

Diagnóstico de ileítis porcina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa

Leticia García Casanova**
Guadalupe Socci Escatel*
Lilia Barrón Flores**
Camila Arriaga Díaz*
Antonio Morilla González*

Abstract

Porcine ileitis is a disease that causes important economical losses to the swine industry. The causing agent of this disease is *Lawsonia intracellularis* which is a microorganism difficult to culture. For this reason, diagnosis is usually performed only at slaughter. Due to the difficulties of diagnosis in live animals, techniques based on the amplification of the bacterial DNA by the polymerase chain reaction (PCR) have been developed. The aim of this work was to evaluate a PCR technique to diagnose porcine ileitis in intestinal mucosa and fecal samples from swine suspected of being infected. DNA was extracted using diatomaceous earth and guanidine thiocyanate. Specific oligonucleotides that amplify a 319 bp DNA fragment of *L. intracellularis* DNA were used in the PCR. For standardization of the technique, intestinal mucosa samples from an experimentally infected pig were used. The minimum amount of infected mucosa DNA that was detected by PCR was 3.72 ng. When the infected mucosa was added to normal fecal samples, 12.4 ng of the extracted DNA were necessary to obtain a visible amplification product. The expected amplification product of 319 bp was also obtained from intestinal mucosa or fecal samples from pigs with characteristic clinical signs of porcine ileitis. It is concluded that the PCR technique could be very useful for the diagnosis of this disease, and for the determination of the prevalence of porcine ileitis in different areas.

Key words: DIAGNOSIS, PIGS, ILEITIS, *LAWSONIA INTRACELLULARIS*, PCR.

Resumen

La ileítis porcina es una enfermedad que ocasiona importantes pérdidas económicas a la industria porcina. El agente causal de esta enfermedad es *Lawsonia intracellularis*, un microorganismo de difícil cultivo. Por esta razón, el diagnóstico generalmente se realiza sólo al sacrificio. Debido a la dificultad del diagnóstico en animales vivos, se han desarrollado técnicas para detectar el ADN de la *L. intracellularis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica de PCR para el diagnóstico de la ileítis porcina en muestras de mucosa intestinal y heces de cerdos sospechosos de la enfermedad. El ADN fue extraído usando tierras diatomeas y tiocianato de guanidina. Para la amplificación del ADN se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de ADN de *L. intracellularis* de 319 pb. La estandarización de la técnica se realizó a partir de mucosa intestinal de un cerdo infectado experimentalmente. La mínima cantidad de ADN de mucosa infectada que se detectó por PCR fue de 3.72 ng. Cuando la mucosa infectada fue adicionada a muestras de heces normales se necesitaron 12.4 ng del ADN extraído, para obtener un producto de amplificación visible. El producto de amplificación esperado de 319 pb fue también obtenido de mucosa intestinal o muestras de heces de cerdos infectados con signos clínicos característicos de ileítis porcina. Se concluyó que la técnica de PCR puede ser muy útil para el diagnóstico de esta enfermedad y para la determinación de la prevalencia de la ileítis porcina en diferentes áreas.

Palabras clave: CERDOS, DIAGNÓSTICO, ILEÍTIS, *LAWSONIA INTRACELLULARIS*, PCR.

Recibido el 4 de diciembre de 1997 y aceptado el 3 de junio 1998.

* Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Km 15.5, Carretera México-Toluca, 05110, México, D.F.

** Investigación Aplicada, S.A. de C.V. Calle 7 Norte núm. 416, Tehuacán, Puebla, 75700, México.

Introducción

La ileítis porcina, también conocida como enteropatía proliferativa (EP), ileítis regional, adenomatosis intestinal, enteropatía proliferativa hemorrágica, entre otros términos, es una enfermedad entérica transmisible,¹ notificada inicialmente en los Estados Unidos de América en 1931. Posteriormente la enfermedad ha sido descrita en varios países, incluyendo México,² por lo que se considera que tiene una distribución mundial.³

El agente causal es una bacteria denominada *Lawsonia intracellularis*.⁴ Esta bacteria es microaerofílica, curvada, en forma de bastón y se multiplica en el citoplasma apical de los enterocitos del íleon, provocando la proliferación de las células epiteliales, lo que afecta el tránsito del bolo alimenticio y su absorción. Esta bacteria solamente se ha podido aislar y multiplicar *in vitro* en líneas celulares de enterocitos y a partir de estos cultivos se ha podido reproducir la enfermedad demostrando que este organismo es el agente etiológico.⁵

La ileítis es una enfermedad de los cerdos en crecimiento, se ha encontrado frecuentemente en granjas de importante estado sanitario, donde a pesar de existir pocas enfermedades infecciosas los animales no ganan el peso esperado, lo que implica importantes pérdidas económicas. También llega a provocar desde diarrea ligera hasta una severa disentería y ocasionalmente la muerte súbita del animal.³ Debido a lo variado de los signos clínicos es necesario diferenciarla de infecciones por *Salmonella typhimurium*, *Serpulina hyodysenteriae* y parásitos intestinales que llegan a causar pérdidas semejantes a las ocasionadas por la ileítis.

