

DETECCIÓN DE ADN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* A PARTIR DE  
MUESTRAS DE PULMÓN DE CERDOS

Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del título de  
Medica Veterinaria Zootecnista  
por

**SARA GORETTI HERNÁNDEZ PÉREZ**

ASESORES: MVZ, Esp, MC EDGAR ALFONSECA SILVA

MVZ, MSc, PhD ALFREDO SAHAGÚN RUIZ

MVZ, MCV, GERARDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D. F., 2005

m344992



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.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT IN213302

## DEDICATORIA

A mis padres, familiares y amigos,  
por su confianza, cariño y apoyo en el transcurso  
de la realización de esta Tesis,  
pero principalmente le dedico este trabajo  
y esfuerzo a la memoria de  
Francisco Luis Hernández †  
por su confianza, amor y apoyo incondicional  
durante toda mi carrera

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincera gratitud a todas aquellas personas que con su apoyo, consejos y conocimientos me ayudaron a realizar esta tesis.

A mis asesores **Edgar Alfonseca Silva, Alfredo Sahagún Ruiz y Gerardo Ramírez Hernández** por sus indicaciones, su dirección y paciencia en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Esperanza Galván del Departamento de Producción Animal Cerdos.**

A mi honorable Jurado: **Francisco Suárez, María Elena Trujillo, Alejandra Mercadillo.**

A todo el personal que integra el **Departamento de Microbiología e Inmunología.**

A mis compañeros y amigos del **Laboratorio de Inmunología Molecular.**

A ti mi amor, **Sixto López Balderas.**

A la **generación 1999-2003.**

A **Dios.**

## CONTENIDO

|                       | <u>Página</u> |
|-----------------------|---------------|
| RESUMEN               | 1             |
| INTRODUCCIÓN          | 2             |
| HIPÓTESIS             | 6             |
| OBJETIVO GENERAL      | 7             |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 7             |
| MATERIAL Y MÉTODOS    | 8             |
| RESULTADOS            | 15            |
| DISCUSIÓN             | 26            |
| CONCLUSIÓN            | 29            |
| LITERATURA CITADA     | 30            |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| 1. Pulmón de cerdo con lesiones de pleuroneumonía .....                          | 3      |
| 2. Cultivo de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....                       | 8      |
| 3. Especificidad de la PCR .....   | 15     |
| 4. Sensibilidad a partir de ADN purificado .....                                 | 16     |
| 5. Sensibilidad a partir de bacterias .....                                      | 17     |
| 6. Sensibilidad a partir de pulmones inoculados .....                            | 18     |
| 7. Crecimiento de <i>A. pleuropneumoniae</i> a partir de muestras experimentales | 19     |
| 8. PCR realizada de ADN extraído de pulmones .....                               | 20     |
| 9. PCR realizada de ADN extraído de hisopos traqueales .....                     | 20     |
| 10. PCR realizada de ADN extraído de hisopos del endocardio .....                | 21     |
| 11. PCR realizada de ADN extraído de hisopos nasales .....                       | 21     |
| 12. Crecimiento de <i>A. pleuropneumoniae</i> a partir de muestras de campo ...  | 23     |
| 13. Amplificación de la PCR a partir de muestras de campo .....                  | 24     |

## RESUMEN

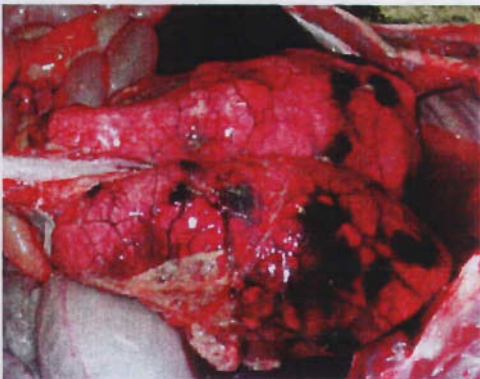
**SARA GORETTI HERNÁNDEZ PÉREZ.** Detección de ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de muestras de pulmón de cerdos. (Bajo la dirección de MVZ, Esp, MC Edgar Alfonseca Silva, MVZ, MSc, PhD Alfredo Sahagún Ruiz y MVZ, MCV Gerardo Ramírez Hernández).

Con el fin de estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para el diagnóstico específico de la pleuroneumonía porcina; se realizó extracción de ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de cultivo, muestras de pulmones inoculados y de pulmones de cerdos inoculados experimentalmente. La cepa de campo UNAM-127 de *A. pleuropneumoniae*, proporcionada por el Departamento de Producción Animal Cerdos (DPAC) de la FMVZ, fue cultivada en agar sangre con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* y agar PPLO en presencia de NAD. El ADN fue extraído por el método de CTAB/fenol/cloroformo y cuantificado por espectrofotometría. Para la PCR se utilizaron los iniciadores del gen *apxIVA* de *A. pleuropneumoniae* (Schaller *et al*, 2001): F-5'TGGCACTGACGGTGATGA3' y R-5'GGCCATCGACTCAACCAT3'. La especificidad fue determinada utilizando ADN de *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis*. La sensibilidad de la PCR fue determinada a partir de diluciones de ADN bacteriano previamente cuantificado; de diluciones de bacteria; de ADN extraído de pulmones inoculados con diferentes diluciones de bacteria y de pulmones de lechones infectados experimentalmente con una suspensión de  $6 \times 10^7$  UFC/ml. También se realizaron extracciones a partir de muestras de campo de animales sospechosos de pleuroneumonía. La concentración de ADN obtenida, por el método de CTAB/fenol/cloroformo, fue de 122 ng/ml a partir de cultivo. La PCR resultó específica al no amplificar ningún producto cuando se utilizó ADN de *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis*. La sensibilidad de los iniciadores de la PCR fue de 0.1 fg a partir de ADN extraído de *A. pleuropneumoniae* en cultivo. La sensibilidad de la PCR, utilizando diluciones del microorganismo fue 1 UFC y de 24 UFC a partir de ADN extraído de pulmones inoculados con diferentes diluciones. Todas las muestras de los cerdos infectados experimentalmente fueron positivas al aislamiento, excepto los hisopos nasales. La PCR fue capaz de detectar *A. pleuropneumoniae* a partir de todas las muestras, incluyendo hisopos nasales. Todas las muestras de campo positivas a la PCR, resultaron positivas al aislamiento. La PCR mostró ser específica al no amplificar ADN de otros géneros bacterianos y altamente sensible al detectar 24 UFC en tejido. Las muestras de los cerdos inoculados experimentalmente fueron positivas a la PCR y a la bacteriología. La PCR detectó ADN de *A. pleuropneumoniae* a partir de muestras de campo.



