

POLIMORFISMO EN EL GEN DE LA ADHESINA P97 DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

Reyes L*, Sahagún A

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

sahagun@servidor.unam.mx

Introducción

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente primario de la neumonía enzootica en cerdos, enfermedad respiratoria crónica, de baja mortalidad y alta morbilidad, que ocasiona importantes pérdidas económicas. *M. hyopneumoniae* inicia la colonización de la superficie del epitelio respiratorio por medio de la adhesina p97, la cual se une a glicolípidos sulfatados sobre la membrana de las células ciliadas. El gen p97 tiene dos regiones repetitivas, R1 y R2 que codifican para A/TKPV/EA/T y GA/E/SPN/SQGKAE respectivamente, ambas varían en cuanto al número de repeticiones en diferentes cepas. La adherencia de *M. hyopneumoniae* a las células ciliadas, es mediada por la región repetitiva R1. Existe polimorfismo entre diferentes aislados de *M. hyopneumoniae* a nivel de R1 y R2 en p97 reportados en GeneBank por lo que suponemos que habrá diferencias en las secuencias de los aislados nacionales en las diferentes regiones del país.

Material y métodos

M. hyopneumoniae fue crecido en el medio de cultivo descrito por Friis. Se cultivo en medio líquido previo a la inoculación en medio sólido a 37 °C, con 5-10% de CO₂, hasta observar colonias de 2 a 10 días.

El procesamiento de las muestras para el aislamiento en cultivo puro en agar sangre, se realizó esterilizando las superficies del tejido pulmonar, obteniendo 1 cm³ de muestra. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5-10% de CO₂, durante 24-48 h. El resto del tejido se homogenizó utilizando medio líquido de Friis para el aislamiento de *M. hyopneumoniae*. Diluciones décuples seriadas de la muestra homogenizada en medio líquido fueron incubadas a 37 °C durante 9 días; posteriormente se subcultivaron en medio sólido de Friis hasta observar las colonias.

Extracción de ADN. El ADN de cultivos bacterianos y del tejido pulmonar de cerdos sospechosos a *M. hyopneumoniae*, fue extraído por la técnica de CTAB/fenol/cloroformo y cuantificado por espectrofotometría (ng/μl).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron los iniciadores MhpRR1-F ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCAT, MhpRR2-R TACCTAAG/TTCAGGAAGTAATTAG basados en la secuencia del gen p97 que amplifican un fragmento de aproximadamente 800 pb. La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador Eppendorf, en un volumen de 20 μl con 2 μl de solución amortiguadora 10X (20mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM de KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 μM de cada primer, 0.25 unidades de Taq polimerasa y concentraciones variables de ADN. Las condiciones fueron: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg. Seguidos se una extensión final a 72°C por 4 min. Cada

reacción de la PCR incluyó un control negativo con ADN de *M. hyorhinis* y un control positivo con ADN de *M. hyopneumoniae*. Los productos de la PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (peso/vol. en TAE 1X), teñido con bromuro de etidio, utilizando el marcador de peso molecular 1 kb ladder (Invitrogen).

Detección de *M. hyopneumoniae* de muestras de pulmón de rastro. Se recolectaron 152 muestras de Veracruz y Jalisco, de las cuales se extrajo ADN para la amplificación del gen p97 por la PCR. El producto fue secuenciado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. El análisis de las secuencias se realizó con el software Secuencer, ClustalW y Blast NCBI.

Resultados

No. de Muestras	Aislamiento	PCR <i>M. hyorhinis</i>	PCR <i>M. hyopneumoniae</i>
1 DPC-UNAM	<i>Pasteurella multocida</i> tipo A	-	-
1 DPC-UNAM	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	-	-
12 Veracruz	<i>Pasteurella multocida</i> tipo A	-	3 +
6 Veracruz	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	-	-
4 Veracruz	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	+	-
21 Jalisco	<i>Pasteurella multocida</i> tipo A	-	4 +
SJ-03	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	+	-
SJ-07	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	+	-
SJ-08	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	+	-

Se obtuvo la secuencia de R1 y R2 de P97 de *M. hyopneumoniae* de una muestra de tejido pulmonar proveniente del Veracruz y una de Jalisco, la cual se comparo con las secuencias reportados en GeneBank.



Bibliografía

- Cary Adams. 2005 Infect. Immun., 73:7784-7787
- Jody L. Wilton. 1998 Microbiol., 144:1931-1943
- Friis, N. F., J. Nordisk 1975 Vet. Medicin. 27: 337-339