

Cairo University  
Faculty of Veterinary Medicine  
Department of Microbiology

**Name : Ahmed Mohamed Abd- El Rahman Erfan**

**Thesis title:**

Differentiation between vaccinal and field strains of *Mycoplasma gallisepticum* by using real time PCR

For PhD 2012

Under Supervision of:

**Prof. Dr. Salah Eldin Abd- El Kareem Selim**

**Prof. Dr. Jakeen Kamal Eljakee**

**Prof. Dr. Mona Mehrez Ali**

**Abstract**

*Mycoplasma gallisepticum* is an important avian pathogen causing significant economic losses within the poultry industry. One of the options for controlling MG infection is live MG vaccines. Differentiation between field and vaccinal strains is important for determining the source of the infection, recognizing particularly virulent strains, and monitoring vaccination programs. In this study we used *mgc2*, MGA0319 genes real time PCR assays to detect MG to be furtherly tested by *mgc2* rt-PCR for F, 6/85 and TS-11 strains. The detection limits for *mgc2* cPCR was 70 CFU/ml. However, those of MGA0319 gene, *mgc2* gene, F, 6/85 and TS-11 rt-PCR were 50, 14, 18, 12 and 20 CFU/ml, respectively. All the PCR assays were specific for its related strains. Out of 84 MG vaccinated and unvaccinated poultry farms, 36 were positive for MG, from which 16 were positive for F strain and 11 were positive for 6/85 strain, while 9 farms were MG positive but negative for live vaccine rt-PCR. DNA nucleotide sequencing for 20 positive cases for *mgc2* gene confirmed the rt-PCR results and grouped the nucleotides sequenced samples into 4 groups (F, 6/85 and two field strain groups named field group A and B).

**Key Words:** Mycoplasma –gallisepticum- vaccines- rt-PCR- Culture- Gene analysis- mutations)

## مستخلص عربى

كلية الطب البيطرى

جامعة القاهرة

قسم الميكروبيولوجيا

الاسم: أحمد محمد عبد الرحمن عرفان

دكتوراة ٢٠١٢

عنوان الرسالة التمييز بين العترات الحقلية و العترات اللقاحية للميكوبلازما جاليسيبيتم باستخدام

تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي (Real time PCR)

تحت اشراف:

أ.د/ صلاح الدين عبد الكريم سليم

أستاذ الميكروبيولوجيا كلية الطب البيطرى- جامعة القاهرة

أ.د/ جاكين كمال عبد الحليم الجاكى

أستاذ و رئيس قسم الميكروبيولوجيا

كلية الطب البيطرى - جامعة القاهرة

أ.د/ منى محرز على

رئيس بحوث أمراض الدواجن بالمعمل المركزى للرقابة البيطرية على الأنتاج الداجنى-

معهد بحوث صحة الحيوان

الميكوبلازما جاليسيبيتم هي ممرض داجنى هام تسبب خسائر اقتصادية هامة لصناعة الدواجن.

أحد الخيارات للتحكم فى عدوى الميكوبلازما جاليسيبيتم هي اللقاحات الحية. التمييز بين العترات

الحقلية و اللقاحية هام لتحديد مصدر العدوى و تعريف العترات الخاصة بالضرارة و متابعة برامج

التحصين. فى هذه الدراسة تم استخدام إختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل الكمي فى الوقت

الحقيقى الخاص بالجينات  $mgc2$  و  $MGA0319$  للكشف عن الميكوبلازما جاليسيبيتم و ذلك

لإختبارها فيما بعد بإختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل الكمي فى الوقت الحقيقى لجين  $mgc2$

للكشف عن العترات F و  $6/85$  و TS-11. حد الكشف لإختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل

التقليدى لجين  $mgc2$  و إختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل الكمي فى الوقت الحقيقى لجين

$MGA0319$  وجين  $mgc2$  و F و  $6/85$  و TS-11 كان ٧٠ و ٥٠ و ١٤ و ١٨ و ١٢ و ٢٠

وحدة مستعمرة/ مليلتر . كل فحوصات إختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل كانت متخصصة