## INTRODUCCIÓN

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente causal de la pleuroneumonía de los cerdos, enfermedad respiratoria altamente contagiosa, que causa una alta morbilidad y mortalidad, afecta a cerdos de alrededor de 3 meses de edad (1, 2, 3, 4, 5). La enfermedad puede presentar un curso subagudo caracterizado por fiebre de hasta 42°C, tos, vomito, anorexia, disnea, silbido pulmonar, cianosis, hemorragias nasales espumosas, respiración por la boca y debilidad cardiovascular, produciendo la muerte en un plazo de 12-24 horas; un curso agudo con disnea, inapetencia, apatía, fiebre de 41°C, tos intermitente y dolorosa; y un curso crónico con fiebre leve o ausente, tos, disnea, anorexia, retraso en el crecimiento y raquitismo. Las lesiones que puede presentarse en el curso agudo y sobreagudo son principalmente zonas neumónicas de 1 a 3 cm de diámetro de color rojo intenso sobresaliendo de la superficie pulmonar sobre todo localizadas en el lóbulo diafragmático, hay adherencias fibrinosas con la pleura, manchas y secreción seroso hemorrágica. En el curso crónico se produce una pleuritis con adherencias y las lesiones pulmonares presentan una superficie de corte de color gris rojizo o gris blanquecino con un centro necrótico (6) (Figura 1).



**Figura 1.** Pulmón de cerdo con zonas neumónicas y adherencias fibrinosas características de pleuroneumonía porcina.

En algunos casos, los animales pueden estar infectados de forma subclínica y no presentar ningún signo clínico ni lesiones en los pulmones.

El control de la enfermedad es difícil, porque se transmite rápidamente a todos los animales de la granja dando lugar a importantes pérdidas en la porcicultura. La detección temprana del microorganismo es importante para el control y el tratamiento de esta enfermedad.

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, es un patógeno oportunista anteriormente conocido como *Haemophilus pleuropneumoniae*, es un bacilo Gram negativo, inmóvil, anaerobio facultativo, crece en satelitismo en agar sangre a 37°C (con una estria se *S. aureus*), formando colonias viscosas de color blanco en su aislamiento primario, perdiendo esta viscosidad en los subcultivos, produce una hemólisis completa en presencia de  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus*, requiere el factor V (NAD) para su crecimiento, es oxidasa positivo, con metabolismo fermentativo (5).

*Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta entre sus factores de virulencia polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos de la membrana externa (7), enzimas como la ureasa y toxinas como la *apxIVA*, estas últimas responsables de la mayoría de las lesiones pulmonares y del daño a los macrófagos alveolares (8). Se les denomina *apxI*, *apxII*, *apxIII* y la descrita recientemente *apxIV* (9), la cual es producida por todas las serovariedades de *A. pleuropneumoniae* y a diferencia de las otras toxinas, la *apxIV* es producida exclusivamente por esta especie. El papel de esta toxina en la patogenia de la infección no es conocido, animales convalecientes producen anticuerpos contra esta toxina.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha clasificado en 2 biovariedades según sus requerimientos de NAD, la biovariedad 1 es dependiente de NAD y la 2 es

independiente; la biovariedad 1 se divide en 12 serovariedades (10) que difieren en su virulencia y distribución geográfica. La serovariedad es determinada por el polisacárido capsular presente en su superficie. Determinar la serovariedad es importante en la prevención y la vigilancia epidemiológica.

Las serovariedades 1, 7 y 5 fueron identificadas en 129 pulmones de 250 cerdos sacrificados en el rastro Municipal de Mérida, Yucatán, México; siendo la serovariedad 1 la más frecuente con 68.2%, seguida de la serovariedad 7 con 22.5% (11). Consistente con este estudio, se identificó la serovariedad 1 por inmunohistoquímica y aislamiento bacteriológico en 11 de 100 pulmones de cerdos sacrificados en un rastro de la periferia de la Cd. de México procedentes de Jalisco, Querétaro, Edo. de México y Sonora (12).

El huésped natural de *A. pleuropneumoniae* es el cerdo, aunque ha sido aislado ocasionalmente de otras especies. La introducción de la infección en una granja es causada por el ingreso de animales portadores, aunque la transmisión por vía indirecta es posible. El contagio se efectúa normalmente vía aerógena. Los factores predisponentes son: la sobrepoblación, cambios bruscos de temperatura, poca ventilación y la presencia de otras enfermedades, como la rinitis atrófica, PRRS, ojo azul e infecciones por *Streptococcus suis*.

Para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina existen pruebas serológicas para clasificar las serovariedades de *A. pleuropneumoniae*, sin embargo su especificidad varía considerablemente, ya que existe reacción cruzada entre las serovariedades 1, 9 y 11; 3, 6 y 8; 4 y 7 (10).

Por otra parte, el aislamiento, identificación y tipificación de *A. pleuropneumoniae* tarda de 48 a 72 horas y es necesario un laboratorio bien establecido, en donde

además de los reactivos, medios de cultivo y antisueros, se requiere del personal calificado; en México existen pocos laboratorios que brindan este servicio.

Otras técnicas, como las pruebas de hemoaglutinación indirecta, coaglutinación, fijación de complemento y ELISA (10), solo se usan para estudios de investigación en los laboratorios de las Universidades e Institutos, más que para diagnóstico, debido principalmente a la infraestructura, equipo y personal capacitado que se requiere.

