



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE
GLÄSSER

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

PMVZ LORENA REYES GUERRA

ASESORES: DR. ALFREDO SAHAGUN RUIZ

DR. EDGAR ALFONSECA SILVA

DRA. ROSARIO ESPERANZA GALVAN PEREZ



MEXICO, D. F.

ABRIL DE 2005

m. 344 247



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mi padre por su gran sabiduría que me sigue motivando.

A mi madre por su corazón tan grande, que me llena de felicidad.

A mis hermanos Héctor, Lizbeth y Adriana Reyes con sus respectivas ideas que me llenan de conocimientos relevantes.

A Jorge Cid que me brinda de comprensión, amistad y amor.

AGARDECIMIENTOS

A mis amigos y asesores, por brindarme todo su apoyo:

“Para ser grande, sé entero: nada tuyo exageres y excluyas.

Sé todo en cada cosa. Pon cuanto eres en lo mínimo que hagas.

Así en cada lago la luna toda brilla, porque alta vive”

F. Pessoa

Mis asesores y amigos: Alfredo Sahún Ruiz, Edgar Alfonseca Silva, Rosario Esperanza Galván.

Al jurado que evaluó, aportó conocimientos y enriqueció este documento:

Dr. Roberto Cervantes Olivares

Dr. Pedro Pradal Roa

Dra. Ina Marcela Figueroa Ochoa

Dr. Gerardo Ramírez Hernández

Mis compañeros y amigos por brindarme su apoyo y ser amables conmigo: Raúl S, Mauricio, Rodrigo Mena, Bernardo, Judith, Selene, Fabiola, Andira, Carolina S, Cristina R. Cnidia, Jimena, Maritoña, Pablo Pedro, Alfredo, Lupita.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto de Investigación fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN213302.

Durante el desarrollo del trabajo la autora fue becaria de Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Probetel)

CONTENIDO

	Página
SUMMARY.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Estudio bacteriológico.....	13
Conteo de microorganismos viables.....	14
Extracción de ADN.....	15
Cuantificación del ADN.....	15
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
Evaluación del producto amplificado.....	16
Sensibilidad.....	16
Especificidad.....	16
Amplificación de ADN bacteriano a partir de tejidos.....	16
Amplificación de ADN a partir de muestras.....	17
RESULTADOS.....	18
Especificidad.....	18
Cuantificación de UFC.....	18

Sensibilidad.....	19
Muestras de campo.....	21
DISCUSIÓN.....	23
APENDICE.....	25
LITERATURA CITADA.....	28

Abreviaturas

μg = microgramos

ng = nanogramos

pg = picogramos

fg = fentogramos

μl = microlitos

kb = kilobases

pb = pares de bases

UFC = unidades formadoras de colonia

xg = gravedades

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

NAD = nicotin amida adenin dinucleotido

LCR = Líquido cefalorraquídeo

PRRS = síndrome respiratorio y reproductivo porcino

SUMMARY

REYES GUERRA LORENA. Molecular diagnosis of Glässer's disease (Under direction of: Alfredo Sahagún Ruiz, Edgar Alfonseca Silva y Rosario Esperanza Galván Pérez).

Glässer's disease is caused by *Haemophilus parasuis*, it is a pleomorphic Gram negative cocobacilli. It grows slowly and it is NAD dependent. Frequently, this bacterium is associated with porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) or porcine respiratory complex. The objective of this study is to standardize the technique of a polymerase chain reaction (PCR) for detection of *H. parasuis*, from purified DNA, pure culture, inoculated tissues, and clinical samples. Identified *H. parasuis* were cultivated in the presence of NAD. The bacterium was harvested with storage medium into 200 µl aliquots. Bacterial culture was used for DNA extraction by the CTAB/phenol/chloroform method. DNA was quantified using a spectrophotometer at 260 nm (1 OD = 50 µg/ml). The sensitivity of PCR was determined by 9 serial ten fold dilutions beginning from 100 ng. Bacterial concentration was quantified by Miles and Misra method in UFC/ml. Sensitivity of PCR from direct bacteria was assayed by 3 ten fold followed by 8 two fold dilutions beginning with 1.6052×10^4 UFC. Sensitivity of PCR from tissues was determined inoculating 8 two fold dilution beginning 5×10^3 UFC to each 50 mg pulmonary sample from a healthy pig. DNA from tissues was extracted by the CTAB/phenol/chloroform method and used for PCR. Specificity of PCR primers was determined using *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* type A, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli*. PCR primers were specific for *H. parasuis*. Sensitivity of PCR to detect purified DNA was 10 fg with an annealing temperature of 54°C. Sensitivity of PCR directly from bacteria was

0.063 UFC. Sensitivity of PCR from inoculated tissues was of 6 UFC, but 156 UFC in the tissue was required. Fifty four field pulmonary tissue samples were evaluated by PCR and bacteriology. Five samples were positive to *H. parasuis* by PCR and one of these was also by bacteriology. PCR was a useful tool for the diagnosis of Glässer's disease including the cases of bacteriological isolation fail.

RESUMEN

REYES GUERRA LORENA. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Glässer (bajo la dirección de: Alfredo Sahagún Ruiz, Edgar Alfonseca Silva y Rosario Esperanza Galván Pérez).