للعترات المتعلقة بها. من ضمن ٨٤ مزرعة دواجن محصنة و غير محصنة للميكوبلازما

جاليسيبيتم كانت ٣٦ مزرعة إيجابية للميكوبلازما جاليسيبيتم. كانت منهم ١٦ مزرعة إيجابية

للعتره F و ١١ مزرعة إيجابية للعتره  $6/85$ . لكن كانت هناك ٩ مزارع إيجابية للميكوبلازما

جاليسيبيتم لكن سلبية لإختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل الكمي فى الوقت الحقيقى الخاص

بالعترات اللقاحية الحية. إختبار الكشف عن التتابع النيوكليوتيدى للحامض النووى ل ٢٠ حالة إيجابية

لجين  $mgc2$  أكد نتائج إختبار تفاعل انزيم البلمره المتسلسل الكمي فى الوقت الحقيقى و جمع

العينات المختبرة للتتابع النيوكليوتيدى للحامض النووى فى ٤ مجموعات (F و  $6/85$  و مجموعتين

للعترات الحقلية تم تسميتهم مجموعة حقلية أ و ب).

(الكلمات الدالة: ميكوبلازما- جاليسيبيتم- لقاحات- البلمرة المتسلسل- العزل- التحليل الجينى-

طفرات )

## List of contents

<b>Item</b>	<b>Page No.</b>
<b>1. Introduction</b>	1 - 6
<b>2. Review of literature</b>	7 - 64
2.1. Characters and genomic structure of the genus mycoplasma	7
2.2. Types, signs and postmortem examination of mycoplasmosis in poultry.	15
2.3. Pathogenesis of mycoplasmosis	18
2.4. Live MG vaccines	22
2.5. Differentiation of strains	27
2.6. Diagnostic procedure for MG in poultry	31
2.6.1. Sampling procedures	31
2.6.2. Isolation of Mycoplasmas	35
2.6.3. cPCR technique for detection of MG	41
2.6.4. Rt-PCR technique	50
2.6.5. Rt-PCR technique for detection of MG	55
2.6.6. Sequencing and nucleotide sequence analysis of MG	60
<b>3. Material and Methods</b>	65 – 97
<b>3.1. Material</b>	65
3.1.1. Microbial strains used in specificity testing of cPCR and rt-PCR	65
3.1.2. Material used in sensitivity testing of cPCR and rt-PCR	67
3.1.3. Field samples	67
3.1.4. Material used for sampling	75
3.1.5. Material used for isolation and preservation of MG	75
3.1.6. Material used for determination of numbers of colony forming units.	77
3.1.7. Material used for extraction of DNA of MG	78
3.1.8. Material used for extraction of nucleic acids of reference strains used for cPCR and rt-PCR specificity test	78
3.1.9. Equipment and apparatuses used for extraction of nucleic acids	78
3.1.10. PCR Master Mix used for cPCR and rt-PCR	79
3.1.11. MG oligonucleotide primers used in cPCR	79
3.1.12. DNA Molecular weight marker	80
3.1.13. Material used for agarose gel electrophoresis	80
3.1.14. Equipment and apparatuses used in cPCR	81

3.1.15. Primers and probes used for rt-PCR for MG	82
3.1.16. Equipment and apparatuses used for rt-PCR for MG	83
3.1.17. Materials used for PCR product purification of MG	84
3.1.18. Material used for sequencing of the purified PCR product	84
<b>3.2 Methods</b>	<b>85</b>
3.2.1. Specificity testing of cPCR and rt-PCR	85
3.2.2. Sensitivity testing of cPCR and rt-PCR	85
3.2.3. Handling of different types of samples	85
3.2.4. Method for isolation and identification of MG	85
3.2.5. Determination of numbers of colony forming units	87
3.2.6. Extraction of MG DNA	88
3.2.7. Preparation of PCR Master Mix for mgc2 cPCR	89
3.2.8. Cycling conditions of the two primers during cPCR	90
3.2.9. Gel Pilot DNA Molecular weight marker	90
3.2.10. Agarose gel electrophoreses	90
3.2.11. Preparation of PCR Master Mix for (mgc2) or (MGA0319) genes rt-PCR for detection of MG	91
3.2.12. Cycling conditions for (mgc2) gene rt-PCR for detection of MG	91
3.2.13. Cycling conditions for (MGA0319) gene rt-PCR for detection of MG	92
3.2.14. Preparation of PCR Master Mix for strain differentiation of MG live vaccines	92
3.2.15. Rt-PCR cycling conditions for strain differentiation of MG live vaccines	92
3.2.16. Methods for purification of the PCR Products	93
3.2.17. Sequencing reaction	95
3.2.18. Purification of the sequence reaction	95
3.2.19. Loading the sequencer machine	97
3.2.20. Phylogenetic analysis	97
<b>4. Results</b>	<b>98 - 203</b>
<b>5. Discussion</b>	<b>204 - 229</b>
<b>6. Summary</b>	<b>230 - 233</b>
<b>7. References</b>	<b>234 - 257</b>
<b>Arabic summary</b>	<b>4-1</b>