El diagnóstico de la enfermedad generalmente se realiza *post mortem* mediante la observación macroscópica e histológica de las lesiones en el íleon. El examen clínico y el estudio de rastro mediante la palpación de los intestinos tiene un valor muy limitado, ya que subestiman la frecuencia con que se presenta la enfermedad, debido a que en la mayoría de los casos la infección es subclínica y las lesiones en el íleon desaparecen cuando los animales llegan a rastro.

Por otra parte, el diagnóstico serológico no ha dado buenos resultados debido a que la respuesta de anticuerpos circulantes a la infección es muy variable.^{6,7}

En virtud de la importancia de la enfermedad y la dificultad para realizar el diagnóstico, se han desarrollado técnicas para detectar el ADN de *L. intracellularis* en muestras de heces por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR),^{8,9} la cual ha demostrado ser particularmente útil en la detección de microorganismos de difícil cultivo.

En este trabajo se describe la estandarización y utilización de la técnica del PCR para el diagnóstico de

ileítis en muestras de heces y mucosa intestinal de cerdos provenientes de granjas de distintas zonas del país, en las que se han observado animales con semiología sugestiva de esta enfermedad.

Material y métodos

Muestras

Para la estandarización de las técnicas de extracción y amplificación de ADN de *L. intracellularis* por PCR, se utilizó mucosa intestinal de un cerdo infectado.* Como testigo negativo se empleó mucosa de un cerdo sano, que no presentaba lesiones macroscópicas ni histopatológicas compatibles con ileítis.

Por otra parte, se obtuvieron muestras de mucosa intestinal, hisopos rectales y heces de cerdos de tres a cuatro meses de edad de tres granjas con signos clínicos de ileítis, y de una granja libre de esa enfermedad. La primera granja era de ciclo completo con una población total de 11,000 cerdos y tenía condiciones higiénicas regulares. Se observó que a partir de las cuatro semanas de edad los animales presentaban diarrea con duración aproximada de cuatro semanas; la mayoría de los suinos se recuperaban de la diarrea con el tratamiento, pero los grupos se hacían heterogéneos en la ganancia de peso y se observó que alrededor de 20% de los animales enfermos se retrasaron. Durante la enfermedad, 118 de entre 500 animales afectados murieron. A uno de estos cerdos se le practicó la necropsia, se evaluaron los cambios patológicos macroscópicos y microscópicos, y se tomó una muestra de raspado de la mucosa del íleon para ser analizada mediante la técnica de PCR. En las otras dos granjas los animales no ganaban peso y tenían diarrea ocasional, por lo que se sospechaba de ileítis; se tomaron muestras de hisopo rectal de cinco animales de una de las granjas y muestras de heces de 10 animales de la otra granja para ser analizadas.

Extracción de ADN

La extracción a partir de mucosa se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Boomet *et al.*,¹⁰ que consistió en que a 400 µl de raspado de mucosa intestinal se le adicionaron 950 µl de solución de lisis [10 M tiocianato de guanidina (Sigma), 22 mM EDTA, 0.1 M tris-HCl (pH 6.4), 0.65% (vol/vol) tritón X-100] y 50 µl de una suspensión a 20% (peso/vol) de tierras diatomeas (Sigma) en 0.17 M HCl; se agitó y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agitó nuevamente (5 seg), centrifugó a 5000g por 15 seg y el sobrenadante se retiró por succión. La pastilla se lavó dos veces con 1 ml de la solución de lavado (10 M tiocianato de guanidina, 0.1M tris-HCl pH 6.4), dos veces con etanol a 70% (vol/vol) y una vez con acetona; en cada lavado se agitó la pastilla hasta dispersarla completamente y se centrifugó 25 seg. Después de retirar la acetona, la pastilla se secó a 56°C durante 30 minutos,

* Proporcionada por la doctora C. Gebhart, de la Universidad de Minnesota, Estados Unidos de América.

posteriormente se resuspendió en solución para PCR y se colocó en baño María a 56°C durante 5 minutos, se centrifugó 5 min y el sobrenadante se empleó para la técnica de PCR.