La enfermedad de Glässer es causada por *Haemophilus parasuis*, un cocobacilo pleomórfico Gram negativo de crecimiento lento y dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD). Frecuentemente este microorganismo está asociado al síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) o al complejo respiratorio porcino. El presente estudio tiene como objetivo la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *H. parasuis*, a partir de ADN purificado, bacterias, tejidos inoculados y muestras de campo. *Haemophilus parasuis*, previamente identificado, fue cultivado en presencia de NAD. Las bacterias fueron cosechadas en medio de conservación y alicuotadas en volúmenes de 200 μ l. El ADN de la bacteria fue extraído por el método de CTAB/fenol/cloroformo y cuantificado por espectrofotometría a 260 nm (1 OD = 50 μ g/ml). Se determinó la sensibilidad de la PCR a partir de 9 diluciones décuples del ADN iniciando con 100 ng. La concentración de bacterias fue determinada por el método de Miles y Misra en UFC/ml. Se determinó la sensibilidad de la PCR para detectar directamente bacterias a partir de 3 diluciones décuples y 8 dobles iniciando con 1.6052×10^4 UFC. Para determinar la sensibilidad de la PCR a partir de tejido, se hicieron 8 diluciones dobles iniciando con 5×10^3 UFC, cada una se inoculó a diferentes porciones de 50 mg de tejido pulmonar de cerdo sano. El ADN de las muestras inoculadas fue extraído con CTAB/fenol/cloroformo y sometido a la PCR. La especificidad de los iniciadores de la PCR se comprobó

utilizando ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* tipo A, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes* y *Escherichia coli*. Los iniciadores para la PCR fueron específicos a *H. parasuis*. La sensibilidad de la PCR para detectar ADN purificado fue 10 fg con una temperatura de alineación a 54°C. La sensibilidad de la PCR directamente de bacterias fue de 0.063 UFC. La sensibilidad de la PCR a partir de ADN extraído de las muestras inoculadas fue de 6 UFC, aunque se requieren aproximadamente 156 UFC en el tejido. Se evaluaron 54 muestras de pulmón de cerdos, de diferentes zonas del país, con signos y lesiones evidentes de enfermedad respiratoria. Cinco pulmones fueron positivos a *H. parasuis* por la PCR, obteniéndose el aislamiento bacteriológico de una muestra. La PCR demostró ser una herramienta útil para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Glässer aún en casos en que no se puede obtener el aislamiento bacteriológico.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Glässer, descrita en 1910, es una enfermedad causada por *Haemophilus parasuis*, que es un cocobacilo pleomórfico, Gram negativo, inmóvil y no hemolítico, de crecimiento lento y dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD). Las lesiones primarias incluyen poliserositis fibrinosa, poliartritis y meningitis (1, 2, 3, 4). *H. parasuis*, es una bacteria potencialmente patógena cuyo único hospedador es el cerdo. La bacteria es comúnmente aislada de secreciones nasales de animales sanos y de pulmones neumónicos (5). En cerdos criados bajo condiciones mínimas de higiene y alimentación, es considerada una de las especies bacterianas prevalentes de las fosas nasales en animales de 1 semana de edad (1, 5). La rinitis purulenta asociada a la colonización de *H. parasuis* puede ser un factor predisponente de otros patógenos bacterianos y virales. En neumonías es considerado como invasor secundario oportunista (5). La transmisión de la enfermedad es por contacto directo entre los animales enfermos y sanos por vía aerógena (2).

La enfermedad de Glässer se presenta en animales jóvenes de 2 semanas a 4 meses de edad, principalmente asociada a factores de estrés y a la presencia de diversos patógenos primarios respiratorios. En cerdos libres de patógenos específicos o con un elevado estatus sanitario, la enfermedad se presenta en animales de cualquier edad y en diferente fase de producción, con altas tasas de morbilidad (60%) y mortalidad (5 y 10%) (2). Esto es debido a las reducidas oportunidades de adquirir inmunidad natural, por la falta de exposición al agente patógeno, incrementando así el riesgo de infección.

La prevalencia de la enfermedad ha aumentado considerablemente durante los últimos años, especialmente como consecuencia de la asociación con el

síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRSS) (2, 6, 7, 8). En la actualidad la infección por *H. parasuis*, representa uno de los principales problemas emergentes en el ganado porcino, siendo así de gran interés económico y científico. Considerando las pérdidas económicas por animales no vendidos debido a su deficiente condición corporal, el gasto de quimioterapéuticos y finalmente la muerte de animales (2, 3, 9, 10, 11,12).

Actualmente, se conocen 15 serovariedades (1, 13, 14), con base en la prueba de inmunodifusión utilizando antisueros específicos procedentes de la inoculación en conejos (15, 16).

Se ha considerado una cierta relación entre algunas serovariedades y la patogenicidad de la cepa, asociándose así las serovariedades 1, 5, 10, 12, 13 y 14, a casos agudos, con muerte dentro de las 96 h postinfección; las serovariedades 2, 4 y 15 son características de la enfermedad crónica, con aparente poliserositis y artritis a la necropsia. La serovariedad 8 se asocia a signos clínicos y lesiones macroscópicas leves y finalmente las serovariedades 3, 6, 7, 9 y 11 no se asocian a signos clínicos, ni lesiones macroscópicas (1, 2, 5). Se ha demostrado que el serotipo 5 denominado Nagasaki es el más virulento y patógeno (17).

La patogenia de este microorganismo no ha sido bien definida en infecciones naturales, los datos actuales se originan de prototipos experimentales de infección, utilizando animales derivados por cesárea, privados de calostro (CDCD) e inoculados por vía intranasal con cepas virulentas de *H. parasuis*. En estas condiciones, se aísla a las 12 h postinoculación de cavidad nasal y tráquea; obteniéndose de sangre a las 36 h, y de tejidos 36-108 h (2, 4, 5).

H. parasuis preferentemente daña la mucosa nasal facilitando la infección en otros órganos (2, 4, 5). La colonización es asociada a rinitis purulenta, pérdida focal de cilios y presencia de células inflamatorias agudas en la mucosa nasal y traqueal. Las lesiones septicémicas consisten en petequias y equimosis en hígado, riñón y meninges. Se detectan altos niveles de endotoxina en plasma, y trombos de fibrina en diversos órganos. La replicación subsecuente del microorganismo produce la poliserositis fibrinosupurativa en peritoneo, pericardio y pleura; poliartrosis principalmente en las articulaciones del carpo y tarso, y meningitis observada en casos de campo. Fascitis, miositis han sido reportadas. La neumonía no es aparente en los casos experimentales, pero *H. parasuis* ha sido aislado de pulmón (Figura 1). Microscópicamente el exudado consiste de fibrina, neutrófilos y en menor número de macrófagos (5).

