



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETECCIÓN DE *Lawsonia intracellularis* EN  
MUESTRAS CLÍNICAS DE CERDOS CON  
ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA PORCINA EN  
MÉXICO, POR MEDIO DE LA PCR.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**EMMA RANGEL HUERTA**

**ASESORES:**

**MVZ M EN C. ALFREDO CASTAÑEDA RAMÍREZ  
MVZ PhD PEDRO JUAN BAUTISTA DE LA SALLE  
FERNANDO PRADAL-ROA**



**MÉXICO, D. F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico este trabajo a:

A mis padres por darme la oportunidad de realizar uno de mis grandes sueños en la vida y por haber confiado en mí... los amo.

A mi hermana Nelhy, por darme su apoyo y consejos para seguir adelante y por ser mi amiga...gracias.

A mi sobrina Rebeca a la que tanto amo.

A mi abuelito "Pompe", gracias por motivarme a seguir adelante.

A mis abuelito, Paulina y Guadalupe que se adelantaron en el camino, pero se que donde quiera que estén, están felices de que haya cumplido una de mis principales metas en la vida.

A todos mis amigos que han estado conmigo en momentos difíciles de mi vida...a todos ellos que estuvieron ahí para apoyarme mil gracias, los quiero.

## Agradecimientos

Gracias a la vida por darme la oportunidad de compartir con la gente que más quiero, este momento tan importante para mí.

Agradezco a mi madre, Emma y a mi padre, Esteban, por apoyarme y alentarme a seguir adelante, para cumplir uno de mis principales metas en la vida. No hay manera, ni palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí; todos esos días de intensos trabajos, sin importar cualquier enfermedad o malestar...y todo para darnos a mi hermana y a mi todo lo que necesitamos; ahora, me han ayudado a que, reciba la mejor de las herencias. Quiero que sepan, que todo lo que hago, es pensando en ustedes, espero nunca defraudarlos y prometo dar mi mejor esfuerzo...los amo con todo mi corazón.

A mi abuelito "Pompe", por sus palabras de aliento y por motivarme a seguir adelante.

A mi hermana Nelhy, gracias por tus consejos... y a mi sobrina "Beky", a la que tanto amo y veo crecer cada día...que rápido pasa el tiempo!!, espero que en un futuro no muy lejano, pueda llegar a verte lograr cumplir tus metas, siempre voy a estar con ustedes para apoyándolas.

Dr. Antonio Verdugo, gracias por darme la oportunidad de trabajar y conocer a Lawsonia. Se que todo lo que me dices es por mi bien y se que debo de aprender a escuchar...estoy en proceso, pero lleva su tiempo!!!. Además gracias por enviarme a ese fascinante Laboratorio de Microbiología Molecular.

Daniel Martínez, gracias por diseñar la estrategia experimental de mi tesis, tú sabes que tengo una profunda admiración y cariño a tú persona, eres un gran ser humano..., lamento que hayas soportado mis enojos y berrinches, no hay palabras para agradecerte todo tu apoyo incondicional.

Alfredo Castañeda, gracias por todas tus enseñanzas, consejos y por estar en los momentos difíciles cuando necesitaba unas palabras de aliento, sabes que eres una persona especial y nunca olvidare todo lo que haz hecho por mí.

"Eddy", gracias por soportar mis días malhumorados, por escucharme y por tenderme tu hombro para llorar en esos momentos de desesperación; lamento esas ausencias, tú sabes que siempre voy a estar contigo... te quiero demasiado.

A mi amado Rafa, después de tantos años...seguimos juntos; hemos crecido y madurado en diferentes ámbitos, pero siempre hemos estado juntos y espero que así sea para toda la vida.

“Raulitos”, tu fuiste de las primeras personas que conocí en el departamento de microbiología, gracias por tus enseñanzas en diagnóstico bacteriológico, por aceptarme de oyente en tus prácticas de bacteriología y gracias por ser un gran amigo.

“Fabis”, gracias por tus enseñanzas en diagnóstico bacteriológico y por ser una gran amiga.

A Liliana “la loca”, gracias por tus consejos y apoyo, amiga.

A Ulises “mi panzón”, se que hemos pasado muchas cosas juntos, lamento haberte en algún momento hacerte sentir mal...; gracias por formar parte de mi vida y por tú apoyo.

A Jessica, Gladis y Edmundo del CUC, gracias por su amistad y motivarme a seguir adelante.

A Omar, amigo gracias por preocuparte por mí y mi familia , por tus buenos deseos y tu cariño, sabes que en mi tienes a una amiga.

A Pepe, gracias por tu apoyo, por tus buenos deseos y por tu amistad

A mis amigos del CCH, Laura, Aurea e Israel, gracias por sus palabras de aliento.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular; Mauricio, Adolfo “Charmín”, Ilane y Emilio gracias por estar en esos momentos de angustia y desesperación cuando necesitaba de un abrazo o una sonrisa, siempre estuvieron conmigo; gracias por su apoyo incondicional, los quiero!!!. A Miriam, Elsa, Gaby, Luis, Karla, Elvia, Sra. Francis, Edith, Julio, Marcela, Juan y Osvaldo por sus palabras de aliento y su apoyo.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología e Inmunología, Andira, Erika Carrillo, gracias por las clases de Ingles, Juan Carlos, Rodrigo Mena, Rodrigo Téllez, Verónica, Chucho, Lorena, Sra. Cristy, Pablo, Dra. Cristina Rodríguez, Rosalía, Marino, Maritoña, Martita, Dr. Iturbe, Lupita a Rosalba...a todos los del Departamento, por brindarme una sonrisa día a día.

A Dra Rosaelena Miranda, Alfredo Saghún y Mario Háro, por su apoyo y su disponibilidad en la pronta revisión de mi tesis.

Gracias a esta gran casa de estudios que es la UNAM, donde aprendí el verdadero significado de ser universitario...orgullosamente hecha en C.U.!!!

## CONTENIDO

	Páginas
Resumen. ....	1
Introducción. ....	2
Hipótesis. ....	23
Objetivos. ....	24
Materiales y Métodos. ....	25
Resultados. ....	43
Discusión. ....	65
Conclusiones. ....	74
Perspectivas. ....	74
Referencias. ....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1. ....	6
FIGURA 2. ....	7
FIGURA 3. ....	13
FIGURA 4. ....	17
FIGURA 5. ....	28
FIGURA 6. ....	31
FIGURA 7. ....	32
FIGURA 8. ....	33
FIGURA 9. ....	35
FIGURA 10. ....	43
FIGURA 11. ....	44
FIGURA 12. ....	45
FIGURA 13. ....	46
FIGURA 14. ....	47
FIGURA 15. ....	48
FIGURA 16. ....	49
FIGURA 17. ....	49
FIGURA 18. ....	50
FIGURA 19. ....	51
FIGURA 20. ....	52
FIGURA 21. ....	53
FIGURA 22. ....	54
FIGURA 23. ....	55
FIGURA 24. ....	56
FIGURA 25. ....	57
FIGURA 26. ....	58
FIGURA 27. ....	59
FIGURA 28. ....	60
FIGURA 29. ....	60
FIGURA 30. ....	60
FIGURA 31. ....	61

FIGURA 32. ....	62
FIGURA 33. ....	63
FIGURA 34. ....	64



## ABREVIACIONES

Adenomatosis Intestinal	(AI)
Amplificación mediada por transcripción	(TMA)
Libres de patógenos específicos	(SPF)
Bromuro de Etidio	(Br-E)
Concentración Mínima Inhibitoria	(MIC)
Conversión Alimenticia	(CA)
CTAB bromuro)	(Hexadecil trimetilamonio)
EDTA 10 mM	(Ácido etilendiaminotetracético)
Enteropatía Hemorrágica Proliferativa	(EHP)
Enteritis Necrótica	(EN)
Enteritis Proliferativa porcina	(EPP)
Ganancia Diaria de Peso	(GDP)
Hematoxilina y Eosina	(H&E)
horas	(h)
IEC-18	(Células Intestinales de Rata)
Ileítis Regional	(IR)
IPEC-J2	(Enterocitos de Cerdo)
Kb	(kilobases)
Kanamicina	( <i>Kan</i> )
Luria-Bertani	(LB)
McCoy	(Fibroblastos de ratón)
minutos	(min.)
Nacional Center for Biotechnology Information	(NCBI)
Pares de bases	(pb)
PBS	(Solución Buffer de Fosfatos)
PK-15	(Riñón de Cerdo)
Reacción en Cadena de la Ligasa	(LCR)
Reacción en Cadena de la Polimerasa	(PCR)
SDS	(Dodecil Sulfato de Sodio)
SSC 1X	(Cloruro de Sodio y Citrato de
Sodio)	
TE 8.0)	(Tris-Cl 10 mM / EDTA 1 mM pH
Tris-Cl	(Tris.-hidroximetil aminometano)
Warthin-Starry	(WS)

## RESUMEN

RANGEL HUERTA EMMA. Detección de *Lawsonia intracellularis* en muestras clínicas de cerdos con Enteropatía Proliferativa porcina en México, por medio de la PCR. (Bajo la dirección de MVZ M en C. Alfredo Castañeda Ramírez y MVZ Ph D. Pedro Juan Bautista de la Salle Fernando Pradal-Roa).

La Enteritis Proliferativa porcina (EPP), es una enfermedad infecciosa producida por *Lawsonia intracellularis*, una bacteria intracelular que se caracteriza por producir un marcado engrosamiento de la mucosa ileal de cerdos destetados, ocasionando retraso en el crecimiento. Esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas en la porcicultura, a nivel mundial. El diagnóstico de EPP es difícil de realizar y diversos trabajos se han desarrollado para implementar nuevas técnicas. Con el fin de estandarizar una nueva metodología de diagnóstico, la cual fuera específica, sensible y verificable, en este trabajo se estandarizó una prueba de PCR para la detección de *L. intracellularis*, basada en el empleo de controles internos, los cuales son capaces de determinar la presencia de inhibidores en las muestras, descartando falsos negativos. Para este fin se construyó un control interno a partir de un fragmento del gene *aph*, adicionándole en los extremos secuencias específicas de *L. intracellularis*, una ventaja de este control es que es amplificado en conjunto con el fragmento específico de *L. intracellularis*. Así mismo la metodología desarrollada contempló la utilización de segundo par de iniciadores, que amplifican un fragmento interno de 270 pb, mismo que fue sometido a digestión con la enzima *Pst-I*, aumentando la especificidad de la prueba. El control interno fue empleado para la estandarización de una PCR a partir de distintas muestras. El límite de detección obtenido para el control interno y el ADN de *L. intracellularis* fue de 1 pg y 1 ng, respectivamente. Cuando este control interno fue colocado en heces de cerdo se logró detectar hasta  $10^5$  bacterias de *E. coli* que contenían el control interno en el plásmido pELW. Finalmente, también se analizaron 28 muestras clínicas de cerdo 20 de ellas correspondían a raspados de mucosa ileal y 8 a heces de animales sospechosos, en ninguna de ellas se logró evidenciar la presencia de *L. intracellularis*, mostrando la utilidad de esta nueva metodología.

**DETECCIÓN DE *Lawsonia intracellularis* EN MUESTRAS  
CLÍNICAS DE CERDOS CON ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA  
PORCINA EN MÉXICO, POR MEDIO DE LA PCR.**

## **1. Introducción**

La Enteropatía Proliferativa Porcina (EPP), también denominada por sus hallazgos a la necropsia como adenomatosis intestinal, ileítis, ileítis proliferativa, ileítis regional, hiperplasia adenomatosa intestinal e hiperplasia ileal atípica (1), es una enfermedad infecciosa producida por una bacteria intracelular obligada llamada *Lawsonia intracellularis*, que afecta la mucosa del intestino delgado de cerdos en etapas de crecimiento, particularmente en la región del íleon (2).

*Lawsonia intracellularis* afecta principalmente a cerdos y hámsters, aunque también afecta a una gran variedad de especies animales entre los que se incluyen a hurones, zorros, caballos, conejos, macacos en cautiverio, jabalís, venados, zorros rojos, lobos grises, liebres cafés y recientemente se ha reportado que también afecta a perros domésticos. En todos estos animales la infección produce Enteropatía Proliferativa (EP) (3, 4, 5, 6).

En 1931 Harry, Biester y Schwarte del Instituto de Investigaciones Médicas Veterinarias de Ames, Iowa (7), describieron por primera vez las lesiones de la EP en la mucosa intestinal de cerdos. Sin embargo, estos investigadores asociaron el desarrollo de este tipo de lesiones a una dieta con alta concentración de maíz y un bajo contenido de vitaminas. No fue sino hasta 1973, que Rowland y Lawson (8), reportaron la presencia de un bacilo curvo

dentro del citoplasma de células en el epitelio intestinal, en las lesiones proliferativas de animales clínicamente afectados.

Posteriormente, estos investigadores realizaron ensayos de desafío con macerados de mucosa intestinal de animales con EP, por vía la oral en cerdos libres de patógenos específicos (SPF), los cuales presentaron lesiones proliferativas similares a las de los animales inicialmente afectados. Apoyándose en estos resultados, Rowland y Lawson propusieron a este organismo como el agente causal de la Enteropatía Proliferativa Porcina .

Inicialmente algunos autores se referían a esta bacteria como un microorganismo similar a *Campylobacter* (*Campylobacter-like*); sin embargo, esta designación estaba basada únicamente en su morfología (9). Estudios posteriores, en los cuales se inocularon experimentalmente microorganismos del género *Campylobacter*, (*C. mucosalis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni* y *C. coli*), en cerdos de destete, adultos, axénicos y SPF, mostraron que esta bacteria no podía ser considerada el agente etiológico ya que estos animales no desarrollaron lesiones proliferativas y no se observó colonización de la bacteria intracelular en las células epiteliales del intestino (9, 10, 11).

En 1985 Lawson y Rowland, diseñaron una prueba de inmunofluorescencia indirecta, donde utilizaron suero de conejos inoculados con la bacteria similar a *Campylobacter*, pero encontraron que los anticuerpos no reaccionaron contra ninguna especie de *Campylobacter* utilizadas en ese estudio (9). Esto sugirió que el organismo similar a *Campylobacter* en realidad podía pertenecer a un nuevo género bacteriano con características de supervivencia intracelular. Dicho hallazgo fue confirmado más adelante, cuando en ensayos de hibridación con una sonda específica para éste microorganismo intracelular, no

mostraron complementariedad con el ADN de microorganismos del género *Campylobacter*, rechazándose de esta forma la hipótesis de que el organismo intracelular causante de la EP perteneciera a este género (13, 14).

Esta bacteria intracelular en un principio se denominó *Ileal symbiont intracellularis* pero el nombre fue modificado en 1993 a *Lawsonia intracellularis* en reconocimiento a los trabajos realizados por Lawson Gordon (12).

En éste mismo año McOrist y col., realizaron experimentos en los cuales se inocularon cultivos de enterocitos de rata infectados con *L. intracellularis* a cerdos gnotobióticos y SPF, para posteriormente, mediante estudios histológicos analizar distintas fracciones del intestino. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que en los animales gnotobióticos, no se desarrolló la colonización de la bacteria en los enterocitos de los animales desafiados (10). En contraste, los cerdos SPF que fueron inoculados por la vía oral, con una dosis de entre  $10^5$  y  $10^6$  bacterias/animal, desarrollaron una severa enteropatía proliferativa después del desafío y en los estudios histopatológicos se observó un gran número de bacterias dentro de los enterocitos. (10). Considerando estos resultados se comenzó a cuestionar, si *L. intracellularis* era capaz de producir la EP, sola o con ayuda de otros microorganismos de la microflora intestinal; como es el caso de *Serpulina hyodysenteriae*, el agente causal de la Disentería porcina, donde se ha demostrado que la presencia de la microflora intestinal favorece su capacidad de colonización y su patogenicidad (11).

Posteriormente en 1994 McOrist, y col., realizaron nuevamente experimentos con el fin de conocer el efecto de la microflora normal en la reproducción de la EP. En estos experimentos se utilizaron cerdos gnotobióticos de 15 días de

edad, a los cuales se les aplicó por la vía oral un inóculo elaborado a partir de un cultivo de *Bacterioides vulgatus* y *Escherichia coli*, que contenía aproximadamente  $10^8$  bacterias/ml. Previamente se había demostrado que ambos microorganismos no eran patógenos para los cerdos gnotobióticos. Adicionalmente, a estos animales se les inoculó también, por la misma vía un cultivo de enterocitos de rata (IEC-18) infectado con *L. intracellularis* que contenía aproximadamente  $3.2 \times 10^5$  bacterias desarrollándose las lesiones características de la EPP. Con base en estos resultados McOrist, y col., sugirieron que la EP podía ser reproducida en cerdos, únicamente en presencia de una cantidad mínima de microflora conocida. Por consiguiente, es probable que al igual que *S. hyodysenteriae*, *L. intracellularis* produzca la EPP solo en presencia de la microflora intestinal, la cual quizás estaría produciendo las condiciones del entorno apropiadas para el establecimiento y colonización de *L. intracellularis* como son el potencial de oxido-reducción, el pH y la tensión de oxígeno (12).

### **1.1 Características de *Lawsonia intracellularis*.**

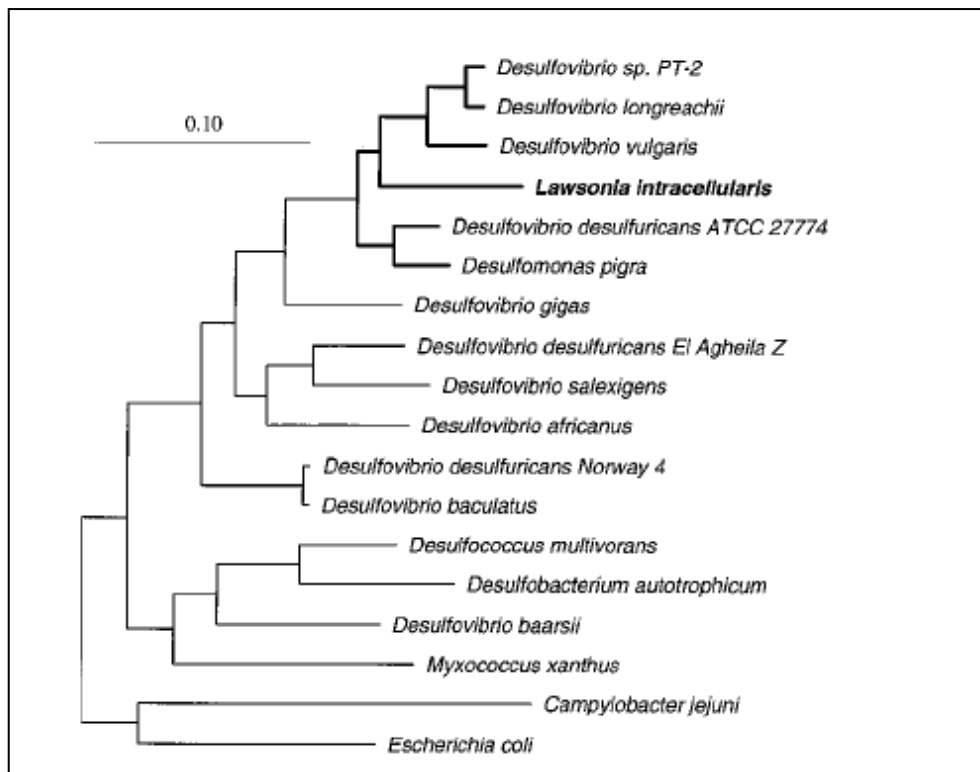
*L. intracellularis* es un bacilo Gram negativo curvo (ocasionalmente sigmoideo), que mide de 1.25 a 1.75 $\mu$ m de largo y 0.25 a 0.43 $\mu$ m de ancho, que se aloja en el citoplasma de los enterocitos que infecta. Presenta una membrana externa ondulada y trilaminar, no se observa la presencia de fimbria o producción de esporas y presenta un flagelo largo que sólo se observa cuando la bacteria se localiza extracelularmente (11,15).

*L. intracellularis* tiene un genoma circular pequeño y 3 mega-plásmidos; totalizando un ADN de  $1.72 \times 10^6$  pares de bases (pb), que contienen

aproximadamente 1, 324 marcos abiertos de lectura. Su genoma contiene un bajo porcentaje de G+C y expresa proteínas de la familia GroEL, las cuales son una característica que se observa en las bacterias con sobrevivencia intracelular (20).

Por otro lado, estudios de la secuencia del ADN del gene ribosomal 16S de *L. intracellularis*, revelaron un nivel de similitud del 91% con *Desulfovibrio desulfuricans*, una bacteria reductora de sulfatos (16) y del 92% con *Bilophila wadsworthia* que también es miembro de la familia *Desulfovibrionaceae* y es un patógeno que se ha relacionado con apendicitis y colecistitis en humanos (Fig. 1). Además, se cree que este microorganismo también puede estar asociado a problemas entéricos en cerdos neonatos (17).

