

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Lawsonia intracellularis* A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS, MEDIANTE LA CONSTRUCCIÓN DE UN CONTROL INTERNO

*Rangel-Huerta, E.¹, Martínez, G. D.¹, Pradal-Roa, P. J.², Verdugo R. A.¹ y Castañeda, R. A.¹

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Depto. de Microbiología e Inmunología, ²Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la FMVZ. de la UNAM. Correo electrónico del autor: emarh21@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

La Enteritis Proliferativa Porcina (EPP) es una enfermedad emergente a nivel mundial que se caracteriza por afectar la mucosa ileal de cerdos destetados produciendo un marcado engrosamiento de ésta. Afecta a varias de especies animales, principalmente los cerdos (1), provocando un impacto económico negativo en la porcicultura a nivel mundial. Esta enfermedad es producida por *Lawsonia intracellularis*, una bacteria intracelular identificada en 1995 por Lawson, G.H.K., *et al.* El aislamiento de *L. intracellularis* es difícil lo que complica su diagnóstico. En 1993 Jones, G. F., *et al.*, (2) detectaron la presencia de *L. intracellularis* en heces de cerdo con EPP mediante PCR y desde entonces esta técnica ha sido ampliamente usada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de determinar la presencia de inhibidores, así como para estandarizar la PCR, se construyó un fragmento de ADN a partir del gene de resistencia a la Kanamicina (*kan^R*), contenido en el plásmido puc4K. Brevemente, el gene *kan^R* (1282pb) se obtuvo a partir del plásmido puc4K por digestión con la enzima EcoRI y se utilizó como ADN blanco en una PCR (PCR-1) con los iniciadores LWe1-KM1 y LWe2-KM2. Las secuencias de estos oligonucleótidos LWe1 y LWe2, amplifican un fragmento específico de *L. intracellularis* de 375 pb que forma parte del gene de una liasa y otra (KM1 y KM2) para amplificar un fragmento de 813 pb de *kan^R*. Esta PCR se llevó a cabo en 2 etapas de la siguiente forma: 10 ciclos con desnaturalización 95°C por 60s, alineación 53°C por 90s y extensión a 72°C por 150s y posteriormente 30 ciclos con desnaturalización 94°C por 90s, alineación 65°C por 90s y extensión 72°C por 150s (2). El producto de esta PCR se purificó con el sistema QIAEX II (QIAGEN) y fue clonado en el plásmido pCR 2.1-TOPO® (Invitrogen) generando el plásmido pELW. Con este plásmido se transformó *E. coli* cepa DH5α que será adicionada a las muestras clínicas de mucosa intestinal y de heces, para realizar otra PCR (PCR-2) utilizando únicamente los iniciadores externos (LWe1-LWe2) que amplifican el fragmento específico.

RESULTADOS

A partir de la PCR1 se logró obtener un fragmento de 854 pb que comprende un segmento del gene *kan^R* de 813 pb y las secuencias de los iniciadores para *L. intracellularis* LWe1 (20 pb) en el extremo 5' y LWe2 (21 pb) en el extremo 3' comprenden regiones que van de 5 a 24 pb y 304 a 323 pb respectivamente. El fragmento se logró clonar en el plásmido pCR 2.1 TOPO y se secuenció, corroborando la eficacia del procedimiento. *E.*

coli cepa DH5α fue transformada por electroporación con pELW, posteriormente se purificó el plásmido por lisis alcalina, logrando detectar hasta 10 pg del control interno mediante la PCR-2. Finalmente, se agregó el plásmido pELW al ADN extraído de mucosa intestinal y de muestras fecales de cerdo para evaluarlos con la misma prueba, logrando la amplificación del control en ambos casos.

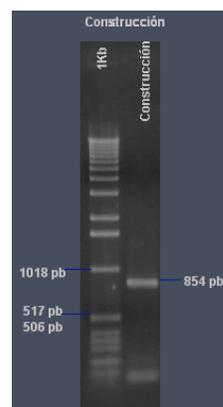


Figura 1. Gel de agarosa al 1%, donde se observa el producto de la construcción hecha mediante la PCR1

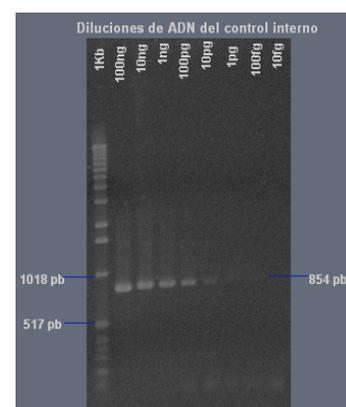


Figura 2. Gel de agarosa al 1%, donde se observa la concentración mínima del control interno detectada mediante la PCR-2

DISCUSIÓN

Aunque la PCR es una técnica molecular utilizada en la identificación de *L. intracellularis*, se puede ver afectada por el tipo y las condiciones de las muestras empleadas. El uso de controles internos (3) permite determinar la presencia de factores que inhiben la reacción que alteran el resultado de la misma, además de que son de utilidad en la estandarización de las condiciones en las que se realiza la prueba. En este trabajo se construyó un producto susceptible de ser empleado como control interno en una PCR encaminada a la identificación de *L. intracellularis* de muestras clínicas de cerdos, que permita determinar la EPP en cerdos de nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- McOrist, S. and Gebhart, C. J. (1999). In: Diseases of Swine, 8th ed., ISU Press. **38**: 521-534.
- 2.- Jones, G. F., Ward, G. E., Murtaugh, M. P., Lin, G. and Gebhart, C. J. (1993). *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2611-2615.
- 3.- Thilsted, L. S., Ballagi-Pordány, A. and Lindqvist, R. (1998). *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 9-11.