Como alternativa la PCR se ha propuesto como método de diagnóstico para *A. pleuropneumoniae*, por su capacidad para detectar secuencias genéticas específicas del microorganismo en cantidades muy pequeñas, lo cual representa una ventaja comparada con otras pruebas tales como el cultivo y la serología. La PCR podría evitar los problemas de especificidad debido a reacciones cruzadas entre microorganismos antigénicamente similares, así como la necesidad de esperar a que la bacteria crezca en el cultivo (13), ya que la prueba de PCR se puede realizar directamente de muestras clínicas para detectar el ADN específico del microorganismo de manera eficiente.

En este estudio, se estandarizó la PCR con iniciadores basados en la secuencia del gen *apxIVA*, el cual amplifica un fragmento específico de 422 pb para la detección de ADN de *A. pleuropneumoniae* a partir de ADN purificado, bacteria y muestras de pulmón de cerdo.

## HIPÓTESIS

La detección de ADN de *A. pleuropneumoniae* por PCR a partir de muestras de pulmón permitirá un diagnóstico rápido de la pleuroneumonía porcina.

## OBJETIVO GENERAL

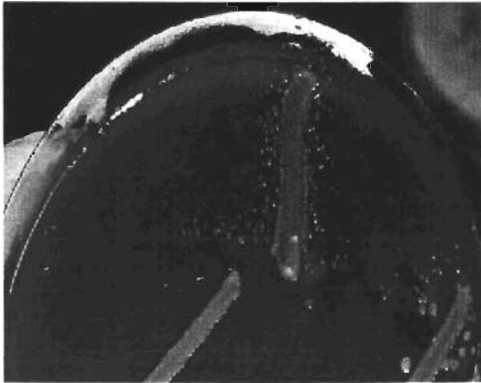
Detectar el gen *apxIVA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para diagnosticar la pleuroneumonía porcina.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica de extracción de ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
2. Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de:
  - ADN purificado de cultivo de *A. pleuropneumoniae*.
  - Diluciones de una concentración conocida de *A. pleuropneumoniae*.
  - ADN extraído de pulmones inoculados con diferentes diluciones de *A. pleuropneumoniae*.
  - ADN extraído de pulmones de cerdos inoculados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae*.
  - ADN extraído a partir de muestras de campo de cerdos sospechosos de pleuroneumonía.

*Haemophilus parasuis* y la cepa LRG-001 de *Pasteurella multocida* aisladas de pulmón de cerdo en el Dpto. Microbiología e Inmunología, FMVZ, UNAM.

Las bacterias fueron cultivadas de 24 a 48 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en agar sangre (AS) con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* (Figura 2), en agar chocolate (Ach), agar PPLO y agar TSA adicionados con 0.002% de NAD.



**Figura 2.** Cultivo de *A. pleuropneumoniae* en AS con cepa nodriza de *S. aureus*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* se cosechó, se resuspendió en 10 ml de caldo PPLO/leche/glicerol (50%, 20%, 30%) y fue almacenada en alícuotas de 500 µl a -70°C. Para obtener la concentración de bacterias existentes en las alícuotas, se llevó a cabo el método de Miles y Misra (14), 24 horas poscongelación se descongeló una alícuota y se sembró por triplicado diluciones décuples en agar PPLO, y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. 48 horas después se realizó el conteo obteniendo la concentración en UFC/ml.

### Extracción de ADN

El ADN se obtuvo por el método de CTAB/fenol/cloroformo.

descongeló una alícuota y se sembró por triplicado diluciones décuples en agar PPLO, y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. 48 horas después se realizó el conteo obteniendo la concentración en UFC/ml.

### Extracción de ADN

El ADN se obtuvo por el método de CTAB/fenol/cloroformo.

La bacteria fue cosechada y resuspendida en 1 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA), se centrifugó a 16060 x g por dos minutos para sedimentarla. La bacteria se resuspendió en 567 µl de TE, se le agregó 30 µl del detergente SDS (10%) y 1.5 µl de proteinasa K (40 mg/ml), se mezcló y se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente, se le adicionó 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB/NaCl, después de mezclar se incubó a 65°C por 10 minutos; con este paso se remueven polisacáridos y otras macromoléculas contaminantes, pasados los 10 minutos se le adicionó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló, se centrifugó a 16060 x g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. A este último se le adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 16060 x g durante 5 minutos para obtener el sobrenadante. El ADN en el sobrenadante fue precipitado al adicionar 600 µl de isopropanol, centrifugando nuevamente a 16060 x g durante 5 minutos; el ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se retiró el sobrenadante después de centrifugar y se dejó secar la pastilla. Por último se resuspendió en 50 µl de TE y se refrigeró el ADN (15).



## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los iniciadores utilizados corresponden al gen *apxIVA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (AF021919) descritos por Schaller *et al* (8). Los cuales amplifican un producto de 422 pares de bases (pb).

*A. PLEROPNEUMONIAE1* 5'TGGCACTGACGGTGATGA3'

*A. PLEROPNEUMONIAE2* 5'GGCCATCGACTCAACCAT3'

La reacción de amplificación se desarrolló en el termociclador Mastercycler Eppendorf, en un volumen de 20 µl de una mezcla de 20 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada iniciador (*A. PLEROPNEUMONIAE1* y *A. PLEROPNEUMONIAE2*), 0.25 unidades de Taq polimerasa y diferentes concentraciones de ADN de la bacteria. Las condiciones fueron: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 52°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Seguidos de una extensión final a 72°C por 4 minutos (9).

Las reacciones de PCR incluyeron un tubo conteniendo todos los elementos de la reacción excepto ADN como control negativo así como un control positivo el cual contuvo los mismos elementos de la reacción además de ADN de *A. pleuropneumoniae*.

## Producto amplificado

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

La reacción positiva presentó una banda de 422 pb en el gel de agarosa, utilizando un marcador de peso molecular (1 Kb ladder, Invitrogen).

## Gel de agarosa al 1%

La solución de electroforesis (TAE 1X) fue utilizada para preparar el gel y medio de conducción en la cámara de electroforesis. Se adiciono 1% de agarosa en TAE 1X, se calentó a temperatura de ebullición (100°C) en un horno de microondas, y se vació al molde de la cámara de electroforesis colocándole el peine para formar los pozos y colocar las reacciones de PCR. Una vez gelificado se agregó la solución de TAE 1X hasta cubrir el gel.

