

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERADA (PCR), PARA LA DETECCIÓN DE *Pasteurella multocida* TOXIGÉNICA

Sánchez A*¹, Pijoan C², Vargas A⁴, Montelongo V¹, Alcantara T¹, Boldo, X.³, Oliva D¹, Hernández, B-E¹, Ciprián A¹ y Mendoza S¹
¹FESC-Cuautitlán, UNAM, Campo I, Posgrado, ²Universidad de Minnesota, ³Ciencias Biológicas, IPN, ⁴Centro de Enseñanza, Xilotepec, UNAM seme@servidor.unam.mx

2

Introducción

La Rinitis Atrófica (RA) es una enfermedad económicamente importante que afecta a los cerdos, producida por los agentes *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*, además de diferentes factores ambientales, sin embargo los casos mas severos de esta enfermedad se presentan con *Pasteurella multocida* el cual es un patógeno oportunista en veterinaria, encontrándose principalmente como flora normal en el tracto respiratorio alto en cerdos, sin embargo existe una subespecie la cual sintetiza una proteína de 146.5 KDa codificada por el gen extracromosomal ToxA de 4381 pb^{1,5}. Esta proteína ToxA es el principal factor de virulencia de la Rinitis Atrófica Progresiva (PAR), que se caracteriza clínicamente por estornudo, sangrado y deformación del morro, retraso del crecimiento, atrofia en los cornetes y desviación del tabique⁵.

Por lo tanto un método rápido y exacto para la detección de este agente etiológico ayudaría a tener un buen diagnóstico preciso y, así aplicar un tratamiento adecuado consiguiendo una estabilidad en la bioseguridad de la granja con estudios epidemiológicos².

El objetivo principal de este trabajo es establecer el procedimiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Pasteurella multocida* toxigenica.

Material y Métodos

Las cepas utilizadas de *Pasteurella multocida* tipo A y D que fueron cultivadas en agar infusión cerebro corazón (BHI) y nuevamente tipificadas con una estría de *Staphylococcus aureus*³, a 37 °C por 24 horas.

La extracción de ADN bacteriano se realizo con el método etanol-cloroformo, y detectado en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio⁴.

La técnica de PCR se realizo con 1µl de ADN molde para 25 µl de reacción. El Kit utilizado para el ensayo fue de la marca QIAGEN® Taq ADN Polymerase con los siguientes volúmenes Q-Solution 5x, 5µl; QIAGEN PCR Buffer 10x con MgCl₂ 15 mM, 2.5µl; MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl; dNTP's 10 mM, 0.5µl; iniciadores ToxA² y ToxA² 10 µM, 1 µl respectivamente; Taq polimerasa 1 U/µl, 1µl. Las condiciones de amplificación son 30 ciclos con temperaturas de desnaturalización de 94 °C a 30 seg., alineamiento 52.5 °C a 30 seg., extensión 72 °C a 1 minutos. El producto de amplificación fue detectado en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio⁴.

Resultados y Discusión.

Se tipifico la cepa de *Pasteurella multocida* tipo A usando la hialuronidasa del *Staphylococcus aureus*, observando una descapsulación como resultado positivo, por lo tanto un resultado negativo no presenta reducción del tamaño, la cual fue observado en la cepa de tipo D.

La obtención de ADN se muestra en la figura 1, se observan bandas de alto peso molecular localizadas por arriba de 2642 pb, indicando la presencia de ADN.

La especificidad de los iniciadores se muestra en la figura 2, detectando que solo *Pasteurella multocida* tipo D mostró amplificación observándose dos bandas, en el carril 7 se muestra en control negativo de la amplificación

Posteriormente se volvió a repetir la amplificación de la bacteria *P. multocida* tipo D, para poder identificar el peso molecular de las bandas amplificadas ver figura 3, en el gel de azarosa se aprecian tres bandas de aproximadamente 865 pb, 760 pb y 450 pb, calculadas por medio del genetools Syngene, por lo tanto, el peso la banda que se busca es de 846 pb^{2,1}, sin embargo para identificar exactamente esta banda se podrían realizar estudios de secuenciación, las dos bandas que aparecen implican otro tipo de estudios.

Figura 1. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Marker XIII, en los carriles 2 al 4 son muestras de *P. multocida* tipo A con tres alicuotas diferentes, en los carriles 5 al 7 son muestras de *P. multocida* tipo D con tres alicuotas diferentes.

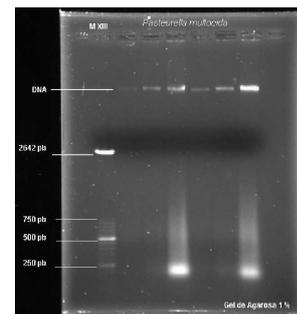


Figura 2. En los carriles 1 a 3 son muestras de ADN de las bacterias *Pasteurella multocida* Tipo A y D y *Haemophilus parasuis* respectivamente, en los carriles 4 a 6 son productos de amplificación de las bacterias anteriores respectivamente.

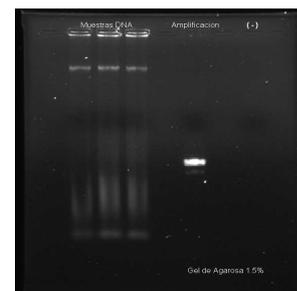
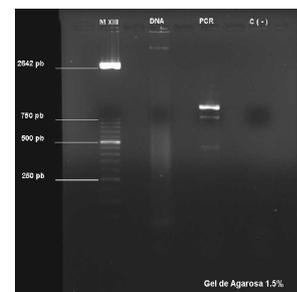


Figura 3. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Marker XIII, en el carril 2 se encuentra la muestra de ADN utilizada, en el carril 3 se observa el producto de amplificación y en el carril 4 se muestra el control negativo de la amplificación



Referencias bibliograficas

1. Petersen, S. K., 1990. Molecular Microbiology Vol. 4, (5): 821-830
2. Lichtensteiger, C.A., Steenbergen, S.M., Lee, R.M., Polson, D.D. and Vimr, E.R. 1996. Journal of Clinical Microbiology 34:12;3035-3039.
3. Carter, G.R., Rundell, S.W. 1975. Vet Rec. pp. 343.
4. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2a Edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.
5. M.F. de Jong en Libro Diseases of Swine. 8ª Edición. Editorial Iowa State University Press. United States of America.

Agradecimientos: Por su apoyo técnico al Sr. Gabino Sánchez y al MVZ David Trujillo

Proyecto PAPIIT IN 223203-2