



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE REACCION  
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), PARA LA  
DETECCION DE *Pasteurella multocida* TOXIGENICA

T E S I S  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
ARGEL ELOY SANCHEZ PEREZ

ASESORES: DR. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA  
DR. JOSE ABEL CIPRIAN CARRASCO  
DR. CARLOS PIJOAN AGUADE

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR),  
para la detección de Pasteurella multocida toxigénica.

que presenta el pasante: Argel Eloy Sánchez Pérez  
con número de cuenta: 09853953-0 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Junio de 2005

PRESIDENTE	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>QFI. Andrea A. Becerril Osnaya</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Martha P. Campos Peón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	

## AGRADECIMIENTOS

*A Tamia por su paciencia y apoyo en aquellos días de trabajo experimental, y por estar junto a mi en los buenos y malos momentos.*

*A Erik Solís Díaz por brindarme su amistad y demostrarme que la vida es de lucha constante al enfrentar los malos momentos con gran valor.*

*A Iztshef y Alma por brindarme su amistad y enseñarme algo nuevo cada día.*

*A mis sinodales por sus consejos para el mejorar este trabajo.*

*A la Dra. Susana por su gran calidad humana y por el deseo que me infunde a ser mejor cada día.*

*Al Dr. Abel por compartir sus conocimientos conmigo.*

*A la FES-C y todos mis amigos  
Silverio, Eric (manga), Alvaro, Iztshef, Alma, Diana, Erik, Cesáreo, Miriam,  
Nancy, Yola, Adolfo, Freddy, Betsabé, Enrique, Javier, Ivan, Ceci, Vladimir,  
Abigail, Angeles, Rocío, María Luisa, David Trujillo, Gabino, Alejandra,  
Angel, Cesar, Omar, Amnin y los que me faltaron...*

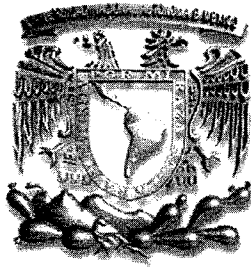
## DEDICATORIAS

*A mis padres Ana Lilia y  
Mauro, por brindarme su  
apoyo incondicional e  
infundir en mí la  
responsabilidad que conlleva  
al término de mi carrera  
universitaria.*

*A mis abuelos Maria Luisa y  
Ernesto por sus consejos y  
compartir sus vidas conmigo  
desde el inicio y término de  
mi vida universitaria.*

*A mi abuelo Mauro Sánchez  
Bonilla quien me guió por el  
buen camino al sembrar en mí  
el espíritu de trabajo,  
dedicación ... y compartir sus  
últimos años de vida conmigo*

*A mis hermanos Ana Lilia,  
Rosalia, Mauro y Belem por  
su paciencia, apoyo y  
comprensión durante todos  
estos años...*



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología y Microbiología,  
Coordinación General de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán, Campo I UNAM.

# INDICE

RESUMEN	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Importancia de Enfermedades Respiratorias</b>	<b>1</b>
1.1.1 Complejo Respiratorio	2
<b>1.2 Rinitis Atrófica</b>	<b>3</b>
1.2.1 Definición	4
1.2.2 Etiología	4
1.2.3 Patología	6
1.2.4 Diagnostico	9
1.2.4.1 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	9
1.2.4.2 <i>Pasteurella multocida</i>	9
1.2.5 Tratamiento	10
1.2.5.1 Vacunación	10
1.2.5.2 Medicación	11
1.2.6 Prevención	11
<b>1.3 Características Generales de <i>Pasteurella multocida</i></b>	<b>12</b>
1.3.1 Morfología	12
1.3.2 Antígenos	14
1.3.3 Toxinas	14
1.3.4 Material Extracromosomal	15
1.3.5 Adherencia	16
<b>1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Justificación</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo General</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Obtención y Acondicionamiento de Microorganismos</b>	<b>23</b>
3.1.1 Cultivo de <i>Pasteurella multocida</i>	23
3.1.2 Identificación de <i>Pasteurella multocida</i>	23
3.1.3 Tipificación de cepas de <i>Pasteurella multocida</i>	23
<b>3.2 Extracción y Cuantificación de DNA de <i>Pasteurella multocida</i></b>	<b>24</b>
3.2.1 Extracción de DNA por el Método de Fenol-Cloroformo	24
3.2.2 Cuantificación de DNA por espectrofotometría	24
<b>3.3 Iniciadores para PCR</b>	<b>25</b>
3.3.1 Dilución de Iniciador ToxA F	25
3.3.2 Dilución de Iniciador ToxA R	25
<b>3.4 Estandarización de PCR de <i>Pasteurella multocida</i></b>	<b>26</b>
3.4.1 Volumen de Reactivos de PCR	26
3.4.2 Parámetros de Amplificación	27
<b>3.5 Corrimiento Electroforético</b>	<b>27</b>
3.5.1 Producto Amplificación de DNA	27
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Cepas de Microorganismos</b>	<b>28</b>
4.1.1 Identificación de <i>Pasteurella multocida</i>	28
4.1.2 Tipificación de cepas de <i>Pasteurella multocida</i>	28

<b>4.2 Extracción y Cuantificación de DNA de <i>Pasteurella multocida</i></b>	<b>29</b>
4.2.1 Extracción de DNA por el Método de Fenol-Cloroformo	29
4.2.2 Cuantificación de DNA por espectrofotometría	30
<b>4.3 Especificidad de los Iniciadores</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Estandarización de PCR para <i>Pasteurella multocida</i> Toxigénica</b>	<b>32</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>38</b>
<b>8. APÉNDICE</b>	<b>42</b>
<b>A. Iniciadores</b>	<b>42</b>
<b>B. Volúmenes de Reacción</b>	<b>44</b>
<b>C. Secuencia de Nucleótidos del Gen ToxA</b>	<b>45</b>
<b>D. Marcador de Peso Molecular</b>	<b>46</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS.