Se mezcló cada reacción de la PCR y el marcador de peso molecular (1 Kb ladder) con 2 µl de solución de carga, colocándola en el pozo, para correrlas por electroforesis. Posteriormente se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) de 10-15 minutos y finalmente el producto de la PCR fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta para su documentación. Se fotografió cada uno de los geles.

## Especificidad y sensibilidad de la técnica

El ADN extraído de suspensiones bacterianas de *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis* y *P. multocida* Tipo A, fue cuantificado en ng/µl por espectrofotometría para la estandarización de la prueba de sensibilidad y especificidad de ADN puro.

## Especificidad

Se utilizó 100 ng de ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Pasteurella multocida* con la finalidad de determinar la especificidad de los iniciadores en la prueba.

## Sensibilidad del PCR a partir de ADN purificado

Se cuantificó por espectrofotometría ( $A_{260nm}$ ) el ADN de *A. pleuropneumoniae* a partir de cultivo puro obtenido por extracción CTAB/fenol. Con la finalidad de determinar la concentración mínima de ADN que puede ser amplificado por la PCR se realizaron diluciones décuples a partir de 100 ng. Para inferir el número mínimo de bacterias detectables. Se consideró que el tamaño del genoma de *A. pleuropneumoniae* es similar al de *E. coli*,  $4.2 \times 10^6$  pb.

## PCR directamente de bacteria

Para conocer el número mínimo de bacterias que detecta la PCR, se realizaron 4 diluciones décuples y 6 dobles a partir de 20  $\mu$ l de una suspensión con  $9.75 \times 10^6$  UFC/ml. Se realizó la reacción de PCR a partir del ADN de cada dilución décuple y doble.

## PCR a partir de pulmones de cerdo sano inoculados con bacterias

Considerando que la PCR para diagnóstico debe de funcionar a partir de tejidos infectados; se determinó la capacidad de la PCR para detectar la cantidad mínima de UFC de *A. pleuropneumoniae* a partir de tejidos, inoculando diferentes diluciones de bacteria a pulmones de cerdos sanos, sacrificados en el rastro TIF 194 de Cuautitlán, Edo. de México.

**A) Examen bacteriológico:** las superficies del tejido fueron esterilizadas con una espátula, obteniendo 1 cm de muestra que fue sembrada en AS para aislamiento en cultivo puro con un asa bacteriológica estéril; en cada cuadrante se cruzó una estría de *S. aureus* como fuente de NAD. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5-10% de CO<sub>2</sub>, durante 24-48 horas. Después del periodo de incubación se

seleccionaron las colonias pequeñas, traslucidas, alrededor de la cepa nodriza, para realizarles un frotis fijo teñido con Gram y visualizar con el objetivo de 100X la afinidad tintorial, morfología y agrupación. Se realizaron las pruebas primarias: catalasa y oxidasa. Las colonias con características morfológicas similares a *A. pleuropneumoniae*, se subcultivaron en agar PPLO adicionado con 0.02% de NAD, y se incubaron en las condiciones descritas para el AS, a partir del subcultivo se realizaron las pruebas bioquímicas para su identificación:

- a) 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) Ureasa. Se inoculó en 2 ml de caldo urea, una colonia, se incubó a 37 °C, 5-10% de CO<sub>2</sub> por 24 horas y se evaluó. El medio de color rojo indicó actividad de ureasa (16).

**B) Extracción de ADN y PCR:** 10 fragmentos de 0.25 g de lóbulo pulmonar diafragmático de las muestras negativas a cualquier género bacteriano, se les inoculó con una jeringa estéril, 100 µl de 3 diluciones décuples y 7 dobles de una suspensión de *A. pleuropneumoniae* con  $39 \times 10^4$  UFC/ml utilizando 20 µl en la primera. Cada fragmento de tejido fue colocado en un vial por separado con 900 µl de TE; fue ligeramente macerado y del sobrenadante se tomó 200 µl para extracción de material genético. A 15.8 µl del producto de cada una de las extracciones se le realizó la técnica de PCR.

## Amplificación de ADN a partir de muestras de cerdos inoculados experimentalmente

Cinco lechones de 35 días de edad, provenientes de una granja del Estado de Morelos, sin antecedentes de pleuroneumonía fueron inoculados experimentalmente vía intranasal con 2 ml de una suspensión de *A. pleuropneumoniae* ( $6 \times 10^8$ /ml) y 2 lechones adicionales sin inocular fueron utilizados como controles negativos.

Los animales inoculados empezaron a mostrar signos de la enfermedad a las 5 horas de haber sido inoculados y a las 24 horas posinfección se les realizó la eutanasia por métodos humanitarios. Durante la necropsia se revisaron las lesiones ocasionadas por *A. pleuropneumoniae* y se tomaron muestras de pulmón, corazón, traquea e hisopos nasales, estas muestras fueron procesadas por bacteriología y extracción de ADN para PCR.

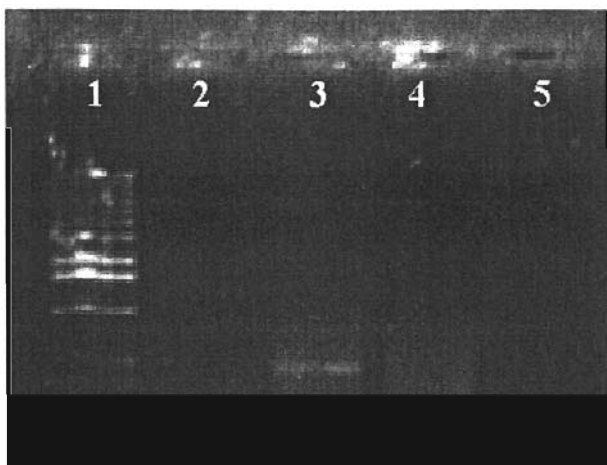
## PCR a partir de muestras de campo

Muestras clínicas remitidas para diagnóstico, proporcionadas por el DPAC y provenientes de rastros y granjas porcinas fueron procesadas para examen bacteriológico y extracción de ADN para PCR.