Fundamentándose en estos y otros hallazgos, *Lawsonia intracellularis* ha sido clasificada en la división delta de las *Proteobacterias* (Fig. 2) (15, 18, 19).



**Fig. 1.** Dendrograma que muestra la relación filogenética entre *L. intracellularis* y los miembros de la familia Desulfovibrionaceae, basándose en la secuencia del gene ribosomal 16S (15).

Particularmente, las *δ-Proteobacterias* son microorganismos reductores de sulfato y azufre que utilizan en su metabolismo sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), para producir azufre elemental que se deposita dentro o fuera de la célula.

*δ-Proteobacterias*

Clase I: *Predibacteria'*

Orden I: *Desulfovibrionales*

Familia I: *Desulfovibrionaceae*

<i>Bilophila</i>	1 sp.
<i>Desulfomicrobium</i>	4 sp.
<i>Desulfomonas</i>	1 sp.
<i>Desulfonatronovibrio</i>	1 sp.
<i>Desulfovibrio</i>	29 sp.
<i>Lawsonia</i>	1 sp.

**Fig. 2.** Clasificación de la familia *Desulfovibrionaceae*. Géneros y taxones de orden superior incluidos en esta lista, representan los organismos que se han reconocido hasta la fecha.

## 1.2 Epidemiología.

Aunque se estima que la EPP está distribuida mundialmente, sólo se ha reportado en Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Dinamarca, Francia, Grecia, Holanda, Irlanda, Japón, Nueva Zelanda, Polonia, Sudáfrica, Suecia, Taiwán, Tailandia, Reino Unido, Estados Unidos y México (21). Tan solo en Estados Unidos y Gran Bretaña se estima una prevalencia de entre 35 y 40%. En el caso de los Estados Unidos de América, un estudio realizado en 1995 por el Sistema Nacional de Monitoreo en Salud Animal, mostró que de un total de 198 granjas porcícolas examinadas, el 90% fueron serológicamente positivas a



EPP, lo que sugiere una alta prevalencia de la enfermedad en este país. Por otra parte, en Australia se ha reportado que del 5 al 20% de las granjas porcinas presentan animales con lesiones compatibles con la EPP y que en algunas se alcanzó una incidencia de hasta el 40% (22).

La EPP se transmite exclusivamente de manera horizontal por la vía oral, a partir de la ingestión de alimento ó agua contaminada con heces de animales infectados. La eliminación de la bacteria, por lo tanto, se da a través de la materia fecal, persistiendo por aproximadamente 2 semanas en el ambiente a una temperatura de 5° a 15°C (9). La diseminación en las granjas ocurre principalmente a través de la ropa, equipo de uso general y botas de plástico contaminadas.

En un estudio realizado en granjas porcícolas de ciclo completo en España, se reportó un 12% de cerdas gestantes y un 8% en cerdas en lactación positivas a la EPP, lo que sugiere que la infección circula incluso en el área de lactancia. En estos casos, la eliminación del agente en las heces de cerdas en lactación, podría ser el principal medio de infección para los lechones en los primeros días de vida (23).

En México Socci, E.G. y col. en el 2005 realizaron un estudio de la frecuencia de piaras infectadas con *L. intracellularis* por medio de la PCR. En este estudio se realizó un muestreo de heces de un total de 282 piaras de 16 estados productores porcícolas encontrándose una positividad del 37% (105 / 282) a *L. intracellularis*, los datos reportados dan un panorama general de la frecuencia de la EPP en México (24).

### **1.3 Importancia económica.**

Hasta el momento solamente se han logrado precisar las pérdidas económicas ocasionadas por la EPP en el Reino Unido, en donde se ha estimado que la forma crónica de la enfermedad causa pérdidas de entre 10 y 25 millones de libras esterlinas por año a la industria porcícola (22). Por otra parte, en el 2000 Fourchon y Chouët (23), estimaron el impacto económico negativo en las granjas porcícolas en las que se halla presente la EP, encontrando un incremento de 17 días más de alojamiento por cada cerdo infectado, para poder alcanzar un peso de 105 kg para la venta, un incremento en la Conversión Alimenticia (CA) de 7.5% y un incremento en la mortalidad de 1.3%. En general, se considera que en los cerdos infectados se puede reducir la Ganancia Diaria de Peso (GDP) de 9% a 31% e incrementar la CA de 6.7% a 33% dependiendo de la forma de manifestación de la EPP (25).

En México no se han realizado estudios del impacto económico que produce esta enfermedad, sin embargo, puesto que en la industria porcícola nacional, el alimento representa aproximadamente el 55% del costo de producción en un sistema tecnificado y el 62% en uno semitecnificado y considerando las cifras reportadas por Tourchon y Choüet, podrían dar un panorama general de las pérdidas económicas que ocasiona la EPP, de ahí la importancia de su estudio y su adecuado diagnóstico (26).

### **1.4 Patogenia.**

Aunque la patogénesis de la enfermedad no se conoce detalladamente, se ha propuesto que la bacteria induce su endocitosis e inhibe la fusión endosoma-

lisosoma en los enterocitos que infecta, para posteriormente escapar hacia el citoplasma donde se reproduce (27).

En la mucosa intestinal, normalmente la migración de las células epiteliales ocurre hacia la superficie de las vellosidades (células maduras), siendo en el fondo de las criptas intestinales donde se encuentran las células en mitosis (células indiferenciadas). Al inicio de la infección, *L. intracellularis* tiene mayor tropismo hacia las células que se encuentran en la cripta intestinal que hacia las que se encuentran en la superficie del epitelio. Por lo tanto, se cree que es a través de la división de las células infectadas que *L. intracellularis* se transmite a las células hijas (9). Por esta razón, se ha propuesto que mediante este mecanismo *L. intracellularis* coloniza el epitelio intestinal y promueve la proliferación activa de los enterocitos inmaduros de las criptas intestinales, dando lugar a la adenomatosis y el engrosamiento de la mucosa intestinal (22). En cultivos de células de rata, se ha podido observar que el proceso de invasión no depende propiamente del metabolismo de *L. intracellularis* sino más bien de la célula hospedera que proporciona ciertas condiciones atmosféricas para su invasión; además, se ha visto que la microflora intestinal juega un papel determinante, ya que, como se mencionó anteriormente (27).

El periodo de incubación de la enfermedad se estima entre 2 y 3 semanas (21). Sin embargo se ha podido observar, a través de la microscopía electrónica, áreas de hiperplasia en la mucosa del íleon y la presencia de *L. intracellularis* en el citoplasma de los enterocitos, desde los 8 días post-infección (9, 19).

Los cerdos infectados eliminan a *L. intracellularis* a través de las heces, iniciando aproximadamente a los 7 días post- infección y persistiendo hasta por

25 a 30 días; aunque, algunos cerdos llegan a eliminar a la bacteria hasta por 12 semanas post-infección.

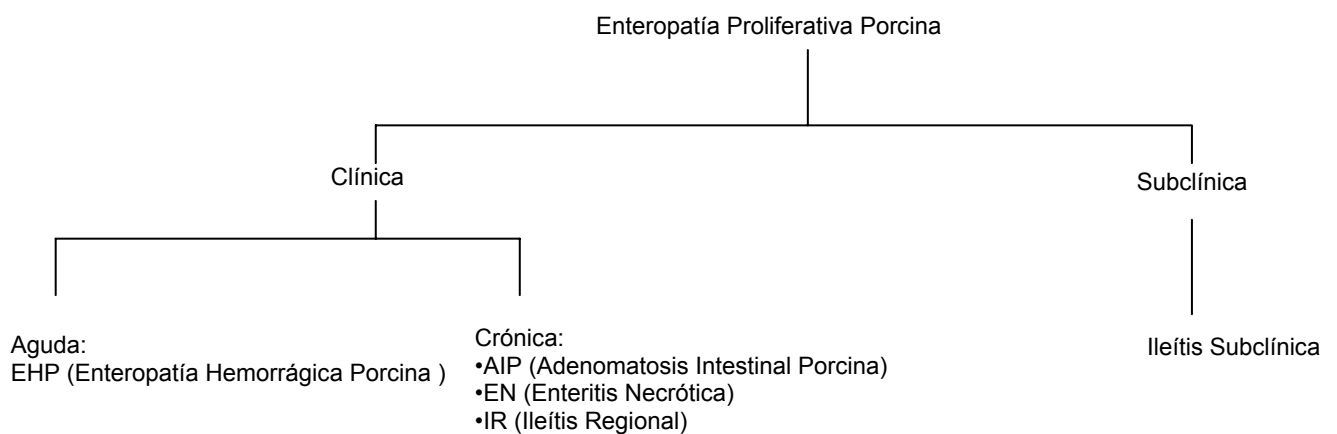
En 1997 McOrist, y col., realizaron experimentos donde utilizaron un grupo de 30 cerdos de 21 días de edad que fueron inoculados por la vía oral con aproximadamente  $3 \times 10^8$  bacterias, obtenidas a partir de cultivos celulares, con el fin de determinar la cantidad y el tiempo de eliminación de *L. intracellularis*. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la cantidad de bacterias eliminadas, llegó a ser de más de  $10^8$  bacterias por gramo de heces. Considerando que la dosis infectante por cerdo se estima en  $10^7$  bacterias, se podría decir que las heces eliminadas por los animales infectados contienen una cantidad suficiente de bacterias para poder infectar a un gran número de cerdos susceptibles. Cabe mencionar en este punto que la diseminación de *L. intracellularis* a través de las heces de cerdos en diferentes etapas de crecimiento, varía de acuerdo al tipo de sistema de producción y las condiciones sanitarias que se tengan en las granjas (28).

### **1.5 Signos clínicos y lesiones.**

La EP se presenta principalmente en cerdos de destete y crecimiento, afectando esencialmente la región del íleon, como se mencionó anteriormente. Estudios histopatológicos de esta región, muestran un engrosamiento del epitelio intestinal en los animales infectados, debido a la expansión y elongación de las criptas intestinales. Esto resulta de una proliferación celular exacerbada, que generalmente se restringe a la superficie epitelial, aunque en ocasiones estas células pueden penetrar la lámina propia y capa muscular de la mucosa (9).

Existen dos formas de manifestación de la EPP, la clínica y la subclínica (Fig. 3). A su vez, la clínica se puede presentar de manera aguda o crónica; la forma aguda también se conoce como Enteropatía Hemorrágica Proliferativa (EHP), la cual afecta a cerdos de 4 a 12 meses de edad y produce mortalidades de hasta el 10% (29, 30, 31). En estos animales se puede observar a la necropsia, sangre coagulada no digerida en la región del íleon, y la mucosa congestionada, hemorrágica y engrosada. Histológicamente se puede observar una acumulación de células inflamatorias en la lámina propia. La forma crónica puede afectar a cerdos de 6 a 20 semanas de edad y a su vez, esta tiene tres presentaciones denominadas; Adenomatosis Intestinal (AI), Ileítis Regional (IR) y Enteritis Necrótica (EN). Las dos primeras se caracterizan principalmente por la presencia de diarrea y retraso en el crecimiento del animal, en el que se puede observar una disminución en la GDP de hasta el 21%, un incremento de la CA de aproximadamente el 25% y un aumento de la mortalidad del 1 al 6% (9, 32). Las lesiones que se observan en la AI e IR son, primordialmente, el engrosamiento de la mucosa intestinal, producido por una infiltración de tejido de granulación que se asocia a una hipertrofia en la capa muscular del intestino. La observación de alguna de estas presentaciones, es evidencia de la persistencia de la enfermedad en las granjas. En la EN se observa a la necropsia un exudado fibrinonecrótico difuso sobre la mucosa intestinal hipertrofiada (29), las lesiones microscópicas que se pueden encontrar son: hiperplasia de los enterocitos en las criptas, células mitóticas abundantes y ausencia de células caliciformes. La hiperplasia celular se asocia a la presencia de bacterias intracelulares, las cuales se pueden evidenciar con tinciones especiales como la de Warthin-Starry (WS) (9). Finalmente, está la Ileítis

subclínica, en la cual se pueden observar a la necropsia engrosamiento de la mucosa en la región del íleon, colón proximal y ciego. En los animales con esta presentación no hay mortalidad, las heces son de color y consistencia normal, pero hay una disminución en la velocidad de crecimiento en la etapa de engorda y se observa variabilidad en el peso y tamaño de animales que son dispuestos a la venta (9).



**Fig.3.** Diagrama donde se muestra las formas de presentación de la Enteropatía Porcina.

En los hámsters, la infección por *L. intracellularis* produce lesiones similares a las descritas en cerdos; sin embargo en éstos animales la EP a menudo se confunde con la enteritis producida por *Escherichia coli* entero-invasiva, la cual es una enfermedad común en animales de laboratorio (9). En los hámsters, las lesiones que se desarrollan más frecuentemente en las fases tardías de la enfermedad son fibrosis y estenosis de la válvula íleo-cecal, las cuales producen obstrucciones ocasionalmente. En estos animales, los estudios histopatológicos muestran comúnmente columnas de células epiteliales que penetran en la capa muscular de la mucosa que frecuentemente se asocian con inflamación piogranulomatosa (9).

En otras especies las lesiones difieren en la localización y detalles patológicos, no obstante, todas muestran proliferación de enterocitos y la presencia intracelular de la bacteria. En hurones, zorros azules y conejos de laboratorio las lesiones se encuentran a nivel del ciego y la parte proximal del colon. Las lesiones en hurones pueden observarse en la superficie de la serosa y ocasionalmente se observa a la bacteria en los linfonodos mesentéricos. Esto puede llegar a expandirse al omento mayor e incluso al hígado, la diseminación de la bacteria es principalmente a tejidos con epitelio glandular (17).

Las lesiones descritas en equinos, venados y cobayos están localizadas principalmente en el íleon y son muy similares a las descritas en cerdos y hámsters. La enfermedad en primates fue descrita hasta 1993, cuando se presentaron dos casos agudos en monos *Maccacus rhesus* de 6 y 8 meses de edad (17). En estos animales se encontraron lesiones en el íleon terminal similares a la EHP de cerdos (9).

## **1.6 Tratamiento y control.**

Se ha reportado que *L. intracellularis* es sensible a una gran variedad de antibióticos como las tetraciclinas, macrolidos y lincomisinas; mostrando particular sensibilidad a clortetraciclina, penicilina, eritromicina, virginiamicina y difloxacina. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) determinada para estos antibióticos oscila alrededor de  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ . En el caso de la tiamulina y la tilmicosina, la MIC se encuentra alrededor de  $< 4\mu\text{g/ml}$  y para otros antibióticos como lincomicina, tilosina y aminoglicosidos la concentración es de  $> 32\mu\text{g/ml}$ . La clortetraciclina a dosis de 200 ppm, en el alimento junto con penicilina G y sulfametazona a dosis de 50 y 100 ppm respectivamente, se han llegado a

utilizar para prevenir la enfermedad. De igual manera la tilosina previene la infección cuando se administra a dosis de 100 o 40 ppm por 16 días en el alimento (9, 21). *L. intracellularis* es susceptible a desinfectantes como los cuaternarios de amonio al 3% (cetrimida), iodopovidona al 1%, pero resistente a peroximonosulfato de potasio al 1% solo o mezclado con fenol al 0.33% (33).

## **1.7 Diagnóstico.**

En la práctica médica el diagnóstico es el procedimiento por el cual se identifica una enfermedad, una entidad nosológica, un síndrome, o cualquier condición que altere el estado de salud (34). Inicialmente el diagnóstico se basaba en el historial clínico y el examen físico, sin embargo, hoy en día se cuenta además con otras herramientas para realizar el diagnóstico de una manera más eficaz y precisa.

La prueba de diagnóstico contundente en una enfermedad infecciosa, es el aislamiento del agente causal a partir de muestras clínicas de individuos enfermos (35), lo anterior está basado en los postulados de Koch, los cuales establecen las bases para demostrar la etiología de las enfermedades infecciosas.

Con el advenimiento de la biología molecular se han desarrollado nuevas herramientas moleculares que se han adoptado rápidamente en el campo del diagnóstico microbiológico. Algunas de las ventajas de las pruebas moleculares son:

- 1.- El ADN puede ser identificado, cuantificado y visualizado
- 2.- Una secuencia de nucleótidos en una determinada molécula de ADN puede ser tan específica que podrían realizarse análisis de hibridación



para el diagnóstico.

3.- Además, las secuencias de ADN pueden amplificarse para incrementar la cantidad necesaria para su análisis (16).

Es importante resaltar que los métodos moleculares no dependen del aislamiento del agente etiológico, ni de su crecimiento, ni de la detección de la respuesta inmune al patógeno(16).

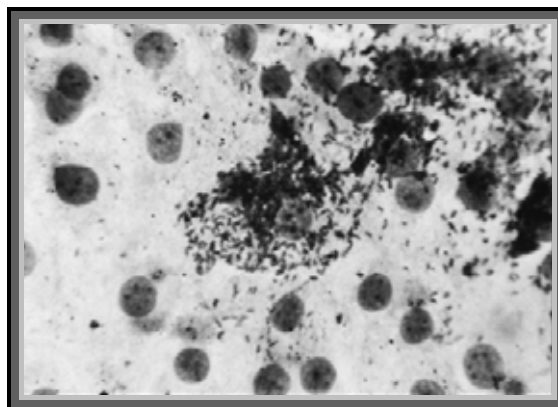
En el caso de la EPP, los signos que presentan los animales infectados no son específicos de la enfermedad y se pueden confundir con otras enfermedades entéricas tales como Salmonelosis, Disentería Porcina, Colibacilosis, Espiroquetosis, Gastroenteritis Transmisible, infecciones por Rotavirus, Síndrome Hemorrágico Intestinal e infecciones por Circovirus porcino tipo 2, por mencionar algunas (36). Generalmente, el diagnóstico de la EPP se basa en la observación de las lesiones a la necropsia y en estudios histopatológicos, sin embargo, también existen otros métodos directos e indirectos para la detección de *L. intracellularis*.

Los métodos indirectos (algunos basados en la detección de la respuesta inmune) utilizados con más frecuencia son el ELISA y la inmunofluorescencia indirecta, que pueden alcanzar una sensibilidad del 89% y una especificidad del 97%. Sin embargo, las pruebas serológicas presentan como limitante, que *L. intracellularis* induce una respuesta inmunológica incipiente (37, 38, 39).

En los estudios histopatológicos de las lesiones se emplean tinciones tales como la de Hematoxilina y Eosina (H&E) o tinciones de plata como la de WS, con el fin de detectar microscópicamente los cambios proliferativos en la mucosa ileal y observar organismos intracelulares en el citoplasma de los enterocitos infectados. Sin embargo, el diagnóstico por medio de éstas técnicas

muestra una sensibilidad del 50% y una especificidad del 98.5% (40), además de que en ellos se requiere de la obtención de muestras a la necropsia (mucosa ileal) lo que implica el sacrificio de animales.

Con los métodos directos se detecta la presencia del agente etiológico mediante el aislamiento. Para el aislamiento de *L. intracellularis* se requieren cultivos celulares de líneas tales como IEC-18 (Células Intestinales de Rata), IPEC-J2 (Enterocitos de Cerdo), PK-15 (Riñón de Cerdo) y McCoy (Fibroblastos de ratón) (17, 41); las condiciones atmosféricas que se requieren son: 82.2% de Nitrógeno, 8.8% de Dióxido de Carbono y 8% de Oxígeno así como una temperatura de 37°C. En cultivo celular se ha observado que en el monoestrato de células infectadas, puede haber alrededor de 30 bacterias por célula y el mayor número de células infectadas se encuentra entre el 5° y 7° día post-infección (Fig. 4). Desafortunadamente, el aislamiento no se efectúa de manera rutinaria para el diagnóstico, ya que *L. intracellularis* es difícil de crecer y pocos laboratorios en el mundo han podido realizarlo (41, 42).



**Fig. 4.** Cultivo de células IEC-18 infectadas con *L. intracellularis*. Unas cuantas células se muestran intensamente infectadas. Inmunioperoxidasa con Mab IG4. x 210 (9).

No obstante, otra manera directa de demostrar la presencia de *L. intracellularis* es detectando su material genético, a partir de muestras procedentes de

animales vivos (heces) o de muestras obtenidas a la necropsia (raspados de mucosa ileal), mediante pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método de amplificación de una secuencia específica de ADN (40, 43), que proporciona un medio sensible, selectivo y de extrema rapidez para amplificar millones de copias de dicha secuencia, utilizando pequeñas cantidades del ADN original. Debido a su sensibilidad, la PCR se ha utilizado en el diagnóstico para amplificar secuencias específicas de ADN a partir de muestras clínicas (16).

