

PCR OU PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Mycoplasma* spp.? RESULTADO PARCIAL

DIAGO DUTRA LIMA¹; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN²; KAUÊ
RODRIGUEZ MARTINS³; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A micoplasmose hemotrópica felina, também conhecida como anemia infecciosa felina, constitui uma das principais afecções infectocontagiosas em felinos domésticos, cuja etiologia pode ser atribuída aos agentes *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”. Conforme HARVEY (2006), micoplasmoses induzidas por *M. haemofelis* (*Mhf*) se manifestam com sintomatologia mais pronunciada, notadamente a anemia, em contraste com infecções desencadeadas por *Candidatus M. haemominutum* (*CMhm*), a qual, via de regra, se associam a alterações sutis no hematócrito e manifestações clínicas e subclínicas. Entretanto, em situações de coinfeção com o vírus da leucemia felina (FeLV), os sintomas relacionados ao *CMhm* se intensificam (FERRAZ *et al.*, 2020; MARTÍNEZ-DÍAZ *et al.*, 2013; HARVEY, 2006).

O avanço no desenvolvimento de abordagens rápidas para a detecção das diferentes espécies de *Mycoplasma* representa um ponto focal no estado da arte. Uma estratégia aplicada nesse contexto implica a análise da sequência 16S do RNA ribossômico (rRNA), a qual é empregada para a diferenciação taxonômica de espécies de *Mycoplasma* (GHORASHI; NOORMOHAMMADI; MARKHAM, 2010; JEFFERY *et al.*, 2007; REBELO; PARKER; CAI, 2011). Importa salientar que os ensaios moleculares se sobressaem como abordagem de eleição, quando cotejados com a identificação via esfregaço sanguíneo (SYKES, 2010). Dentro do escopo dos ensaios moleculares, merecem destaque as modalidades de PCR convencional (PCR) e as baseadas na técnica de PCR em tempo real (SYKES, 2010).

Dito isso, uma pergunta pode ser alinhada: há diferenças na sensibilidade dos testes de PCR e PCR em tempo real? O presente estudo buscou apontar se há diferenças no resultado do diagnóstico molecular para *Mycoplasma* spp., *Mhf* e *CMhm*, comparando os resultados aqui apresentados.

2. METODOLOGIA

Amostras de sangue felino com EDTA foram coletadas na clínica veterinária Império Para Gatos (Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil). As amostras foram recebidas, processadas para a extração do DNA total, e armazenadas em -4 °C para futuras análises.

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo de extração Quick-zol conforme as indicações do fabricante (LUDWIG BIOTECNOLOGIA Inc.). Em seguida, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria, utilizando espectrometro NanoDrop Lite (THERMO FISHER SCIENTIFIC, MA, USA,). O material então foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

Para o diagnóstico por PCR, foram utilizados os seguintes primers: Hf Forward (5'-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3') Hf Reverse (51-ACGCCCAATAAATCCGRATAA-3') segundo KAMYINGKIRD *et al.* (2021). Cada reação foi preparada no volume total de 25 µL. Foram utilizados 2,5 µL de tampão de reação 10x, 2,5 mM de dNTPS, 50 mM de MgCl₂, 10 µM de cada primer, e 1 µL de Taq DNA polimerase (LUDWIG BIOTECNOLOGIA Inc., RS, Brasil). Foi utilizado 40 ng de DNA amostral, e o volume completado para 25 µL com água livre de DNase. A reação de termociclagem inicia com um passo de 94 °C por 2 minutos, seguido então de 35 ciclos de um passo de desnaturação de 94 °C por 1 minuto, anelamento de 55 °C com 30 segundos e extensão de 72 °C por 30 segundos. Por último, um passo de 72 °C por 7 minutos e, posteriormente, mantido a 4 °C até a retirada do produto. O produto de PCR foi observado em gel de agarose 1,5% contendo Marcador de peso molecular de 100 pb (LUDWIG BIOTECNOLOGIA Inc., RS, Brasil). As amostras foram consideradas positivas para *Mhf* quando apresentaram amplicon de 170 pb, e para *CMhm* quando apresentaram amplicon de 193 pb.

