

## DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY Y *Mycoplasma hyopneumoniae* POR MEDIO DE UN PCR MÚLTIPLE

Carrera SE; Socci EG; Diosdado VF\*

CENID-Microbiología, INIFAP. Km. 15.5 carretera México-Toluca, 05110, México DF.

Correspondencia con el autor: fernandodiosdado@yahoo.com.mx

### INTRODUCCIÓN

El origen de los problemas respiratorios en los cerdos es multifactorial y diversos agentes infecciosos pueden estar involucrados; algunos de ellos son agentes primarios debilitantes de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio, que facilitan la infección por agentes secundarios generalmente bacterianos (5,6). Dentro de los principales agentes primarios se encuentra el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) y el *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mh*), que al estar presentes de manera simultánea, incrementan hasta tres veces el riesgo de que los animales sufran infecciones secundarias por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (AP) (2). Por esta razón es de gran importancia contar con métodos de diagnóstico más eficientes que permitan implementar medidas de control contra el VEA y *Mh* de manera oportuna y que contribuyan a disminuir los costos por medicación que se emplean para los agentes secundarios. El objetivo de este trabajo fue el establecer un PCR múltiple para la detección del VEA y *Mh*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Con el propósito de establecer un PCR múltiple para la detección simultánea del VEA y el *Mh*, se realizó la extracción de ADN total de ambos agentes a partir de cultivos empleando un kit comercial de la marca roche (High Pure PCR Template). La amplificación del ADN del VEA se llevó a cabo con un par de oligonucleótidos que amplifican un producto de 195 pb del gen gB, cuya secuencia es: 5'-ACGGCACGGGCGTGATC-3' 5'-GGTTCAGGGTCACCCGC-3' (4). Para la amplificación del ADN de *Mh* se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 352 (pb) del gen 16S ribosomal, cuya secuencia es: 5'-ACTAGATAGGAAATGCTCTAGT-3'; 5'-GTGGACTACCAGGGTATCT-3'(1). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP's 200 μM y 0.8 μM de cada uno de los oligonucleótidos, Taq polimerasa Gold 1.25 U en un volumen final de 25μl. El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de 94°C 4 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 54°C 30 seg y 68°C 1: 30 min y un ciclo final de 68°C 3 min. Para la visualización de los productos de amplificación se utilizó un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró amplificar los fragmentos esperados de 195 y 352 pb individualmente a partir del ADN del VEA y *Mh*. Por otra parte, fue posible obtener los productos de amplificación de manera simultánea (figura 1). Estudios

previos han señalado la importancia de contar con técnicas capaces de detectar paralelamente y en la misma muestra a los agentes patógenos; ya que a diferencia de la detección individual se aumenta la eficiencia con relación al costo y rapidez de la prueba sin disminuir la sensibilidad de la misma en el diagnóstico (3).

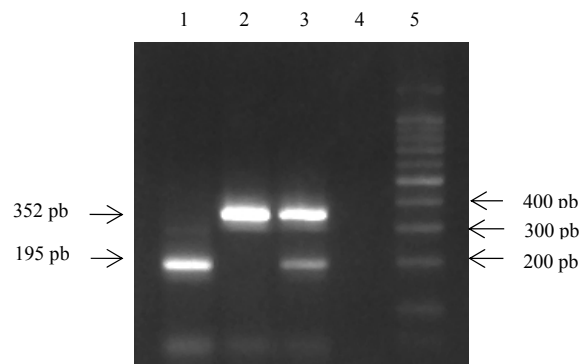


Figura 1. Detección individual y simultánea de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mh*) y del virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA). Carril 1: VEA, Carril 2: *Mh*, Carril 3: VEA y *Mh*, Carril 4: Control negativo, Carril 5: Marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder, Promega).

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados los oligonucleótidos empleados y las condiciones que se establecieron para el PCR múltiple permitieron detectar de manera simultánea al VEA y *Mh*, que se consideran agentes primarios causantes de problemas respiratorios en los cerdos. Posteriormente, se llevará a cabo la validación de la técnica a nivel de campo.

### REFERENCIAS

1. Calsamiglia *et al.*, 1999. J Vet Diag Invest 11:246-251.
2. Diosdado *et al.*, 1999. Téc Pecu Méx 37:23-30.
3. Huang *et al.*, 2004. Vet Microbiol 101:209-214.
4. Hyun *et al.*, 2005. J of Microbiol 43:430-436.
5. Iglesias *et al.*, 1992. J Vet Res 56:74-77.
6. Kobisch *et al.*, 1993. J Rech Porcine en France 25:339-344.