La especificidad de la PCR se basa en el uso de dos oligonucleótidos que se hibridan con secuencias complementarias en la cadena del ADN blanco y flanquean la secuencia que se desea amplificar. Generalmente, los oligonucleótidos se diseñan para regiones de genes que se cree se han conservado a través de una gran variedad de organismos (16). La PCR utiliza la desnaturalización mediante calor (separación de las hebras de ADN) del ADN genómico, seguida por un enfriamiento lento en presencia de los oligonucleótidos (alineamiento), lo que lleva a su hibridación en la secuencia blanco del genoma de ADN. La adición de la enzima DNA polimerasa permite entonces la extensión de estos oligonucleótidos, formando dos nuevas cadenas de ADN. Los productos de extensión de cada oligonucleótido sirven de moldes para subsecuentes amplificaciones. Este proceso continua de forma cíclica y en cada ciclo se duplica la cantidad del ADN específico, la amplificación es exponencial y por tanto, con 20 a 30 ciclos se puede producir una secuencia específica  $10^5$  o más (40). Además, con este método se puede amplificar a partir de un fragmento de 50 a 100 pb hasta 3.5 Kb (kilobases).

En 1993 Jones, G.F., y col., diseñaron una PCR para la detección de *L. intracellularis* en donde utilizaron dos juegos de oligonucleótidos (44); uno que permite la amplificación de un fragmento de 329 (pb) y otro que sirve para la amplificación de una región interna a la anterior de 270 (pb). Ambas regiones corresponden a un fragmento específico de *L. intracellularis*, que ahora se sabe, es parte del gene *aspA* (que codifica para una enzima liasa aspartato-amonio) y que va del nucleótido 5 al 334. (No. de acceso al GenBank: AM180252).

Con ésta prueba se logró una sensibilidad y especificidad al rededor del 100%, al utilizar muestras de raspados ileales, sin embargo, al emplear muestras fecales la sensibilidad de la prueba disminuyó (33, 45). Algunos autores también mencionan una reducción en la sensibilidad de la PCR al utilizar muestras de heces con respecto a las de raspados de mucosa ileal, lo cual puede deberse a la presencia de inhibidores presentes en las muestras fecales que dificultan la detección de *L. intracellularis* por medio de la PCR (33, 45). Se ha reportado que algunos compuestos orgánicos e inorgánicos pueden inhibir la amplificación de ácidos nucleicos en la PCR en varios niveles y que existe una amplia variedad de inhibidores presentes en muestras clínicas (Hemoglobina, urea y heparina), alimento (componentes orgánicos y fenólicos, polisacáridos, grasa y  $Ca^{2+}$ ) y componentes ambientales (compuestos fenólicos, ácido húmico y metales pesados) (46). Estas sustancias no son completamente removidas en el proceso de extracción de los ácidos nucleicos e inclusive los tratamientos usados para la remoción de éstas sustancias (tratamientos con detergentes, proteasas o fenol:cloroformo), pueden interferir con la amplificación de ácidos nucleicos (47). Los detergentes, la Proteinasa K

y el fenol pueden inhibir a la enzima *Taq* polimerasa; en los procesos de extracción del ADN, frecuentemente se utilizan detergentes para la lisis celular y la desnaturalización de proteínas. Existen dos tipos de detergentes, los iónicos y los no-iónicos, se ha demostrado que los detergentes no-iónicos generalmente no inhiben la *Taq* polimerasa (48). Muchos detergentes son usados en combinación con la enzima Proteinasa K que desnaturaliza y subsecuentemente digiere proteínas, pero este tratamiento afecta a la enzima *Taq* polimerasa que es muy sensible a la degradación proteolítica. Finalmente, los residuos de fenol en el proceso de extracción de igual manera, pueden inhibir a la DNA polimerasa (47).

Para detectar a *L. intracellularis* se han diseñado distintas variantes de la PCR que han alcanzado niveles de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%. Dado que la EPP no es una enfermedad necesariamente mortal, resulta indispensable para el productor porcícola, realizar una detección temprana de la misma, lo cual puede lograrse aplicando la PCR en muestras de heces.

En México en 1998 García, C. L. y col., (49), aplicaron la PCR para el diagnóstico de la ileítis porcina en muestras de mucosa intestinal y heces. Aseguran haber detectado una concentración mínima de 3.72 ng de ADN, sin embargo al detectar a *L. intracellularis* a partir de muestras fecales se redujo la sensibilidad notablemente y es muy probable que este fenómeno se haya debido a la presencia de inhibidores.

Por esta razón, diversos autores han propuesto la utilización de controles internos en la PCR (46, 50, 51, 52, 53, 54), los cuales funcionan como indicadores de las condiciones de la prueba para la detección falsos-negativos.

En el 2003 Jacobson M., y col., realizaron también una PCR para la identificación de *L. intracellularis* utilizando un control interno al cual denominaron “mimic”, para detectar inhibidores de la prueba en muestras fecales y facilitar la interpretación de los resultados negativos. En éste trabajo, lograron detectar hasta  $10^3$  mimics por gramo de heces mediante la PCR (53, 54).

No obstante que las pruebas de diagnóstico molecular son altamente sensibles y específicas, en algunas ocasiones ciertas muestras clínicas que son sometidas a la PCR, pueden ser inadecuadamente tratadas, ya sea al efectuar la extracción de ácidos nucleicos (por los residuos de Etanol y/o Fenol) ó al llevar a cabo la reacción de PCR, como ya se ha mencionado. Como consecuencia los resultados que se obtienen no son confiables puesto que se pueden generar resultados falsos-negativos. La aplicación de controles internos, los cuales son colocados en cada una de las muestras que son sometidas a la PCR, podría ayudar a solucionar esta problemática, al proporcionar información de cada muestra, detectando con precisión los resultados negativos y descartando aquellos falsos negativos. A diferencia de otros controles, los controles internos propuestos en este trabajo proporcionan información sobre la eficiencia de la extracción de ácidos nucleicos, así como de las condiciones en las que se lleva a cabo la PCR, estableciendo además un límite de detección en la prueba.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de diagnóstico basado en la PCR para demostrar la presencia de *L. intracellularis* en muestras fecales y raspados de mucosa ileal de animales sospechosos de EPP, una ventaja de

nuestra metodología fue la construcción de un control interno, capaz de detectar resultados falso-negativos. Este control fue diseñado para que mediante una PCR se lograra la amplificación, en un solo paso, del control interno y el fragmento específico de *L. intracellularis*, utilizando únicamente un juego de oligonucleótidos.

Una de las características de nuestro sistema es que el producto utilizado como control interno tiene un peso molecular diferente al detectado como ADN blanco, que en este caso corresponde a un fragmento del gene *aspA* de *L. intracellularis*. Esto con el fin de que la amplificación tanto del control interno como el del ADN blanco se realicen bajo las mismas condiciones y pueda ser claramente diferenciada mediante electroforesis (52).

## **Hipótesis**

El empleo de controles internos en la técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa permite detectar de manera confiable la presencia de *Lawsonia intracellularis* en muestras clínicas, al identificar reactores falsos negativos.



## **Objetivo general**

Optimizar la detección de ADN de *Lawsonia intracellularis* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de muestras de íleon y heces de cerdos con signología compatible con Enteropatía Proliferativa.

## **Objetivos específicos**

- Construcción de un control interno que permita optimizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de una región del gene *aspA* de *L. intracellularis*, y distinguir entre resultados negativos y falsos negativos.
- Estandarizar una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de ADN de *L. intracellularis* a partir de raspados de mucosa ileal y muestras fecales de animales sospechosos de Enteropatía Proliferativa Porcina, empleando el control interno antes desarrollado.
- Probar la técnica desarrollada en muestras clínicas de cerdos sospechosos de EPP.

## 2. Materiales y métodos

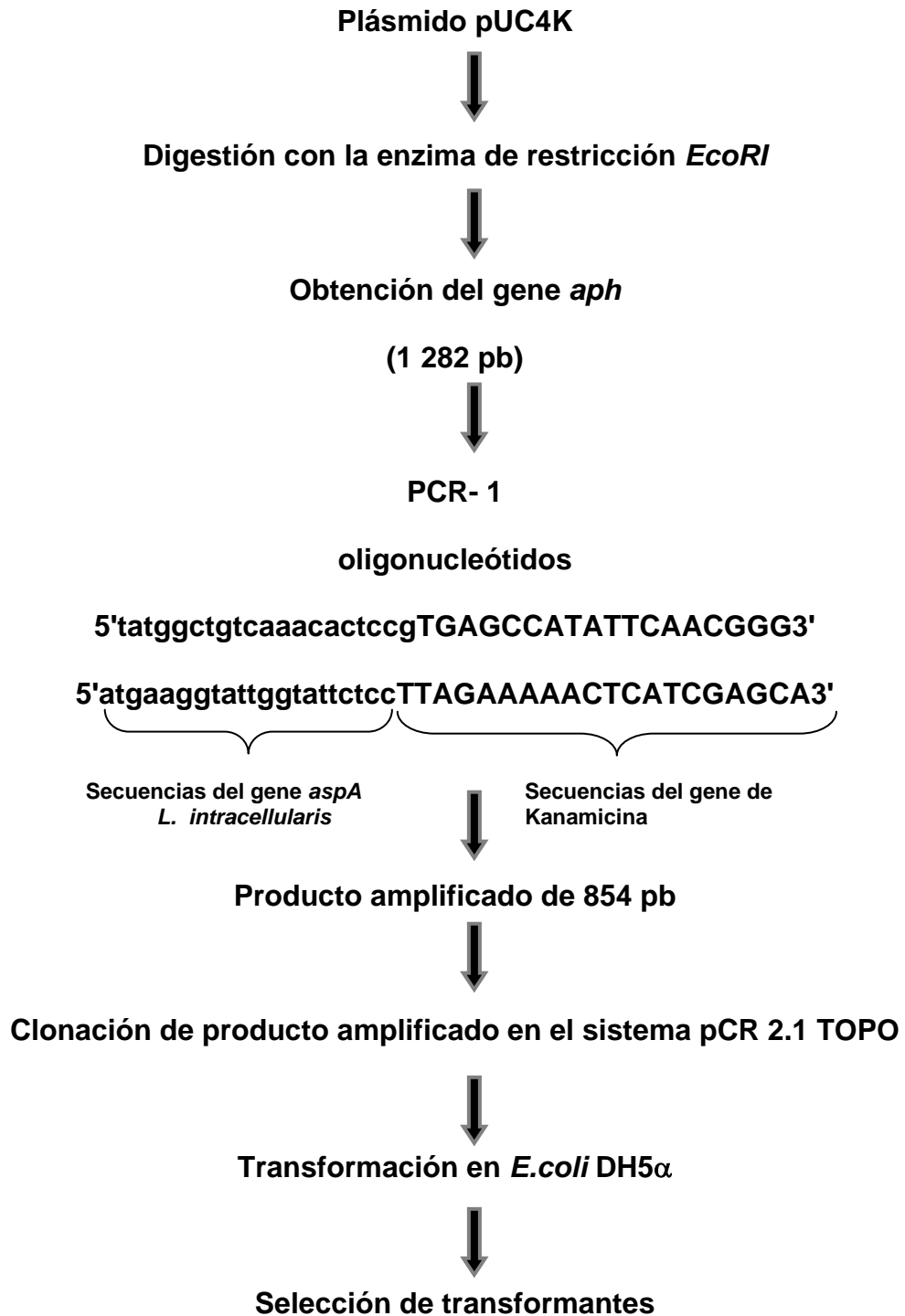
### Estrategia general

Con el fin de desarrollar un método de diagnóstico para la EPP, que pueda ser reproducible y verificable, en la primera fase consistió en construir un control interno. Se desea establecer una PCR que utilice un solo par de oligonucleótidos, que amplifican simultáneamente un segmento específico (329 pb) del gene *aspA* de *L. intracellularis* y un segmento de mayor tamaño (854 pb) que corresponde al control interno el cual es colocado en cada una de las muestras que son analizadas.

La segunda fase, se asentó en corroborar que el producto amplificado en la PCR-2 correspondiera al fragmento esperado de *L. intracellularis*. Esto se logró realizando una tercera PCR- anidada, donde se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento interno del gene *aspA* de 270 pb. Este producto de amplificación es sometido posteriormente, a una digestión con la enzima de restricción *Pst-I*, obteniendo dos segmentos, uno de 222 pb y otro de 48 pb. Con ambos procedimientos se verifica que el fragmento amplificado corresponde al segmento específico de *L. intracellularis*.

A continuación se describe mediante diagramas de flujo, la estrategia utilizada para la construcción del control interno, así como la metodología diagnóstica desarrollada para determinar la presencia de *L. intracellularis*, en muestras clínicas de cerdos, por medio de la PCR.

## Construcción del Control interno



Determinación de la presencia de *L. intracelularis* por medio de la PCR

Obtención de ADN a partir de las muestras (raspados ileales y heces)  
Adición del control interno a las muestras.

↓  
PCR-2

oligonucleótidos externos del gene *aspA*

5'TATGGCTGTCAAACACTCCG3'

5'ATGAAGGTATTGGTATTCTCC3'

↓

Productos amplificados

↙  
854 pb control interno

↘  
329 pb fragmento externo de  
*L. intracelularis*

↓

↓

PCR-3

PCR-3

oligonucleótidos internos del  
gene *aspA*

oligonucleótidos internos del  
gene *aspA*

5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3'

5'-TTACAGGTGAAGTTATTGGG-3'

↓

↓

No amplificación

Producto amplificado de 270 pb  
fragmento interno de *L. intracelularis*

↓

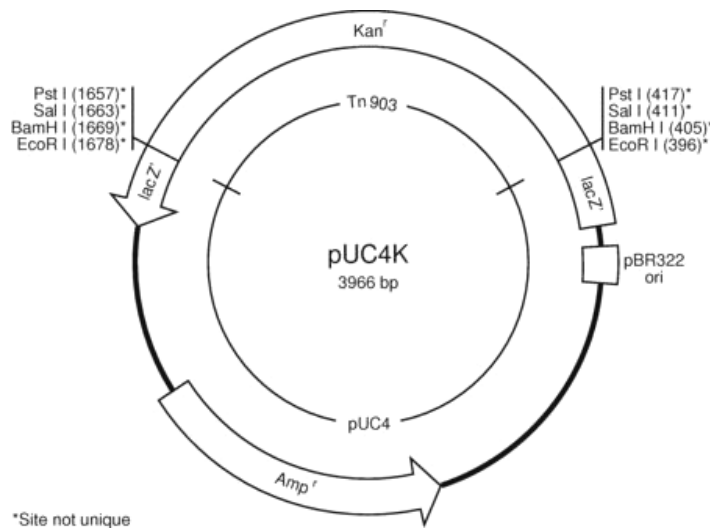
Análisis de restricción con la enzima *Pst-I*

↙  
222 pb

↘  
48 pb

## 2.1 Extracción de ADN plasmídico.

Para la construcción del control interno, se utilizó el gene *aph* que confiere resistencia a la Kanamicina, este gene se encuentra en el plásmido pUC4K (Fig. 5).



**Fig. 5.** Mapa del plásmido pUC4K

Para lograr lo anterior, se realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando la metodología de Lisis alcalina descrita por Sambrook, J., y col., (55). Brevemente, se transfirió una colonia del plásmido pUC4K (previamente crecida en una placa de Agar Luria-Bertani [LB] con Kanamicina [*Kan*]), en medio LB caldo al cual se le agregó Kan (100  $\mu$ g/ml) e incubó durante 12 horas (h) en agitación a 37°C. Se tomaron 1.5 ml del cultivo y se centrifugaron a 12,000 X *g* por 5 minutos (min.) a 4°C (Centrifuga Beckman, Modelo J2-21, U.S.A.), para obtener la pastilla bacteriana. La pastilla bacteriana obtenida del cultivo, fue resuspendida en la Solución I (Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8.0 [Tris.-hidroximetil aminometano], EDTA 10 mM [Ácido

etilendiaminotetracético pH 8.0]), mediante agitación vigorosa (Super-mixer, Lab-line instruments, Inc., Melrose Park. ILL.). Posteriormente se agregó la Solución II (NaOH 0.2 N, SDS [Dodecil Sulfato de Sodio 1%]), se mezcló por inversión rápida y se agregó la Solución III (Acetato de Potasio 5 M, Ácido Acético, resultando una solución 3M con respecto al Potasio y 5M con respecto al Acetato) que se homogeneizó mediante agitación vigorosa en un vortex por 10 seg (Super-mixer, Lab-line instruments, Inc., Melrose Park. ILL.) e incubó en hielo de 3 a 5 min, para después ser centrifugado a 12, 000 X *g* por 5 min. a 4°C (Centrifuga Beckman, Modelo J2-21, U.S.A.) y obtener el sobrenadante al cual se le agregó el mismo volumen de fenol:cloroformo (1:1). El ADN plasmídico fue precipitado con 2 volúmenes iguales de etanol absoluto, lavado con etanol al 70% y posteriormente resuspendido para su almacenamiento en solución TE (Tris-Cl 10 mM / EDTA 1 mM pH 8.0).

## **2.2 Digestión del plásmido pUC4K.**

Para obtener el gene *aph* (1,282 pb) del pUC4K, se realizó una digestión con la enzima *EcoR* I (10 UI) (Invitrogen®), en una solución buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM) y utilizando 100 ng del ADN del pUC4K; la reacción se dejó incubar durante 1 h a 37°C y posteriormente la enzima se inactivo a 65°C por 20 min. (57).

## **2.3 Purificación del gene *aph*.**

Para la purificación del gene *aph*, los productos de la digestión del plásmido pUC4K descrita anteriormente, fueron sometidos a electroforesis (Horizontal Gel Electrophoresis System, Horizon®58 GIBCO BRL, California, EUA) en un

gel de agarosa al 1% y teñido con Bromuro de Etidio (Br-E). La banda de 1,282 pb, correspondiente al gene *aph*, fue cortada y el ADN contenido en el fragmento de agarosa fue recuperado utilizando el sistema QIAEX®II (QIAGEN) (58), el cual se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción del ADN a partículas de sílice, en presencia de una solución con alto contenido de sales. La purificación se hizo de acuerdo a las indicaciones del fabricante y el ADN fue eluido con agua inyectable estéril y conservado a -20° C hasta su uso.

#### **2.4 Iniciadores para la PCR.**

La construcción del control interno se realizó mediante una PCR (PCR-1), para la cual se diseñaron un par de oligonucleótidos exclusivamente para éste fin. Cada oligonucleótido consta de dos secuencias distintas como se muestra enseguida; en minúsculas se indican los oligonucleótidos descritos por Jones y col., (44) que corresponden a la región que amplifica un fragmento del gene *aspA* que codifica para una liasa aspartato-amonio específica de *L. intracellularis* (LW1 y LW2) (No. de acceso al GenBank AM180252) y en mayúsculas los oligonucleótidos que amplifican una región del gene *aph* (Km1 y Km2)

1) LW1-Km1 .- 5'-tatggctgtcaaacactccgTGAGCCATATTCAACGGG-3'

2) LW2 –Km2.- 5'-atgaaggtattggtattctccTTAGAAAACTCATCGAGCA-3'

También se utilizaron en otra PCR (PCR-2) solo los oligonucleótidos LW1 y LW2 que se muestran a continuación:

1) *Externo*. LW1.- 5'-TATGGCTGTCAAACACTCCG-3'

2) *Externo*. LW2.- 5'-ATGAAGGTATTGGTATTCTCC-3'

Estos últimos tienen el propósito de amplificar en la misma reacción (PCR-2) los fragmentos que corresponden al control interno (854 pb) y un fragmento del gene *aspA* (329 pb).

Finalmente se realizó una tercera PCR (PCR-3) en donde se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

1) *Interno*. LW3.- 5'-TTACAGGTGAAGTTATTGGG-3'

2) *Interno*. LW4.- 5'-CTTTCTCATGTCCCATAAGC-3'

Estos oligonucleótidos (LW3 y LW4) amplifican una región interna de 270 pb del fragmento anterior del gene *aspA*, que va del nucleótido 45 al 314 (44). Con la finalidad de aumentar la especificidad de la prueba.