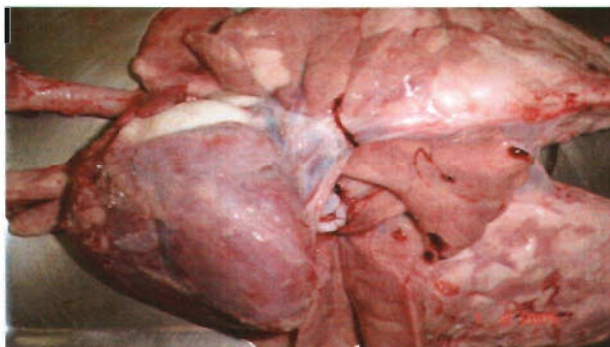


Figura 1. Macrofotografía de Pulmón y corazón de un cerdo con lesiones compatibles con neumonía, pleuritis fibrinosa y pericarditis por *H. parasuis*.

La infección puede ser aguda o crónica, dependiendo del estado inmunológico en que se encuentre el hato. El curso agudo se caracteriza por fiebre, apatía, inapetencia, anorexia, inflamación de las articulaciones, laminitis, tremor, incoordinación, cianosis, edema pulmonar y subcutáneo, y eventualmente reclinación, la muerte puede sobrevenir a los 2 días de iniciada la infección (1,

3, 5). El aborto y laminitis crónica en verracos puede ser secuela de una infección aguda (5).

La infección crónica puede producir signos menos severos; como tos, disnea, retraso en el crecimiento, laminitis y pelo hirsuto. Esta infección afecta más a los lechones que han sido destetados entre los 15 a 21 días de edad (destete temprano) y que están ubicados en el área de crianza durante 4 a 6 semanas (1, 3, 5).

Para obtener un control de las infecciones causadas por *H. parasuis*, se requiere de tratamientos con quimioterapéuticos (estreptomicina y sulfamidas), buenas prácticas de manejo (2) y de un diagnóstico preciso.

El diagnóstico de la infección por *H. parasuis* es difícil, debido a lo complicado del aislamiento bacteriológico, por ser una bacteria fastidiosa y de la necesidad de un crecimiento abundante para su identificación bioquímica. Un factor importante, es la forma en que se colecta y transporta la muestra clínica, ya que a veces resulta inadecuada debido a su contaminación, lo que dificulta aún más su diagnóstico por los métodos tradicionales (1, 2).

Han sido propuestas técnicas alternativas para su diagnóstico. Este microorganismo ha sido detectado de muestras clínicas provenientes de animales experimentales por medio de inmunohistoquímica, que detecta a la bacteria no viable en el citoplasma de células fagocíticas, presentando actividad cruzada con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (18).

El diagnóstico serológico puede determinar si un animal ha estado expuesto a *H. parasuis*. Recientemente, en el Laboratorio de Virología y Enfermedades Respiratorias del Cerdo de FES-Cuautitlán, se obtuvo un antígeno teñido con rosa de Bengala a partir del serotipo 5 (Nagasaki) para realizar la prueba tamiz

de aglutinación en placa y así determinar si el animal tiene anticuerpos contra el agente de la Enfermedad de Glässer (17).

También se han producido conjugados de *H. parasuis*, para el diagnóstico por inmunofluorescencia, que pueden ser de utilidad (17).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica usada para amplificar regiones específicas de ADN de la bacteria, permitiendo la detección e identificación de microorganismos fastidiosos y de lento crecimiento, mejorando la precisión y rapidez en el diagnóstico, obteniendo resultados certeros de las muestras, aún cuando estas se encuentren contaminadas. Con la bacteriología tradicional se requiere mínimo de tres días para alcanzar un diagnóstico, en el caso de la PCR solo unas pocas horas son necesarias (3, 7). Recientemente se ha desarrollado técnicas moleculares para la detección e identificación de *H. parasuis*, que son altamente sensibles y específicas (2). Se describió una PCR con iniciadores a partir del gen para el RNA ribosomal 16S de *H. parasuis*, con una sensibilidad de 69 pg de ADN, detectando un mínimo de 100 UFC; la PCR fue positivo en 26 de 30 muestras de animales infectados (5 de campo y 25 experimentales) mientras que el aislamiento fue obtenido de 18 de las 30 muestras (3). También se ha propuesto una PCR a partir de secuencias intragénicas conservadas en enterobacterias que permite diferenciar serotipos de *H. parasuis*, aunque requiere del aislamiento bacteriológico previo (17). Además se ha reportado una PCR-RFLP a partir del gen de la proteína de unión a transferrina (*tbpA*), el cual puede ser utilizado para la tipificación de *H. parasuis*, sin embargo no diferencia los serotipos 5, 12, 14 y 15 (10).

En el presente estudio, se estandarizó la prueba de PCR, empleando iniciadores pertenecientes al gen 16S ribosomal de *Haemophilus parasuis* (GenBank M75065) (3), con la finalidad de tener una mejor herramienta de diagnóstico.

Hipótesis

La detección de ADN de *H. parasuis*, por medio de la técnica de PCR, a partir de muestras de animales infectados naturalmente, permitirá el diagnóstico más rápido y preciso de la enfermedad de Glässer.

Objetivos

Estandarizar la extracción de ADN de *H. parasuis*, a partir de cultivos y tejidos infectados, así como la técnica de PCR para la amplificación de fragmentos específicos de ADN.

Determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR para detectar ADN de *H. parasuis*.

Material y métodos

Cepas: se utilizaron las cepas Bacter-2 de *H. parasuis*, aislada en el Laboratorio de Virología de la FES-Cuautitlán-UNAM, la LRG-002 de *H. parasuis*, la SG-001 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, LRG-001 de *Pasteurella multocida* Tipo A y LRG-003 *Arcanobacterium pyogenes* aisladas de pulmón de cerdo en el Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ, UNAM. Adicionalmente, se utilizaron cepas de *Bordetella bronchiseptica* y *E. coli* provenientes del cepario del Depto. de Microbiología e Inmunología.