Para o diagnóstico por PCR em tempo real foram utilizados os mesmos primers descritos anteriormente. Para a reação, foi utilizado 5 µL de GoTaq qPCR MasterMix (PROMEGA Inc.), 10 µM de cada primer, 40 ng de DNA genômico, e o volume total completado com água livre de DNase. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em termociclador Bio-Rad CFX Opus-96 (BIO-RAD In. CA, USA). A reação de termociclagem iniciou com um passo de ativação a 95 °C por 2 minutos, seguido então de 40 ciclos de um passo desnaturação de 94°C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Por último, um passo a 72 °C por 7 min, seguido por um passo de curva de fusão (*melt curve*), de 65 °C a 95 °C, com incrementos de 0,5 °C por 5 segundos. Os dados foram analisados utilizando o *software* Bio-Rad CFX Maestro (BIO-RAD In. CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento foram analisadas 39 amostras. Após a realização dos testes de diagnóstico, observou-se uma diferença expressiva entre os resultados de PCR e PCR em tempo real. Diferenças entre as técnicas de diagnóstico molecular estão apresentadas na tabela de distribuição de frequência a seguir (Tabela 1).

Tabela 1: distribuição de frequências dos resultados de detecção de DNA de *Mycoplasma* spp. realizados por PCR e PCR em tempo real.

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
PCR em tempo real	Positivo	14 (36%)	11 (28%)	25 (64%)
	Negativo	0 (0%)	14 (36%)	14 (36%)
Total		14 (36%)	25 (64%)	39 (100%)

Do número total de amostras (n = 39), 14 foram diagnosticadas como negativas nos dois diagnósticos, 14 amostras foram positivas em ambos, e 11 foram positivas no PCR em tempo real, mas negativas no PCR. Os resultados encontrados apontam o PCR em tempo real como uma ferramenta de maior taxa de detecção, quando comparado nessa porção ao montante amostral

(STAGGEMEIER *et al.*, 2015). Logo, podemos especular que o PCR em tempo real apresenta uma maior sensibilidade quando comparado ao PCR.

O PCR possui algumas limitações, como a necessidade de eletroforese em gel para a confirmação de diagnóstico, o que aumenta o tempo e a quantidade de material necessários para a realização do diagnóstico (PARKER *et al.*, 2018), a inabilidade de quantificação de amostras do produto da amplificação na mesma reação, e o uso de reagentes prejudiciais para a saúde, como o brometo de etídio (STAGGEMEIER *et al.*, 2015). Essas limitações tornam a PCR em tempo real mais segura, uma vez que esta técnica utiliza novas tecnologias de corantes de segunda e terceira geração, no caso das análises descritas nesse estudo o corante utilizado foi o *BrightGreen*, e permite a quantificação das amostras utilizando controles com concentrações conhecidas e comparando os valores encontrados na amplificação da amostra com essa curva padrão dos controles, assim criando uma curva dinâmica de detecção, possibilitando o cálculo de quantidade de DNA do patógeno presente na amostra (KRALIK; RICCHI, 2017; MADDOCKS; JENKINS, 2017).

4. CONCLUSÕES

Até o momento, podemos apontar uma diferença entre os resultados dos diagnósticos molecular de Mhf e *CMhm*. A quantidade de amostras cujo teste foi realizado continua baixa, sendo então necessário uma quantidade maior de dados para a realização dos testes estatísticos mais robustos para provar a diferença entre as formas de diagnóstico e elucidar a metodologia para diagnóstico por PCR em tempo real, buscando a diferenciação das espécies de *Mycoplasma spp*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERRAZ, A *et al.* MICOPLASMOSE EM FELINO DOMÉSTICO, FELV (+), RELATO DE CASO. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 0001–0007, 2020.
- HARVEY, J. W. Infectious Diseases of the dog and cat. **St Louis: Saunders Elseiver**, v. 3, p. 252–260, 2006.
- KETSARIN KAMYINGKIRD *et al.* Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and '*Candidatus Mycoplasma turicensis* of stray cats residing in Bangkok monasteries, Thailand. **AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES**, v. 55, p. 423–430, 2021.
- KRALIK, P.; RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- MADDOCKS, SARAH; JENKINS, ROWENA. Quantitative PCR. *Em: UNDERSTANDING PCR*. **Elsevier**, 2017. p. 45–52.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, Verónica L *et al.* Prevalence and co-infection of haemotropic *mycoplasmas* in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 879–885, 2013.
- PARKER, A. M. *et al.* A review of *mycoplasma* diagnostics in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 3, p. 1241–1252, 2018.



STAGGEMEIER, R. *et al.* QUANTITATIVE VS. CONVENTIONAL PCR FOR DETECTION OF HUMAN ADENOVIRUSES IN WATER AND SEDIMENT SAMPLES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 299–303, 2015.

SYKES, J. E. Feline Hemotropic *Mycoplasmas*. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1157–1170, 2010.