

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER

Reyes L, Sahagún A*, Alfonso E, Galván E, Mendoza S

Laboratorio de Inmunología Molecular, Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM

Proyecto financiado por PAPIIT/UNAM IN213302

Introducción

La enfermedad de Glässer es causada por *Haemophilus parasuis*, un cocobacilo pleomórfico Gram negativo de crecimiento lento y dependiente de NAD. Frecuentemente este microorganismo está asociado al síndrome respiratorio reproductivo del cerdo (PRRS) o al complejo respiratorio del cerdo. El presente estudio tiene como objetivo la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADN purificado, bacterias, tejidos inoculados y muestras de campo.

Material y métodos

Haemophilus parasuis, previamente identificado, fue cultivado en presencia de NAD. Las bacterias fueron cosechadas en medio de conservación y alicuotadas en volúmenes de 200 µl. El ADN de la bacteria fue extraído por el método de CTAB-fenol-cloroformo y cuantificado por espectrofotometría. Se determinó la sensibilidad del PCR a partir de 9 diluciones décuples del ADN iniciando con 100 ng. La concentración de bacteria fue determinada por el método de Miles y Misra en UFC/ml. Se determinó la sensibilidad del PCR para detectar directamente bacterias a partir de 3 diluciones décuples y 8 dobles iniciando con 1.6052×10^4 UFC. Para determinar la sensibilidad del PCR a partir de tejido, se hicieron 8 diluciones dobles iniciando con 5×10^3 UFC, cada una se inoculó a diferentes porciones de 50 mg de pulmón de cerdo sano. El ADN de las muestras inoculadas fue extraído con CTAB/cloroformo y sometido a PCR. La especificidad de los iniciadores del PCR se comprobó utilizando ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* tipo A, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes* y *Escherichia coli*.

Resultados

La sensibilidad del PCR para detectar ADN purificado fue 10 fg con una temperatura de alineación a 54°C. La sensibilidad del PCR directamente de bacterias fue de 0.063 UFC. La sensibilidad del PCR a partir de ADN extraído de las muestras inoculadas fue de 6 UFC, aunque se requieren aproximadamente 156 UFC en el tejido. Se

evaluaron 54 muestras de pulmón de cerdos, de diferentes zonas del país, con signos y lesiones evidentes de enfermedad respiratoria. Cinco pulmones fueron positivos a *H. parasuis* por PCR, obteniéndose el aislamiento bacteriológico de una muestra.

Discusión

El PCR constituye una herramienta útil para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Glässer, ya que permite la detección de hasta una bacteria. Sin embargo, para la extracción de ADN a partir de tejido, se requieren aproximadamente 156 UFC. El ADN extraído se resuspendió en 50 µl y se utilizaron 2 µl en la reacción de PCR lo que corresponde a 6 UFC. Oliveira S. *et al.* reportó que la sensibilidad de los iniciadores del PCR fue de 69 pg a partir de ADN purificado de *H. parasuis* a una temperatura de alineación de 59°C. En nuestro estudio se logró incrementar la sensibilidad hasta 10 fg con una temperatura de alineación de 54°C, sin modificar la especificidad. De manera similar el autor detecta 100 UFC por PCR a partir de cultivo bacteriano, mientras que nuestro estudio detecta 0.063 UFC. Oliveira S. *et al.*, reporta amplificación por PCR a partir de LCR, corazón, tonsilas y pulmón provenientes de animales inoculados y de campo. En nuestro estudio únicamente se obtuvieron amplificaciones a partir de pulmón y no de LCR ni de corazón. Posiblemente esto se deba a que la mayoría de sus muestras provienen de animales experimentales mientras que en nuestro estudio se utilizaron únicamente muestras de campo.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que el PCR es una herramienta útil para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Glässer aún en casos en que no se puede obtener el aislamiento bacteriológico.

Bibliografía

1. Oliveira S. J. Vet. Diagn. Invest., 2001; 13: 495-501.
2. Done S, H. The Pig Journal 1999; 44: 207-221
3. Rapp-Gabrielson. Diseases of swine. 8th edit, B.S. Straw et al., Blackwell Science, Iowa State University., Ames, Iowa, 1999.