## RESULTADOS

### Especificidad

Los iniciadores utilizados resultaron específicos para ADN de *A. pleuropneumoniae* (100ng) al amplificar un producto de 422 pb; y no amplificar ningún producto cuando se utilizó ADN (100ng) de *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis* (Figura 3).

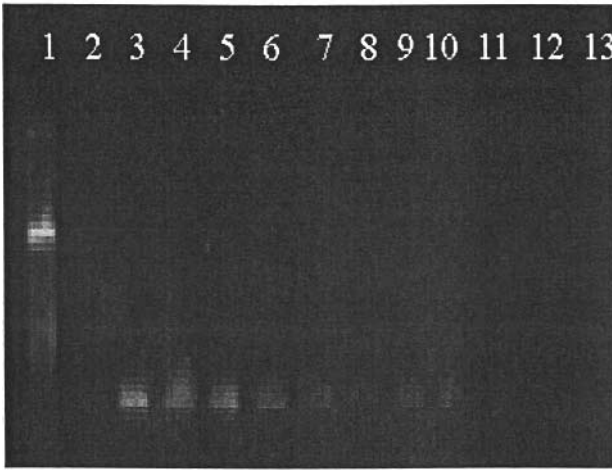


**Figura 3.** Especificidad de la PCR

Carril 1: Marcador de peso molecular (1 kb), Carril 2: Control negativo, Carril 3: ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Carril 4: ADN de *Haemophilus parasuis*, Carril 5: ADN de *Pasteurella multocida*.

## Sensibilidad

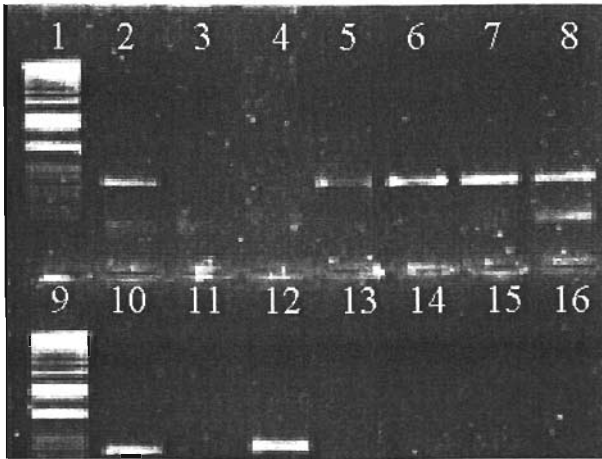
La concentración mínima de ADN purificado de *A. pleuropneumoniae* que los iniciadores de la PCR fueron capaces de detectar fue de 0.1 fg, equivalente a 0.02 bacterias, considerando un genoma de  $4.2 \times 10^6$  pb similar a *E. coli* (Figura 4).



**Figura 4.** Sensibilidad a partir de ADN purificado. PCR realizado a partir de diluciones de ADN de *A. pleuropneumoniae*. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2: Control negativo, Carril 3-13: diferentes concentraciones de ADN de *A. pleuropneumoniae* extraído a partir de un cultivo puro. Comenzando con una concentración de 1 ng hasta 0.0001 fg, siendo 0.1 fg en el carril 11 la concentración más baja que amplifica la PCR.

### Sensibilidad directamente de bacteria

La cantidad mínima de bacterias de *A. pleuropneumoniae* detectables por PCR sin extracción previa de ADN fue de 1 bacteria, a partir de la suspensión bacteriana  $9.75 \times 10^6$  UFC/ml (Figura 5).



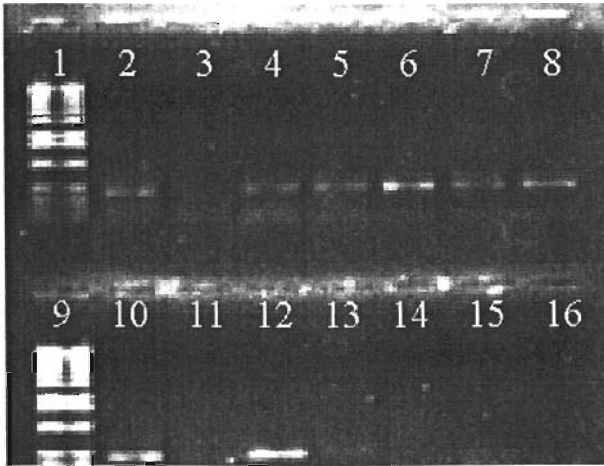
**Figura 5.** Sensibilidad a partir de bacterias.

PCR a partir de bacterias de *A. pleuropneumoniae* en diferentes concentraciones. Carril 1, 9: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2, 10: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 3, 11: Control negativo, Carril 4-7: diluciones décuples de UFC iniciando con una concentración 30810. Carril 8, 12-16: Diluciones dobles de UFC, la concentración mínima de bacterias que amplifica la PCR es de 1, carril 15.



## Sensibilidad a partir de tejidos

La sensibilidad de la PCR realizado de ADN extraído de pulmones inoculados con diferentes concentraciones de *A. pleuropneumoniae*, fue de 24 bacterias (Figura 6).



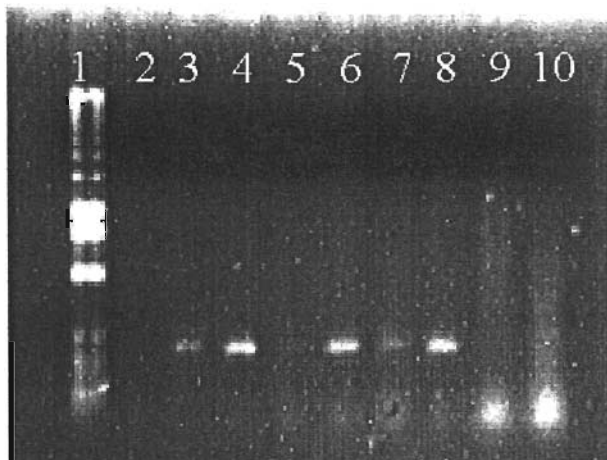
**Figura 6.** Sensibilidad a partir de pulmones inoculados. PCR realizado de ADN extraído de pulmones inoculados con diferentes concentraciones de *A. pleuropneumoniae*. Carril 1, 9: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2, 10: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 3, 11: Control negativo, Carril 4-6: diluciones décuples de ADN, iniciando con una concentración de 39040 bacterias, Carril 7, 8, 12-16: diluciones dobles de ADN, donde 24 bacterias, carril 13 es la concentración mínima que detecta la PCR.

