

DETECCION DE MICOPLASMAS DE AVES MEDIANTE ELISA-PCR.

*M.J.Rodriguez*¹ y *J.C.Abad*²

¹ INGENASA

Mycoplasma synoviae y *Mycoplasma gallisepticum* son dos micoplasmas patógenos que causan importantes pérdidas en aves de corral. *M.gallisepticum* cursa con sintomatología respiratoria crónica en pollos y sinusitis en pavos, como consecuencia de la infección primaria por *M. gallisepticum*, aparecen infecciones secundarias por *E. coli* y/o virus. *M.synoviae* produce infecciones respiratorias de vías altas en pollos y sinovitis en pavos. El control de estas enfermedades se basa en la erradicación de los micoplasmas de los lotes de animales reproductores 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, estas pruebas son fáciles de realizar y altamente sensibles, pero esta alta sensibilidad significa que se presentan falsos positivos. Entre las pruebas serológicas más utilizadas esta la aglutinación rápida en placa, es la más rápida en detectar anticuerpos después de la infección, pero también tiene limitaciones. Aparecen falsos positivos ante infecciones como la de estafilococos entre otras, cuando la muestra de suero está contaminada, cuando el suero se ha congelado, cuando el antígeno que se utiliza es muy sensible, también existen reacciones cruzadas de Ms con Mg, y también es frecuente que aparezcan falsos positivos después de la vacunación con vacunas inactivadas. Ante un resultado positivo de la aglutinación en placa se debe confirmar con pruebas más específicas como la inhibición de la hemoaglutinación (IH), esta prueba no es tan sensible como la prueba de aglutinación y además tarda más en detectar anticuerpos en las aves infectadas, con lo que puede dar falsos negativos. Además existen cepas de Mg poco invasivas, que colonizan la superficie del epitelio traqueal pero no desencadena una reacción inmunológica hasta varias semanas más tarde. Esto indica claramente que, cuando exista sospecha de infección, es necesario confirmar mediante aislamiento o detección del ácido nucleico del patógeno.. Todo ello hace deseable el desarrollo de métodos de diagnóstico sensibles, específicos y rápidos que permitan la detección diferencial de los micoplasmas.

Con este objetivo, hemos desarrollado dos ensayos de diagnóstico uno para *M. gallisepticum* y otro para *M. synoviae*. En ambos casos se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar RNA ribosomal de los micoplasmas y una sonda específica de especie que detecta el producto de la amplificación en placa y es revelada por un anticuerpo conjugado a peroxidasa. La valoración de los resultados se realizó mediante una reacción colorimétrica con lectura de absorbancia a 450nm.

Los ensayos se han optimizado para la detección del patógeno a partir de exudados traqueales recogidos con una torunda. El tratamiento de la muestra es muy sencillo, requiere solo tres lavados en una solución tamponada, hervido y hielo. Todos los componentes de la PCR se suministran como dos soluciones a 4°C que se han de mezclar y añadir el sobrenadante de la muestra hervida. El revelado en placa sigue la metodología habitual de los ensayos tipo ELISA y permite la lectura del resultado en espectrofotómetro.

El ensayo de *M. gallisepticum* resulta económicamente más costoso que el de *M. synoviae* ya que debido a la escasa presencia del patógeno en muestras de traquea es necesario el marcaje de la PCR en lugar del marcaje de la sonda.

Ambos métodos han sido probados en aislados de campo sin necesidad de un paso previo de enriquecimiento en cultivo y los resultados obtenidos han presentado una coincidencia de un 100% con otros ensayos presentes en el mercado.

OBJETIVOS

Desarrollo de dos ensayos de diagnóstico específicos sensibles y de fácil automatización basados en la amplificación del ácido nucleico de *M. gallisepticum* y *M. Synoviae* para la detección de Micoplasmas en muestras de exudado de traquea de aves de corral

MATERIAL Y MÉTODOS

TOMA DE MUESTRA Y TRANSPORTE. La obtención del exudado traqueal se realiza de la siguiente forma: Se introducen los dedos en la laringe del animal hasta visualizar la traquea, posteriormente, se introduce la torunda varias veces para arrastrar todo el contenido traqueal. Una vez la torunda está impregnada, se introduce en un tubo con 1.5 ml de solución salina. El transporte al laboratorio se realizará en frío dentro de las primeras 24 horas. Si bien, es posible el almacenamiento de las muestras a -20°C hasta su extracción.

EXTRACCIÓN DEL ACIDO NUCLEICO. El tratamiento de la muestra es muy sencillo, se recoge el contenido de la torunda mediante presión contra la pared del tubo en el tampón que se utilizó para el transporte, se recogen las células por centrifugación, se realizan tres lavados en una solución tamponada, tras concentrar la muestra en el mismo tampón se somete a hervido y hielo.