A continuación se muestra la secuencia del fragmento de 375 pb del gene *aspA* de *L.intracellularis*, a partir de la cual se diseñaron los oligonucleótidos LW1, LW2, LW3 y LW4 (Fig. 6).

```
1      TTATTATGGC TGTCAAACAC TCCGTGCTGT TGAAAACTTT CAAAttacag gtgaagttat
      AATAATACCG ACAGTTTGTG AGGCACGACA ACTTTTGAAA GTTTAATGTC CACTTCAATA

61     tgggaAATAT CCCTCATTAA TTACTTCATT AGCTCAAGTT AAACAAGCTG CAGCACTTGC
      ACCCTTTATA GGGAGTAATT AATGAAGTAA TCGAGTTCAA TTTGTTCGAC GTCGTGAACG

121    AAACAATAAA CTTGGTCTTC TTTCTGATAA AAAAGGAGAT GCTATCTCTG CTGCATGTAA
      TTTGTTATTT GAACCAGAAG AAAGACTATT TTTTCCTCTA CGATAGAGAC GACGTACATT

181    TGAAATCATA AATGGAGAAC TCCTTGATCA ATTTGTTGTG GATTGTATTC AAGGAGGTGC
      ACTTTAGTAT TTACCTCTTG AGGAACTAGT TAAACAACAC CTAACATAAG TTCCTCCACG

241    AGGGACAAGT ACAAATATGA ATGCTAATGA AGCAATTTGT AATCGTGCTC TTGAGCTTAT
      TCCCTGTTCA TGTTTTACT TACGATTACT TCGTTAAACA TTAGCACGAG AACTcgaata

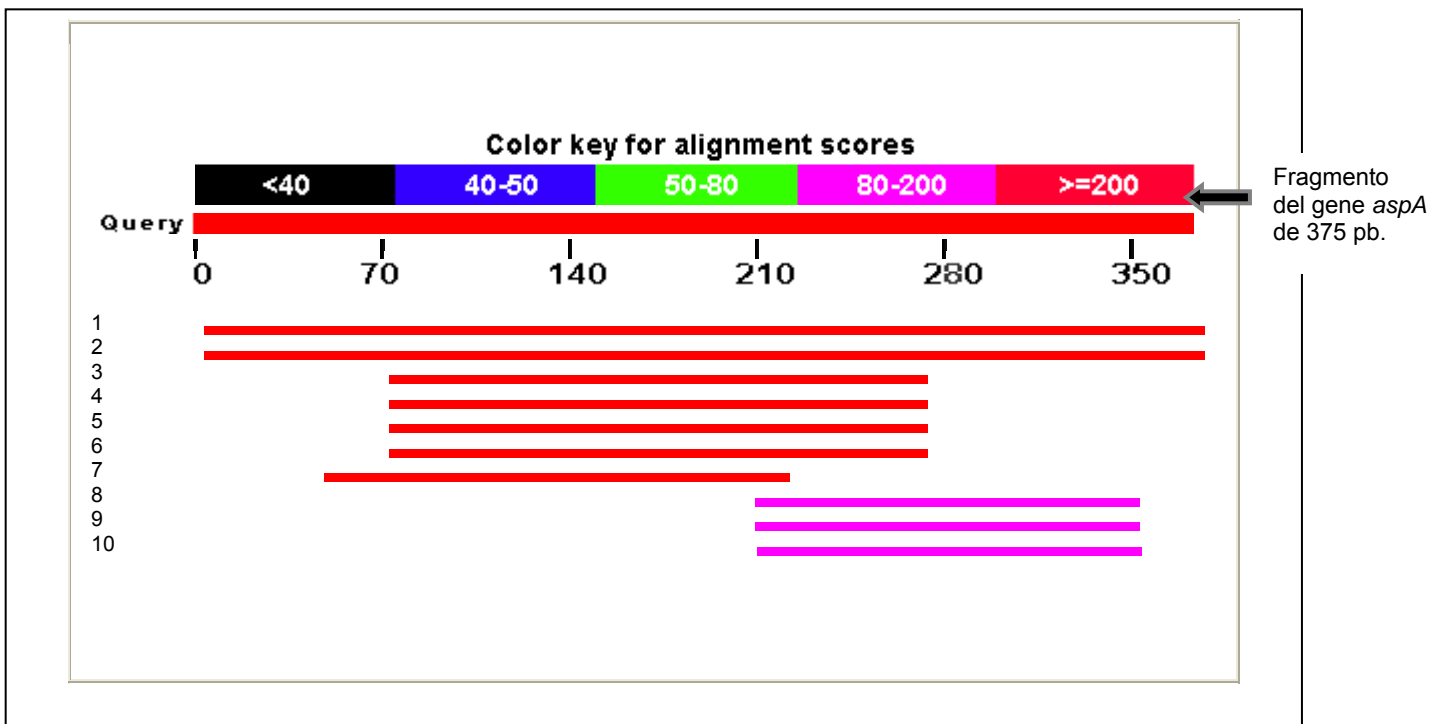
301    GGGACATGAG AAAGGAGAAT ACCAATACCT TCATCCTAAT AATGATGTAA AATATGTCCA
      ccctgtactc tttcCTCTTA TGGTTATGGA AGTAGGATTA TTACTACATT TTATACAGGT

361    ATCAACAAAT GACGT
      TAGTTGTTTA CTGCA
```

**Fig. 6.** Secuencia del fragmento del gene *aspA*. Señalado con negritas, se muestra el par de oligonucleótidos que amplifican el fragmento externo de 329 pb (mayúsculas) y el par de oligonucleótidos que amplifican el fragmento interno de 270 pb del gene *aspA* (minúsculas).



En la Fig. 7 y 8, se muestra el porcentaje de homología del gene *aspA* con otros organismos; esta búsqueda se realizó con el programa *Blast* del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) (59), para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos externos e internos utilizados en éste trabajo. La flecha del lado derecho señala la barra que representa la secuencia del fragmento del gene *aspA* y en la parte inferior se muestran 10 barras que representan la longitud y localización de los fragmentos que tienen homología con la secuencia empleada en la búsqueda.



**Fig. 7.** Diagrama donde se muestra el resultado de una búsqueda en el Blas del NCBI. Las 7 líneas en rojo indican una homología en más de 200 nucleótidos y las 3 líneas en morado muestran una homología entre 80 y 200 nucleótidos con respecto al gene *aspA*.

En la Fig. 8, se enlistan, en orden de aparición y marcados con número cada línea, el No. de acceso al GeneBank del NCBI, el nombre del organismo al cual

pertenece la secuencia homóloga y finalmente el porcentaje de homología de cada uno de los microorganismos encontrados.

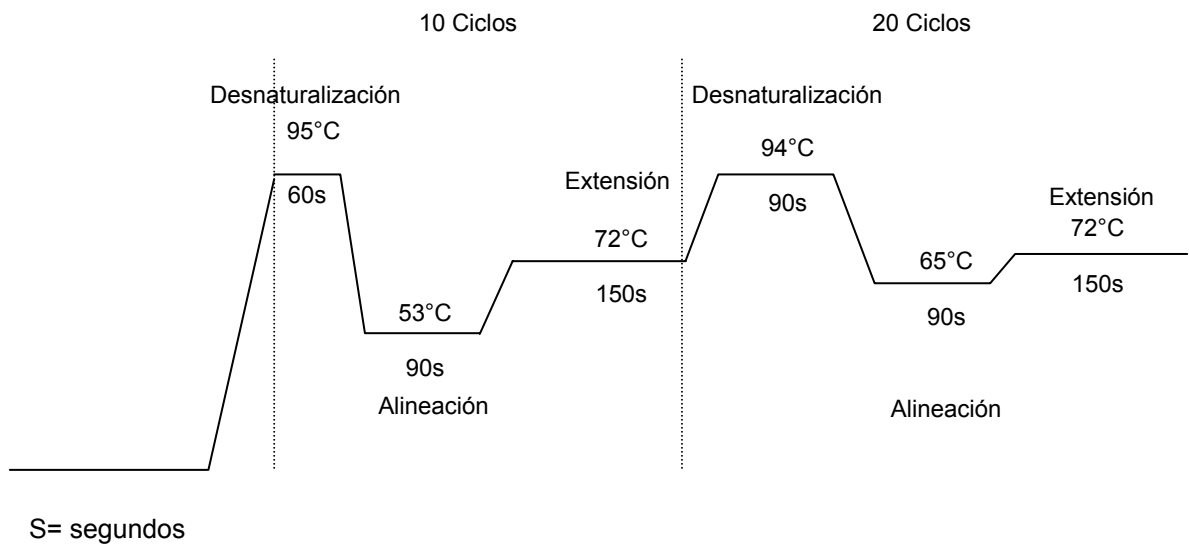
**Tabla1.** Porcentajes de identidad del fragmento del gene *aspA* comparado con otros microorganismo en el Blast del GeneBank.

No.	Accession	Description	Max ident
1	<a href="#">L08049.1</a>	Campylobacter-like bacterium DNA sequence	100%
2	<a href="#">AM180252.1</a>	Lawsonia intracellularis PHE/MN1-00	98%
3	<a href="#">AY280626.1</a>	Lawsonia intracellularis isolate 7510 aspartate ammonia-lyase gene, partial cds	99%
4	<a href="#">AY280625.1</a>	Lawsonia intracellularis isolate 4369 aspartate ammonia-lyase gene, partial cds	99%
5	<a href="#">AY280628.1</a>	Lawsonia intracellularis isolate 3220 aspartate ammonia-lyase gene, partial cds	98%
6	<a href="#">AY280627.1</a>	Lawsonia intracellularis isolate 2380 aspartate ammonia-lyase gene, partial cds	98%
7	<a href="#">AY697509.1</a>	Lawsonia cf. intracellularis unknown genomic sequence	92%
8	<a href="#">CP000538.1</a>	Campylobacter jejuni subsp. jejuni 81-176, complete genome	82%
9	<a href="#">AL111168.1</a>	Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11168 complete genome	82%
10	<a href="#">CP000025.1</a>	Campylobacter jejuni RM1221, complete genome	81%

## 2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-1.

La PCR-1 se realizó en un termociclador Touchgene Gradient (TECHNE® FTGRADZD, Cambridge Inglaterra) y cada reacción se ajustó a un volumen final de 50 µl. En cada prueba se agregó buffer para PCR (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, KCl 25 mM), MgCl 2.5 mM, 0.5 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina, 1X de Tritón, 0.15 mM de cada trifosfato deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 UI de *Taq* Polimerasa, 10 ng de ADN blanco (fragmento purificado del gene *aph*), 0.15 pMol. de cada oligonucleótido LW1-KM1 y LW2-KM2 y el resto del volumen se ajustó con agua bidestilada estéril.

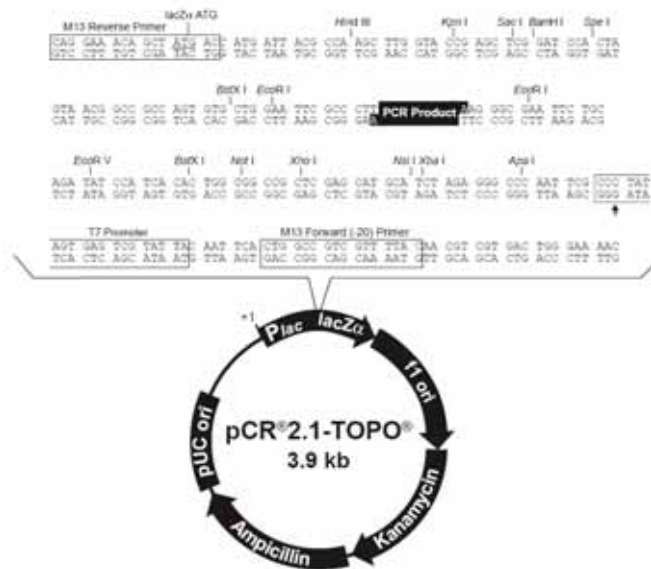
Las condiciones utilizadas en la PCR-1 fueron las siguientes:



## 2.6 Clonación.

El producto amplificado en la PCR-1 se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen®) siguiendo las especificaciones del fabricante (60) (Fig. 8), con lo que se obtuvo el plásmido pELW, que se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación (2.5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ), utilizando un electroporador Gene Pulser® (Bio-Rad, USA). Posteriormente las células se incubaron por 1 h a una temperatura de 37°C en medio SOC (20g. de Triptona, 54 g. de extracto de levadura, 0.5g de NaCl, 1M de Glucosa y 1M de MgCl<sub>2</sub>), para después ser sembradas en Agar LB con *Kan*, e incubadas a una temperatura de 37°C por 24 h. Para identificar las clonas que insertaron el control interno, se hizo una selección aleatoria de las bacterias transformantes y se sembraron en caldo LB. A cada transformante se le extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina utilizando el método de Sambrook, J. y col.,(55), el cual fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* con el fin de liberar el fragmento clonado y linearizar el plásmido, respectivamente. Por último, se eligió una transformante, con el fin de obtener la secuencia del inserto, empleando unos oligonucleótidos (M13 reverse/foward primer) que

reconocen los sitios que contiene el vector para este fin. A continuación se muestra el mapa del vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen®).



**Fig. 8.** Mapa del pCR2.1-TOPO® (Invitrogen®), en el recuadro negro se indica el sitio de inserción del producto obtenido en la PCR-1.

## 2.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-2.

El ADN del pELW fue sometido a la PCR-2 para amplificar el control interno de 854 pb, utilizando los iniciadores LW1 y LW2, en un termociclador Touchgene Gradient (TECHNE® FTGRADZD, Cambridge Inglaterra). Cada reacción de PCR se ajustó a un volumen final de 50  $\mu$ l y se le agregó buffer para PCR 0.5 X (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 25 mM), MgCl 2.5 mM, 0.5 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina, 1X de Tritón, 0.15 mM de cada trifosfato deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 UI de *Taq* Polimerasa, 100 ng de ADN del pELW, 10 pMol. de cada oligonucleótido LW1 y LW2 y el resto del volumen se ajustó con agua bidestilada estéril.

Las condiciones utilizadas en la PCR-2 fueron las siguientes:



Melrose Park. ILL.), posteriormente, se le agrego SDS y Proteinasa K a una concentración final de 0.5% y 100 µg/ml respectivamente y se incubó por 1h a 37°C en baño María (Isotemp®waterbath, FisherScientific, USA). Subsiguientemente, se agregó NaCl 5M, se homogenizo, se agregó una solución de NaCl 0.7M y CTAB 10% (Hexadecil trimetilamonio bromuro) para eliminar restos de pared celular, polisacáridos y proteínas remanentes y se incubo a una temperatura de 65°C en baño María (Reciprocal Shaking Bath Model 25, Precision Scientific, USA) por 10 min. Después, se realizaron dos extracciones consecutivas, inicialmente con cloroformo: alcohol isoamilico (24:1, volumen/volumen) y luego con fenol: cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1, volumen/volumen), se centrifugo a 12 000 X g por 5 min. (Micromax, IEC, USA) para obtener el sobrenadante y precipitar el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol. Finalmente, el ADN fue lavado con etanol al 70% y resuspendido para su almacenamiento en solución TE.

#### **2.10 Concentración mínima detectable del ADN de *L. intracellularis* por PCR.**

El ADN de *L. intracellularis* obtenido, fue cuantificado en un espectrofotómetro Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech® Cambridge, Inglaterra), con una absorbancia de 260 - 280 nm para después realizar diluciones decimales comenzando con 100 ng/µl hasta 100 pg/µl. Posteriormente, estas diluciones fueron sometidas a la PCR-2 empleando los oligonucleótidos LW1 y LW2 y las condiciones anteriormente descritas.

### **2.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-3.**

Para incrementar la especificidad de la prueba, se realizó una tercera PCR en la cual se utilizó el producto obtenido en la PCR-2, para amplificar una región interna de 270 pb. Para la obtención de éste producto, se utilizaron los oligonucleótidos LW3 y LW4 (43) y las condiciones de los ciclos fueron las mismas utilizadas en la PCR-2.

### **2.12 Análisis de Restricción del fragmento interno de *L. intracellularis*.**

Adicionalmente, se efectuó un análisis de restricción con el programa DNAMAN Ver. 3.0 (Lynnon BioSoft, 1997) en la búsqueda de sitios de corte para enzimas de la secuencia de nucleótidos del producto obtenido en la PCR-3, el cual reveló la existencia de sitios únicos de restricción, de los cuales se eligió el digerido por la enzima *Pst*-I, que corta al fragmento en dos porciones; una de 222 pb y otra de 48 pb.

### **2.13 Ensayos de inhibición con el control interno.**

Puesto que en una sola PCR y utilizando únicamente los oligonucleótidos LW1 y LW2, se logra amplificar tanto al control interno como al fragmento específico de *L. intracellularis*, se puede presentar un fenómeno de competencia entre el ADN blanco y el control interno, razón por la cual se realizaron ensayos de inhibición del control interno (62). Los objetivos fueron; determinar la concentración del control interno que inhibe la amplificación del fragmento específico de *L. intracellularis* y establecer la concentración mínima con la que se puede amplificar tanto el control interno, como el fragmento específico de *L. intracellularis*, mediante la PCR-2.

En este ensayo se utilizó ADN de *L. intracellularis* y del pELW, colocados en la misma reacción, agregando concentraciones constantes del ADN de *L. intracellularis* (10 ng) y concentraciones decrecientes del control interno (10 ng a 1 pg). De igual manera, se colocaron concentraciones constantes del control interno (100 pg) y concentraciones decrecientes de ADN de *L. intracellularis* (100 ng a 1 pg), utilizando las condiciones de la PCR-2 anteriormente mencionadas. Además, éste ensayo nos permitió determinar la concentración del control interno que se debía adicionar en las muestras a analizar.

#### **2.14 Diluciones del control interno en heces de cerdo.**

El control interno fue llevado a muestras de heces de cerdo para detectar la cantidad de bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contienen al pELW, necesarias para la amplificación del control interno. Se realizó un cultivo de la clona seleccionada en medio LB caldo con Kan (100  $\mu$ g/ml) y se incubó a 37°C en agitación (Lab-Line®, Incubator-Shaker, USA), realizando lecturas del cultivo cada 2 h, hasta detectar una concentración del 0.5 McFarlan ( $10^8$  bacterias) que equivalen a una densidad óptica de 0.08-0.10 en el espectrofotómetro (63) (Ultraspec 3000 Pharmacia Biotech®, Cambridge, Inglaterra), una vez alcanzado el 0.5 de McFarlan se realizaron diluciones decimales del cultivo, iniciando con  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$ , posteriormente las diluciones de las bacterias fueron centrifugadas a 12 000g por 5 min. (Micromax, IEC, USA), para obtener las pastillas bacterianas correspondientes y se les agregaron 220 mg de heces de cerdo estériles a cada una. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN genómico a partir de dichas



muestras junto con el control interno, utilizando el método QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) (64) y se sometieron a la PCR-2.

### **2.15 Extracción de ADN genómico a partir de muestras fecales.**

Finalmente con el fin de estandarizar la PCR a partir de muestras de heces, se llevó a cabo una extracción de ADN en muestras fecales de cerdos sospechosos a EP utilizando el equipo comercial QIAamp® (QIAGEN) (64), siguiendo las indicaciones del fabricante. La metodología comprende tres puntos importantes que son: la lisis celular, la adsorción de impurezas y la purificación del ADN mediante columnas. Finalmente el ADN obtenido fue desecado en una centrifuga al vacío (Speed Vac®CS110, Savant, USA) y resuspendido para su almacenamiento en solución TE.

### **2.16 Extracción de ADN genómico a partir de tejidos frescos y congelados**

Para la estandarización de la PCR a partir de muestras de tejidos, se realizó la extracción de ADN de dichas muestras, utilizando el método descrito por Birren Bruce y col., (65). Brevemente, se tomaron 100 mg de un raspado de la mucosa del ileon y se colocó en 1 ml de solución de lisis (Sucrosa al 27%, SSC 1X [Cloruro de Sodio y Citrato de Sodio], EDTA 1mM, SDS 1%) y proteinasa K (200 µg/ml), mezclando gentilmente por inversión del tubo e incubando por un periodo de 24 h a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se realizó una extracción con una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) para remover los restos de pared celular, polisacáridos y proteínas, se centrifugó a 12 000 X g por 5 min. (Micromax, IEC, USA), se obtuvo el sobrenadante y después se precipitó el ADN con un volumen igual de

isopropanol (volumen/volumen), el ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en solución TE. Posteriormente, se realizó otra extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 12 000 X g por 5 min. (Micromax, IEC, USA) para obtener el sobrenadante y precipitar el ADN utilizando 1/3 del volumen de acetato de amonio 7.5 M (pH. 7.4) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, finalmente el ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en solución TE.