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BAAR	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
BHI	Infusión Cerebro Corazón
DNT	Dermonecrotoxina
dNTP's	Deoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetracético
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NPAR	Rinitis Atrófica No Progresiva
p/v	Peso/Volumen
PAR	Rinitis Atrófica Progresiva
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
RA	Rinitis Atrófica
rpm	Revoluciones Por Minuto
TAE	Tris-Acetato
U	Unidades
UI	Unidades Internacionales
V	Volts
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

# INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

- Tabla No. 1 Enfermedades del Sistema Respiratorio de los Porcinos
- Tabla No. 2 Bacterias Involucradas en el Complejo Respiratorio
- Tabla No. 3 Factores que Influyen la Severidad de la Rinitis Atrófica
- Tabla No. 4 Criterios para Determinar el Grado de Lesión de Rinitis Atrófica Progresiva
- Tabla No. 5 Antibióticos utilizados contra *Pasteurella multocida*
- Tabla No. 6 Propiedades diferenciales de las especies de *Pasteurella*
- Tabla No. 7 Propiedades Fisicoquímicas de las toxinas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*
- Tabla No. 8 Concentración y volumen de reactivos para PCR
- Tabla No.9 Resultados de Pruebas realizadas a las cepas de *Pasteurella multocida*.
- Tabla No. 10 Absorbancias de las muestras de ADN de *Pasteurella multocida* tipo A y D
- Tabla No 11. Concentración de las muestras de ADN de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y D

## FIGURAS

- Figura No.1 Cerdo de 15 semanas con Rinitis Atrófica Progresiva (PAR), mostrando una severa desviación lateral del morro
- Figura No.2 Corte transversal del hocico de un cerdo sano (grado 0), donde se puede observar la anatomía normal de los cornetes que llenan la cavidad nasal, el septo en posición simétrica y derecho.
- Figura No.3 Corte transversal del hocico de un cerdo negativo a rinitis atrófica progresiva (grado 1). Muestra ligera atrofia o morfología anormal del cornete ventral (atrofia escasa)
- Figura No.4 Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 2). Se observa atrofia de uno de los cornetes ventrales y ligera degeneración en los dorsales.
- Figura No.5 Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 3). Donde se observa atrofia de ambos cornetes ventrales.
- Figura No.6 Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 4). Donde se observa atrofia de uno de los cornetes ventrales y ligera degeneración en los ventrales y dorsales.
- Figura No.7 Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 4). Donde se observa pérdida completa del cornete
- Figura No.8 Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. En el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular Marker XIII, en los carriles 2 al 4 son muestras de *Pasteurella multocida* tipo A con tres alícuotas diferentes, en los carriles 5 al 7 son muestras de *Pasteurella multocida* tipo D con tres alícuotas diferentes.
- Figura No.9 Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio 50 µg/ml. En los carriles 1 al 3 son muestras de ADN de las bacterias *Pasteurella multocida* tipo A y D y *Haemophilus parasuis* respectivamente, en los carriles 4 al 6 son productos de amplificación de acuerdo con el orden de las bacterias anteriores, en el carril 7 se muestra el control negativo de la amplificación.
- Figura No. 10 Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio 50 µg/ml. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Marker XIII, en el carril 2 se encuentra la muestra de ADN de *Pasteurella multocida* tipo D utilizada, en el carril 3 se observa el producto de amplificación de la misma cepa y en el carril 4 se muestra el control negativo de la amplificación.
- Figura No.11 Secuencia completa de nucleótidos del gen de la toxina de *Pasteurella multocida*.

## RESUMEN

La utilización de una técnica rápida y confiable como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para detectar el gen responsable de la dermonecrotina (DNT) de *Pasteurella multocida* toxigénica, es el objetivo principal del estudio.

Las cepas utilizadas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D, obtenidas del cepario del Laboratorio de Virología del departamento de Microbiología de la Coordinación General de Estudios de Posgrado FES Cuautitlán Campo I, fueron identificadas con pruebas bioquímicas y tipificadas, para confirmar que eran dichas cepas.

La estandarización del ADN bacteriano se realizó con el método extracción por calentamiento y su purificación por el método Fenol-Cloroformo, obteniéndose buenos resultados, lo cual permitió controlar las variables de extracción y purificación. En el estudio se estimó la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos y su cuantificación por medio de espectrofotometría, posteriormente las muestras de ADN se concentraron a 50 µg/ml.

Se llevó a cabo la especificidad de los iniciadores probando con las cepas de *Pasteurella multocida* no toxigénica tipo A, *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D, y *Haemophilus parasuis*, en donde no se encontró amplificación de alguna banda a excepción de la cepa toxigénica.

Por último se estandarizó la técnica de PCR para la detección del gen responsable de la dermonecrotina, obteniéndose buenos resultados, al detectar en el gel de agarosa una banda de aproximadamente 865 pb correspondiente al fragmento amplificado del gen ToxA, de una cepa de *Pasteurella multocida* toxigénica.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia de Enfermedades Respiratorias

En granjas porcinas donde existen sistemas intensivos de producción o simplemente instalaciones que operan en condiciones inadecuadas, desarrollan un medio ambiente desfavorable para los animales, dando lugar a una alta concentración de contaminantes (microorganismos, gases y polvo).

Aunque algunos estudios sugieren que los cerdos toleran bastante bien la mala calidad del aire, se ha visto que estos contaminantes alteran directamente sus reacciones metabólicas o afectan indirectamente su salud (Hollis, 2004).

En un estudio realizado en México (1999), se demostró que el 53.5 % de las enfermedades de los porcinos corresponde a afecciones del sistema respiratorio, seguidas por un 23.3 % del sistema digestivo, 17.8 % del sistema nervioso y 5.5 % de otros sistemas. Las lesiones del aparato respiratorio reportadas fueron diversas (Tabla No.1). Destacando 82.6 % asociadas a bacterias, seguidas por 16 % asociadas a virus y 1.4 % de origen parasitario (Torres y Ramírez, 1999).

Tabla No.1 Enfermedades del Sistema Respiratorio de los Porcinos\*

Diagnostico	Porcentaje
Rinitis Atrófica	3.7
Bronconeumonía linfoproliferativa sugestivo de <i>Mycoplasma spp</i> y bacterias secundarias	23.5
Bronconeumonía purulenta por <i>Pasteurella multocida</i>	11.2
Bronconeumonía purulenta	20.4
Pleuroneumonía fibrino-necrotica por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	11.9
Neumonía supurativa por <i>Actinomyces pyogenes</i>	2.0
Neumonía supurativa por <i>Streptococcus</i> $\alpha$ hemolítico	1.7
Neumonía fibrinopurulenta	6.8
Neumonía granulomatosa (negativo a BAAR)	1.4
Neumonía intersticial sugestiva de una infección viral	15.9
Neumonía por <i>Metastrongylus spp</i>	1.4

\* Torres y Ramírez, (1999)

Aunque el sistema respiratorio del cerdo puede eliminar normalmente las bacterias que respira y mantener sus pulmones relativamente estériles, la exposición a estrés ambiental puede deprimir este proceso y dejar a los cerdos predispuestos a infecciones respiratorias (Hollis, 2004).