H. parasuis y *A. pleuropneumoniae* fueron cultivadas de 24 a 48 h a 37°C con 5-10% de CO₂ en agar sangre (AS) con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, posteriormente subcultivada en agar PPLO (pleuropneumoniae like organisms) (19, 20) adicionado con 1% de suero equino y 0.02% de NAD (Figura 2). *P. multocida* Tipo A de un cultivo de 24 h en AS, fue subcultivada en 50 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) e incubada en agitación a 37°C (3). La cepa de *E. coli* fue cultivada en Trypticasa soya agar, mientras que las cepas de *B. bronchiseptica* y *A. pyogenes* fueron cultivadas en AS.

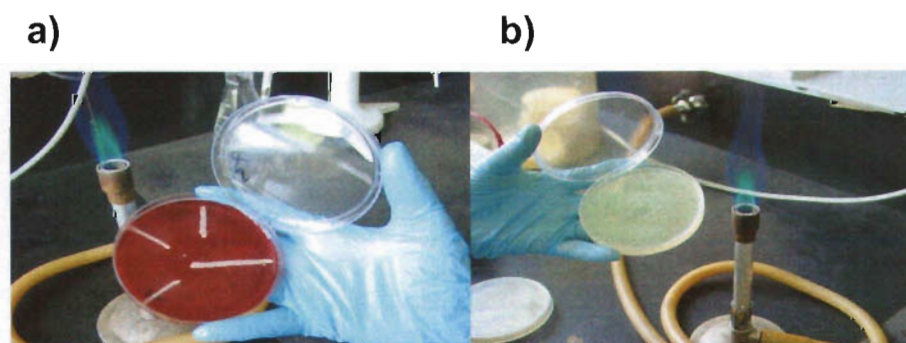


Figura 2 Cultivo de *H. parasuis* en a) agar sangre con cepa nodriza de *S. aureus* y b) agar PPLO adicionado con NAD y suero equino

Estudio bacteriológico

Las muestras de pulmón sospechosas a *H. parasuis* fueron proporcionados por el Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC) de FMVZ-UNAM y el Laboratorio de Virología de FES-Cuautitlán. Además se obtuvieron muestras de cerdos con signos clínicos respiratorios en dos granjas porcinas, una localizada en Ajuchitlán, Querétaro y otra en Chipilo, Puebla. Las superficies del tejido fueron esterilizadas con espátula, obteniendo 1 cm³ de muestra que fue sembrada en AS, para aislamiento en cultivo puro, en cada cuadrante se cruzó una estria de *S. aureus* como fuente de NAD. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5-10% de CO₂, durante 24-48 h. El resto del tejido fue mantenido a -70°C hasta la extracción de ADN. Después del periodo de incubación se seleccionaron las colonias pequeñas, traslúcidas, alrededor de la cepa nodriza, para realizarles frotis fijo teñido con Gram. Se realizaron las pruebas de catalasa y oxidasa. Las colonias con características morfológicas similares a *H. parasuis*, se subcultivaron en caldo PPLO adicionado con 1% de suero equino y 0.02% de NAD y se incubaron en las condiciones descritas para el AS. A partir del subcultivo se realizaron las pruebas bioquímicas indispensables para su identificación:

- a) Pruebas de requerimiento de NAD o Factor V. La necesidad de éste factor fue evaluada por el crecimiento en satelitismo de la bacteria en relación a *S. aureus* como fuente del factor en AS.
- b) Prueba de indol. Se humedeció un pedazo de papel filtro estéril con 2 - 3 gotas con el reactivo de indol p-dimetilaminocinamaldehído (DMACA),. Se colocó una colonia proveniente de un cultivo puro en AS de 24-48 h., con un asa bacteriológica estéril y se extendió sobre el papel. Se

observó la aparición de color azul a azul-verde en un lapso de 2 min, como indicador de una reacción positiva para la producción de indol. En caso de no haber cambio de coloración o cambio a rosa se consideró negativo (21).

- c) Actividad de ureasa. Se inoculó en caldo urea, 0.5 ml de caldo PPLO con crecimiento bacteriano, se incubó a 37°C, 5-10% de CO₂ por 24 h. El medio de color rojo indicó actividad de ureasa (21).
- d) Fermentación de carbohidratos: Se utilizó base rojo de fenol conteniendo 1% del carbohidrato (glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, xilosa), adicionado con 0.02% de NAD (10mg/lt) y 1% de suero equino, prefiltrado. El cambio del medio a rojo indicó fermentación del carbohidrato (21).

Conteo de microorganismos viables

El conteo bacteriológico se llevó a cabo por el método de Miles y Misra (22). Una suspensión de *H. parasuis* en caldo BHI fue previamente alicuotada y almacenada a -70 °C, en volúmenes de 200 µl en tubos de 1.5 ml con 20% de glicerol, 0.02% NAD y 1% de suero equino. Después de 24 h se tomó una alícuota para determinar la concentración de bacterias, sembrando por triplicado diluciones décuples en agar PPLO y por conteo de unidades formadoras de colonia por ml (UFC).

Extracción de ADN

El ADN de cultivos bacterianos y tejido pulmonar fue extraído por la técnica de CTAB/fenol/cloroformo (23). La extracción de tejido pulmonar de cerdos sanos inoculados y sospechosos a *H. parasuis*, se realizó utilizando 1 ml de tejido lavado y ligeramente macerado (ver apéndice 1).