### **2.17 Extracción de ADN genómico a partir de muestras fijadas en formol al 10%.**

También se realizó la extracción de ADN a partir de muestras fijadas en formol al 10%, para determinar la eficacia de la PCR a partir de estas muestras (provenientes de Navojoa, Sonora). Para esta extracción se utilizó el método descrito por Fretter Sian (66). Brevemente, se tomaron 500 mg. de la mucosa intestinal y se sometieron a un lavado con agua corriente por 24 horas, con el fin de eliminar el formol. Posteriormente, a la mucosa se le agrego una solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 25 mM y SDS 0.5%) y proteinasa K (200 µg/ml) y se incubo por un periodo de 72h a 37°C. Subsiguientemente, se realizaron dos extracciones con una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (volumen/volumen), y se centrifugó a 7000 X g por 5 min. (Micromax, IEC, USA), enseguida se realizó una tercera extracción con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se centrifugó a 7000 X g por 5 min. (Micromax, IEC, USA) para finalmente ser precipitado con etanol absoluto en relación 2:1, el ADN se lavó con etanol al

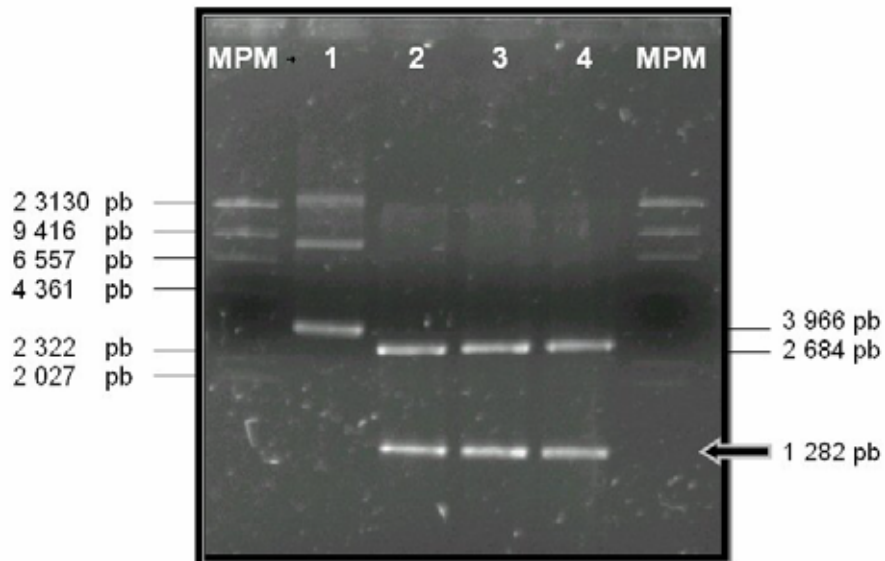
70% y se desecó en una centrifuga al vacío (Speed Vac®CS110, Savant, USA) para ser resuspendido en solución TE.

El ADN obtenido de las diferentes muestras fue cuantificado en un espectrofotómetro Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech® Cambridge, Inglaterra) con una absorbancia de 260 -280nm y la concentración de ADN se ajusto a una concentración de 100 ng/μl, para ser sometidas a la PCR-2.

### 3. Resultados

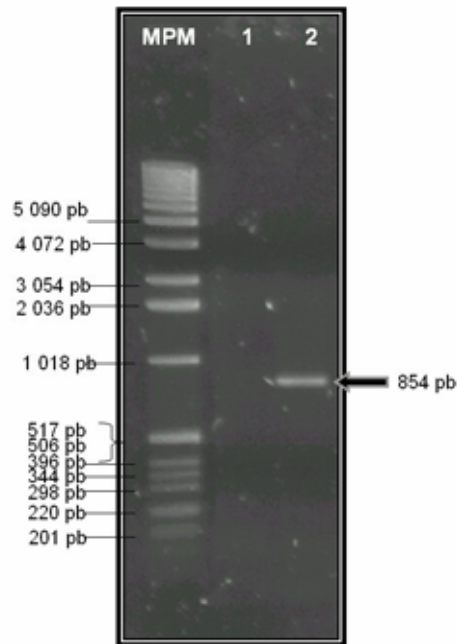
#### 3.1 Construcción del control interno.

En la construcción del control interno se utilizó el gene *aph*, el cual posee un tamaño de 1 282 pb, que se obtuvo a partir del plásmido pUC4K, mediante restricción con la enzima *EcoRI* (Fig. 9).



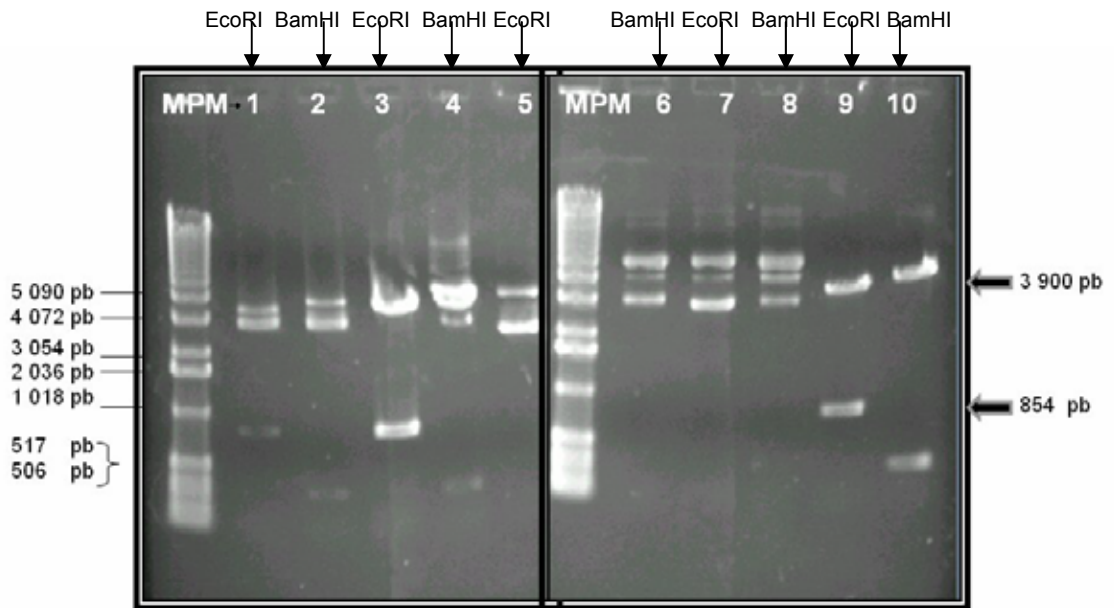
**Fig. 9.** Digestión del plásmido pUC4K con *EcoRI* y *BamHI*. Fotografía de un gel de Agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1, plásmido pUC4K sin digerir; Carril 2, 3, 4, plásmido pUC4K digerido con *EcoRI*; MPM= Marcador de Peso Molecular,  $\lambda$  ADN/*HindIII*.

Una vez separado por electroforesis el fragmento que corresponde a este gene, fue purificado y sometido a la PCR-1 donde se utilizaron los oligonucleótidos LW1-KM1 y LW2-KM2, logrando amplificar un segmento de 854 pb que corresponde al control interno (Fig. 10 ).



**Fig. 10.** Amplificación del control interno mediante la PCR-1. Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con Br-E. Carril 1, Control negativo. Carril 2, Amplificación del control interno, 854 pb. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

El producto amplificado en la PCR-1, fue introducido en el vector pCR2.1-TOPO®, obteniendo el plásmido pELW, que se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* DH5α. Para la identificación de las clonas con el control interno insertado, se realizó una selección aleatoria de las transformantes y se obtuvo el ADN plasmídico, que fue sometido a digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* liberando el fragmento que corresponde al control interno y linearizando el plásmido. Como se muestra en la Fig. 11, la clona 1 (carril 1), 2 (carril 3) y 5 (Carril 9) adquirieron el pELW ya que presentan bandas con un peso molecular que indican la inserción del control interno obtenido en la PCR-1. De estas transformantes, se eligió la clona 2 para realizar la secuenciación del inserto y cerciorarse de que la construcción fuese la esperada.



**Fig. 11.** Digestión de las transformantes 1, 2, 3, 4 y 5. Fotografía de un gel de Agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1 y 2, ADN plasmídico obtenido de la Clona 1. Carril 3 y 4, ADN de la Clona 2. Carril 5 y 6, ADN de la Clona 3. Carril 7 y 8, ADN de la Clona 4. Carril 9 y 10, ADN de la Clona 5. MPM = Marcador de Peso Molecular, 1Kb DNA Ladder.

En la Fig. 12 se muestra la secuencia de la construcción (854 pb), la cual está conformada por un segmento del gene *aph* de 813 pb que va del nucleótido 90 al 902 (cuyo codón de inicio fue alterado para evitar su transcripción), flanqueado por los oligonucleótidos LW1 y LW2 que permiten la amplificación del fragmento específico de *L. intracellularis*. El oligonucleótido LW1 comprende del nucleótido 69 al 89 y el LW2 del 903 al 923.

1 CGGATTGGGC CCTCTAGATG CGTGCTCGAG CGGCCGCCAG TGTGATGGAT ATCTGCAGAA  
GCCTAACCCG GGAGATCTAC GCACGAGCTC GCCGGCGGTC ACACTACCTA TAGACGTCTT

61 TTCGCCCTTT ATGGCTGTCA AACACTCCGT GAGCCATATT CAACGGGAAA CGTCTTGCTC  
AAGCGGGAAA TACCGACAGT TTGTGAGGCA CTCGGTATAA GTTGCCCTTT GCAGAACGAG

121 GAGGCCGCGA TTAAATTCCA ACATGGATGC TGATTTATAT GGGTATAAAT GGGCTCGCGA  
CTCCGGCGCT AATTTAAGGT TGTACCTACG ACTAAATATA CCCATATTTA CCCGAGCGCT

181 TAATGTCGGG CAATCAGTGC GACAATCTAT CGATGTATGG GAAGCCCGAT GCGCCAGAGT  
ATTACAGCCC GTTAGTCACG CTGTTAGATA GCTACATACC CTTCCGGGCTA CGCGGTCTCA

241 TGTTTCTGAA ACATGGCAAA GGTAGCGTTG CCAATGATGT TACAGATGAG ATGGTCAGAC  
ACAAAGACTT TGTACCGTTT CCATCGCAAC GGTACTACTA ATGTCTACTC TACCAGTCTG

301 TAAACTGGCT GACGGAATTT ATGCCTCTTC CGACCATCAA GCATTTTATC CGTACTCCTG  
ATTTGACCGA CTGCCCTAAA TACGGAGAAG GCTGGTAGTT CGTAAAATAG GCATGAGGAC

361 ATGATGCATG GTTACTCACC ACTGCGATCC CCGGGAAAAC AGCATTCCAG GTATTAGAAG  
TACTACGTAC CAATGAGTGG TGACGCTAGG GGCCCTTTTG TCGTAAGGTC CATAATCTTC

421 AATATCCTGA TTCAGGTGAA AATATTGTTG ATGCGCTGGC AGTGTTCCTG CGCCGGTTGC  
TTATAGGACT AAGTCCACTT TTATAACAAC TACGCGACCG TCACAAGGAC GCGGCCAACG

481 ATTCGATTCC TGTTTGTAAAT TGTCTTTTA ACAGCGATCG CGTATTTCTG CTCGCTCAGG  
TAAGCTAAGG ACAAACATTA ACAGGAAAAT TGTCGCTAGC GCATAAAGCA GAGCGAGTCC

541 CGCAATCACG AATGAATAAC GGTTCGTTG ATGCGAGTGA TTTTGATGAC GAGCGTAATG  
GCGTTAGTGC TTACTTATTG CCAAACCAAC TACGCTCACT AAAACTACTG CTCGCATTAC

601 GCTGGCCTGT TGAACAAGTC TGGAAAGAAA TGCATAAGCT TTTGCCATTC TCACCGGATT  
CGACCGGACA ACTTGTTTCAG ACCTTTCTTT ACGTATTCGA AAACGGTAAG AGTGGCCTAA

661 CAGTCGTCAC TCATGGTGAT TTCTCACTTG ATAACCTTAT TTTTGACGAG GGGAAATTA  
GTCAGCAGTG AGTACCACTA AAGAGTGAAC TATTGGAATA AAAACTGCTC CCCTTTAATT

721 TAGGTTGTAT TGATGTTGGA CGAGTCGAA TCGCAGACCG ATACCAGGAT CTTGCCATCC  
ATCCAACATA ACTACAACCT GCTCAGCCTT AGCGTCTGGC TATGGTCTTA GAACGGTAGG

781 TATGGAAGT CCTCGGTGAG TTTTCTCCTT CATTACAGAA ACGGCTTTTT CAAAAATATG  
ATACCTTGAC GGAGCCACTC AAAAGAGGAA GTAATGTCTT TGCCGAAAAA GTTTTTTATAC

841 GTATTGATAA TCCTGATATG AATAAATTGC AGTTTCATTT GATGCTCGAT GAGTTTTTCT  
CATAACTATT AGGACTATAC TTATTTAACG TCAAAGTAAA CTACGAGCTA CTCAAAAAGA

901 AAGGAGAATA CCAATACCTT CATAAGGGCG AATTCAGCA CACTGGCGGC CGTTACTAGT  
TTCTCTTAT GGTATGGAA GTAATCCCGC TTAAGTCTG GTGACCGCCG GCAATGATCA

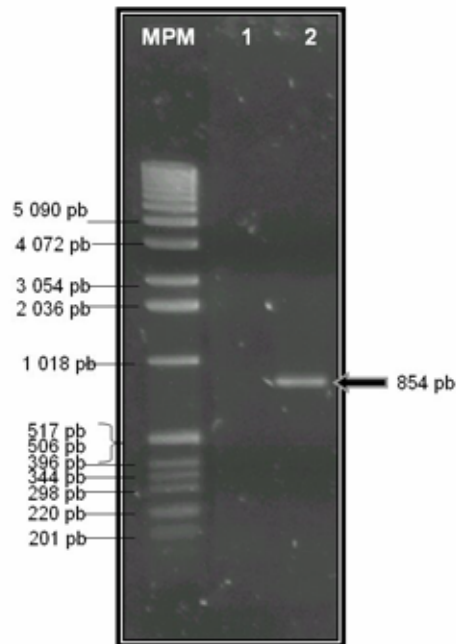
961 GGATCCGAGC TCGGTACCAA GCTGGCGAAT  
CCTAGGCTCG AGCCATGGTT CGACCGCTTA

Lawsonia Kanamicina

**Fig. 12.** Secuencia de las dos cadenas de ADN del pELW. Se muestra la identificación de los oligonucleótidos LW1-KM1 y LW2-KM2, en verde los oligonucleótidos que corresponden a *L. intracellularis* y en rojo los oligonucleótidos que corresponde al gene de *aph*.

### 3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-2).

El ADN de la clona 2 se utilizó en la PCR-2 para amplificar el fragmento correspondiente al control interno utilizando los oligonucleótidos LW1 y LW2 (Fig. 13, carril 2).



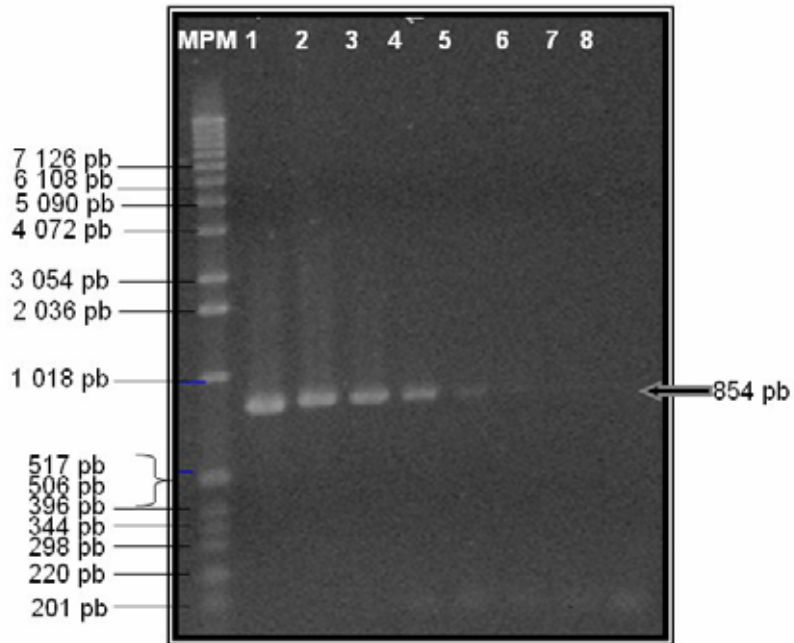
**Fig. 13.** Amplificación del control interno.

Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con Br-E. Carril 1, Control negativo. Carril 3, Amplificación del control interno, 854 pb. MPM = Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

### 3.3 Concentración mínima detectable del control interno.

Con el fin de conocer la concentración mínima del control interno que puede ser amplificada en la PCR-2, se colocaron diferentes concentraciones del ADN del pELW comenzando con 100 ng a 10 fg; logrando amplificar hasta 1 pg del control interno (Fig. 14, carril 6).



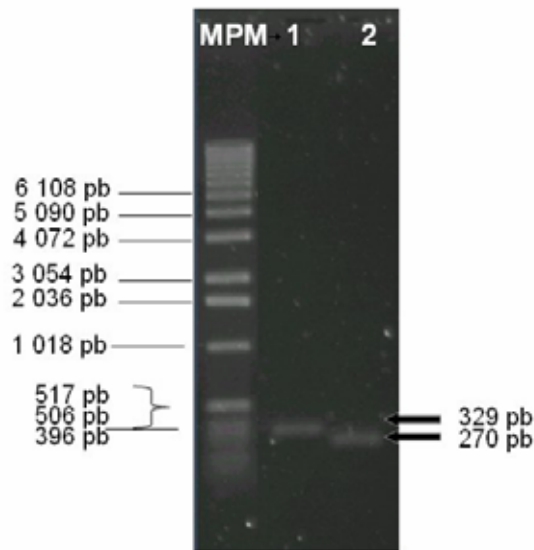


**Fig. 14.** Concentración mínima detectable del control interno.

Fotografía de un gel de Agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio. Carril 1, ADN pELW 100ng; Carril 2, ADN pELW 10 ng; Carril 3, ADN pELW 1 ng; Carril 4, ADN pELW 100 pg; Carril 5, ADN pELW 10 pg; Carril 6, ADN pELW 1 pg; Carril 7, ADN pELW 100 fg; Carril 8, ADN pELW 10 fg. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

### 3.4 PCR a partir de ADN de *L. intracellularis*.

El ADN de *L. intracellularis* obtenido a partir de la vacuna Enterisol®Ileitis FF (Boehringer Ingelheim VetMedica), fue sometido a la PCR-2 con los oligonucleótido LW1 y LW2 para amplificar el fragmento del gene *aspA* de 329 pb (Fig. 15, Carril 1); éste mismo producto amplificado se sometió a la PCR-3, donde se utilizaron los oligonucleótidos LW3 y LW4 que amplifican un fragmento interno de 270 pb, que comprende del nucleótido 45 al 314 del fragmento anterior (Fig. 15, carril 2).



**Fig. 15.-** Amplificación del fragmento del gene *aspA* de 329 y 270 pb. Fotografía de un gel de Agarosa al 1 % teñido con Br-E. Carril 1, Producto amplificado de 329 pb. Carril 2, Producto amplificado de 270 pb. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

### 3.5 Análisis de restricción enzimática

El análisis de restricción del fragmento del gene *aspA* de 375 pb empleado en este estudio, reveló la presencia de sitios únicos de restricción. A continuación en la Fig. 16 se muestra la lista de las enzimas de restricción obtenidas en la búsqueda y el sitio de corte de cada una de ellas.

Análisis de restricción en el programa DNAMAN26	
Total de sitios: 9	
ApaBI	1 GCANNNNN/TGC
BbvII	1 GAAGACNN/
BclI	1 <b>T</b> /GATCA
Bsc91I	1 GAAGACNN/
BsmI	1 GAATGCN/
DraIII	1 CACNNN/GTG
<b>PstI</b>	<b>1 CTGCA/G</b>
VspI	1 AT/TAAT
XmnI	1 GAANN/NTTC
Lista del número de nucleótido que corta cada enzima de restricción:	
23, DraIII ; 112, PstI; 128, BbvII; 205, BclI; 36, XmnI; 117, ApaBI ; 128, Bsc91I; 265, BsmI; 77, VspI .	

**Fig. 16.** Lista de las enzimas de restricción que cortan al fragmento del gene *aspA* de 375 pb, en negritas se muestra el sitio de corte de enzimas en la secuencia.