Estudios epidemiológicos de este tipo de infecciones muestran que existen factores ambientales que interaccionan con las condiciones de instalaciones y con la edad de los animales, mostrando diferentes relaciones en la tasa de crecimiento, eficiencia alimentaria y la severidad de las lesiones o en casos mas severos produciendo la muerte del animal (Roth, 2001).

El conocimiento de los procesos patológicos que afectan la función respiratoria de los porcinos ha incrementado notablemente la redituabilidad de las empresas. Por esta razón los esfuerzos van encaminados a controlar el efecto de las enfermedades por medio de sistemas de manejo y producción que se han desarrollado con el objetivo principal de evitar el efecto negativo de la enfermedad (Iglesias y Trujano, 2000).

#### 1.1.1 Complejo Respiratorio Porcino

El complejo respiratorio de los cerdos sigue siendo una de las principales preocupaciones en la industria porcina, nacional e internacional, debido al efecto negativo que tiene sobre los costos de producción por concepto de mortalidad, tratamientos, disminución en la ganancia diaria de peso y aumento en la conversión alimenticia.

En México el complejo respiratorio se encuentra asociado a la presencia de organismos patógenos como bacterias, micoplasmas y virus; clasificados de acuerdo a su virulencia y patogenicidad en primarios y secundarios (Torres y cols., 2000).

Tabla No. 2 Bacterias Involucradas en el Complejo Respiratorio\*

Patógenos Primarios	Patógenos Secundarios
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Haemophilus parasuis</i>
	<i>Streptococcus suis</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
	<i>Actinomyces pyogenes</i>

\* Torres y Cols., (2000)

En consecuencia el conocimiento del control y prevención del complejo respiratorio, es la mejor manera de mantener la granja con fundamentos de bioseguridad, manteniendo un estatus sanitario de la población mediante el uso de biológicos específicos para los microorganismos involucrados en el complejo respiratorio de cada granja (Estrada, 1997)

## 1.2 Rinitis Atrófica

Es una enfermedad específica de cerdos reconocida hace más de 170 años y descrita por vez primera como "*Schnüffelkrankheit*" en Alemania por Franque (1830). Es una enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior de cerdos caracterizándose clínicamente por la atrofia total o parcial de los cornetes nasales ventrales, desviación del septo nasal y deformación facial con formación de pliegues cutáneos en la zona nasal ver Figura 1. Los síntomas agudos de la RA acostumbra a aparecer entre las 3 y las 8 semanas de edad; sin embargo, los lechones pueden infectarse a cualquier edad e incluso afectar a animales adultos (de Jong, 1999).

La rinitis atrófica (RA) es una enfermedad insidiosa que, aunque no siempre provoca un cuadro clínico grave ni bajas, causa una marcada reducción del peso, raquitismo y por lo tanto tamaño corporal pequeño.



Figura No.1 Cerdo de 15 semanas con Rinitis Atrófica Progresiva (PAR), mostrando una severa desviación lateral del morro

### 1.2.1 Definición

El término Rinitis Atrófica (AR) es asociado por los granjeros a cualquier rinitis producida por diferentes agentes etiológicos. Sin embargo el término Rinitis Atrófica Progresiva por sus siglas en inglés PAR es exclusivo para la enfermedad producida por el agente etiológico, *Pasteurella multocida* toxigénica. Pedersen y Nielsen en 1983, recomendaron el uso de este término como resultado de las deliberaciones de la Comisión de Especialistas en PAR, de la Comunidad Económica Europea. En un acuerdo realizado en 1988 entre especialistas de enfermedades de los cerdos de Europa, norte y sur de América y Asia, definieron PAR a la enfermedad causada por la infección con *Pasteurella multocida* toxigénica. En donde las manadas de cerdos presentan manifestaciones sospechosas tales como estornudo, sangrado de la nariz, deformación del morro, retraso de crecimiento, atrofia del cornete, y desviación del tabique y donde *Pasteurella multocida* toxigénica es detectada en el laboratorio (de Jong, 1999).

En consecuencia esta enfermedad es clasificada como Rinitis Atrófica No Progresiva (NPAR), causada por *Bordetella bronchiseptica* toxigénica y Rinitis Atrófica Progresiva (PAR), causada por *Pasteurella multocida* toxigénica sola o conjuntamente con otros agentes biológicos, físicos y químicos (de Jong, 1999).

### 1.2.2 Etiología

Esta enfermedad se produce como consecuencia de diferentes factores ambientales, sin embargo la investigación sugiere que las cepas toxigénicas de *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*, son los agentes infecciosos primarios de NPAR y PAR respectivamente.

Los casos más severos de esta enfermedad solo se presenta en PAR que es atribuida específicamente a la colonización de la cavidad nasal del cerdo por cepas de *Pasteurella multocida*. Sin embargo aunque exista una asociación con *Bordetella bronchiseptica* toxigénica, la NPAR por si sola es considerada de menor importancia o insignificante en el crecimiento en cerdos, pero es el elemento crítico de control de *P. multocida* por que se puede controlar la infección previa por *Bordetella* (Ciprián y cols., 1994).

Las condiciones necesarias para la colonización y crecimiento de *Pasteurella multocida* y/o *Bordetella bronchiseptica* es la producción de suficientes cantidades de toxina que esta

influenciada por el daño bacteriano o viral de la mucosa y cuando interaccionan factores como el sistema de producción, manejo, medio ambiente y nutrición, dando origen a una enfermedad compleja o multifactorial. Cuando todos estos factores están presentes, puede resultar la PAR clínicamente muy severa (de Jong, 1999).

La severidad de la enfermedad que se desarrolla en los cerdos se relaciona con la cantidad de una o ambas toxinas absorbidas por el animal. La susceptibilidad de los cerdos a cierta cantidad de toxina que causa la reducción del hueso en el cornete ha demostrado una relación con la edad del animal. Las cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida* producen la severidad de Rinitis Atrófica Progresiva, incluyendo un extremo retraso en el crecimiento, incluso en cerdos de más de 3 meses de edad; mientras que las cepas toxigénicas de *Bordetella bronchiseptica* producen hipoplasia en el cornete solo en cerdos hasta 6 semanas de edad (de Jong, 1999).

