

ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER CAUSADA POR *Haemophilus parasuis* EN MÉXICO CON LA TÉCNICA ERIC-PCR

Montelongo V^{1*}, Pijoan C⁴, Vargas, A², Pérez Ma. L¹, Sánchez A¹, Hernández B-E¹, Nahar, A¹, Cibrián, A¹, Oliva D¹, García A¹, Sagahun, A³, Alcántara T¹, Ciprián A¹, Mendoza S¹.

¹FES-Cuautitlán-UNAM, ²Centro de Enseñanza, Xilotepec, UNAM, ³FMVZ, UNAM, ⁴Universidad de Minnesota. seme@servidor.unam.mx

Introducción.

La enfermedad de Glässer, es producida por la bacteria *Haemophilus parasuis*. Esta enfermedad esta contemplada como una afección esporádica, asociada a situaciones pos-éstrés principalmente en cerdos en la etapa de destete. Sin embargo, en granjas con elevado grado de sanidad la enfermedad puede producir una elevada morbilidad y mortalidad en todas las etapas de producción. El diagnóstico se basa en los signos clínicos en presencia y ausencia de lesiones en la necropsia, y en el cultivo bacteriológico. Actualmente existen pruebas de PCR para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis*. La prueba de ERIC-PCR está basada en la amplificación de secuencias de consenso enterobacterial repetitivo intergénico (3) y la prueba de PCR con la cual se amplifica un fragmento de 821pb de la región que codifica para el ARN 16s (1). Se ha mostrado que la ERIC-PCR es eficaz para clasificar diferentes especies bacterianas y para discernir entre las cepas de una misma especie, mientras que la prueba de PCR que amplifica un fragmento de 821pb detecta al *Haemophilus parasuis* de muestras clínicas y define la prevalencia de las infecciones (2). En este trabajo las dos pruebas fueron estandarizadas en el laboratorio como método de diagnóstico de *Haemophilus parasuis* con el objetivo de evaluar la ERIC-PCR para el posterior estudio de la enfermedad de Glässer en México. El estudio se llevó a cabo con cepas de *Haemophilus parasuis* aisladas de muestras obtenidas de pulmón, cornetes nasales y líquido cefalorraquídeo de diferentes cerdos en granjas de México.

Material y Métodos.

Para la estandarización se utilizo la cepa de *H.parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), posteriormente esta fue tomada como control positivo para todas las reacciones. Debido a que *H. parasuis* se puede aislar de sitios respiratorios y sistémicos, el muestreo para el aislamiento de cepas de esta bacteria se llevo a cabo en tres sitios de la anatomía del cerdo: pulmón, líquido cefalorraquídeo y cornetes nasales. Las cepas obtenidas se cultivaron en agar enriquecido PPLO con levadura. La extracción de ADN de las

cepas de *H.parasuis* se realizo por el método Fenol- Cloroformo. Alícuotas de 5µL de las muestras amplificadas gel de agarosa al 2% con 0.5µg/ml de Bromuro de etidio corrido a 80v por 60min (Fig 1).

Resultados y Discusión.

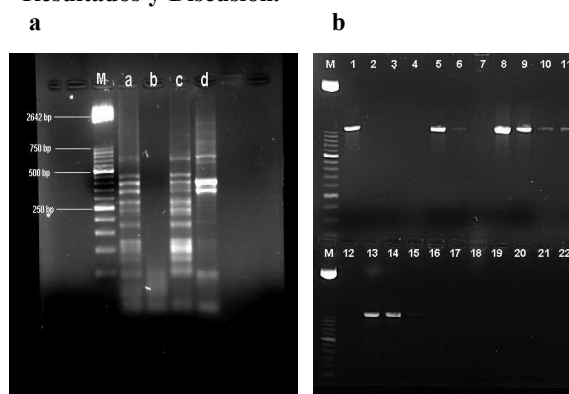


Figura 1. a Perfiles de ADN de *H. parasuis* obtenidos con la ERIC-PCR. **b** Fragmentos de ADN de 821pb de *H. parasuis*.

Con la técnica de ERIC-PCR utilizando los oligonucleótidos ERIC1R y ERIC2 se obtuvieron patrones de huellas genómicas de cuatro muestras, en tanto que con los oligonucleótidos *Hps* se amplificaron fragmentos de 821pb. La prueba de PCR con oligonucleótidos *Hps* detecto de manera específica a la bacteria *Haemophilus parasuis* incluso con muestras contaminadas. La técnica de ERIC- PCR nos permitió diferenciar entre las cepas aisladas de una misma granja, esto es importante ya que con esto se podrá realizar posteriormente estudios sobre la epidemiología en granjas de todo el país.

Referencia bibliográfica.

1. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J Vet Diagn Invest 2001. 13(6): 495-501.
2. Oliveira, S; and Pijoan, C. 2003. *Haemophilus parasuis* : new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology. Review.
3. Versalovic, J; T. Koeuth, and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research. 19:6823-6831

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

Proyecto PAPIIT IN 223203-2