

XXI REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

“DR. BERNARDO JORGE CARRILLO”

ASOCIACION ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO

Fundada el 21 de noviembre de 1984

Personería Jurídica 439/96

Afiliada a la World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD)



6, 7 y 8 de OCTUBRE de 2016
SAN SALVADOR DE JUJUY

XXI Reunión científico-técnica Dr. Bernardo Jorge Carrillo : Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico / Raúl Eduardo Marin ... [et al.] ; compilado por Raúl Eduardo Marin ... [et al.]. - 1a ed . - San Salvador de Jujuy : Universidad Nacional de Jujuy, 2016.

182 p. ; 29 x 21 cm.

ISBN 978-987-3926-15-0

1. Diagnóstico. 2. Veterinaria. 3. Bacteriología. I. Marin, Raúl Eduardo II. Marin, Raúl Eduardo, comp.

CDD 636.089

ISBN 978-987-3926-15-0



B19- OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE LAWSONIA INTRACELLULARIS EN EXPLANTES INTESTINALES PORCINOS MEDIANTE PCR

PÉREZ GAUDIO DS^{1,2}; MARTINEZ G^{1,2}; FERNÁNDEZ PAGGI MB^{1,3}; RICCIO MB^{1,2}; DECUNDO J¹; DIEGUEZ S¹; TAPIA MO^{1,2}; SORACI AL¹

- 1- Área de Toxicología, Depto. de Fisiopatología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina
- 2- Área de Patología, Depto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina
- 3- Área de Producción Porcina, Depto. de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina
Correo electrónico: denisa@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Lawsonia intracellularis (LAW), agente causal de la Enteropatía Proliferativa Porcina (EPP) es una bacteria microaerófila, Gram-, intracelular obligada, que afecta principalmente a los cerdos, aunque puede infectar a otros mamíferos como equinos, caninos y roedores. No crece en los medios convencionales *in vitro* y no existen técnicas serológicas capaces de detectarla (3). Su diagnóstico certero es complejo y consiste en PCR de materia fecal y mucosa intestinal e inmunohistoquímica. El tratamiento antibiótico de LAW se considera de eficacia incompleta, una observación que se ha interpretado como la adquisición de resistencia. Por otro lado, explantes intestinales han sido utilizados como modelo para el estudio de penetración de antibióticos en células intestinales (4). A causa de las complicaciones del crecimiento de LAW en cultivos celulares y a la necesidad de encontrar fármacos que penetren en los enterocitos para un tratamiento eficaz de la EPP, se consideró útil la optimización de una técnica de PCR que permita detectar su presencia en explantes intestinales. De este modo, estos luego podrían ser utilizados en estudios de penetración de antibióticos a fin de lograr un tratamiento eficaz de esta patología, causante de numerosas pérdidas económicas en la industria porcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Cuatro cerdos clínicamente sanos en etapa de crecimiento-terminación.

Fuente de LAW: Vacuna viva atenuada, Enterisol Ileitis® (Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Alemania).

Primers: Forward (law-int146F; secuencia (5' a 3') ADN - GATAATCTACCTTCGAGACGG) y Reverse (law-745R; secuencia (5' a 3') ADN - TGACCTCAGTGTCAGTTATCGT) (2).

Obtención de explantes: Luego del sacrificio se extrajo el intestino delgado y se removió el contenido intestinal con solución fisiológica. Las muestras se transportaron (4 °C) al Laboratorio de Toxicología de la FCV-UNCPBA. Los explantes intestinales se efectuaron mediante una adaptación del método descrito por Niefeld et al. en 1991 (5), con algunas modificaciones. Los explantes se desafiaron con LAW, obtenida de la vacuna.

Determinación del tiempo de incubación con LAW: En cada pocillo de una placa de cultivo de seis pocillos se introdujo una esponja con su respectivo explante. En el centro del pocillo de la placa de cultivo se adicionó 1 mL de DMEM con GlutaMAXTM-1 (Dulbecco's Modified Eagle Medium - High Glucose, Gibco®) y 1 mL de F-12 Nutrient Mixture (Gibco®). Por acción capilar, el medio cubrió las vellosidades y mantuvo viable al tejido. A cada explante se le adicionaron 0,50 mL de la vacuna conteniendo LAW. Se ensayaron distintos tiempos de incubación (8, 24 y 48 hs) para determinar el tiempo correcto de penetración de la bacteria al tejido. La placa fue mantenida en agitador a una temperatura constante de 37 °C. Se realizó histopatología de los explantes.