Se ha demostrado la presencia de PAR después de dosificar la toxina de *Pasteurella multocida*, esto indica que la colonización de *Pasteurella multocida* toxigénica en el cornete no es necesaria para el desarrollo de la enfermedad, sin embargo existen otros lugares anatómicos como los pulmones y tonsilas que pueden ser considerados para producir toxinas (Ackermann y cols., 1994).

Es importante distinguir el agente de *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* como NPAR y PAR respectivamente, ya que estos agentes infecciosos tienen impactos económicos totalmente diferentes en la producción de cerdos, y requieren diversos métodos y estrategias para la prevención y tratamiento.

A pesar del papel principal de los agentes infecciosos, otros factores contribuyen a la causa o por lo menos a la expresión clínica de RA. Estos factores están asociados con métodos de producción intensa, traslado de animales del aire libre a condiciones cerradas, el flujo continuo de animales, una ventilación reducida o inadecuada y niveles elevados de polvo o gases nocivos (como el amoníaco), intensifican la RA y contribuyen a la propagación de la enfermedad (Hamilton y cols., 1996). También se ha observado manifestarse RA con mayor gravedad en primavera y verano. La genética puede tener algún papel en la susceptibilidad a la infección y hay factores nutricionales que pueden influir en la gravedad de la enfermedad (Smith y Giles 1980). Penny (1977) identifico algunos factores predisponentes en la severidad de la AR (Tabla No.3).



Tabla No. 3 Factores que Influyen la Severidad de la Rinitis Atrófica\*

INCREMENTO	DECREMENTO
Grandes explotaciones	Pequeñas explotaciones
Ciclos abiertos	Ciclos cerrados
Explotaciones en crecimiento	Censos estables
Alto porcentaje de primerizas	Cerdas viejas
Salas de maternidad grandes	Salas pequeñas
Destetes múltiples	Destetes sencillos
Transiciones grandes	Sistemas modulares mas aislados
Gran numero de animales por sala	Bajo numero de animales por sala
Destete en grupos	Destete en camadas
Frecuencia de movimiento y mezclado	Poco movimiento y no mezclado
Sistemas intensivos cerrados de producción	Sistemas extensivos "aire libre"
Alta densidad de animales	Baja densidad de animales
Temperatura y ventilación deficiente	Control de temperatura y buena ventilación
Higiene y desinfección deficiente	Higiene y desinfección adecuada
Introducción continua de animales	Descanso de las instalaciones
Alimentación seca y atmósfera polvorienta	Alimentación húmeda y atmósfera limpia

\* Penny, (1977)

### 1.2.3 Patología

En granjas con problemas de RA, los signos pueden observarse en cerdos de todas las categorías, pero son más aparatosos en los animales de los destetes. Son perceptibles ruidos respiratorios anormales, particularmente inspiratorios, se escuchan estornudos y tos en forma exagerada. Los animales evidencian un lagrimeo constante, muchas veces asociado a conjuntivitis, con presencia de material seropurulento condensado en las comisuras oculares y el pelo de la cara se ve aglomerado en el trayecto del escurrimiento lacrimal. La presencia de exudados nasales abundantes, seropurulentos (amarillo-grisáceo), son un indicador constante de la presencia de rinitis. Ocasionalmente, en animales gravemente afectados, puede ocurrir la observación de descargas nasales hemorrágicas y la magnitud se puede determinar por la desviación del hocico y/o acortamiento anormal de la mandíbula conocido como branquignatia, según sea unilateral o bilateral. Como consecuencia de las alteraciones en la base ósea del hocico, la piel se presenta fuertemente plegada (Ciprián y cols., 1994).

Para evaluar el grado de lesión en animales muertos por cualquier causa o sacrificados en el rastro, se realiza un corte transversal en el maxilar superior, a la altura del segundo premolar, es necesario recordar aquí que el primer premolar aparece en animales de mas de

un año, por lo que la mayoría de los casos, excepto hembras reproductoras o sementales, se debe considerar el corte a la altura del primer premolar visible, detrás de los colmillos. Este corte permite visualizar con mayor claridad y comparar los cornetes izquierdos con los derechos, en busca de la existencia de asimetría, reducción del tamaño y espesor entre ellos para poder diagnosticar las formas leves de la enfermedad, particularmente la situación de los cornetes ventrales, por ser los primeros y más constantemente afectados (Ciprián y cols. 1994; Torres y cols., 2000).

Straw (1986) clasifico la intensidad o severidad de las lesiones por grados, sin que exista un acuerdo en la clasificación ver Tabla No. 4 y Figuras 2, 3, 4, 5 y 6.

Tabla No. 4 Criterios para Determinar el Grado de Lesión de Rinitis Atrófica Progresiva\*

Espacio de los cornetes nasales (mm)	Grado	Interpretación	Descripción
0 - 2	-1	Negativo	Estructura anatómica sin cambios patológicos aparentes.
3 - 6	0	Normal	Los cornetes llenan la cavidad nasal. Septo en posición simétrica y derecho.
7 - 9	1	Negativo	Ligera atrofia, morfología anormal del cornete ventral.
10 - 12	2	Sospechoso	Atrofia leve de uno o ambos cornetes ventrales con cornetes dorsales normales o con ligera atrofia.
13 - 16	3	Atrofia Moderada	Moderada atrofia en cornetes ventrales, usualmente involucrados los cornetes dorsales.
17 - 20	4	Atrofia Marcada	Atrofia marcada de cornetes dorsales y ventrales, sustitución fibrosa de cornetes ventrales.
20 o más	5	Atrofia Severa	Pérdida completa de cornetes (solo vestigios) y/o atrofia de cornetes dorsales.

\* De acuerdo a Straw

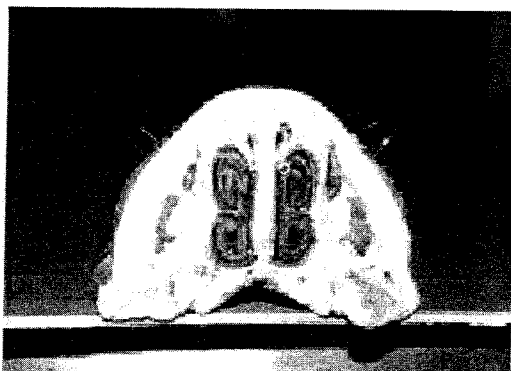


Figura 2. - Corte transversal del hocico de un cerdo sano (grado 0), donde se puede observar la anatomía normal de los cornetes que llenan la cavidad nasal, el septo en posición simétrica y derecho.