Sin embargo la PCR fue capaz de detectar *A. pleuropneumoniae* a partir de todas las muestras, incluyendo hisopos nasales (Figuras 7, 8, 9, 10 y 11) (Cuadro I).



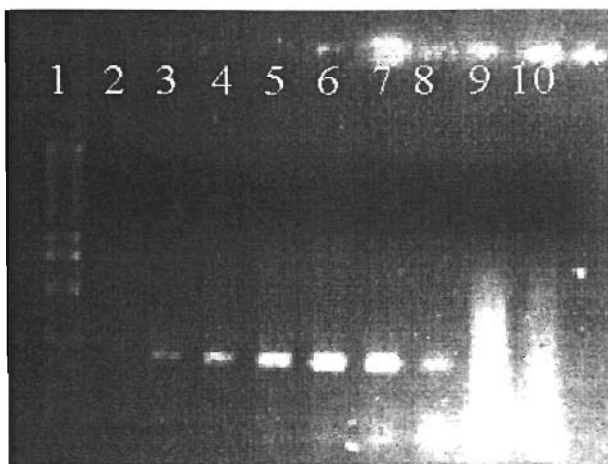
**Figura 7.** Crecimiento de *A. pleuropneumoniae*. Siembra realizada a partir de las muestras de los pulmones obtenidos de los animales infectados experimentalmente.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



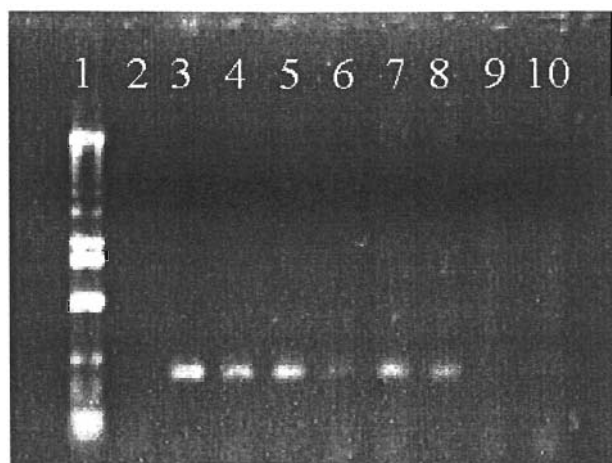
**Figura 8.** PCR realizado de ADN extraído de pulmones de cerdos inoculados experimentalmente.

Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 4-8: amplificación del ADN extraído de los pulmones de los lechones infectados, Carril 9, 10: extracción de ADN de los pulmones de los lechones control.



**Figura 9.** PCR realizado de ADN extraído de hisopos traqueales de cerdos inoculados experimentalmente.

Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 4-8: amplificación del ADN extraído de las tráqueas de los lechones infectados, Carril 9, 10: extracción de ADN de tráqueas de los lechones control.



**Figura 10.** PCR realizado de ADN extraído de hisopos del endocardio de cerdos inoculados experimentalmente.

Carril 1: Marcador de peso molecular (1Kb), Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 4-8: amplificación del ADN extraído de los corazones de los lechones infectados, Carril 9, 10: extracción de ADN de corazón de los lechones control.



**Figura 11.** PCR realizado de ADN extraído de hisopos nasales de cerdos inoculados experimentalmente.

Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 3: Control negativo, Carril 4-8: ADN extraído de los hisopos nasales de los lechones infectados, Carril 9, 10: extracción de ADN de hisopos nasales de los lechones control.

**Cuadro I.** Bacteriología y PCR realizadas a las diferentes muestras de cerdos inoculados experimentalmente por vía intranasal con 2 ml de una suspensión de *A. pleuropneumoniae* ( $6 \times 10^8$ /ml) (1-5), y cerdos control negativos (6-7).

|         | Bacteriología |   |   |   |   |   |   | PCR |   |   |   |   |   |   |
|---------|---------------|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|
|         | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Lechón  |               |   |   |   |   |   |   |     |   |   |   |   |   |   |
| Pulmón  | +             | + | + | + | + | - | - | +   | + | + | + | + | - | - |
| Corazón | +             | + | + | + | + | - | - | +   | + | + | + | + | - | - |
| Tráquea | +             | + | + | + | + | - | - | +   | + | + | + | + | - | - |
| Hisopos | -             | - | - | - | - | - | - | +   | + | - | - | + | - | - |

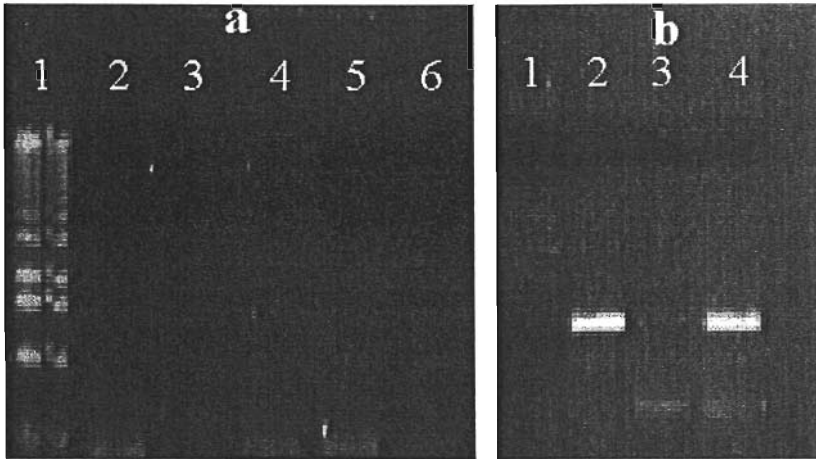
## Muestras de campo

Una vez que la PCR fue estandarizado con ADN purificado, bacterias, ADN a partir de tejidos inoculados y ADN purificado a partir de muestras experimentales, se realizó la PCR a partir de muestras de campo procedentes de diferentes zonas del país. Se trabajaron 41 muestras provenientes de cerdos con signos o lesiones pulmonares sugerentes a enfermedades respiratorias. Cuatro de las muestras resultaron positivas a *A. pleuropneumoniae* por bacteriología y PCR. (Figuras 12 y 13 a-b) (Cuadro II).

