

DETECCIÓN DE ADN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PLEURONEUMONIA PORCINA

Hernández S, Alfonseca E*, Sahagún A, Ramírez G

**Laboratorio de Inmunología Molecular Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM
Proyecto financiado por PAPIIT/UNAM IN213302**

Introducción.

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente causal de la pleuroneumonía de los cerdos, enfermedad respiratoria altamente contagiosa, que causa una alta morbilidad y mortalidad. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha propuesto como método de diagnóstico para *A. pleuropneumoniae*, por su alta sensibilidad para detectar secuencias genéticas específicas del microorganismo. En este estudio, se utilizó un PCR con iniciadores basados en la secuencia del gen *apxIVA*, el cual amplifica un fragmento específico de 422 pb para la detección de *A. pleuropneumoniae* a partir de muestras de pulmón de cerdo.

Material y Métodos

La cepa de campo UNAM-127 de *A. pleuropneumoniae*, proporcionada por el Departamento de Producción Animal Cerdos de la FMVZ, fue cultivada en agar sangre con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* y agar PPLO en presencia de NAD. El ADN fue extraído por el método de CTAB/fenol/cloroformo y cuantificado por espectrofotometría. Para el PCR se utilizaron los iniciadores del gen *apxIVA* de *A. pleuropneumoniae* (Schaller, 2001): F-5'TGGCACTGACGGTGATGA3' y R-5'GGCCATCGACTCAACCAT3'. La especificidad fue determinada utilizando ADN de *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis*. La sensibilidad del PCR fue determinada realizando 11 diluciones décuples de ADN bacteriano a partir de 1 ng; de 3 diluciones décuples y 7 dobles a partir de 3.081×10^4 UFC, y de ADN extraído de pulmones inoculados con 3 diluciones décuples y 7 dobles a partir de 3.904×10^4 UFC. Además se evaluaron muestras de pulmones, corazón traquea e hisopos nasales de 5 lechones infectados experimentalmente con 2 ml de una suspensión de 6×10^7 UFC/ml. También se realizaron extracciones a partir de 41 muestras de campo de pulmones de animales sospechosos de pleuroneumonía.

Resultados

El PCR resultó específico al no amplificar ningún producto cuando se utilizó ADN de *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis*. La sensibilidad de los iniciadores del PCR fue de 0.1 fg a partir de ADN extraído de *A. pleuropneumoniae* en cultivo. La sensibilidad del PCR, utilizando diluciones del microorganismo fue 1 UFC y de 24 UFC a partir de ADN extraído de pulmones inoculados. Todas las muestras de los cerdos infectados experimentalmente fueron positivas al aislamiento, excepto los hisopos nasales. El PCR fue capaz de detectar *A. pleuropneumoniae* a partir de todas

las muestras, incluyendo hisopos nasales (Cuadro 1). Todas las muestras de campo positivas al PCR, resultaron positivas al aislamiento (Cuadro 2).

Cuadro 1.- Cerdos infectados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae*

5 lechones	Bacteriología	PCR
Pulmones	+	+
Corazones	+	+
Tráqueas	+	+
Hisopos	-	+

Cuadro 2.- Pulmones de cerdos sospechosos a *A. pleuropneumoniae*

Origen	Muestras	Cultivo (+)	PCR (+)
Toluca	10	-	-
Michoacán	3	1	1
Yucatán	3	3	3
Veracruz	2	-	-
Puebla	8	-	-
Coahuila	1	-	-
Querétaro	14	-	-

Discusión

Las secuencias del gen *apxIVA* han sido propuestas en otros estudios, por su capacidad de detectar *A. pleuropneumoniae* por PCR^{1,2}. Sin embargo, se han evaluado con cultivos puros del microorganismo, cultivos bacterianos mixtos en tonsilas y en hisopos nasales; en la mayoría de estos estudios se han usado animales infectados experimentalmente, sin demostrar su eficacia en muestras de campo^{1,3,4,5}. El PCR utilizado mostró ser específico al no amplificar ADN de otros géneros bacterianos y altamente sensitivo al detectar 24 bacterias en tejido. Las muestras de los cerdos inoculados experimentalmente fueron positivas al PCR y a la bacteriología excepto los hisopos nasales. El PCR detectó ADN de *A. pleuropneumoniae* a partir de pulmones de cerdos sospechosos a pleuroneumonía.

Literatura citada

- Schaller, A., et al., 2001, *Vet Microbiol*; 79(1): 47-62.
- Schaller, A., et al., 1999, *Microbiol*; 145: 2105-2116.
- Cho, W. S., Chae, C. 2003, *Lett Appl Microbiol* ; 37 (1): 56-60.
- Hernanz, M. C., et al., 1999; *J. Clin. Microbiol.* 37: 1575-1578
- Gram, T., et al., 2000, *Vet. Microbiol.* ; 75: 43-57.