Figura 3. - Corte transversal del hocico de un cerdo negativo a rinitis atrófica progresiva (grado 1). muestra ligera atrofia o morfología anormal del cornete ventral (atrofia escasa).

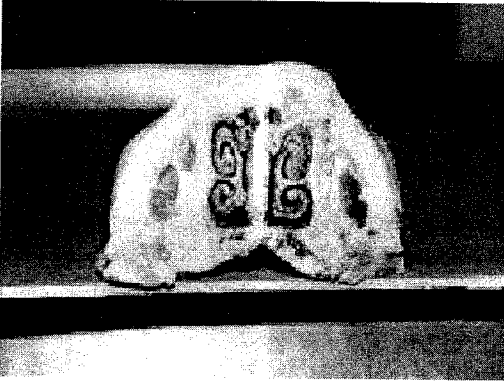


Figura 4.- Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 2), se observa atrofia de uno de los cornetes ventrales y ligera degeneración en los dorsales.



Figura 5.- Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 3), donde se observa atrofia de ambos cornetes ventrales.

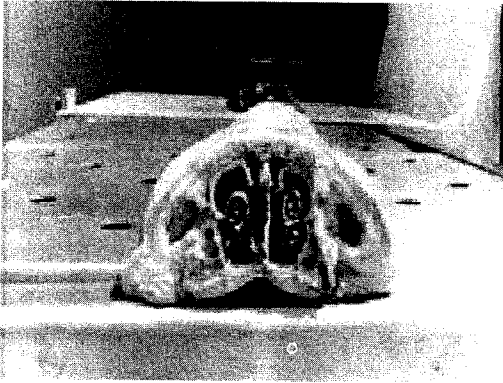


Figura 6.- Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 4), donde se observa atrofia de uno de los cornetes ventrales y ligera degeneración en los ventrales y dorsales.



Figura 7.- Corte transversal del hocico de un cerdo que presenta rinitis atrófica progresiva (grado 5), donde se observa pérdida completa de cornetes.

La patología microscópica permite caracterizar los efectos de las toxinas bacterianas, sobre los procesos de formación y remodelación ósea. Los cambios sugerentes de una mayor remoción ósea, se soportan en la observación de un número aumentado de osteoclastos en el campo microscópico, estas células gigantes, multinucleadas, de citoplasma ácido filo, son fácilmente reconocibles; así como en la presencia de grandes espacios lacunares en la matriz ósea, asociados o no a los osteoclastos, y en los que no se observan osteoblastos o estos se presentan claramente dañados. Estudios de microscopía electrónica, han indicado sin embargo la observación de diferentes alteraciones en los organelos de los osteoblastos expuestos a las toxinas de *Pasteurella multocida*, por lo que,

aun con ciertas reservas, existe evidencia de que la actividad de formación ósea estaría afectada en la enfermedad. Una forma de evaluar la actividad osteoblástica en cortes de parafina es emplear la técnica histoquímica de PAS, que colorea en forma específica la sustancia osteoide (glucoproteína) sintetizada por los osteoblastos. Por todo lo anterior se consideran a las toxinas estar afectando los procesos de síntesis ósea, lesionando a los osteoblastos, como promoviendo los mecanismos de resorción ósea, con activación de osteoblastos. Ambos procesos son por otra parte, difícilmente separables entre si y la activación de uno actúa negativamente sobre el otro y viceversa. La observación de lesiones microscópicas indicativas de inflamación, cambios vasculares y exudados celulares, no son significativas y su presencia y características son variables según el momento en que se toma la muestra. Igualmente se consideran poco significativos los cambios que pudieran ocurrir en el epitelio (hiperplasia, metaplasia) o en las células de las glándulas de la mucosa. Sin embargo el examen, principalmente de estas últimas células debe realizarse con cuidado ante la posibilidad de una rinitis por cuerpos de inclusión, ocasionada por un citomegalovirus que produce cuerpos de inclusión basófilos intranucleares y que afecta a lechones con alta morbilidad, esta enfermedad ya ha sido diagnosticada en México y puede actuar como factor predisponente a RA. En su forma de viremia esta enfermedad puede determinar alta mortalidad en lechones (Ciprián y cols., 1994).

#### 1.2.4 Diagnostico

##### 1.2.4.1 *Bordetella bronchiseptica*

Un diagnostico definitivo de Bordetellosis en cerdos es solo posible por medio de bacteriología en pulmones postmortem o lavados de ellos y secreciones nasales. El crecimiento de estos microorganismos se realiza en agar sangre o MacConkey con una adición de 1 % de glucosa, o medios selectivos (de Jong y Borts 1985). Investigaciones por Giles y Smith en 1983, detallaron y demostraron la interpretación de resultados de métodos empleados para la obtención de antígenos específicos de *Bordetella bronchiseptica*, por lo cual utilizaron la serología como otra forma de diagnosticar una infección.

##### 1.2.4.2 *Pasteurella multocida*

El diagnostico de la PAR, no solamente se basa en observaciones clínicas o morfológicas de lesiones, si no también requiere la identificación de *Pasteurella multocida* utilizando pruebas de laboratorio como son: microbiológicas (MacFaddin, 2000), serológicas

(Pedersen, 1983; Foget y cols., 1988) y actualmente las técnicas basadas en la PCR (Hunt y cols., 2000; Choi y Chae, 2001; Lichtensteiger y cols., 1996). La prueba serológica de ELISA puede detectar anticuerpos antitoxina de *P. multocida* pero no se puede utilizar en animales vacunados, ya que existe reacción cruzada. Estos anticuerpos, son poco inmunógenos y en algunos cerdos se manifiestan pasados unos meses tras la infección.

Sin embargo es muy importante saber la prevalencia de la enfermedad en la granja por este agente infeccioso, por lo tanto el diagnostico postmortem nos permitirá conocer la severidad de la atrofia de los cornetes.