La enzima utilizada para la digestión del fragmento de 270 pb obtenido en la PCR-3, fue la enzima *Pst-I*. En la Fig. 17 se muestra la secuencia del fragmento del gene *aspA* de 375 pb y el sitio de corte de esta enzima de la cual se obtuvieron dos segmentos uno de 222 pb y otro de 48 pb.

```

1   TTATTATGGC TGTCAAACAC TCCGTGCTGT TGAAAAC TTT CAAATTACAG GTGAAGTTAT
   AATAATACCG ACAGTTTGTG AGGCACGACA ACTTTTGAAA GTTTAATGTC CACTTCAATA
                                     PstI
61  TGGGAAATAT CCCTCATTAA TTA CTTT CATT AGCTCAAGTT AAACAAGCTG CAGCACTTGC
   ACCCTTTATA GGGAGTAATT AATGAAGTAA TCGAGTTCAA TTTGTTTCGAC GTCGTGAACG

121 AAACAATAAA CTTGGTCTTC TTTCTGATAA AAAAGGAGAT GCTATCTCTG CTGCATGTAA
   TTTGTTATTT GAACCAGAAG AAAGACTATT TTTTCCTCTA CGATAGAGAC GACGTACATT

181 TGAAATCATA AATGGAGAAC TCCTTGATCA ATTTGTTGTG GATTGTATT C AAGGAGGTGC
   ACTTTAGTAT TTACCTCTTG AGGAACTAGT TAAACAACAC CTAACATAAG TTCCTCCACG

241 AGGGACAAGT ACAAATATGA ATGCTAATGA AGCAATTTGT AATCGTGCTC TTGAGCTTAT
   TCCCTGTTCA TGTTTTACT TACGATTACT TCGTTAAACA TTAGCACGAG AACTCGAATA

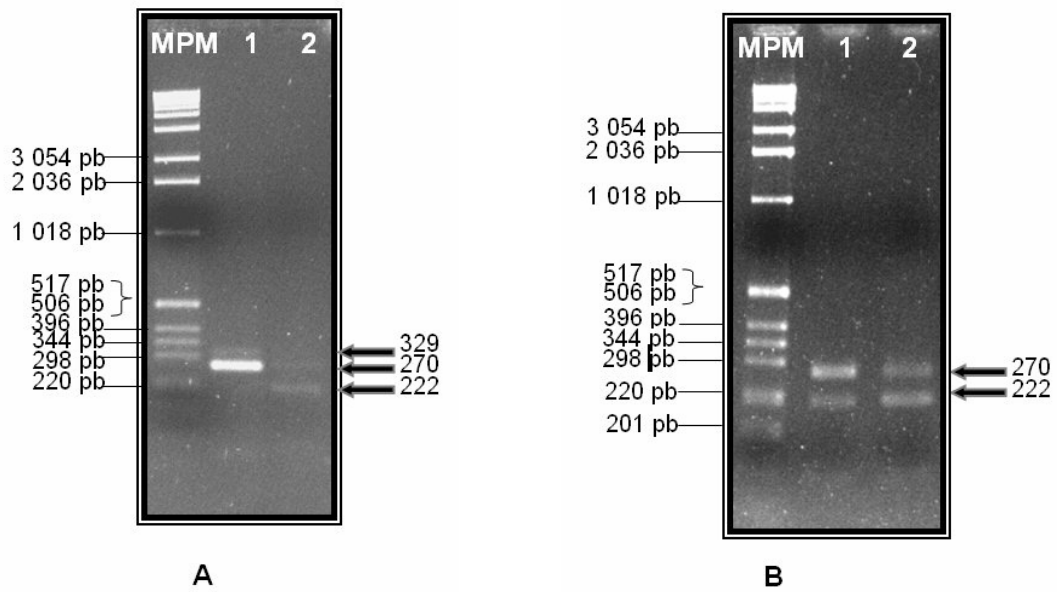
301 GGGACATGAG AAAGGAGAAT ACCAATACCT TCATCCTAAT AATGATGTAA AATATGTCCA
   CCCTGTACTC TTTCTCTTA TGGTTATGGA AGTAGGATTA TTACTACATT TTATACAGGT

361 ATCAACAAAT GACGT
   TAGTTGTTTA CTGCA

```

**Fig. 17.** Secuencia del fragmento amplificado del gene *aspA* de *L. intracellularis* de 375 pb. Se muestra el sitio de restricción de la enzima *Pst-I* (negritas) (Número de acceso al GeneBank L08049.1).

En la Fig. 18A carril 1 y 2 se observa la digestión del fragmento de 270 pb, que produce un fragmento de 222 pb y otro de 48 pb, que no es visible en la fotografía del gel de agarosa. En la figura 18B se pueden observar, los productos de amplificación de la PCR-2 y la PCR-3 (carril 1) comparados con el resultado de la digestión del fragmento interno de 270 pb (carril 2).

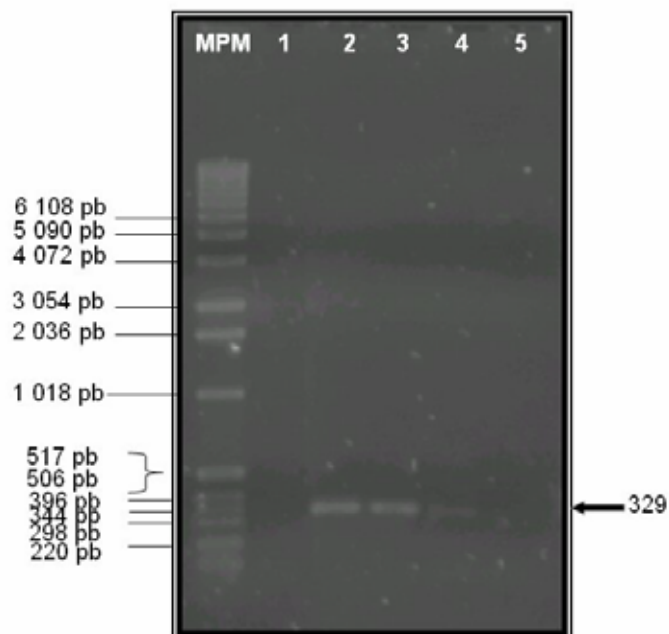


**Fig.18.** Digestión del fragmento interno del gene *aspA* de 270pb.

**A.-** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1, Amplificación de fragmento externo (329 pb) y fragmento interno (270 pb). Carril 2, Digestión del fragmento interno de 270 pb. **B,** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1 y 2, Digestión del fragmento interno (270 pb). MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

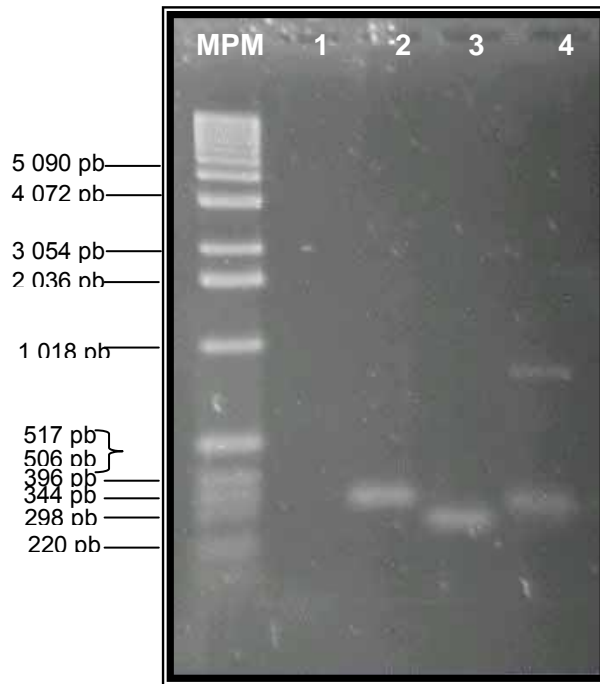
### 3.6 Concentración mínima detectable del ADN de *L. intracellularis* a partir de la PCR.

El ADN de *L. intracellularis* fue utilizado en la PCR-2 para detectar también la concentración mínima amplificable. En la Fig. 19 se pueden observar las concentraciones decrecientes del ADN de *L. intracellularis* iniciando con 100 ng hasta 100 pg (carriles 2 al 5); logrando amplificar el fragmento esperado hasta con 1 ng del ADN de *L. intracellularis* (Fig. 19, carril 4).



**Fig. 19.** Concentración mínima detectable del ADN de *L. intracellularis* a partir de la PCR. Fotografía de un Gel de agarosa al 1% Teñido con Br-E. Carril 1, Control negativo. Carril 2, ADN de *L. intracellularis* 100ng. Carril 3, ADN de *L. intracellularis* 10ng. Carril 4, ADN de *L. intracellularis* 1ng. Carril 5, ADN de *L. intracellularis* 100 pg. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

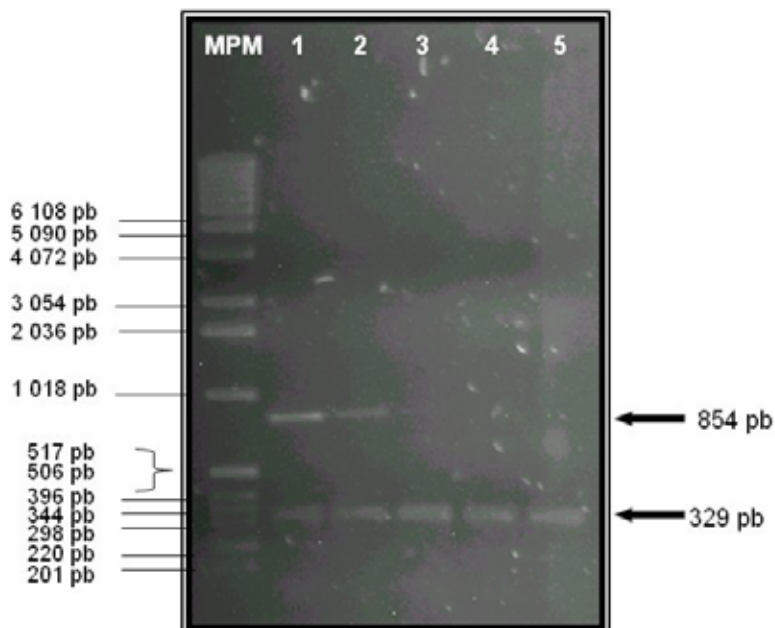
En la Fig. 20 se resume el funcionamiento del control interno utilizando las PCR-2 y 3. Empleando la PCR-2 se logro amplificar en un solo paso el control interno (854 pb) y el fragmento específico de *L. intracellularis* (329 pb) (carril 4), utilizando únicamente los oligonucleótidos LW1 y LW2. Y utilizando la PCR-3 se amplifico el fragmento de 270 pb (carril 3), empleando los oligonucleótidos LW3 y LW4.



**Fig. 20.** Funcionamiento del control interno mediante la PCR-2 y 3 (resultado positivo). Fotografía de un gel de Agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1, Control negativo; Carril 2, Control positivo, fragmento de *L. intracellularis* (329 pb); Carril 3, Amplificación del fragmento interno (270 pb); Carril 4, Amplificación del control interno (854 pb) y amplificación del fragmento externo de *L. intracellularis* (329 pb). MPM= Marcador de Peso Molecular. 1 Kb DNA Ladder.

### 3.7 Ensayo de inhibición con el control interno.

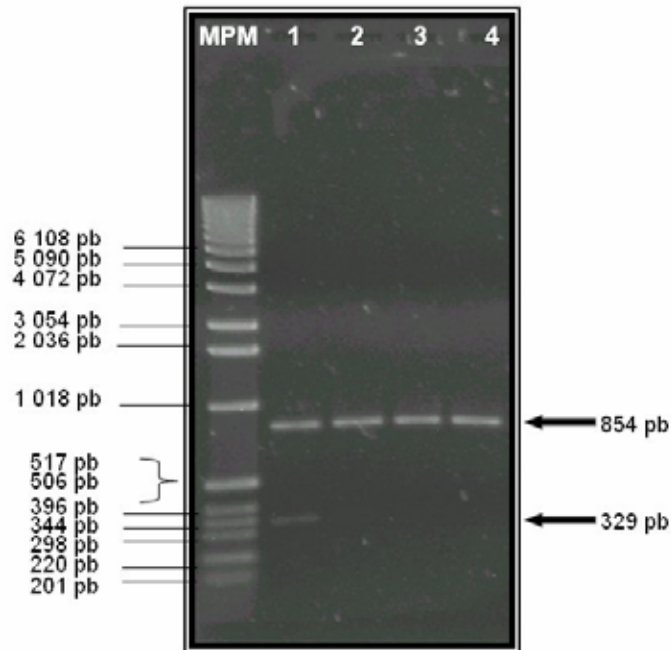
Una vez amplificados ambos fragmentos (854 pb y 329 pb) mediante la PCR-2, se realizaron ensayos para determinar la presencia de fenómenos de inhibición del control interno o del fragmento de *L. intracellularis*. Las concentraciones de ADN empleadas en este ensayo fueron el resultado de experimentos previos donde se determinó la concentración de ADN mínima detectada a través de la PCR. En un primer ensayo se colocaron concentraciones constantes del ADN de *L. intracellularis* (10 ng) y concentraciones decrecientes del ADN del pELW (10 ng- 1 pg), El resultado obtenido en este ensayo, muestra que 10 ng de ADN de *L. intracellularis*, fueron suficientes para inhibir hasta 100 pg del control interno (Fig. 21, carril 3).



**Fig. 21.** Ensayo de inhibición con el control interno.

Fotografía de un gel de Agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1, 10 ng de ADN de *L. intracellularis* y 10 ng de ADN del pELW . Carril 2, 10 ng de ADN de *L. intracellularis* y 1 ng de ADN del pELW . Carril 3, 10 ng de ADN de *L. intracellularis* y 100 pg de ADN del pELW . Carril 4, 10 ng de ADN de *L. intracellularis* y 10 pg de ADN del pELW . Carril 5, 10 ng de ADN de *L. intracellularis* y 1 pg de ADN del pELW . MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

Tomando como base el experimento anterior, se realizó un segundo ensayo en el que se utilizó una concentración constante del control interno de 1 ng y diluciones del ADN de *L. intracellularis* desde 1 ng hasta 100 fg. Sin embargo, no se logró observar la amplificación del segmento específico de *L. intracellularis* en ninguna de las diluciones (datos no mostrados). Por esta razón, se decidió realizar un nuevo experimento, ahora utilizando una concentración de 100 pg del control interno y concentraciones decrecientes del ADN de *L. intracellularis* desde 10 ng hasta 100 fg observando la inhibición del ADN de *L. intracellularis* en 1 ng de este último (Fig. 22, carril 1).



**Fig. 22** Ensayo de inhibición con el control interno.

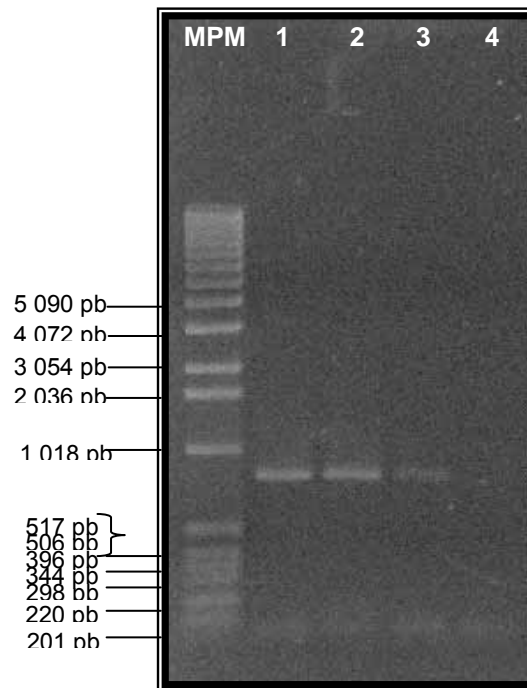
Fotografía de un gel de Agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1, 100 pg de ADN del pELW y 100 ng de ADN de *L. intracellularis*. Carril 2, 100 pg de ADN del pELW y 10 ng de ADN de *L. intracellularis*. Carril 3, 100 pg de ADN del pELW y 1 ng de ADN de *L. intracellularis*. Carril 4, 100 pg de ADN del pELW y 100 pg de ADN de *L. intracellularis*. MPM= Marcador de Peso Molecular. 1 Kb DNA Ladder

### 3.8 Diluciones del control interno en heces.

Se realizó un ensayo para detectar la cantidad de bacterias que se necesitan para la amplificación del control interno y para ello el control interno es aplicado en muestras de heces de cerdo. Se inocularon heces de cerdo previamente estériles, con diferentes concentraciones de la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  iniciando con  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ; se realizó la extracción de las mismas utilizando el método QIAamp® DNA Stool Mini Kit Handbook (QIAGEN) y se realizó la PCR-2 para la amplificación del fragmento que corresponde al control interno. En la Fig. 24, se observan las diferentes diluciones en heces iniciando con  $10^8$  a  $10^5$  bacterias de *E. coli*; en este ensayo se detectó hasta  $10^5$  bacterias de *E.coli*,



esta es la cantidad de bacterias en heces que se necesita para amplificar el control interno.



**Fig. 24.** Diluciones del control interno en heces.

Gel de agarosa al 1 % teñido con Br-E. Carril 1,  $10^8$  bacterias de *E.coli*. Carril 1,  $10^7$  bacterias de *E.coli*. Carril 1,  $10^6$  bacterias de *E.coli*. Carril 1,  $10^5$  bacterias de *E.coli*. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

Una vez conociendo la cantidad necesaria para la amplificación del control interno y el fragmento que corresponde a *L. intracellularis*, el control interno es aplicado en muestras clínicas de cerdos (heces, raspados de mucosa ileal a partir de tejidos frescos, congelados y en formol).

Para descartar la posibilidad de que el fenómeno de inhibición pudiera presentarse al procesar muestras clínicas, se realizó la PCR con ADN de muestras clínicas a las que se les agregaron 10 pg del control interno en la misma reacción así mismo aumentamos la posibilidad de amplificar al fragmento del gene *aspA* con menor cantidad de ADN de *L. intracellularis*. Una

vez obtenido el ADN de cada muestra, se ajusto a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l para ser sometido a la PCR-2 junto con 10 pg del control.

A continuación se muestra el ADN obtenido de las diferentes muestras procesadas y los respectivos PCR's de cada una de ellas.

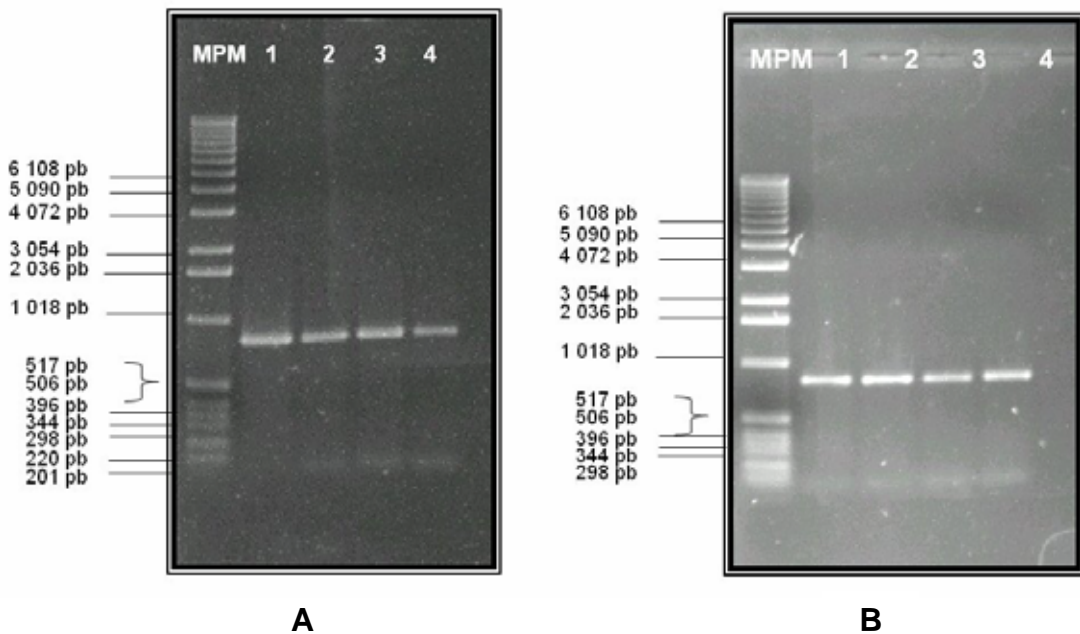
### 3.9 Extracción y PCR de ADN genómico a partir de muestras fecales.



**Fig. 25.** Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio. Extracción de ADN a partir de Heces. Carril 1, ADN de muestra J2; Carril 2, ADN de muestra S4; Carril 3, ADN de muestra S3/J1; Carril 4, ADN de muestra D2/J1; Carril 5, ADN de muestra D1/J1/S1; Carril 6, ADN de muestra S3/J3; Carril 8, ADN de muestra D. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

La extracción de ADN se realizó mediante el método de QIAamp® DNA Stool Mini Kit descrito anteriormente (64) y en la Fig. 25 se observa el ADN de dichas muestras. En la Fig. 26 A y B, se observan los resultados obtenidos de las muestras de la Fig. 25 que fueron sometidas a la PCR-2. Con base a los resultados obtenidos, las ocho muestras son negativas a la PCR ya que

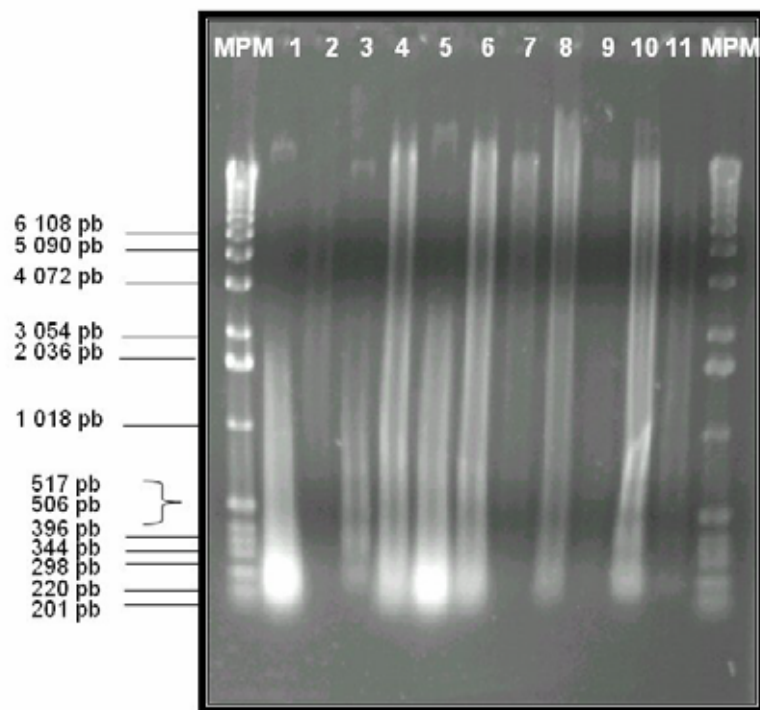
únicamente se observa la amplificación del control interno (854 pb) y no se observa la amplificación del fragmento externo de *L. intracellularis* (329 pb).