Optimización de la PCR para detección de LAW en mucosa intestinal: Como control positivo para las PCR de mucosa intestinal, se extrajo el ADN de LAW de la vacuna mediante calentamiento y fenol/cloroformo. Posteriormente, los explantes inoculados con la vacuna durante 24 hs se lavaron con agua HPLC para eliminar los microorganismos que no hayan ingresado a los enterocitos. Se colocaron en tubos de vidrio y fueron sometidos a homogeneización en equipo Ultraturrax. Se transfirieron a tubos de 1,5 mL y se adicionaron 50 µg/mL de proteinasa K y 500 µL de buffer de lisis (10 mM Tris, 25 mM EDTA, 100 mM ClNa, 0,50% SDS). Se efectuó una incubación durante la noche a 37 °C y se realizó extracción de ADN con fenol-cloroformo. Para la amplificación, se utilizaron 10 µL del material extraído. Se utilizó mucosa intestinal normal, sin inocular como control negativo, y como control positivo, el ADN

vacunal. Las condiciones de la PCR fueron: Buffer: 2,50 µL; Primers (20 pm): 1 µL, dNTPS: 1 µL (10 mM), Taq: 0,3 µL, ADN: 3 µL. MgCl₂ (50 mM): 2 µL y agua: 14,20 µL. Las reacciones fueron sometidas a 95 °C durante 15 min. en termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). La amplificación se realizó durante 35 ciclos donde cada ciclo consistió en 95 °C durante 15 seg., 50 °C durante 1 min. 30 seg. y 72 °C durante 2 min. Finalmente, se efectuó una extensión a 72 °C durante 10 min. Los amplicones (10 µL), teñidos con SyBR Safe (Invitrogen Argentina S.A.), se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,20 %.

RESULTADOS

La presencia de LAW se constató mediante los cortes histológicos correspondientes a los tres tiempos de incubación. A las 8 hs, el microorganismo se encontraba en escasa cantidad y el tejido no presentaba alteraciones. A las 24 y 48 hs, el número de LAW presentes en el epitelio intestinal fue superior, aunque a las 48 hs de incubación, se observaron señales de daño tisular. El método más adecuado para extracción del genoma bacteriano fue la extracción mediante calentamiento de la vacuna. Se logró optimizar la técnica de extracción del ADN de LAW desde la mucosa intestinal, partiendo de explantes intestinales incubados con 1 mL de la vacuna Enterisol Ileitis®.

DISCUSIÓN

Los explantes intestinales procedentes de cerdos son un modelo útil para estudiar la concentración de antibiótico intracelular en condiciones *ex vivo*. A su vez, la utilización de los explantes reduce el número de animales a utilizar por tiempo de muestreo. La morfología tisular se encontró preservada en los cortes histológicos de los explantes teñidos con hematoxilina-eosina (HE) luego de 24 hs. En los cortes histológicos de los explantes incubados durante 8 hs con LAW, teñidos con Giemsa, se observó la presencia de los bacilos curvos intracelularmente, tal como lo demostraron Boutrup et al. en 2010 (1), quienes luego de 6 hs de desafiar loops intestinales con la vacuna Enterisol Ileitis®, encontraron al microorganismo en íntimo contacto con los enterocitos y bacterias aisladas en las vellosidades intestinales. Se determinó que el tiempo óptimo para evaluar la penetración de LAW en los enterocitos es a las 24 hs debido al mayor número de microorganismos intracelulares en los cortes histológicos y a la adecuada morfología tisular. La extracción del ADN de LAW por calentamiento de la vacuna a baño María (extracción por calor) a fin de ser utilizada como control positivo en la reacción de PCR, mostró ser sencilla, rápida y de bajo costo. Se puso a punto exitosamente el método de extracción del ADN de LAW desde la mucosa intestinal, partiendo de explantes intestinales incubados con 0,5 mL de la vacuna, mediante el uso de fenol- cloroformo. La optimización de estos procedimientos permitirá la detección de LAW en explantes intestinales infectados y facilitará los estudios de penetración intracelular de diversos antibióticos que puedan ser útiles para lograr un tratamiento eficaz de esta patología, que hasta el momento no se ha conseguido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boutrup TS, Schauser K, Agerholm JS, Jensen TK. (2010). Acta Vet Scand, 52:17.
2. La T, Collins AM, Phillips ND, Oksa A, Hampson DJ. (2006) Lett Appl Microb 42: 284-288
3. Lawson GHK, Mc Orist S, Jasni S, Mackie RA. (1993). J Clin Microbiol, 31, 1136-1142.
4. Martínez G, Pérez DS, Soraci AL, Tapia MO. (2012). Anal Vet, 3(2):11-16.
5. Niefeld JC, Tyler DE, Lenn RH, Cole JR., Latimer KS, Wayne AC. (1991). A J Vet Res, 52(7):1142-1146.