**Figura 12.** Crecimiento de *A. pleuropneumoniae*, siembra realizada a



partir de las muestras de campo obtenidas de diferentes estados de la República Mexicana.



**Figura 13.** Amplificación de la PCR a partir de muestras de campo.  
Carril 1 **a-b**: Marcador de peso molecular (1 Kb), Carril 2 **a-b**: Control positivo (100 pg de ADN de *A. pleuropneumoniae*), Carril 3 **a-b**: Control negativo, Carril 4-6 **a** y Carril 4 **b**: ADN extraído de los muestra de pulmón de cerdos positivo a *A. pleuropneumoniae*.

**Cuadro II. Bacteriología y PCR realizadas a las muestras clínicas remitidas para diagnóstico de pleuroneumonía porcina.**

| Origen                  | Muestras | Cultivo | PCR | Origen    | Muestras              | Cultivo | PCR |
|-------------------------|----------|---------|-----|-----------|-----------------------|---------|-----|
| Rastro Municipal Toluca | A Pulmón | -       | -   | Coahuila  | Z Pulmón              | -       | -   |
|                         | B Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | C Pulmón | -       | -   | Querétaro | A <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | D Pulmón | -       | -   |           | B <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | E Pulmón | -       | -   |           | C <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | F Pulmón | -       | -   |           | D <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | G Pulmón | -       | -   |           | E <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | H Pulmón | -       | -   |           | F <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | I Pulmón | -       | -   |           | G <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | J Pulmón | -       | -   | Yucatán   | H <sub>1</sub> Pulmón | +       | +   |
| K Pulmón                | +        | +       |     |           |                       |         |     |
| Michoacán               | L Pulmón | -       | -   | Querétaro | I <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | M Pulmón | -       | -   |           | J <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
| Yucatán                 | N Pulmón | +       | +   |           | K <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | O Pulmón | +       | +   |           | L <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
| Veracruz                | P Pulmón | -       | -   |           | M <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | Q Pulmón | -       | -   |           | N <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
| Puebla                  | R Pulmón | -       | -   |           | O <sub>1</sub> Pulmón | -       | -   |
|                         | S Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | T Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | U Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | V Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | W Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | X Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |
|                         | Y Pulmón | -       | -   |           |                       |         |     |



## DISCUSIÓN

El método CTAB/fenol/cloroformo para la extracción de ADN, resultó adecuado, se obtuvieron concentraciones de 122 ng/ml de ADN de *A. pleuropneumoniae* a partir de un cultivo puro. El diagnóstico tradicional para la pleuroneumonía porcina es el aislamiento bacteriológico, el cual muchas veces se ve limitado por el uso de antibióticos. En contraste, la PCR constituye una herramienta útil para el diagnóstico molecular de la pleuroneumonía porcina ya que tiene la ventaja de detectar las secuencias del microorganismo aunque éste se vea limitado en su desarrollo en medios de cultivo, así, esta técnica permite la detección de hasta 1 bacteria. Sin embargo, para la extracción de ADN a partir de tejido (0.25 g), se requiere que estén presentes por lo menos 380 UFC. El ADN extraído se resuspendió en 50 µl y solo se utilizaron 15.8 µl en la reacción de PCR que corresponde a aproximadamente 24 UFC.

El gen *apxIVA* es una RTX descrita recientemente, en *Actinobacillus pleuropneumoniae* (9), y aunque la función biológica de *apxIVA* no es precisa, se expresa en todas las serovariedades de *A. pleuropneumoniae* (17, 9). Las secuencias del gen *apxIVA* han sido utilizadas en otros estudios, por su capacidad de detectar animales infectados (18, 19). Los iniciadores diseñados para este trabajo se basan en el gen *apxIVA* y amplifican un fragmento de 422 pb.

La PCR propuesta es capaz de identificar secuencias del gen *apxIVA*, presentes en todas las serovariedades patógenas de *A. pleuropneumoniae*, sin tener la capacidad de diferenciarlas. Sin embargo, se han desarrollado técnicas para diferenciar serovariedades de *A. pleuropneumoniae* (20, 21, 22, 23), información

necesaria para realizar estudios epidemiológicos de esta enfermedad en nuestro país. Shucher *et al* (24), desarrolló una PCR múltiplex que es capaz de detectar e identificar las serovariedades 1, 2 y 8 de *A. pleuropneumoniae*, diseñó iniciadores de una región conservada que codifica para el polisacárido capsular. Esta PCR amplifica un fragmento de 489 pb para todas las serovariedades y utiliza un iniciador específico para cada serovariedad que amplifican fragmentos de 1.6 Kb, 1.7 Kb y 970 pb respectivamente; Hennessy *et al* (25) diseñó una PCR que distingue cada serovariedad, pero su método tiene la desventaja de requerir bacteria en cultivo, es susceptible a la contaminación y no da resultados repetitivos. Gram *et al* (26), en uno de sus estudios utiliza una PCR con iniciadores del gen *omlA* (lipoproteína de membrana externa) que a diferencia de la PCR con iniciadores del gen *apxlVA*, puede discriminar a la mayoría de las serovariedades de *A. pleuropneumoniae* biovariedad 1. Los estudios para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina, utilizando la técnica de PCR, se han evaluado con cultivos puros del microorganismo (26, 27), cultivos bacterianos mixtos en tonsilas (28, 13) y en hisopos nasales; y en la mayoría de estos se han usado animales infectados experimentalmente, sin demostrar su eficacia en muestras de campo. Este estudio mostró ser específico al no amplificar ADN de otros microorganismos y sensible al detectar *A. pleuropneumoniae* a partir de ADN purificado, bacterias en cultivo, bacterias inoculadas en pulmones, bacterias en muestras de animales infectados experimentalmente y en muestras clínicas sospechosas a pleuroneumonía porcina. Schaller *et al* (8), determina la especificidad de sus iniciadores propuestos utilizando ADN de 17 especies bacterianas estrechamente relacionadas con *A. pleuropneumoniae*, incluso *Actinobacillus lignieressi* y reporta

una sensibilidad de 10 fg que corresponde al ADN presente en 5 a 10 bacterias (8). En este estudio, para evaluar la especificidad de los iniciadores se utilizó ADN de *Haemophilus parasuis* y *Pasteurella multocida*, sin observar productos de amplificación, y la sensibilidad fue de 0.1 fg, a partir de ADN purificado de un cultivo de *A. pleuropneumoniae*.