#### 1.2.5 Tratamiento

El tratamiento efectivo de un brote de NPAR y PAR requiere de la combinación de la vacunación y medicación, que no es igualmente aplicable a todas las manadas afectadas. Todos los tratamientos están dirigidos a: 1) Reducir la prevalencia y la carga de las infecciones bacterianas específicas importantes (Bordetellosis y Pasteurellosis) en cerdos jóvenes por la vacunación de la hembra, medicación en la alimentación y tratamiento de antibióticos a los lechones; 2) Para tratar cerdos en desarrollo con una rinitis aguda para reducir la infección bacteriana y la severidad de la hipoplasia y para mantener un crecimiento eficiente y utilización del alimento; 3) Mejorar el medio ambiente de los animales evitando estrés ambiental (de Jong y Bartelse, 1980).

##### 1.2.5.1 Vacunación

La mayoría de las vacunas están basadas en la presencia de bacterias inactivadas de *Pasteurella* y *Bordetella* más una cantidad variable de toxoide. Estas vacunas compuestas son efectivas para controlar los efectos a largo plazo de la infección, ya que el toxoide puro no evita la colonización del epitelio nasal, esto en particular es cierto para *Bordetella bronchiseptica* ya que reduciendo la colonización o adherencia de esta bacteria, se reduce la infección por *Pasteurella multocida* (Foged y cols., 1989).

Foreman (1991), encontró que los hatos endémicamente afectados por RA la vacunación con células completas inactivadas de *Pasteurella multocida* tipo A y D y *Bordetella bronchiseptica* no protegido con la cantidad de anticuerpos circulantes para estos organismos en los hatos de cuestión, confirmando la necesidad del uso del toxoide para evitar el desarrollo de la atrofia del cornete (Ciprián y cols., 1994).

### 1.2.5.2 Medicación

Muchos antibióticos no son bien absorbidos por el tracto gastrointestinal, por lo que la administración oral de antibióticos no es de mucho valor en el tratamiento de infecciones sistémicas, además que los animales enfermos no comen; dando como resultado imposible conseguir un nivel adecuado del antibiótico en animales enfermos, sí el fármaco es administrado en el alimento. Sin embargo la utilización de sulfas con trimetoprima (12.5 mg/kg sulfadoxina + 2.5 mg/kg trimetoprima) es la mejor elección, sí Bordetellosis es la infección principal en lechones de cría. Inyecciones de oxytetraciclina (20-80 mg/kg) una o dos veces por semana es eficaz para PAR (de Jong y Oosterwoud, 1977; Mefford, 1983).

Otros antibióticos a los cuales *Pasteurella multocida* puede ser sensible y que se utilizan con frecuencia en concentraciones terapéuticas contra neumonía y Pasteurellosis están incluidas en la Tabla No.5

Tabla No. 5 Antibióticos utilizados contra *Pasteurella multocida*\*

Fármaco	Concentración
Penicilina /Estreptomicina	20,000 UI/10 – 25 mg/kg
Tylosin	10 – 25 mg/kg
Lincomicina/Spectinomycin	50 / 100 mg/kg
Ampicilina	10 – 20 mg/kg
Amoxicilina	10 – 20 mg/kg
Spiramycin	25 mg/kg
Derivados de Quinolonas	0.5 – 5 mg/kg
Cefalosporinas	1 – 5 mg/kg
Tiamulin	10 – 20 mg/kg

\* Ciprián y Cols., (1994)

Los beneficios de los tratamientos no han sido evaluados críticamente hasta la protección y/o eliminación nasal o pulmonar de *Pasteurella multocida*.

### 1.2.6 Prevención

La entrada constante de hembras es uno de los problemas centrales de todos los sistemas de producción de cerdos, resaltó el doctor Carlos Pijoan Aguade (2004). Por ello, propuso un sistema de producción denominado multisitios, en donde las áreas de gestación y parto, destete y engorda estén en sitios e incluso en granjas separadas. Este proceso evita la entrada de microorganismos, pues una vez que el animal ha concluido su ciclo es trasladado a otro lugar, lo cual permite que la granja se limpie y desinfecte para el ingreso de

un nuevo grupo de animales. Con este sistema se realiza un destete segregado, en el cual los lechones son separados de las madres antes de que se infecten, pues son ellas las que transmiten bacterias y virus. Al implementar este método, han desaparecido padecimientos como la pleuroneumonía contagiosa, rinitis atrófica y disentería; otros casos como la enfermedad de Aujeszky y el cólera incluso han sido erradicados; sin embargo, otros males como micoplasma cambiaron su epidemiología y aparecieron nuevas enfermedades como el Síndrome Respiratorio.

### **1.3 Características Generales de *Pasteurella multocida***

Ha pasado un poco más de un siglo desde que Louis Pasteur en 1880, aisló por primera vez, un microorganismo que lleva su nombre, *Pasteurella multocida*. Durante este tiempo, ha habido una considerable investigación sobre mecanismos de la inmunidad, predilección del huésped, la virulencia y la patogénesis que ha dado lugar solamente a aumentos muy pequeños en nuestra comprensión del organismo, hasta hace más de una década que no había caracterización extensa de este organismo en el nivel molecular (Hunt y cols., 2000).

Las bacterias que pertenecen a la familia de *Pasteurellaceae* se caracterizan principalmente por tener un alto grado de la especificidad hacia el huésped, en esta familia está incluido el género *Pasteurella* que en la actualidad tiene 20 especies que son, fundamentalmente, microorganismos patógenos de animales y que en ocasiones causan infecciones en el hombre transmitidos por animales caseros (Donnio y cols., 2004)

#### **1.3.1 Morfología**

*Pasteurella multocida* es un cocobacilo pequeño, de aproximadamente 1 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho. La morfología de estos microorganismos es variable, si son aislados del tracto respiratorio superior de animales clínicamente sanos se observan como bacilos relativamente largos, que miden aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de longitud y 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho.

Las pruebas bioquímicas para identificar este género y diferenciar especies se presentan en la Tabla No.6.