Cuando la extracción de ADN se realizó a partir de heces, se homogenizó 1 g de heces con 1.5 ml de agua destilada estéril, se pasó a través de un cedazo para eliminar partículas grandes, se colocaron 400 µl del filtrado en un vial y se añadieron 950 µl de la solución de lisis y 50 µl de la suspensión de diatomeas; se continuó con el procedimiento mencionado.

En el caso de hisopo rectal, éste se colocó directamente en un vial que contenía la solución de lisis y las tierras diatomeas, el vial se agitó (5 seg), el hisopo se retiró y el vial se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente y se continuó con la extracción de la manera descrita anteriormente.

Amplificación del ADN

La técnica de PCR se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito por Jones *et al.*,⁸ con ciertas modificaciones para optimizar las condiciones de la reacción. Como iniciadores se utilizaron los oligonucleótidos A y B que corresponden a las posiciones de los nucleótidos 5 al 24 y 304 al 323, respectivamente, en la secuencia del fragmento clonado pCLO78 del ADN de *L. intracellularis*.¹¹ Las secuencias de los iniciadores empleados son las siguientes: A, 5'-TATGGCTGTCAAACACTCCG-3' y B, 5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3'. Dos microlitros del ADN extraído de cada una de las muestras se sometieron a la amplificación en 50 µl de una mezcla de reacción con una concentración 2 mM de MgCl₂, 200 mM de cada uno de los desoxinucleótidos, * 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.2 mM (60 ng) de cada uno de los iniciadores A y B, y 2.5 U de Taq polimerasa.* La mezcla de reactivos del PCR se cubrió con 50 µl de aceite mineral. La amplificación se efectuó en un termociclador Robocycler 40** con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización de 93°C 5 min, alineación a 50°C 45 seg y extensión a 72°C 45 seg, seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 93°C 45 seg, alineación a 50°C 45 seg y extensión a 72°C 45 seg y un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 minutos. Los productos de amplificación (20 µl) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa a 2% en solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA (TAE) conteniendo 100 ng/ml de bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron con una cámara DS-34*** bajo iluminación ultravioleta en un transiluminador. **

* Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT.

** Stratagene, La Jolla, CA 92037, USA.

***Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA.

Resultados

Para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR se utilizaron distintas cantidades de ADN extraído de la mucosa infectada en el proceso de amplificación. La cantidad mínima de ADN de mucosa infectada con *L. intracellularis*, a partir de la cual se logró el producto de amplificación de 319 pb esperado, fue de 3.72 ng. En contraste, no hubo amplificación con el ADN de la mucosa negativa (Figura 1). Cuando se añadieron distintas cantidades de mucosa positiva a muestras de heces de cerdos no infectados, también se obtuvo el producto de amplificación de 319 pb. La sensibilidad en este caso fue menor, ya que la cantidad mínima de ADN que pudo ser amplificado fue de 12.4 ng. Las muestras de heces de animales no infectados no dieron ningún producto de amplificación (Figura 2).

La técnica de PCR estandarizada fue utilizada para analizar muestras de mucosa intestinal y muestras de heces de tres granjas con signos clínicos de ileítis. Los resultados de la necropsia del cerdo proveniente de la granja donde se había observado signos clínicos y habían muerto varios animales, mostraron que el fleon tenía engrosamiento de la mucosa y plegamiento transversal, con notable reticulación de la superficie serosa; en el examen histológico del fleon se observó infiltración de leucocitos mononucleares, hiperplasia de células caliciformes y de células epiteliales de las criptas de las vellosidades, necrosis focal de células epiteliales y presencia de fibrina sobre la superficie e hiperplasia linfóide. Estos resultados son compatibles con las lesiones que se observan en la ileítis porcina. La muestra de mucosa resultó positiva a PCR; en las otras dos granjas donde los animales presentaban signos clínicos, 2 de 5