Cuantificación del ADN

El ADN extraído de suspensiones bacterianas de *H. parasuis*, *P. multocida* Tipo A, *A. pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica*, *A. pyogenes* y *E. coli*; fue cuantificado en ng/μl por espectrofotometría a 260 nm (1 OD = 50 μg/ml) para la estandarización de la prueba de sensibilidad y especificidad de ADN puro.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los iniciadores que se utilizaron corresponden al gen 16S *ribosomal* de *Haemophilus parasuis* (Gen Bank M 75065) descritos por Oliveira, S; *et al.* 2001, y amplifican un fragmento de 821 pb:

Hpsf 5' GTGATGAGGAAGGGTGGTGT 3'

Hpsr 5' GGCTTCGTCACCCTCTGT 3'

La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador Eppendorf, en un volumen de 20 μl de solución amortiguadora 10X (20mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM de KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 μM de cada iniciador, 0.25 unidades de Taq polimerasa y concentraciones variables de ADN de la bacteria. Las condiciones fueron: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 54°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 minutos. Seguidos se una extensión final a 72°C por 4 minutos.

Las reacciones de la PCR de los experimentos de este estudio, incluyeron un tubo con todos los elementos de la reacción, excepto ADN como control negativo, así como un control positivo con los mismos elementos de la reacción además de ADN de *H. parasuis*.

Evaluación del producto amplificado

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis a 100 volts, por 45 min, en un gel de agarosa al 1% (peso/vol. en TAE 1X).

La reacción positiva presentó una banda de 821 pb en el gel de agarosa, utilizando un marcador de peso molecular (1 Kb ladder, Invitrogen).

Sensibilidad

Se cuantificó el ADN *H. parasuis* obtenido por extracción CTAB/fenol/cloroformo (23) por espectrofotometría a 260 nm (1 OD = 50 µg/ml). Con la finalidad de determinar la concentración mínima de ADN que puede ser amplificado por la PCR se hicieron 9 diluciones décuples a partir de 100 ng.

Para determinar el número mínimo de bacterias detectables directamente por la PCR, se hicieron 3 diluciones décuples y 8 dobles iniciando con 1.6052×10^4 UFC (21). Se realizó la PCR a partir del ADN de cada dilución décuple y doble.

Especificidad

Se utilizaron 100 ng de ADN de *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* tipo A, *B. bronchiseptica*, *A. pyogenes* y *E. Coli*, para determinar la especificidad de los iniciadores en la prueba.

Amplificación de ADN bacteriano a partir de tejidos

Para determinar la cantidad mínima de UFC de *H. parasuis* que es posible detectar a partir de tejidos, se hicieron 8 diluciones dobles iniciando con 5×10^3

UFC, cada una se inoculó con una jeringa estéril a diferentes porciones de 50 mg de tejido pulmonar de cerdo sano. Posteriormente, se extrajo ADN a partir de cada tejido y se realizó la PCR.

Amplificación de ADN a partir de muestras

Se obtuvieron muestras de pulmón, líquido cefalorraquídeo (LCR) y corazón de cerdos en las granjas porcinas de Puebla y Querétaro; así como muestras recibidas para diagnóstico en el DPAC y en Lab. Virología FES-Cuautitlán. Las muestras fueron procesadas para examen bacteriológico y extracción de ADN para la PCR.

RESULTADOS

Especificidad

Los iniciadores utilizados en la PCR fueron específicos para ADN de *H. parasuis*, amplificando una banda de 821 pb. Esta PCR no amplificó ADN (100 ng) de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, y *Escherichia coli* (Figura 4).

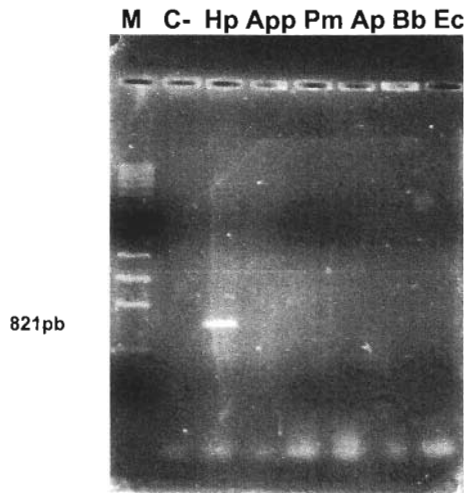


Figura 4. Especificidad de la PCR para *H. parasuis*. M= 1Kb ladder, C- = control negativo sin ADN. Hp = *H. parasuis*, A.pp= *A. pleuropneumoniae*, Pm= *P. multocida*, Ap= *A. pyogenes*, Bb= *B- bronchiseptica*, Ec= *E. coli*.

Cuantificación de UFC

Se determinó la concentración a partir de alícuotas de dos cultivos congelados de *H. parasuis* en UFC/ml por el método de Miles y Misra (22). La cuantificación obtenida fue de 5×10^5 UFC/ml y de 5×10^6 UFC/ml. Estos cultivos fueron utilizados para determinar la sensibilidad de la PCR en células bacterianas y en tejidos respectivamente.

Sensibilidad

La concentración mínima de ADN purificado de *H. parasuis* que fue capaz de detectar la PCR fue de 10 fg equivalente a 2 bacterias, considerando un genoma de aproximadamente 4.2×10^6 pb similar a *E. coli* (Figura 5).