Tabla No. 6 Propiedades diferenciales de las especies de *Pasteurella*\*

Prueba	<i>P. aerogenes</i>	<i>P. anatis</i>	<i>P. avium</i>	<i>P. bettyae</i>	<i>P. caballi</i> <sup>a</sup>	<i>P. canis</i>	<i>P. dagmatis</i>	<i>P. gallinarum</i>	<i>P. langaeensis</i>	<i>P. lymphangitidis</i>	<i>P. mairii</i>	<i>P. multocida subesp gallicida</i>	<i>P. multocida subesp multocida</i>	<i>P. multocida subesp septica</i>	<i>P. pneumotropica</i>	<i>P. stomatis</i>	<i>P. testudinis</i>	<i>P. trehalosi</i>	<i>P. volantium</i>
Catalasa	+	+	+	V	-	+	+	+	-	+	V	+	+	+	+	+	+	-	+
Oxidasa	V	+ <sup>w</sup>	+	+	+	+	+	+	+ <sup>w</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	+	NR	-	NR	NR	NR	NR	V'	NR	NR	NR	+	+	+	V'	NR	-	NR	NR
MacConkey (MAC)	G	G <sup>w</sup>	NG	V	NG	NG	NG	NG	NG	V	V	V	V	V	V	NG	V	G	NG
β-hemólisis, 5% SBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+	V'	-
HIDRATOS DE CARBONO																			
Glucosa	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A <sup>b</sup>	A
Lactosa	V	A <sup>b</sup>	-	-	A <sup>b</sup>	-	-	-	A <sup>b</sup>	-	V	-	-	-	V	-	V	-	V <sup>w</sup>
Adonitol	-	NR	-	NR	-	-	-	-	-	NR	NR	V	V	V	V	-	NR	NR	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	V	-	-	V	-	V	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
Dextrina	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	A	NR	NR	NR	V	V	V	V	NR	V	NR	NR
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	V	V	V	V	NR	NR	NR	NR
Fructosa	NR	NR	A	NR	A	A	A	A	NR	A	A	A	A	A	A	A	NR	NR	A
Galactosa	A	A	A <sup>b</sup>	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V'	-	NR
Glicerol	A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	V	V	V	V'	NR	-	NR	NR
Inositol	V	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V	-	A <sup>b</sup>	V	NR
Inulina	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	NR	V	V	V	-	NR	-	NR	NR
Maltosa	A	-	-	V	V	-	A	A	A	V	V	-	-	V	V	-	V'	A	A
Manitol	V	A	-	-	A	-	-	-	A	A	V'	A	A	V'	-	-	V	A	A
Manosa	A	A	A <sup>b</sup>	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	A	NR
Melibiosia	V	-	-	-	NR	A	-	-	-	A	-	NR	NR	V	V	-	A	V'	NR
Rafinosa	V	A <sup>w</sup>	-	-	V	-	A	V'	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	NR
Ramnosa	V	NR	-	NR	V	-	-	-	-	NR	NR	V	V	V	V	-	A	NR	-
Ribosa	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	A	NR	NR	NR	NR
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	V	-	V	V	NR
Sorbitol	V	-	-	-	V	-	-	V	-	A	V	A	-	A	-	-	V	A	V
Sorbosa	NR	NR	-	NR	NR	-	-	-	-	NR	NR	V	V	V	-	-	NR	NR	-
Sacarosa	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	NR
Trehalosa	-	A	A	-	-	V	A	A	A	V	-	A	V	V'	A	A	V	A	A
Xilosa	A	A	V	-	V	V'	-	V	-	-	A	A	A	V	V	-	A	-	V
OTRAS PRUEBAS																			
Indol	V	-	-	-	-	V <sup>w</sup>	+	-	-	-	-	+	+	V'	+	+ <sup>w</sup>	+	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	+	V	-
Arginina deshidrolasa	-	NR	-	NR	-	-	-	-	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-	NR	-
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-	NR	-
Ornitina descarboxilasa	V	-	-	-	V	+	-	-	-	-	V'	+	+	V	+	-	-	-	V
Licuefacción de la gelatina, 22 °C	-	NR	-	NR	-	-	-	-	NR	NR	NR	-	-	-	V	-	-	NR	-
ONPG	V	+	-	-	+	-	-	-	+	-	V	-	-	-	+	-	-	V'	+
Fosfatasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rojo de Metilo (MR)	-	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	NR	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR
Voges-Proskauer (VP)	-	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	NR	-	-	-	-	NR	-	NR	NR
Ureasa	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Requerimiento de Factor V (NAD)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	-	-	-	NR	NR	NR	NR
Requerimiento de factor X	-	NR	-	NR	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

\* MacFaddin, (2000).

G, crecimiento; NG, sin crecimiento; NR, no se dispone de resultados; V, reacciones variables; V', variable, por lo general positivo; V, variable, por lo general negativo; w, reacción débil; SBA, agar con sangre de oveja; factor X, protoporfina IX o protohem; factor V, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o NAD fosfato (NADP); <sup>a</sup> El 76% de las cepas produce pigmento amarillo; <sup>b</sup> La reacción positiva puede ser tardía.



### 1.3.2 Antígenos

La mayoría de las cepas de *Pasteurella multocida* poseen en su superficie polisacáridos capsulares altamente hidratados, ligados a bacteria covalentemente por moléculas de fosfolípidos. Los polisacáridos compuestos por repeticiones de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos y con variaciones en el contenido, orden y estructura, forman una alta diversidad de configuraciones. Esta diversidad capsular de polisacáridos es de gran importancia en la patogénesis de la enfermedad ya que provee de funciones importantes a los serotipos, como la resistencia a la desecación, una mejor adherencia al huésped, actividad antifagocitaria, resistencia a la acción del complemento (Boyce y cols, 2000),

Las diferencias serológicas clasifican a *Pasteurella multocida* en 5 serogrupos definidos como A, B, D, E y F los cuales son basados sobre los antígenos capsulares y en 16 serotipos somáticos. Estos serotipos generalmente son relacionado con la predilección de la enfermedad por ejemplo, los serogrupos B o E frecuentemente se asocian con hemorragia septicémica, el serogrupo A se relaciona frecuentemente con cólera aviario y el serogrupo A o D se asocia comúnmente rinitis atrófica sin encontrar una diferencia en la toxigenicidad en ambos serogrupos (Boyce y cols, 2000, Chul, y Hwan, 1985).

Los serotipos capsulares fueron determinados mediante estudios inmunológicos empleando pruebas de hemoaglutinación indirecta, autoaglutinación en presencia de acriflavina (Carter y Subroto, 1973) e inhibición de la formación capsular por hialuronidasa (Carter y Rundell, 1975). Actualmente se ha desarrollado una técnica molecular de PCR multiplex que sirve como alternativa rápida y altamente específica, para la identificación de los 5 serogrupos (Townsend y cols., 2001).