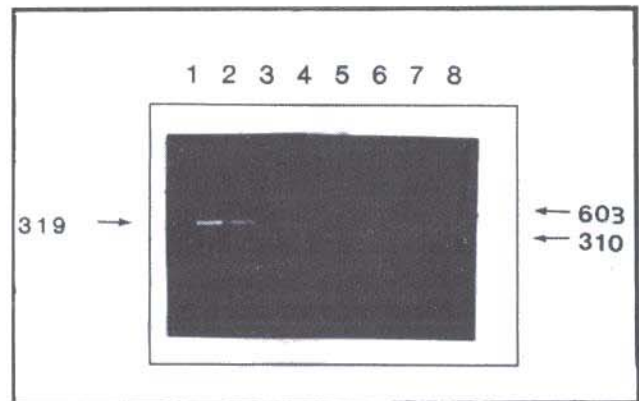


Figura 1. Sensibilidad del ensayo de PCR para la detección de *Lawsonia intracellularis* empleando los iniciadores A y B y diferentes concentraciones del ADN blanco. Carril 1: 372 ng; carril 2: 37.2 ng; carril 3: 3.72 ng; carril 4: 0.37 ng; carriles 5 y 6: testigos negativos sin ADN blanco, y carril 7: marcadores de tamaño, 0X174 digerido con Hae III. Los números indican el tamaño del producto de amplificación (izquierda) y de los marcadores (derecha), en pares de bases (pb).

muestras de hisopos analizadas y 4 de 7 muestras de heces resultaron positivas en PCR. Ninguna de las muestras de mucosa o de heces de la granja libre de ileítis fue positiva (Figura 3).

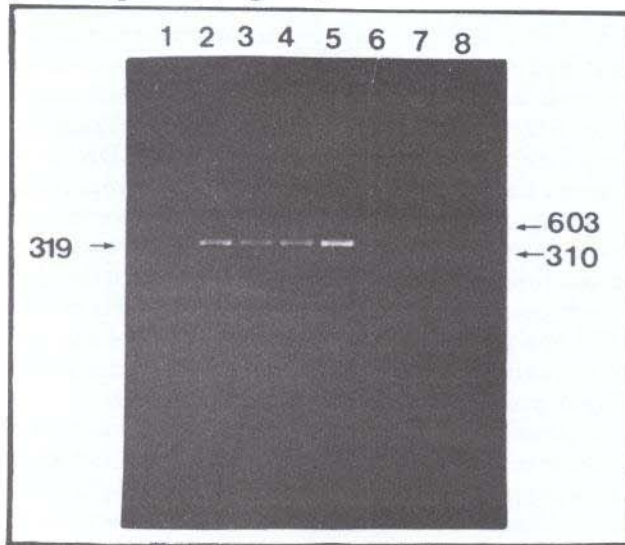


Figura 2. Sensibilidad de detección de *L. intracellularis* por PCR a partir de muestras de heces adicionadas con diferentes cantidades de mucosa infectada. Carriles 1-3: cantidades ascendentes de mucosa infectada (20, 50 y 100 μ l) adicionadas a cantidades constantes de heces (400 μ l); carriles 4 y 5: cantidades ascendentes de mucosa (20 y 50 μ l); carriles 6 y 7 testigos negativos sin ADN blanco, y carril 8 marcadores de tamaño, 0X174. Los números indican el tamaño del producto de amplificación (izquierda) y de los marcadores (derecha), en pares de bases (pb).

Discusión

El diagnóstico de ileítis o enteropatía proliferativa de los cerdos ha sido tradicionalmente difícil de efectuar, debido a la dificultad de cultivar el microorganismo⁵ y a que la respuesta de anticuerpos circulantes a la infección es de vida corta.³ Por lo tanto, el diagnóstico se ha limitado a la observación de lesiones macroscópicas en la necropsia. El desarrollo de la técnica de PCR específica para la ileítis ha permitido efectuar un diagnóstico rápido y certero de la enfermedad en las granjas, ya que es posible detectar el ADN de la bacteria a partir de muestras de heces de los animales sospechosos.⁸ De esta forma es posible controlar la enfermedad, esto último significa un incremento del peso corporal de los animales.

La metodología empleada en este trabajo permitió la detección específica de *L. intracellularis* a partir de muestras de mucosa intestinal, heces e hisopos rectales. En este último caso esto es posible debido a que el número de bacterias excretadas es muy elevado; por lo tanto, con una pequeña cantidad de muestra se puede detectar el microorganismo, lo que hace que el método sea altamente sensible, como había sido informado por Jones *et al.*⁸

Una de las ventajas de detectar *L. intracellularis* mediante la amplificación del ADN usando PCR, consiste en efectuar el diagnóstico de la enfermedad sin la necesidad de sacrificar al animal; además, las muestras de heces pueden mantenerse refrigeradas o congeladas, ya que no se requiere que las bacterias estén vivas. El tiempo que se requiere para efectuar el diagnóstico es de ocho horas, por lo que el resultado se puede obtener en un día. Por otra parte, se ha notificado que la técnica es muy específica. En este trabajo sólo se encontraron muestras positivas en las granjas donde se había diagnosticado clínicamente la enfermedad y además ésta se confirmó en una de las granjas por medio de hallazgos de lesiones macroscópicas y microscópicas que concuerdan con las señaladas para la ileítis en cerdos. En contraste, los animales de la granja en que no se observaban signos clínicos y no se había detectado a la necropsia lesiones sugerentes de la ileítis, fueron negativos en PCR.