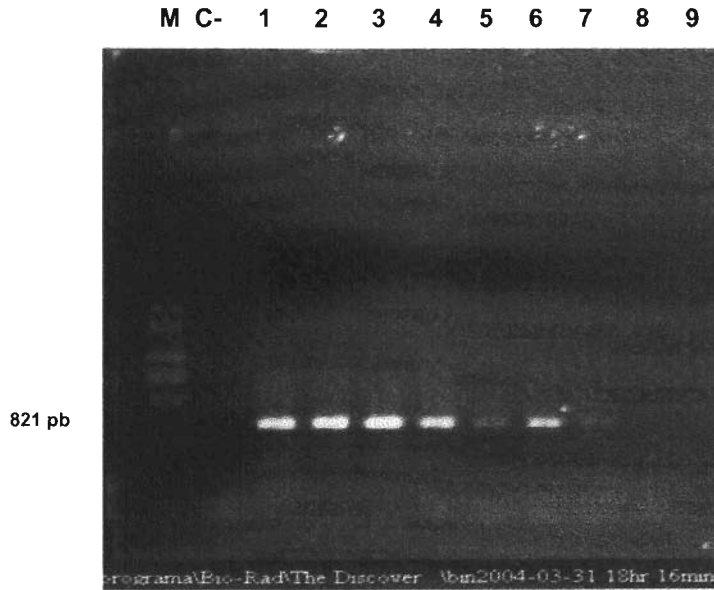


Figura 5. Sensibilidad de la PCR a partir de diluciones décuples de ADN purificado de *H. parasuis* M= 1 kb ladder, C-= control negativo sin ADN, 1= 100 ng, 2=10 ng, 3=1 ng, 4=100 pg, 5=10 pg, 6=1 pg 7=100 fg, 8=10 fg. 9= 1 fg

La cantidad mínima de bacterias detectables directamente por la PCR fue de 0.063 UFC presente en la dilución 3.9×10^{-6} a partir de una suspensión inicial con 1.6052×10^4 UFC (Figura 6).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

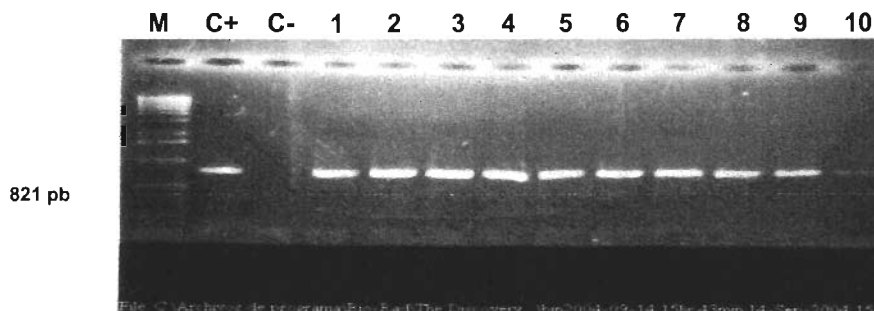


Figura 6. Sensibilidad de la PCR a partir de células de *H. parasuis*, M= 1 kb ladder, C+= control positivo, C-= control negativo sin ADN, carril 1-2 diluciones décuples desde 1.6×10^3 UFC, 3-10 diluciones dobles hasta 0.063 UFC.

Considerando que la PCR para diagnóstico debe de funcionar con muestras de tejidos infectados; se inocularon 8 porciones (50 mg) de pulmón de cerdo sano con 8 diluciones dobles a partir de 5×10^3 UFC. Después de extraer el ADN de estos tejidos, se determinó que la PCR fue positivo hasta la sexta dilución conteniendo aproximadamente 156 UFC. Sin embargo, debido a que el ADN extraído fue resuspendido en 50 μ l, y solo se utilizaron 2 μ l en la reacción, la PCR fue capaz de detectar aproximadamente 6 UFC de los tejidos inoculados (Figura 7).

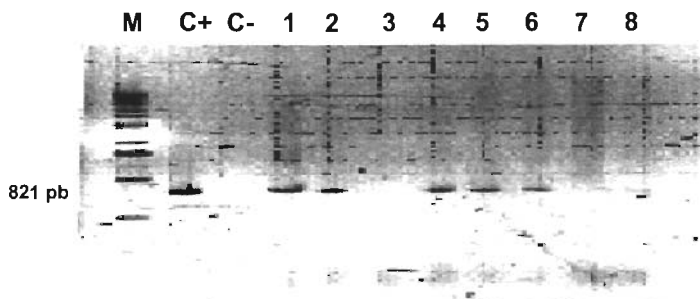


Figura 7. Sensibilidad de la PCR para detectar ADN de *H. parasuis* en pulmón sano inoculado con la bacteria. M= 1 kb ladder, C+= control positivo *H. parasuis*, C-= control negativo sin ADN, carriles 1-8 diluciones dobles iniciando con 5×10^3 UFC de *H. parasuis*.

Muestras de campo

Una vez que la PCR fue estandarizado con ADN purificado, bacterias y ADN purificado a partir de tejidos inoculados, se realizó la PCR y diagnóstico bacteriológico a partir de muestras de campo procedentes de granjas porcinas en diferentes zonas del país. Se trabajaron 54 muestras provenientes de cerdos con signos o lesiones pulmonares sugerentes a enfermedades respiratorias. Cinco muestras fueron positivas a *H. parasuis* por la PCR, obteniéndose el aislamiento en solo una. De las muestras negativas a *H. parasuis* por la PCR, se aisló *B. bronchiseptica* en 6 casos, *A. pleuropneumoniae* en 3 casos y *S. suis* en 2 casos; se observaron infecciones mixtas aislando *B. bronchiseptica* y *A. pyogenes* en un caso, y *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida* tipo A en un caso. En uno de los cinco casos positivos a *H. parasuis* por la PCR y negativo por bacteriología, se detectó infección por otros dos agentes, *P. multocida* tipo D y *A. pyogenes* por bacteriología (Cuadro 1) (Figura 8).

