

VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE MUESTREO PULMONAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), A TRAVÉS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Robles GJF*; González MAR; Angulo EJR; Díaz EEF; Chevez SJC
Departamento Técnico. Boehringer Ingelheim Vetmedica.

INTRODUCCIÓN

La pleuroneumonía producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) es una de las enfermedades que causa importantes pérdidas económicas en la porcicultura. Se calcula que en EUA el impacto de la enfermedad es de más de 30 millones de dólares anuales¹. Los signos clínicos en animales afectados son: disnea, tos, anorexia, depresión, fiebre y algunas veces vómito; y cuando la infección es crónica se caracteriza por tos y pleuritis². La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser sensible y específica para detectar de manera rápida agentes patógenos a partir de muestras de tejido³, por ello el objetivo de esta investigación fue detectar la región anatómica pulmonar a partir de la cual se obtiene mejor resultado para el diagnóstico de APP mediante PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de 1 cm³ de cada lóbulo pulmonar (en total 7) a partir de 10 cerdos con problemas sugerentes a APP. Las muestras se identificaron de la siguiente forma: Lóbulo (L) anterior izquierdo #1, anterior derecho #2, intermedio izquierdo #3, intermedio derecho #4, posterior derecho #5, posterior izquierdo #6 y accesorio #7. El DNA bacteriano se obtuvo a partir de 10 mg de tejido mediante el kit QIAamp DNA Minikit (QIAGEN®) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la PCR se utilizaron los "primers" diseñados para identificar APP bajo el siguiente protocolo: 94°C X 5 min de desnaturalización inicial y 35 ciclos de 94°C X 30 s, 56°C X 30 s y 72°C X 2 min, y una elongación final de 72°C por 5 min³. Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, con buffer TAE y tinción con bromuro de etidio (10 µg/ml) en búsqueda de una banda de 1000 pb. Adicionalmente se realizó aislamiento bacteriano de las muestras para identificar presencia de APP.

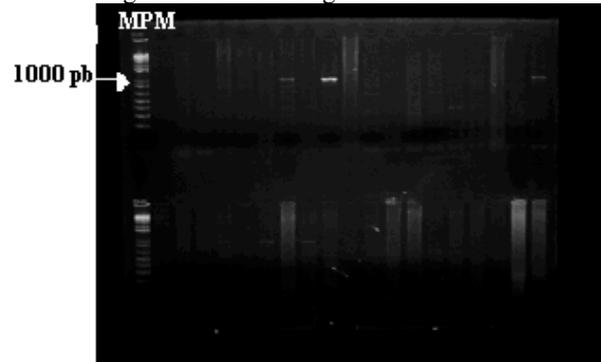
RESULTADOS

Las muestras positivas por PCR a APP dieron la banda esperada de 1000 pb en el electroferograma (Figura 1). El 90% de los cerdos fueron positivos a APP mediante PCR y sólo el 60% con aislamiento bacteriano (Tabla 1).

Tabla 1. Comparativo entre aislamiento bacteriano y PCR para APP.

# Cerdo	Signos APP	Aislamiento bacteriano	PCR (Lóbulos +)
1	+	-	+(3/7)
2	+	+	+(3/7)
3	+	+	+(3/7)
4	+	+	+(3/7)
5	+	+	+(4/7)
6	+	+	+(4/7)
7	+	+	+(1/7)
8	+	-	+(5/7)
9	+	-	+(2/7)
10	+	-	-(0/7)
TOTAL	100 %	60%	90%

Figura 1. Electroferograma del PCR de APP.



MPM = Marcador de Peso Molecular

En todos los lóbulos pulmonares se logró identificar APP, aunque las frecuencias fueron diferentes en cada animal, los resultados de cada muestra se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Frecuencia de positivos y negativos por PCR en cada lóbulo por cerdo.

L	Cerdo										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	6
2	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	5
3	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	5
4	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	4
5	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	4
6	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
7	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2
	3	3	3	3	4	4	1	5	2	0	

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que en los lóbulos anteriores (11/20) e intermedios (9/20) se obtuvieron más positivos, mientras que en el caudal y accesorio hubo menor frecuencia (2/20); lo cual contrasta con Straw *et al.*, 1999, quien refiere que los lóbulos principalmente afectados en una infección por APP son los caudales. La PCR tuvo mayor sensibilidad (90%) en comparación con el aislamiento bacteriano (60%) para detectar animales positivos con signología clínica en campo. Es importante mencionar que la PCR detecta material genético, por lo tanto aunque las bacterias no sean viables para montar una infección la técnica puede identificarlas.

BIBLIOGRAFIA

- Losinger WC. Prev. Vet Med 68 (2005) 181-193.
- Gottschalk M, Broes A, Fittipaldi. www.exopol.com/general/circulares/184.html.
- Gram T, Ahrens P, Andreasen M, Nielsen JP. Vet Microbiol 75 (2000) 43-57.
- Straw B, et al. 1999 8va Edición. Iowa State University Press. USA: 343-354.