La frecuencia de la enfermedad en México no se conoce, Stephano² informó que se encontraba en las granjas, pero debido a la dificultad del diagnóstico, no se ha podido precisar la frecuencia de granjas infectadas y dentro de éstas, cómo son los patrones de infección en los animales. En otros países, utilizando la técnica de PCR se ha encontrado que en aproximadamente 30% de las granjas muestreadas se puede detectar la bacteria y se asocia con pérdida de peso. Esto ha hecho que se considere a la ileítis como la segunda causa, después de las neumonías, de pérdidas en la industria porcina.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la PCR constituye una técnica

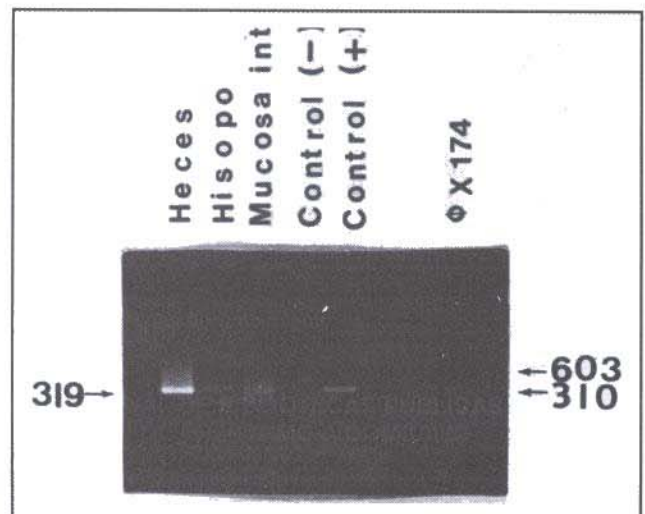


Figura 3. Amplificación específica de un producto de 319 pb a partir de ADN extraído de mucosa, heces e hisopo rectal de cerdos infectados de forma natural con *L. intracellularis*. Testigo negativo: mezcla de PCR sin ADN blanco; testigo positivo: mucosa infectada. 0X174 marcadores de tamaño. Los números indican el tamaño del producto de amplificación (izquierda) y de los marcadores (derecha), en pares de bases (pb).

simple y rápida para realizar el diagnóstico de ileítis porcina y servirá de base para determinar la frecuencia e importancia de esta enfermedad en las granjas en México.

Agradecimientos

Los autores agradecen a ELANCO de México, S.A. de C.V., y al PAIEPEME el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Gebhart CJ, Jones GF, McOrist S, Lawson G. Porcine proliferative enteropathy: etiology and pathogenesis. In: Cronje R, Allen D, editors. Lemman Swine Conference. Volume 20. St Paul (MN): Veterinarian Continuing Education and Extension, University of Minnesota, 1993:139-141.
2. Stephano HA. Enteropatía proliferativa porcina en México. En: Morilla GA, Correa GP, Stephano HA, editores. Avances en enfermedades del cerdo. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos A.C., 1985:393-397.
3. Rowland AC, Lawson GHK. Porcine proliferative enteropathies. In: Lemman AD, Straw BE, Mengeling WL, Allaire SA, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 7th ed. Ames (IA): Iowa State University Press, 1992:560-569.
4. McOrist S, Gebhart CJ, Boid R, Barns SM. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Sys Bacteriol* 1995;45:820-825.
5. Lawson GHK, McOrist S, Jasni S, Mackie RA. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance *in vitro*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1136-1142.
6. Lawson GHK, McOrist S, Rowland AC, McCartney E, Roberts L. Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: implications for aetiology and epidemiology. *Vet Rec* 1988;122:554-557.
7. Holyoake PK, Cutler RS, Cople IW, Monckton RP. Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring Ileal Symbiont Intracellularis-specific immunoglobulin G response in sera of pigs. *J Clin Microbiol* 1994;32:1980-1985.
8. Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, Ileal Symbiont Intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:2611-2615.
9. McOrist S, Gebhart CJ, Lawson GHK. Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol* 1994;41:205-212.
10. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495-503.
11. Gebhart CJ, Lin GF, McOrist SM, Lawson GHK, Murtaugh MP. Cloned DNA probes specific for the intracellular *Campylobacter*-like organism of porcine proliferative enteritis. *J Clin Microbiol* 1991;29:1011-1015.