## **List of abbreviations**

6-FAM	6-carboxyfluorescein
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AIV	Avian influenza virus
AP-PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction
ATCC	American type culture collection
BCPP	Bovine contagious pleuropneumonia
BHI	Brain heart infusion
bp	Base pair
°C	Celsius degree
CCU	Color change unit
CD4, CD8	Cluster of differentiation 4,8
CDSs	coding DNA sequences
CFU	Colony forming unit
Cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
cPCR	Conventional polymerase chain reaction
CRD	Complicated respiratory disorder
CT	Threshold cycle
CY5	Cyanine 5 dye
DDW	Double distilled water
DNA	Deoxy ribonucleic acid
Ds	Double stranded
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
Fg	Fimto gram
FRET	Flourescence resonance energy transfer
g	Gram
GCP of HRM	Genotype confidence percentage of high-resolution melting
GFP	Green Fluorescent Protein
Govern.	Governorate
GTS	gene-targeted sequencing
H	Hour
HEX	Hexachlorofluorescein
Hr	Hour
HRM	High-resolution melting
IBD	Infectious bursal disease

IB	Infectious bronchitis
IGSR	intergenic spacer region
IL	Interleukin
ILT	Infectious laryngotracheitis
Kb	Kilo base
L	Ladder
LC	Light cycler
LCS	Live chicken swab
LP	Lipoprotein
LPAI	Low pathogenic Avian influenza
M	Mycoplasma
MA	Mycoplasma agar
Mb	Mycoplasma broth
MD	Marek's disease
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
mg	Milligram
MGB	Minor groove binder
MGLP assay	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> lipoprotein assay
MI	<i>Mycoplasma iowae</i>
<i>Mim</i>	<i>Mycoplasma imitans</i>
Min	Minute
μl	Microleter
ml	Milliliter
μm	Micrometer
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
Mol	Molarity
MS	<i>Mycoplasma synovi</i>
N	Nested
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Hydrogen
ND	Newcastle disease
Neg	Negative
ng	Nanogram
Nm	Nanometer
Nt	Nucleotide
OIE	Office International des Epizooties
<i>oriC</i>	Origin of replication
PCR	Polymerase chain reaction
Ph	Power of Hydrogen
pi	Post infection

pmol	Pico mole
PMT	photomultiplier tube
Pos	positive
PPLO	Pleuropneumonia like organisms
Q	Quencher
Q-PCR	Quantitative PCR
R	Reporter
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RBCs	Red blood corpuscles
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
Rn	Normalized row fluorescence
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamine
rpm	Revolution per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT	Room temperature
rt-PCR	Real time polymerase chain reaction
S	<i>Saccharomyces</i>
sec	second
SMST	Scraping mucosal surface of trachea
SPF	Specific pathogen free
tRNA	Transfer ribonucleic acid
TS-11	temperature sensitive mutant
Taq	<i>Thermos aquaticus</i>
TBE	Tris borate EDTA
Tm	Melting temperature
TS	Tracheal swab
UNVD group	Unvaccinated diseased group
UNVH group	Unvaccinated healthy group
VD group	Vaccinated diseased group
VH group	Vaccinated healthy group
WHO	World health organisation
W / V	Weight / Volume

## **List of nucleotide abbreviations**

A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine

## **List of amino acids abbreviations**

A	Alanine
C	Cysteine
F	Phenylalanine
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
K	Lysine
L	Leucine
M	Methionine
N	Asparagine
P	Proline
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Serine
T	Threonine
V	Valine