## CONCLUSIONES

La técnica de PCR propuesta fue capaz de detectar a *A. pleuropneumoniae* a partir de muestras de campo, haciendo de este método un recurso rápido, fácil y efectivo para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina. Se observó que esta técnica es capaz de detectar *A. pleuropneumoniae* a partir de muestras de hisopos nasales, provenientes de cerdos infectados experimentalmente, sin embargo, muestras tomadas en cerdos para abasto, antes del sacrificio, resultaron negativas, tanto a la bacteriología como por PCR, por lo que sería recomendable realizar un estudio con cerdos clínicamente enfermos de pleuroneumonía para determinar la capacidad de hacer el diagnóstico a partir de animales vivos utilizando esta técnica.

La sensibilidad de la PCR a partir de muestras de campo resulta similar a la bacteriología con la diferencia de que utilizando esta técnica se ahorra tiempo y las muestras pueden mantenerse en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante tiempo indeterminado.

## Literatura citada

1. Shope, R. E., White, D. C. and Leidy, G. Porcine contagious pleuropneumonia. J Exp Med 1964; 119: 369-375
2. Sebunya, T. N. and Saunders, J. R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. J Am Vet Med Assn 1983; 182: 1331-1337.
3. Nicolet, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, IA 1992; 401-408.
4. Frey, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxin. Trends Microbiol 1995; 3: 257-261.
5. Scanlan, C. Introducción a la bacteriología veterinaria. Zaragoza (España): Editorial ACRIBIA, S.A, 1991; 209-211.
6. Zimmermann, y Plonait, H. Enfermedades del aparato respiratorio. In Bickhardt K y Plonait H, editores. Manual de las enfermedades del cerdo. 2ª Edición, Zaragoza (España): Editorial ACRIBIA, S.A, 2001.
7. Dubreuil, D., Jacques, M., Mittal, K. and Gottschalk, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: uses in diagnosis and as vaccinal molecules against pig pleuropneumonia. Animal Health 2000. Res. Rev. 1(2):73-93.
8. Schaller, A., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Forbes, W. A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J. and Frey, J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. Vet Microbiol 2001; 79(1): 47-62.

9. Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T. J., MacInnes, J. I., Segers, R.P.A.M. and Frey, J. Characterization of apxIVA a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol* 1999; 145: 2105-2116.
10. Taylor, D. J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Diseases of swine*. 8<sup>th</sup> ed. Iowa States Press A Blackwell Publishing Company, 1999; 343-350.
11. Williams, J. J., Torres-León, M. A., Echeverría-Coello, P. y Matos-Medina, M. C. Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro municipal Mérida, Yucatán, México. *Rev Biomed* 2000; 11: 175-181.
12. Hernández -Castro, R., Chávez-Gris, G. y Gutiérrez-Pabello, J. A. *Identificación de Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1 de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica. *Vet Mexico* 2002; 33 (3):4-16.
13. Gram, T., Ahrens, P. and Nielsen, J. P. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet Microbiol* 1996; 51: 95–104.
14. Alton, G. G. *Técnicas para el laboratorio de Brucelosis*. Instituto Nacional de la investigación Agronómica, Paris , 1988.
15. Ausubel, F. M., Bret, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. *Short protocols in molecular biology*. 3<sup>a</sup> Ed. United States of America: Published by John Wiley, 1995.

16. Quinn P.J , Carter M. E. Microbiología Clínica Veterinaria. Ed. Wolfe, Londres, Inglaterra; 1994.
17. De Costa, M. M., Klein, C. S., Balestrin, R., Schrank, A., Piffer, I. A., da Silva, S. C., Schrank, I. S. Curr. Microbiol 2004; 48 (3): 189-95.
18. Cho, W. S., Chae, C. PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ hybridization. Lett Appl Microbiol 2003; 37 (1): 56-60.
19. Fittipaldi, N., Broes, A., Harel, J., Kobisch, M., and Gottschalk, M. Evaluation and Field Validation of PCR Tests for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Subclinically Infected Pigs. Journal of clinical microbiology 2003; 41 (11): 5085–5093.
20. Hussey, D., Schlatter, Y., Miserez, R., Inzana, T. y Frey, J. PCR-based identification of serotype 2 isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars I and II. Vet. Microbiol 2004; 99 (3-4): 307-10.
21. Jessing, S. G., Angen, O., Inzana, T. J. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 6. J. Clin. Microbiol 2003; 41.
22. Sthitmatee, N., Sirinarumit, J. R. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based apx genes. Mol. Cell. Probes 2003; 17: 301-305.
23. Ward, C. K., Inzana, T. J. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol 1998; 36: 1704-1710.

24. Schuchert, J. T., Inzana, T. J., Angen, O., Jessing, S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 8 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol 2004; 42 (9): 4344-8.
25. Hennessy, K. J., Iandolo, J. J. and Fenwick, B. W. Serotypoidentification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1155–1159.
26. Gram, T., Ahrens, M., Andreasen, M. and Nielsen, J. P. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *amlA* genes- evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. Vet. Microbiol. 2000; 75: 43-57.
27. Hernanz, M. C., Cascon, S. A., Sánchez, S. M., Ygueros, M. J., Suarez, R. S., and Naharro, C. G. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use PCR assay for rapid identification. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 1575-1578.
28. Gram, T., and Ahrens, P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 443–448.