicas

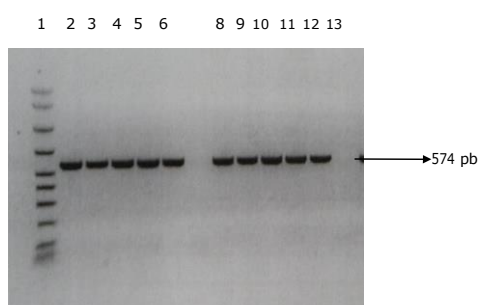


Figura 7. Electroforese em gel de agarose a 1%, com seleção de amostras clínicas positivas a *M. mycoides* 1: Marcador de peso molecular 2000 pb (Promega); linha 2-6 ADN de amostras clínicas; linha 8-11 ADN de muestras clínicas; linha 12: controlo positivo DNA *M. mycoides* (MmSC); linha 13: controlo negativo

Condições da Mistura

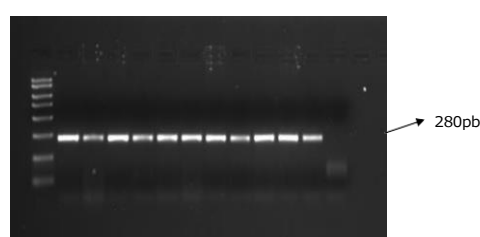


Figura 4. Electroforese em gel de agarose a 1% Mistura congelada sem enzima (um mês). Linha 1. Marcador PM 100pb. Linha 2 - 9 ADN de *M. mycoides*, Linha 10 - 12. ADN de *M. spp*, Linha 13. controlo negativo

Repetibilidade e Reprodutibilidade

Réplicas (8) de limite de de detecção

(*M. mycoides* 10⁵, *M. mycoides* 10⁶ y *M. mycoides* 10⁷)

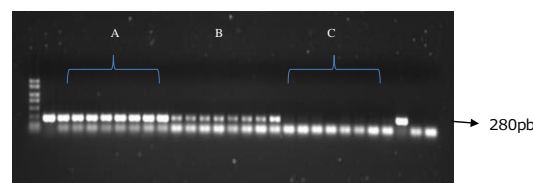


Figura 5. Electroforese em gel de agarose a 1% Linha 1. Marcador PM 100pb, Linha 2. ADN de *M. mycoides*, Grupo A: ADN de *M. mycoides* diluição 10⁵, grupo B: ADN de *M. mycoides* diluição 10⁶, grupo C: ADN de *M. mycoides* 10⁷, Linha 3. ADN de *M. spp*, Linha 4 - 5 control negativo.

Referências

Rosa-Stella Mbulu, et al., 2004: Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC. Veterinary Microbiology 98: 229-234

Edy M. Vilei *, Joachim Frey, 2010: Detection of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC in bronchoalveolar lavage fluids of cows based on a TaqMan real-time PCR discriminating wild type strains from an lppQ- mutant vaccine strain used for DIVA-strategies. Journal of Microbiological Methods 81: 211-218

S. Woubi, et al., 2007: A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: Application to the diagnosis of contagious agalactia. Molecular and Cellular Probes 21: 391-399

Philippe Totte, et al., 2010: Identification of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* Small Colony Genes Coding for T-Cell Antigens. Clinical and Vaccine Immunology, Vol. 17, No. 8

Reporte de los métodos de Diagnóstico de la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (PPCB) armonises au niveau communautaire JLM/PBB 34-92 27 1992/ SF modifié le 18.05.92.

Procedimiento normativo Operacional para el diagnóstico de *Mycoplasma mycoides*. Laboratorio de Microbiología. Instituto Zooprofilactico Sperimentale (IZS), Centro de Referencia de la OIE para el diagnóstico de la PPCB, Teramo, ITALIA

Conclusões

- Os estudos de robustez foram realizados como parte do desempenho analítico para a detecção de *M. Mycoides* em amostras clínicas, com resultados satisfatórios.
- Em 31.42 %, do total de amostras trabalhadas, foi detectada a amplificação de uma banda de 574 pares de base (bp) correspondente ao rRNA 16S de *M. mycoides*.
- A circulação desta espécie foi confirmada pela primeira vez, corroborando os estudos serológicos anteriormente realizados nesta localidade.
- Estes estudos constituem contributos para o conhecimento sobre a PPCB, confirmando a correlação do *M. mycoides* na região, aspecto a ter em conta em futuros trabalhos de epidemiologia molecular desta entidade em Angola e no desenvolvimento de novas vacinas que suportem o controlo e erradicação da PPCB.