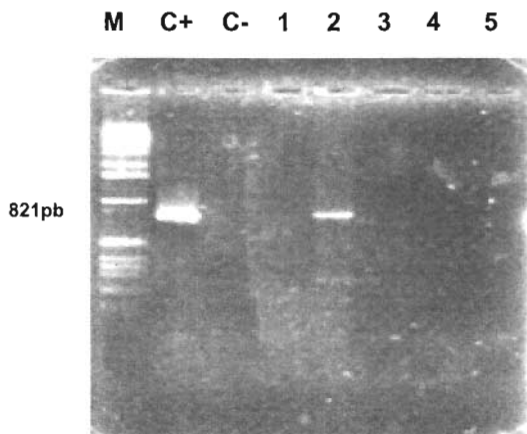


Figura 8 Amplificación de la PCR a partir de muestras de campo. M= 1 kb ladder, C+= control positivo *H. parasuis*, C-= control negativo sin ADN, 2= Muestra de pulmón de un cerdo positivo a *H. parasuis* y 1,3,4,5 muestras de pulmón negativas *H. parasuis*

Cuadro 1. Resultados de la PCR y aislamiento bacteriológico en muestras de campo

ORIGEN	PCR	AISLAMIENTO
Mérida 300604-01	-	<i>S. suis</i>
Mérida 300604-02	+	<i>H. parasuis</i>
Puebla 030904-03	-	-
Veracruz 111004-05	-	-
Veracruz 111004-06	-	-
Veracruz 111004-07	-	-
Mérida 211004-08	-	<i>A. pleuropneumoniae</i>
Mérida 211004-09	-	<i>A. pleuropneumoniae</i> y <i>P. multocida</i> tipo A
Veracruz 121104-09	+	-
Veracruz 121104-10	-	<i>S. suis</i>
FES-C 061204-11	-	-
FES-C 061204-12	+	-
FES-C 061204-13	-	-
FES-C 061204-14	-	-
FES-C 061204-15	+	-
Sonora 061204-16	-	-
Sonora 061204-17	-	-
Sonora 061204-18	-	-
Sonora 061204-19	-	-
Sonora 061204-20	-	-
Sonora 061204-21	-	-
Sonora 061204-22	-	-
Sonora 061204-23	-	-
Sonora 061204-24	-	-
Sonora 061204-25	-	-
Monterrey 061204-26	-	-
Monterrey 061204-27	-	-
Monterrey 061204-28	-	-
Querétaro 240105-29	-	-
Querétaro 240105-30	-	-
Querétaro 240105-31	-	-
Querétaro 240105-32	-	-
Querétaro 240105-33	-	-
Querétaro 240105-34	-	-
Querétaro 240105-35	-	-
Querétaro 240105-36	-	-
Puebla 010205-37	-	<i>B. bronchiseptica</i>
Puebla 010205-38	-	<i>B. bronchiseptica</i>
Puebla 010205-39	-	<i>B. bronchiseptica</i> , <i>A. pyogenes</i> ,
Puebla 010205-40	+	<i>P. multocida</i> tipo D , <i>A. pyogenes</i>
Puebla 010205-41	-	<i>B. bronchiseptica</i>
Puebla 010205-42	-	<i>B. bronchiseptica</i>
Puebla 010205-43	-	<i>B. bronchiseptica</i>
Querétaro 0702005-44	-	-
Querétaro 0702005-45	-	-
Querétaro 0702005-46	-	-
Querétaro 0702005-47	-	-
Querétaro 0702005-48	-	-
Querétaro 0702005-49	-	-
Mérida 080205-50	-	<i>A. pleuropneumoniae</i>
Torreón 080205-51	-	-
Edo. México 220205-52	-	-
Edo. México 220205-53	-	-
Tláhuac 010305-54	-	<i>B. bronchiseptica</i>

Discusión

La PCR constituye una herramienta útil para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Glässer, ya que ésta técnica permite la detección de hasta una bacteria (3). Sin embargo, para la extracción de ADN a partir de tejido (50 mg), se requiere que estén presentes aproximadamente 156 UFC. El ADN extraído se resuspendió en 50 μ l y sólo se utilizaron 2 μ l en la PCR que corresponde a aproximadamente 6 UFC.

Oliveira S. *et al.* (2001) reportó que la sensibilidad de los iniciadores de la PCR fue de 69 pg a partir de ADN purificado de *H. parasuis* a una temperatura de alineación de 59°C. En nuestro estudio se logró incrementar la sensibilidad hasta 10 fg utilizando una temperatura de alineación de 54°C, sin comprometer la especificidad. De manera similar el autor detecta 100 UFC por la PCR a partir de diluciones de cultivo bacteriano (3), mientras que nuestro estudio detecta 0.063 UFC.

Oliveira S. *et al.* (2001), también reporta que obtiene amplificación por la PCR a partir de LCR, corazón, tonsilas y pulmón provenientes de animales inoculados y de campo (3). En nuestro estudio únicamente se obtuvieron amplificaciones a partir de pulmón y no de LCR ni de corazón. Posiblemente esta diferencia se deba a que los tejidos utilizados en este estudio provienen únicamente de casos de campo, mientras que los de Oliveira S. *et al.* la mayoría fueron derivados de animales experimentales.

Uno de los principales inconvenientes para la detección de *H. parasuis*, a partir de tejidos por bacteriología o PCR, es el uso frecuente de quimioterapéuticos que disminuyen las bacterias presentes en la muestra (5). En nuestro estudio, a pesar de que los tejidos tenían las lesiones sugestivas de un cuadro

respiratorio, la mayoría (38/54) fueron negativos a la bacteriología y PCR. En las muestras provenientes de Puebla solo un animal fue positivo a *H. parasuis* por la PCR, las demás muestras (6/7) fueron positivas a *B. bronchiseptica*. Aunque estos animales se encontraban bajo las mismas condiciones de crianza no se encontró interacción de *H. parasuis* con *B. bronchiseptica*, al momento de este estudio como lo sugiere Brockmeier SL (24). Infección mixta de *H. parasuis* y *P. multocida* tipo D fue detectada en un caso.

De las muestras de campo (54 casos), 5 (9.3%) fueron positivos a la PCR para *H. parasuis*, de estos 1 (1.9%) también fue positivo por bacteriología. Esto sugiere que la sensibilidad de la PCR es mayor que la del resultado bacteriológico. Trece (24.1%) de las muestras tuvieron un resultado bacteriológico positivo a otras bacterias (*A. pleuropneumoniae* (5.5%), *B. bronchiseptica* (13%), *P. multocida* tipo A y D (3.7%), y *A. pyogenes* (3.7%), *S. suis* (3.7%).