**Fig. 26.** Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio. PCR a partir de Heces. **A.-** Carril 1, ADN de pELW y ADN de muestra S3/J3; Carril 2, ADN de pELW y ADN de muestra D; Carril 3, ADN de pELW y ADN de muestra D1/J1/S1; Carril 4, ADN de pELW y ADN de muestra D2/J1. **B.-** PCR a partir de Heces. Carril 1, ADN de pELW y ADN de muestra J2; Carril 2, ADN de pELW y ADN de muestra S4; Carril 3, ADN de pELW y ADN de muestra S3/J6; Carril 4, ADN de pELW y ADN de muestra S4/J4. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

### 3.10 Extracción y PCR de ADN genómico a partir de tejidos frescos y congelados.

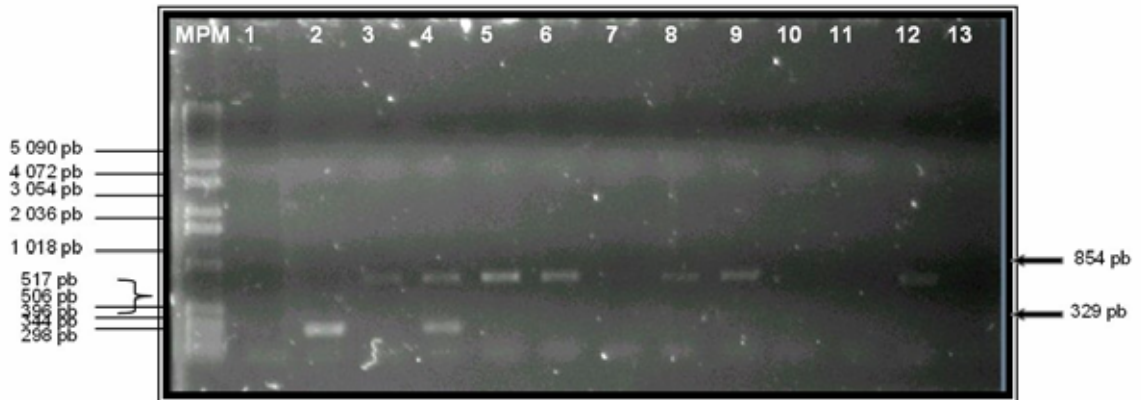
Para la extracción de ADN a partir de muestras frescas y congeladas, se utilizó el método descrito por Birren Bruce y col., (65). En la Fig. 27 se muestra el ADN extraído de las muestras antes mencionadas.



**Fig. 27.** Fotografía de un gel de Agarosa al 1% teñido con Br-E. Carril 1, ADN de Muestra 5'; Carril 2, ADN de muestra UACH; Carril 3, ADN de muestra 3 cong; Carril 4, ADN de muestra 2 cong; Carril 5, ADN de muestra 4; Carril 6, ADN de muestra; Carril 7, ADN de muestra SC; Carril 8, ADN de muestra 5; Carril 9, ADN de muestra V; Carril 10, ADN de muestra I; Carril 11, ADN de muestra II. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

En la Fig. 28 se observan los resultados obtenidos de las muestras de la Fig. 27. En el carril 1, control negativo; carril 2, control positivo que corresponde al fragmento externo de *L. intracellularis* (329 pb); Carril 3, fragmento que corresponde al Control interno (854 pb); Carril 4 amplificación de control interno (854 pb) y fragmento externo de *L. intracellularis* (329 pb). Del carril 5-13 se colocó en cada reacción el control interno más ADN de la muestra de la Fig. 27. Con base a estos resultados las muestras de los carriles 5, 6, 8, 9 y 12 de la Fig. 28, son negativas a la PCR y las muestras que corresponden a los carriles

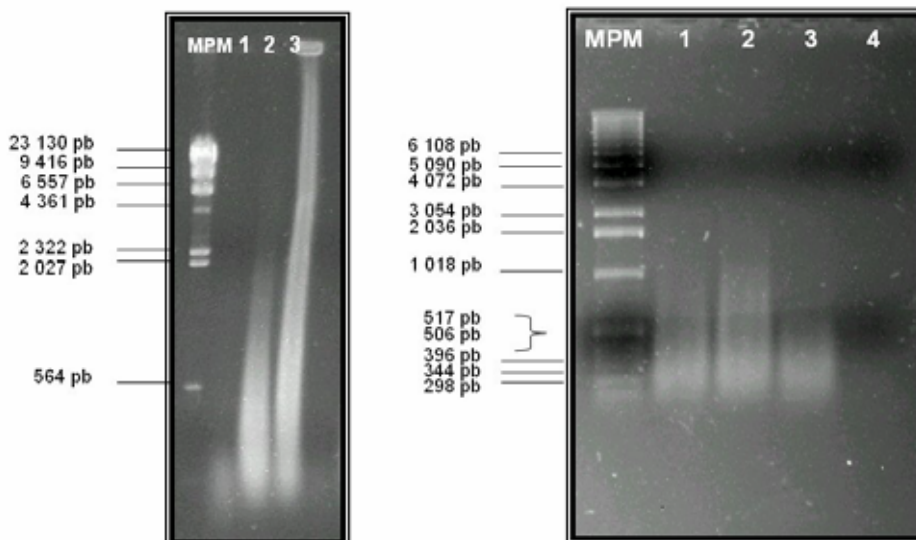
7, 10, 11 y 13 presentan inhibidores de la prueba debido a que en la reacción no se amplificó el control interno (854 pb).

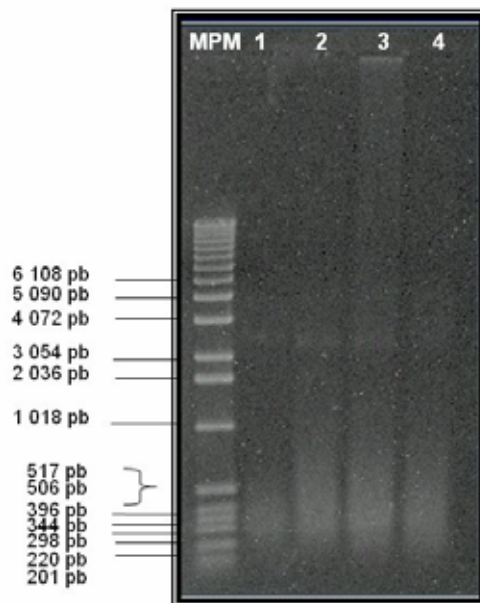


**Fig. 28.** Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con Br-E. Carril 1, Control negativo; carril 2, ADN de *L. intracellularis* (329 pb); carril 3, ADN del pELW; carril 4, ADN del pELW y ADN de *L. intracellularis*; carril 5, ADN de muestra 5' más ADN del pELW; carril 6, ADN de muestra 3cong más ADN del pELW; carril 7, ADN de muestra 4 más ADN del pELW; carril 8, ADN de muestra SC más ADN del pELW; carril 9, ADN de muestra V más ADN del pELW; carril 10, ADN de muestra UACH más ADN del pELW; carril 11, ADN de muestra 5 más ADN del pELW; carril 12, ADN de muestra I más ADN del pELW; carril 13, ADN de muestra 11 más ADN del pELW. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

### 3.11 Extracción y PCR de ADN genómico de muestras fijadas en formol al 10%.

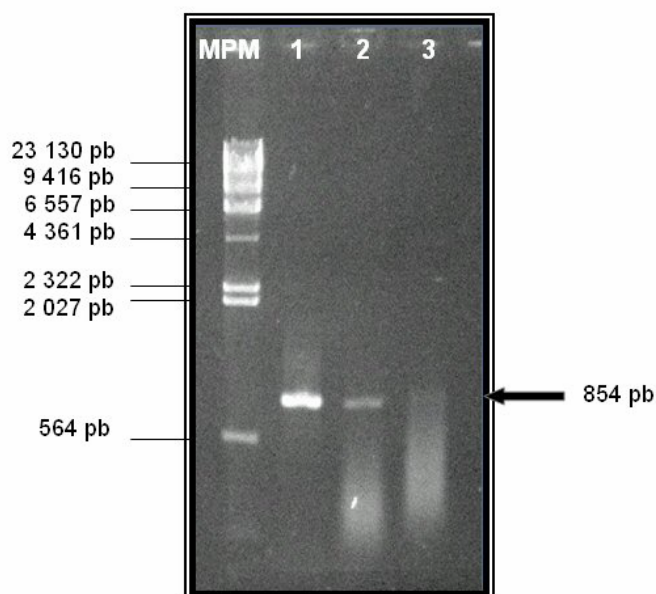
La extracción de ADN a partir de muestras fijadas en formol se realizó en base a la metodología descrita por Fretter Sian (66). En la Fig. 29, 30 y 31 se muestra el ADN extraído de dichas muestras.





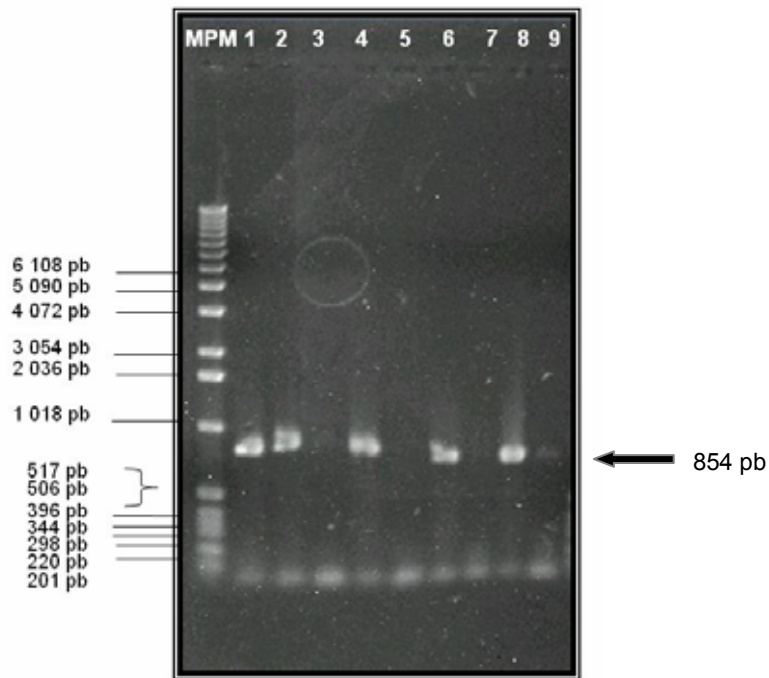
**Fig. 31.** Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con Br-E. Extracción de ADN a partir de muestras de formol al 10%. Carril 1, Muestra No 8; Carril 2, Muestra No 9; Carril 3, Muestra No 10; Carril 4, Muestra No 11. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

En la Fig. 32 se observa el resultado obtenido en la PCR-2 de 3 muestras en formol al 10%. En el carril 1 y 2 se observa la amplificación del control interno, sin embargo no se observa la amplificación del fragmento externo de *L. intracellulraais* con base al resultado obtenido, esto nos indica que ambas muestras son negativas; no obstante en el carril 3, no se observa la amplificación del control interno ni la del fragmento externo de *L. intracellularis*, esto nos indica que en particular la muestra número 3 pudiera presentar inhibidores de la prueba, puesto que no amplificó el control interno.



**Fig. 32.** Fotografía de un gel de Agarosa al 1 % teñido con Br-E. Carril 1, PCR de la muestra 1 (10 pg de control interno y 100 ng de ADN de la muestra); Carril 2, PCR de la muestra 2 (10 pg de control interno y 100 ng de ADN de la muestra); Carril 3, PCR de la muestra 3 (10 pg de control interno y 100 ng de ADN de la muestra). MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

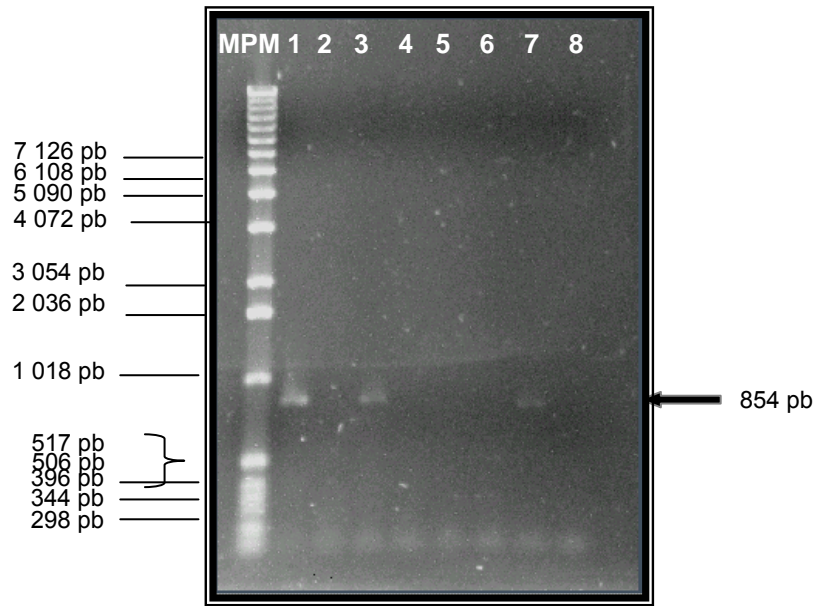
En la Fig. 33, se colocó en el carril 1, el control interno; en los carriles 2, 4, 6 y 8 se colocó el control interno más el ADN de la muestra y los carriles 3, 5, 7 y 9 se colocó sólo el ADN de la muestras. Con base a los resultados obtenidos en ésta PCR podemos decir que las muestras correspondientes a los carriles del 2 al 9 son negativas.



**Fig. 33.** Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con Br-E. PCR de muestras de formol al 10%. Carril 1, Control interno; Carril 2, ADN del pELW y ADN de muestra No 6; Carril 3, ADN de muestra No 6; Carril 4, ADN del pELW y ADN de muestra No 7; Carril 4, ADN de muestra No 7; Carril 5, ADN del pELW y ADN de muestra No 5; Carril 6, ADN de muestra No 5; Carril 7, ADN del pELW y ADN de muestra No 4; Carril 8, ADN de muestra No 4. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

En la Fig. 34 se observa los resultados del resto de las muestras en formol al 10% que se sometieron a la PCR-2, en los carriles 1, 3, 5 y 7 se colocó el control interno y el ADN de las muestras correspondientes y en los carriles 2, 4, 6 y 8 se colocó el ADN de cada muestra. Con base a estos resultados las muestras 8, 9 y 11 son negativas, por que hubo amplificación del control interno, en cambio la muestra 10 no se observa la amplificación del control interno debido a la presencia de inhibidores de la PCR.





**Fig. 34.** Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio. PCR de muestras de formol al 10%. Carril 1, ADN del pELW y ADN de muestra No 8; Carril 3, ADN de muestra No 8; Carril 4, ADN del pELW y ADN de muestra No 9; Carril 4, ADN de muestra No 9; Carril 5, ADN del pELW y ADN de muestra No 10; Carril 6, ADN de muestra No 10; Carril 7, ADN del pELW y ADN de muestra No 11; Carril 8, ADN de muestra No 11. MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb DNA Ladder.

#### 4. Discusión

En éste trabajo se estandarizó una metodología diagnóstica específica, basada en la técnica de PCR, para la detección de *L. intracellularis*, esta nueva metodología emplea un control interno, el cual permite identificar resultados falsos negativos, por tanto permite establecer diagnósticos de manera mas confiable. Actualmente el diagnóstico de la EPP se realiza mediante la observación de las lesiones a la necropsia y estudios histopatológicos. En el examen histológico, se pueden observar los cambios tisulares ocasionados por la infección y eventualmente se pueden llegar a observar a microorganismos con una morfología similar a la de *L. intracellularis*, sin embargo esto no indica con precisión si esas formas similares corresponden a *L. intracellularis*, además de que solo se puede realizar en animales muertos. Por otra parte, el diagnóstico serológico no ha dado buenos resultados, debido a que por lo general la respuesta inmunológica que presentan los animales infectados es incipiente (49). Todo lo anterior hace del diagnóstico de la EPP una actividad difícil de realizar, por lo cual generalmente no se realiza, ocasionando con esto que la situación de esta enfermedad en granjas porcícolas en nuestro país sea totalmente desconocida, a pesar de su enorme impacto económico.

La PCR es una técnica molecular sensible, selectiva y de extrema rapidez, que permite amplificar millones de copias de una secuencia de ADN específica, utilizando pequeñas cantidades del ADN original. Debido a su alta sensibilidad, esta técnica ha sido utilizada en el diagnóstico, para amplificar segmentos de ADN a partir de muestras clínicas (39, 40). Los dos juegos de oligonucleótidos empleados en este trabajo, son especie-específicos y fueron diseñados a partir

de la secuencia de la clona p78 la cual contiene un fragmento de ADN del organismo denominado entonces como "Ileal Symbiont Intracellularis" (44), capaz de hibridar solo con *L intracellularis*. Actualmente se sabe, que este segmento forma parte del gene *aspA* el cual codifica una enzima liasa aspartato- amonio de *L intracellularis*, también se sabe que la localización de los iniciadores reportada en un inicio, así como el tamaño del producto amplificado, son incorrectos, como se apreció en este trabajo. No obstante, la especificidad de los oligonucleótidos y del fragmento amplificado, se confirmó mediante el análisis realizado para determinar el porcentaje de homología con otros organismos, utilizando el programa Blast del NCBI.

Adicionalmente, con el fin de aumentar la especificidad de nuestra metodología diagnóstica, se diseñaron un par extra de iniciadores los cuales amplifican un segmento interno permitiendo desarrollar una PCR-anidada, este ensayo se complementa con un análisis de restricción con la enzima *Pst-I* del producto obtenido en esta PCR. Con estos dos ensayos la especificidad de nuestro PCR aumenta al 100%.

En México, García, C. L., y col. (49) llevaron a cabo una PCR utilizando también los iniciadores descritos por Jones y col. (44), en la que detectaron hasta 3.72 ng del ADN de *L intracellularis* inoculado en muestras de ADN de mucosa intestinal y 12.4 ng del mismo ADN cuando este mismo ADN fue inoculado en muestras de heces. Si bien, en este trabajo no hace referencia de la dificultad para realizar la PCR a partir de muestras fecales es evidente, ya que disminuyó la sensibilidad de la prueba, al requiriese una mayor cantidad de

ADN para poder ser amplificado. En varias ocasiones este decremento en la sensibilidad también aumenta el riesgo de obtener falsos negativos en la prueba. Este fenómeno ha sido reportado también por otros investigadores (33), En este trabajo, empleando nuestra metodología, se logró amplificar el fragmento esperado, hasta con 1 ng del ADN de *L. intracellularis* y la construcción de un control interno que nos ayudó a obtener resultados más confiables en la PCR, aun cuando se realizó a partir de muestras fecales.

La interpretación de los resultados negativos en la PCR se debe de tomar con mesura ya que la ausencia del producto esperado no es un indicativo de un resultado verdadero negativo (51). La utilización de controles internos garantiza una adecuada interpretación de los resultados obtenidos en la PCR. (50) Numerosos estudios demuestran que una pequeña, pero significativa porción de una muestra clínica, contiene sustancias que pueden inhibir la PCR, la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR) y la amplificación mediada por transcripción (TMA) (50). Los inhibidores de la PCR actúan generalmente en alguna de las tres etapas esenciales de la reacción ya que pueden interferir con la lisis celular necesaria para la extracción de ADN, interferir degradando o capturando los ácidos nucleicos, o inhibiendo la actividad de la Polimerasa al amplificar el ADN blanco. Sin embargo, aunque existen una gran variedad de inhibidores que han sido reportados, en la mayoría de los casos no se sabe la manera en que actúan para la inhibición (50). Dado que es difícil conocer la cantidad de inhibidores contenidos en una muestra y por tanto eliminarlos, es recomendable el empleo de secuencias testigo, las cuales ponen en evidencia la presencia de estos. El control diseñado en este trabajo nos ayuda a

determinar aquellas muestras que contengan algún tipo de inhibidor o aquellas muestras en las cuales el procedimiento de extracción no fue eficiente.