AMPLIFICACIÓN DEL ACIDO NUCLEICO Y REVELADO EN PLACA. La técnica se conoce como ELOSA, consiste en utilizar cebadores marcados para llevar a cabo la PCR, estos cebadores se unen a la placa que está recubierta de streptavidina. Posteriormente se desnaturaliza la doble hélice de ADN y se expone a una sonda específica marcada. La sonda híbrida en una zona interior a los cebadores, sólo si ha habido amplificación específica mediante la PCR se puede quedar unida a la placa. En un paso posterior se añade un anticuerpo conjugado a peroxidasa, si ha habido hibridación y por tanto PCR al añadir el sustrato de la peroxidasa los pocillos desarrollan color. Si no ha habido amplificación el pocillo permanece blanco.

RESULTADOS

SELECCIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICOPLASMAS AVIARES. Se seleccionaron diferentes parejas de oligonucleótidos descritos en la bibliografía (1, 2, 3) y se analizó su capacidad para amplificar el ácido nucleico de *Ms* y *Mg*. Se probaron tanto oligonucleótidos generales para ambos micoplasmas, como nucleótidos específicos para cada cepa que tuvieran sensibilidad suficiente para detectar estos micoplasmas en muestras de exudado traqueal. Finalmente se eligieron dos parejas para *Ms* (una específica y otra general para micoplasmas aviarios) y una para *Mg* (general de micoplasmas). Se inició la optimización del ensayo diagnóstico marcando el amplificado durante la PCR. Con este ensayo que no fue el definitivo se optimizaron las condiciones del ELISA. (Cantidad de sonda, dilución de conjugado, especificidad de las sondas para *MS* y *MG*). Se comprobó especificidad de la sonda mediante hibridación de la PCR específica *MS* con las sondas *MS* y *MG*

RESULTADOS OBTENIDOS CON MUESTRAS GALLINAS *MS* POSITIVAS, ANALIZADAS EN POOL DE TRES TRAQUEAS. Resulta más objetiva la interpretación de los resultados mediante medida de densidad óptica

que mediante detección en gel. Nuestros resultados presentaron una concordancia del 100% con un ensayo comercial.

RESULTADOS OBTENIDOS CON MUESTRAS DE GALLINAS POSITIVAS MG. Con los oligonucleótidos generales y el ensayo como se describe en métodos no se consiguió llegar al límite de detección necesario para el análisis de Mg en muestras de campo. Por lo que fue necesario modificar el ensayo. Se marcó la PCR con digoxigenina y se capturó con sonda marcada con biotina. También fue necesario añadir un paso de lavado de la sonda sobrante en la placa para evitar la competición entre ésta y la sonda pegada. El ensayo en estas condiciones resulta caro. Se han seleccionado nuevos oligonucleótidos (4) específicos de MG, que combinados con los primeros oligonucleótidos seleccionados, permiten realizar el ensayo de la forma más económica. (Pruebas preliminares).

DISCUSIÓN

Hemos realizado un estudio de distintas secuencias descritas en la bibliografía como específicas para MS y MG para poner apunto ensayos de diagnóstico para estas patologías.

Hemos seleccionado las parejas de oligonucleótidos que mostraban sensibilidad suficiente para la detección de los micoplasmas en muestras de campo. En el caso de MG solo tras revelado en placa.

Hemos comprobado la especificidad de sondas para la detección de MS y MG en ensayos de PCR combinados revelados en placa de microtitulación.

En el caso de Mg en una primera aproximación solo se pudieron seleccionar oligonucleótidos generales de micoplasmas aviáres con ellos ha sido necesario marcar la PCR con mayor número de moléculas de digoxigenina e introducir un paso de lavado en el ELISA para aumentar la sensibilidad del ensayo. Esto encarece mucho el ensayo.

Se hizo una segunda búsqueda de oligonucleótidos específicos de MG pensando que la baja sensibilidad en muestras de campo fuese debido a que al estar presente MS, los oligonucleótidos tuviesen mayor afinidad por esa cepa, datos preliminares indican que con estos nuevos oligonucleótidos el ensayo más económico es suficientemente sensible para la detección en muestras de campo.

Los ensayos se han optimizado para la detección del patógeno a partir de exudados traqueales recogidos con una torunda. El revelado en placa sigue la metodología habitual de los ensayos tipo ELISA y permite la lectura del resultado en espectrofotómetro.

La próxima aproximación será combinar ambos ensayos para conseguir un ensayo dúplex y específico para ambos micoplasmas.

1. Garcia, M., *et al.*, *Detection of Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, and M. iowae by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism*. Avian Dis, 1995. **39**(3): p. 606-16.

2. Garcia, M., *et al.*, *Use of species-specific oligonucleotide probes to detect Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, and M. iowae PCR amplification products*. J Vet Diagn Invest, 1996. **8**(1): p. 56-63.

3. Wang, H., A.A. Fadl, and M.I. Khan, *Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas*. Mol Cell Probes, 1997. **11**(3): p. 211-6.

4. Kiss, I., *et al.*, *Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay*. Vet Microbiol, 1997. **58**(1): p. 23-30.