Se requiere investigación epidemiológica de *H. parasuis* en las diferentes regiones del país. La metodología descrita en este estudio provee las herramientas para su desarrollo.

APENDICE 1

Protocolo de extracción de ADN por método de CTAB/Fenol:

1.- Se resuspendió el cultivo bacteriano en 1 ml de TE en un tubo de 1.5 ml, hasta alcanzar una turbidez. De los tejidos se requirió 50 mg que fueron enjuagados y ligeramente macerados en la solución de TE. Se centrifugó por 5 minutos a 13 000 rpm.

2.- Se resuspendió la pastilla en 567 μ l de TE buffer hasta quedar homogénea; se le adicionó 30 μ l de SDS al 10% y 1.5 μ l de proteinasa K (40mg/ml), se mezcló suavemente en vortex e incubó a 37 °C durante 1 hora.

3.-Se adicionó 100 μ l de 5M NaCl y 80 μ l de sol. CTAB/NaCl, se mezcló e incubó a 65 °C por 10 min en un baño María.

Con este paso se comenzó a remover polisacáridos y otras macromoléculas contaminantes.

4.- Se adicionó un volumen igual de Cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló e incubó por 5 min a 13 000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo; si se dificultaba se removió primero con un palillo estéril la capa de interfase.

5.- Se adicionó volumen igual de Fenol Cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló y centrifugó por 5 min a 13 000 rpm. Se removió la interfase si era necesario.

6.- Se adicionó 600 μ l de isopropanol, se mezcló suavemente y se dejó precipitar el ADN. Se transfirió el precipitado, agregando 1 ml de etanol al 70% para su lavado. Se secó a temperatura ambiente por 12 hrs.

Se centrifugó por 3-5 min a 13 000 rpm para obtener un rápido precipitado.

7.- Finalmente se resuspendió la pastilla en 50-100 μ l de TE dependiendo del tamaño y se refrigeró el ADN.

Soluciones utilizadas

- TRIS 1M (pH 8.0)

121.1 g de base TRIS en 800 ml de agua destilada

- EDTA 0.5 M (pH 8.0)

186.1 g EDTA para 800ml de agua destilada

- Solución TE

10 Mm Tris-Cl (pH 7.5 a 8.0)

1Mm EDTA pH 8.0

- Solución amortiguadora de electroforesis

Tris-acetato (TAE)

Solución de trabajo

1X: 0.04 M Tris-acetato

0.01 M EDTA

Solución concentrada por litro (Sol. madre)

50X: 242 g Tris base

57.1 ml ácido acético glacial

100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

- Sulfato dodecyl de sodio al 10% (pH 7.2)

100 g SDS en 900 ml de agua destilada

- Bromuro de cetiltrimetilamonico (CTAB)

10% CTAB

0.7 M NaCl

- Solución amortiguadora de carga utilizada en el gel de agarosa

0.25% de azul de bromofenol

0.25% de xilencianol F.F

30% de glicerol en agua

se almacenó a 4°C

- Bromuro de Etidio

100 mg/ml de agua destilada

Literatura citada

1. Done SH. *Haemophilus parasuis*: A synopsis. The Pig Journal 1999; 44: 207-221
2. Ferri E., Puente VA. Meningitis bacteriana del cerdo: Enfermedad de Glässer. Porci 2000; No. 59.
3. Oliveira S. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J. Vet. Diagn. Invest., 2001; 13: 495-501.
4. Lichtensteiger CA., Vimr ER. Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*. Vet. Microbiol. 2003; 2: 93, 79-87.
5. Rapp-Gabrielson VJ. *Haemophilus parasuis* in Diseases of Swine. 8th edit, B.S. Straw et al., Blackwell Science, Iowa State University., Ames, Iowa, 1999, pag.475-500.
6. Segalés J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Haemophilus parasuis* antigen distribution in dually infected pigs. Vet. Microbiol., 1998; 64: 287-297
7. Ciprian A. y Mendoza, S. Aplicación de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades del "Complejo Respiratorio Porcino". Agrupación de Consultores en Tecnologías del Cerdo. México, 2000.
8. Solano I, Segalés J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis* Vet. Microbiol.1997; 55: 247-257

9. Smart NL. Glässer's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in Southern Ontario. *Can. Vet. J.* 1989; 30: 339-343.
10. Larsen . Glässer's on the increase. *Pig Int.* 1990; 20: 24.
11. Hill H., Conner. J.F. *Haemophilus parasuis* (Part 1), *Agri-Practice* 1993; 14: 19-23
12. Puente VA. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. *Vet. Microbiol.* 2003; 92: 253-262.
13. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* 1976; 93: 9-62.
14. Kielstein P., Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* based on immunodiffusion using heatstable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 862-865.
15. Morozumi T, Nicolet J. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23:138-142.
16. Rafiee M., Blackall PJ. Establishment validation and use of the Kielstein y Rapp- Gabrielson serotyping scheme from *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* 2000; 78: 172-174.
17. Hernández MR; Ciprián A. Preparación de un antígeno de *Haemophilus parasuis* para el diagnóstico de la enfermedad de Glässer en cerdos. *Memorias del Congreso Nacional AMVEC XXXIX.* Mazatlán, México, 2004: 237
18. Rafiee M, Bara M. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* 2000 Dec; 78: 846-9.

19. Kielstein P, Wuthe H. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. *Vet. Microbiol.* 2001; 81: 243-255
20. Segales J, Domingo, M. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997; 9: 237-43. 19.
21. Quinn P.J, Carter M. E. *Clinical Veterinary Microbiology*. Ed. Wolfe, Londres, England; 1994.
22. Alton G. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris , 1988.
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2nd edition *Molecular cloning a laboratory manual*, ed. Cold Spring Harbor Laboratory USA, 1989
24. Brockmeier SL. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Vet. Microbiol.* 2004, 99: 75-78