Jacobson y col.(45) diseñaron una PCR utilizando como control interno un fragmento del gene de la  $\beta$ -actina. Para ello utilizaron un juego de oligonucleótidos que constan de tres porciones (oligonucleótido externo de *L. intracellularis* seguido del oligonucleótido interno de la misma y oligonucleótido de  $\beta$ -actina humano) logrando amplificar un producto de 596 pb que corresponde a su control interno y otro específico de *L. intracellularis* de 319 pb, utilizando también los oligonucleótidos descritos por Jones y col (44). Sin embargo, este sistema presenta varias dificultades. Primero, la estandarización de una PCR resulta sumamente complicada al pretender utilizar 3 juegos de oligonucleótidos de forma simultánea y con temperaturas de alineación que no siempre son compatibles. Segundo, determinar las concentraciones del ADN del control interno y del ADN específico que proporcionan una sensibilidad "adecuada" o "aceptable" puede caer en la subjetividad. Con el fin de evitar estas dificultades, el control interno construido en éste trabajo a partir del gene *aph*, se amplifica en la PCR utilizando un solo juego de iniciadores que logran amplificar en la misma reacción tanto al control interno (854 pb) como al fragmento específico de *L. intracellularis* (329 pb) facilitando la realización de la prueba. La sensibilidad alcanzada (1 pg de ADN del control interno y 1 ng del ADN de *L. intracellularis*) es comparable a la reportada por diferentes autores (49).

Aunque esta sensibilidad también es un indicador de su confiabilidad, la realización de la prueba a partir de las muestras clínicas nos enfrenta a otro reto, la existencia de inhibidores de la reacción (46, 47, 48). Con el control interno diseñado en este trabajo pudo confirmarse la existencia de muestras que contenían inhibidores, a pesar de la utilización de métodos de extracción del ADN previamente reportados por su efectividad, al igual que sistemas comerciales de uso extendido tanto en muestras de tejido intestinal como en muestras de heces. Tal es el caso de la muestra número 10 de intestino de cerdo fijado con formol al 10%, en donde no se logró la amplificación del control interno, a pesar de que se adicionó en cantidad suficiente (10 pg de ADN),. Esto nos habla de la necesidad de contar con métodos de colección de muestras más adecuados o formas de tratamiento de dichas muestras para la eliminación de los inhibidores, aunque esto en la práctica resulta imposible. En este trabajo se observó que en muestras de la misma naturaleza, las cuales fueron trabajadas de igual forma, en algunas se logro la amplificación del control interno y en otras no. lográndose la identificación de resultados falsos negativos (51).

El control interno se inoculó en heces de cerdo para realizar la extracción del ADN genómico a partir de dichas muestras, encontrándose que la cantidad mínima de bacterias de *E. coli* transformadas con el pELW que se necesitan para amplificar al control interno, corresponde a  $10^5$  bacterias. Si bien la cantidad de bacterias necesarias parece ser elevada, es un valor aceptable, ya que nos permite establecer un límite de detección, desde el procedimiento de extracción. Probablemente, la razón de que se necesite una gran cantidad de

bacterias para amplificar al control interno, se debe a que el control interno se encuentra en un plásmido y la metodología de extracción de ADN aplicada en las muestras fecales, esta diseñada para la extracción del ADN genómico y no plasmídico, por lo que una gran cantidad del ADN del pELW se puede perder durante el proceso de extracción. La transformación de cepas de *E. coli* a nivel cromosoma, por métodos de recombinación homóloga, probablemente sería la solución a este problema.

No obstante, cuando se emplean controles internos de tipo competitivo como los de este trabajo, existe la posibilidad de que se presente un fenómeno de competencia entre el control interno y al ADN blanco (62), por lo cual en este trabajo se determinó la concentración de ambos, en la cual no se inhibieran ambos fragmentos, y poder amplificarlos en una sola reacción, empleando un solo par de oligonucleótidos. Se colocaron concentraciones constantes del ADN de *L. intracellularis* y concentraciones decrecientes del control interno, mostrando que más de 100 veces el ADN de *L. intracellularis*, inhibió la amplificación del control interno (10 ng de ADN de *L. intracellularis* y 100 pg del pELW). Esto nos indica que aun en animales que estén eliminando muchas bacterias, el control no se ve inhibido

Por otra parte con base en lo anterior se decidió reducir la concentración del control interno en las muestras analizadas, utilizando solo 10 pg, con el fin de aumentar la posibilidad de detectar una menor cantidad de ADN de *L. intracellularis*. Cabe recalcar en este punto que esta disminución no afecto la

amplificación del control interno, mostrando la utilidad de nuestro control interno aplicado en muestras clínicas, para emitir resultados más confiables.

En este trabajo se apreció que se requería 100 veces mas ADN de *L. intracellularis* para lograr inhibir el control interno, la explicación de este fenómeno puede ser que debido a que el control interno se encuentra en un plásmido, cabe la posibilidad de que exista un mayor número de copias del control interno por ng de ADN, en el caso del gene *aspA*, este reside como copia única en el cromosoma por lo cual cabe la posibilidad de que existan menor número de copias por ng de ADN de *L. intracellularis*.

Dado que otro sitio donde también se puede detectar a *L. intracellularis* es la mucosa del Ileon, en este trabajo se decido analizar 20 muestras de mucosa de cerdos sospechosos. Los resultados obtenidos muestran que estos animales eran negativos a la prueba de PCR. Estos resultados son aceptables si se considera que en muchos de los casos la sintomatología de EPP puede ser confundida con otras enfermedades. Además en el procesamiento de las muestras se realizó el raspado de mucosa intestinal en regiones donde observaron lesiones sugerentes a EPP y aun así no se detectó ADN de *L. intracellularis*.

Es importante señalar que la toma y envío de muestras es crucial para la obtención de ADN de una calidad aceptable. La obtención de ADN a partir de tejidos frescos redundo en un ADN íntegro con poca degradación, como se aprecia en la muestra 3 cong (Fig. 27, carril 3), por lo contrario en muestras



congeladas, resultó en la mayoría de los casos en un ADN degradado (Fig. 27), esto es debido a que la lisis celular en el intestino ocurre entre las 3 a 5 horas de sacrificado el animal (67). Por lo cual es recomendable que no transcurra un periodo muy largo entre la toma de las muestras y su procesamiento.

En este trabajo se empleó el método descrito por Birren y col. que se basa en el uso de la proteinasa K y ha sido utilizado previamente con buenos resultados (65). No obstante, aunque el método es sencillo y rápido, el ADN obtenido a partir de esas muestras todavía presenta cierto grado de degradación parcial que no implica una dificultad mayor para la detección del ADN de *L intracellularis*, pero puede mejorarse.

En cuanto a las muestras fijadas en formol, se ha reportado que existe la posibilidad de recuperar el ADN a partir ellas, en este trabajo se empleó la reportada por Fetter Sian (66) la cual mostró menor tendencia a producir degradación del ADN extraído.

Finalmente, la extracción del ADN a partir de muestras fecales ha sido realizada por diversos métodos con resultados variables (68). El uso de sistemas comerciales facilita el proceso haciéndolo más rápido y obteniendo ADN de buena calidad, aunque resultan costosos. No obstante, estos sistemas tienen mayor disponibilidad en el mercado y son utilizados comúnmente para la detección de organismos patógenos intestinales (68).

Una parte importante de todo programa de control y erradicación de enfermedades, es el diagnóstico, es decir la posibilidad de identificar a los animales infectados. Este trabajo aporta un nuevo sistema de diagnóstico basado en controles internos el cual permite identificar resultados falsos negativos de manera más confiable y en un corto tiempo. Así mismo este sistema será útil para conocer la epidemiología de esta enfermedad en el país, ya que no requiere que el animal sea sacrificado para realizar su diagnóstico.

## **5. Conclusiones**

- 1.- La utilización de un control interno es esencial para la adecuada interpretación de los resultados obtenidos en la PCR.
- 2.- El control interno obtenido en este trabajo permitió la estandarización de la PCR para la detección de *L. intracellularis*.
- 3.- Se logró establecer una metodología diagnóstica basada en una PCR específica para la detección de *L. intracellularis*.
- 4.- En México, es el primer trabajo donde se utiliza un control interno para la identificación de *L. intracellularis* mediante la PCR.

## **6. Prospectivas**

- 1.- Se propone realizar la transformación a nivel cromosomal de la *E. coli* DH5 $\alpha$  con el control interno, para incrementar la sensibilidad de la prueba con muestras de heces.
- 2.- Estandarizar la PCR a partir de muestras fecales detectando la concentración mínima de ADN bacteriano que puede ser amplificada mediante la PCR.
- 3.- Utilizar del control interno en el diagnóstico de la EPP a través de la realización de estudios en granjas con sospecha de la enfermedad y así conocer su incidencia en nuestro país.

## 7. Referencias.

- 1.- Cooper, D.M. and Gebhart, C.J. (1998). Comparative aspects of proliferative enteritis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **212**: 1446-1451.
- 2.- Stills, H.R. (1991). Isolation of an intracellular bacterium from hamster (*Mesocricetus auratus*) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure culture. *Infect. Immun.* **59**: 3227-3236.
- 3.- Husnik, R., Klimes, J., Tomanova, K., Smola, J., Halouka, R., Tichý, F. and Brázdil, J. (2003). *Lawsonia intracellularis* in a dog with inflammatory bowel disease. *Vet Med.* **5**:141-145.
- 4.- Dezorzova-Tomanová, K., Smola, J., Trcka, I., Lamka, J. and Pavlik, I. (2006). Detection of *Lawsonia intracellularis* in wild boar and fallow deer bred in one game enclosure in the Czech Republic. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* **53**: 42-4.
- 5.- Tomanová, K., Literák I., Klimě, J., Pavlačík, L., Mrlík, V. and Smola, J. (2003). *Lawsonia intracellularis* in wild mammals in the Slovak carpathians. *J. Wildl. Dis.* **39**: 407-411.
- 6.- Klein, E.C., Gebhart C.J. and Duhamel, G.E. (1999). Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *J. Med. Primatol.* **28**: 11-18.
- 7.- Biester, H.E. and Schwarte, L.H. (1931). Intestinal adenoma in swine. *Am. J. Path.* **7**: 175-185.
- 8.- Rowland, A.C., Lawson, G.H.K. and Maxwell, A. (1973). Intestinal adenomatosis en the pig: occurrence of a bacterium in affected cells. *Nature.* **247**: 417.

- 9.- Lawson G.H.K. and Gebhart C.J. Proliferative enteropathy, J.Comp.Path.2000. **122**: 77-100.
- 10.- McOrist, S., Jasni, S., Mackie,R. A., Macintyre, N., Neef, N. Y. and Lawson, G.H.K. (1993) Reprodución of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of *Ileal Symbiont Intracellularis*. Infection and Immunity. **61**:4286-4292.
- 11.- Harris, D.L. and Glock, R.D. (1981) Swine dysentery. Diseases of swine. 5<sup>th</sup> edit. Eds A.D. Leman. R.D. Glock, W.L. Mengeling, R. H. C. Penny, E. Scholl y B. Straw. Ames. Iowa State University Press. P 432.
- 12.- McOrist ,S., Mackie, R.A., Neef, N., Aitken, I. Y. and Lawson, G.H.K. (1994) Synergism of ileal symbiont intracellularis and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. Veterinary Record. **26**: 331-332.
- 13.- Lawson, G.H.K., Rowland, A.C. and MacIntyre, N. (1985) Demostration of a New Intracellular Antigen in Porcine Intestinal Adenomatosis and Hamnster Proliferative Ileitis. Vet. Microbiol. **10**: 303-313.
- 14.- McOrist, S., Boid, R. and Lawson, G.H.K. (1989). Antigenic analysis of *Campylobacter* species and an intracellular *Campylobacter*-like organism associated with porcine proliferative enteropathies. Infect. Immun. **57**, 957-962.
- 15.- McOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R. and Barns, S.M. (1995) Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the Obligately Intracellular Bacterium of Porcine Proliferative Enteropathy. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**: 820-825.
- 16.- Madigan, T. Michael, Martinko, John, M. and Parker, J. (2004) Biología de los microorganismos. 10<sup>a</sup> Edición. Edit. Pearson Prentice Hall. p. 29, 395.

- 17.- McOrist, A. L., Warhurst, M., McOrist, S. and Brid, A.R. (2001) Colonic infection by *Bilophila wadsworthia* in pigs. J Clin. Microbiol. **39**:1577-1579.
- 18.- Sapicto, F.L., Reeves, D., Wexler, H.M., Duncan, J., Wilson, K.H. and Finegold, S.M. (1994). Preliminary study using species –specific oligonucleotide probe for rRNA of *Bilophila wadsworthia* .J. Clin. Microbiol., **32**: 2510-2513.
- 19.- Gebhart, C.J., Barns, S.M., McOrist, S., Lin, G-F. and Lawson, G.H.K. (1993) Ileal Symbiont Intracellular, an Obligate Intracellular Bacterium of Porcine Intestines Showing Relationship to Desulfovibrio species. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**:533-538.
- 20.- Dale C. Jane H., Moses Eric K., Ong Chin-Chui, Morrow Chris J., Reed Michael B., Hasse-Dete and Strugnell-Richard A. (1998) Identification and sequencing of the groE operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: use in phylogeny **144**: 2073-2084.
- 21.- McOrist, S. and Gebhart, C.J. (1999). Diseases of Swine. 8<sup>th</sup> Edition, 521-534
- 22.- Rodríguez, B.J., Aranzazu, D., Giraldo, G.E., Alvarez, L.C., Cano, E.M. y Isaza, B. (2004) Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina y caracterización histopatológica de las lesiones asociadas en cerdos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín, Colombia. Rev. Col. Cienc. Pec. **17**: 1-19.
- 23.-<http://www.Boehringer-Ingelheim.com>
- 24.- Socci, E. G., Diosdado, V. F., Carrera, S. E., López, J., Arriaga, D.C. y Morilla, G.A. 2005. Determinación de la frecuencia de piaras infectadas con *Lawsonia intracellularis* en México mediante la técnica de PCR. Téc. Pecu Méx. **43**: 21-218.

- 25.-** McOrist, S.(2005). Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. J. Vet. **170**: 8-9.
- 26.-** Porcicultura en México. SAGARPA. pdf.
- 27.-** Smith, D.G.E. and Lawson, G.H.K. (2001) *Lawsonia intracellularis*: getting inside the patogénesis of proliferative enteropathy. Vet. Microbiol. **82**: 331-345.
- 28.-** Smith, S.H. and McOrist S. 1997. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis*. Res. Vet. Scienc. **62**: 6-10.
- 29.-** Machuca M., Riganti J. and Perfumo C.J. (2000) Actualización sobre una enfermedad emergente de los cerdos: la enteropatía proliferativa. **84**:53-58.
- 30.-** Perfumo, C.J.,Saguinetti,HR,Petruccelli, M.A., Giorgio, N., Giacoboni, G., Agurre, J.I. and Armocida, A.D. (1997) Enteropatía proliferativa del cerdo. Descripción clínico patológica y visualización con microscopia óptica y electrónica del microorganismo *Ileal symbiont intracellularis*. Rev.Med. Vet. **78**: 69-72.
- 31.-** Strigel , D., Case study: hemorrhagic enteritis. Proceedings 32<sup>nd</sup> Annual Meeting AASP. February 24-27, Nashville, Tennessee, USA.2001. pp. 371.
- 32.-** Gyle, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.U.(2004) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 3th Edition: 363-372.
- 33.-** Huerta, B., Arenas, A., Carrasco, L., Maldonado, A., Tarradas, C., Carbonero, A. and Perea, A. (2003). Comparision of Diagnostic Techniques for Porcine Proliferative Enteropathy (*Lawsonia intracellularis* Infection) J. Comp. Path. **129**: 179-185.
- 34.-** <http://es.wikipedia.org/wiki/Diagn%C3%B3stico>
- 35.-** <http://www.altillo.com/medicina/monografias/postulados.asp>

- 36.-** Proceeding of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006. Vol 1: p 48-53.
- 37.-** Lanza, I. (1996) Diagnóstico de la ileítis porcina. Poci Aula Veterinaria., **32**:13-16.
- 38.-** Lawson, G.H.K., McOrist, S., Rowland, A.C., McCartney, E. and Roberts, L. (1988) Serological diagnosis of porcine proliferative enteropathies: implications for etiology and epidemiology. Vet Rec., **122**: 554-557.
- 39.-** McOrist, S. (1997) Diagnosis of porcine proliferative enteritis. Comp Cont Ed Pract Vet Food Anim, **19**: 26-29).
- 40.-** Smith, C.A. and Wood, E.J. 1998. Biología Molecular y Biotecnología. 1ª edición, AWL, México.
- 41.-** Yeh, Jung-Young; Kim, Tae-Jong; Park, Seung-Yopung; Song Chang-seon; Yoon, Yong-Dhunk; Kim, Soo-Ki; Lee, Joong-Bak and Choi, In-Soo; (2006). Isolation of *L. intracellularis* in Korea and reproduction of Proliferative Enteropathy in pigs and hamsters. J. Vet. Med. Sci. **68**: 499-501.
- 42.-** Lawson, G.H.K.; McOrist, S.; Jasni, S. and Mackie, R.A. (1993). Intracellularis Bacteria of Porcine Proliferative Enteropathy: Cultivation and Maintenance In vitro. J. Clin. Microbiol. **5**:1136-1142.
- 43.-** Kreuzer, H. and Massey, A. 1996. Recombinant DNA and Biotechnology. ASM press, USA.
- 44.-** Jones, G.F., Ward, G.E., Murtagh, M.P., Lin, G. and Gebhart, C.J. (1993) Enhanced Detection of Intracellular Organism of Swine Proliferative Enteritis, Ileal Symbiont Intracellularis, in Feces by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. **31**: 2611-2615.



- 45.-** Jacobson, M., Englund, S. and Ballagi-Podány, A. (2003) The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*, **15**: 268-273.
- 46.-** Wilson, G.I., (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiol*, **63**: 3741-3751.
- 47.-** Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. and Weber-Rolfs, I. (1992) PCR: Clinical Diagnostics and Research, Substances affecting PCR: Inhibition or enhancement. Edit. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 53-55..
- 48.-** Weyant R.S., Edmonds, P., Swaminathan, B. (1990) Effect of ionic and non-ionic detergents on the Taq polymerase. *Bio Techniques*, **9**: 308-309.
- 49.-** García, C. L., Socci, E.G., Barrón, F.L., Arriaga, D.C. y Morilla, G.A. (1998). Diagnóstico de ileítis porcina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev. Mex. Vet.* **29**: 263-267.
- 50.-** Rosentraus, M., Wang, Z., Chang, S-Y., DeBonville, D. and Spadoro, P.J. (1998) An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 191-197.
- 51.-** Cone, W.R., Hobson, C.A. and Huang, W. M-L. (1992) Coamplified positive control detects inhibition of Polymerase Chain Reactions, *J. Clin. Microbiol.* **30**: 3185-3189.
- 52.-** Ballagi-Podány, A. and Belák, S. (1996) The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes*, **10**: 159-164.
- 53.-** Jacobson, M., Englund, S. and Ballagi-Podány, A. (2003) The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*, **15**: 268-273.

- 54.-** Jacobson, M., Aspan, A., Heldtander Königsson, M., Hård af Segerstad, C., wallgren, P., Fellström, C., Jensen-Waern, M. and Gunnarson, A. (2004). Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Vet. Microbiol.* **102**: 189-201.
- 55.-** Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T. (1982) *Molecular cloning a Laboratory Manual*, 2a Edition, Tomo I: 1.25-1.28.
- 57.-** <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15202013.pdf>.
- 58.-**  
[http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DNACleanupAndConcentration/QIAEX\\_II/1011033\\_qiaexii.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DNACleanupAndConcentration/QIAEX_II/1011033_qiaexii.pdf)
- 59.-** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 60.-** [http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2\\_1topo\\_map.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf)
- 61.-** Ausubel, M.F., Brent, R., Kingston, E.R., Moore, D.D., Seidman, G.J., Smith, A.J. and Struhl, K. (1999) *Current Protocol in Molecular Biology*. **1**: 2.4.1-2.4.2.
- 62.-** Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. and Fach, P. (2004) Practical Considerations in design of intestinal amplification controls por diagnostic PCR assays. *J. Clinic. Microbiol.* **42**: 1863-1868.
- 63.-** National Committee for Medical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) Normativa para la puesta en práctica del estudio de la susceptibilidad antimicrobiana mediante discos-sexta edición; norma aprobada, Turbidez adecuada para la preparación del inóculo: **13** (24): 6.

**64.-**

[www1.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilizationPurification/QIAampSystem/QIAampDNAMiniKit.aspx](http://www1.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilizationPurification/QIAampSystem/QIAampDNAMiniKit.aspx).

**65.-** Birren, B., Green, D. E., Klapholz, S., Myers, M., R., Roskams J. Genome Analysis a Laboratory Manual . (1997). Analyzing ADN: **1(7):** 8, 15.

**66.-** Fretter Sian. DNA Profilin Project Report-Cellmark Diagnostics. The Standard DNA EXtraction Protocol. 2002.