### 1.3.3 Toxinas

En Europa, se han demostrado las *Pasteurellas* aisladas de casos de rinitis atrófica pertenece al serotipo "D", y se caracterizan por producir toxinas que se identifican por medio de pruebas biológicas, con la producción de una lesión dermonecrótica (de Jong y Bartelse, 1980); letalidad en ratones (Rutter, 1983) y toxicidad de cultivos celulares. Por otro lado Nakai y cols., (1986), purificaron una toxina a partir de extractos obtenidos por sonicación de *Pasteurella multocida* tipo D (cepas SP-72 y 4745a) y *Bordetella bronchiseptica* (cepa L3), obteniendo los siguientes resultados:

Tabla No. 7 Propiedades Físicoquímicas de las toxinas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*

Propiedad	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
PM (kDa)	160	190
Punto isoeléctrico	4.7 – 4.8	6.5 – 6.6
Absorción a 280/269 nm	1.89	1.93

\* Ciprián y Cols., (1994)

Esto sugiere que se trata de glicoproteínas que tienen propiedades biológicas y actividades tóxicas similares, pero difieren en pruebas de neutralización cruzada.

En trabajos similares realizados por Niels y cols., se encontró que la DNT de *Pasteurella multocida* tipo D (cepa 45/78) obtenida de sobrenadantes tuvo un PM de 143 kDa y concluyendo ser similar en cuanto actividad biológica a la de *Bordetella bronchiseptica* pero diferente en propiedades químicas (Ciprián y cols., 1994). Ahora se sabe por análisis de la secuencia del gen ToxA con 4381 pb, que codifica para una proteína de 146.5 kDa (Petersen, 1990).

#### 1.3.4 Material Extracromosomal

En México, Mendoza (1985) aisló una exotoxina en los sobrenadantes de cultivos de 18 horas de *Pasteurella multocida*, los hallazgos hicieron pensar que la fracción de PM de 22,000 D fue la causante de la reacción dermonecrotóxica en la piel de cuyo (DNT positiva). Esta actividad se perdió con el tratamiento de tripsina, pepsina y elevación de la temperatura coincidiendo con resultados de Rutter (1983) y Van Der Heyden y cols., (1984), además de este trabajo la cepa control de *Pasteurella multocida* tipo D mostró tener un plásmido de alrededor de 5.2 kDa en geles de agarosa, esta banda parece ser responsable de la presencia (DNT) en el plásmido que dio una reacción dermonecrotóxica en la piel del cuyo en comparación con la cepa citada (tratada con 400 µg de naranja de acridina), no mostró la presencia del plásmido y no dio positividad a la reacción de la piel del cuyo. Además con la pérdida del material extracromosomal, se perdió la resistencia a varios antibióticos, lo que sugiere que estos factores están en el mismo plásmido. En un estudio se aislaron 58 cepas de *Pasteurella multocida* serotipo 3 de pavos y se encontró la presencia del plásmido R, en siete de estas cepas las cuales fueron resistentes a tetraciclina y ampicilina, codificada en ADN extracromosomal. En otro estudio con cinco cepas de *Pasteurella haemolytica*, sólo tres de ellas presentaron plásmido con resistencia hacia algunos antibióticos.

### 1.3.5 Adherencia

La rinitis atrófica es una enfermedad multifactorial muy compleja. Se sabe que tanto *Bordetella bronchiseptica* como *Pasteurella multocida*, son capaces de causar atrofia en los cornetes nasales de cerdos, pero la severidad y la persistencia de los cambios que se inducen son diferentes, sin embargo los cuadros clínicos más graves de RA se producen cuando la infección se inicia con *B. bronchiseptica* y va seguida de la invasión por *P. multocida* (Rutter y Rojas 1982). Esto constituye una evidencia de que la colonización y toxicidad, son los determinantes virulentos más importantes de estos microorganismos.

La colonización es esencial para la producción de lesiones en los cornetes, tanto microscópicas como macroscópicas y para persistencia de la infección "in situ"; más aún, la aplicación de un irritante como ácido acético, amoníaco han sido considerado como un requisito para la colonización de *Pasteurella multocida* lo que indica probablemente que *Pasteurella multocida* se encuentra como flora normal en la mucosa de cerdos. (Ciprián y cols., 1994, Hamilton y cols. 1996 y 1998).

La adherencia es una interacción compleja, de la bacteria y el epitelio nasal lo que permite la colonización y propicia que se exprese su patogenicidad y se desencadenen los mecanismos inmunológicos ya conocidos. Con respecto a esto Frymus y cols., (1986) observaron muy poca adherencia de *Pasteurella multocida* tipo D aisladas de epitelio nasal porcino en contraste con *Pasteurella multocida* tipo A que se adhirió en gran número a estas células traqueales, y mucho más eficiente colonizador si se le compara con *Bordetella bronchiseptica* aunque no existen estudios donde se compare la adherencia de un gran número de aislamientos de estos microorganismos, bajo las mismas condiciones experimentales. Jacques y cols., (1988) compararon 25 aislamientos de *Pasteurella multocida* reportando que su adhesión es significativamente seis veces menor a la de *Bordetella bronchiseptica* en estudios "in vivo".

Hasta ahora la información de las características de virulencia de *Pasteurella multocida* en tracto respiratorio superior o el proceso por medio del cual el organismo coloniza la mucosa nasal es poco conocido, Nakai y cols., (1986) demostraron que *Pasteurella multocida* no coloniza la mucosa nasal en cerdos sanos y cuando lo hace en lechones es de una manera diferente a *Bordetella bronchiseptica*. Posiblemente esto explique las diferencias que presentan ambas bacterias.

Nakai y cols., (1988) encontraron en un estudio de adherencia de estas bacterias, que las células epiteliales cultivadas "in vitro" el número de bacterias de *Bordetella bronchiseptica* adheridas por célula es aproximadamente 3 veces más alto en comparación a *Pasteurella multocida* y una mínima afinidad dista a la mucosa, se comprobó mediante microscopia electrónica observando que los fragmentos celulares a los cuales se adhirieron presentaron una estructura normal, mientras que los fragmentos colonizados por *Bordetella bronchiseptica* mostraron una marcada degeneración, escamación y severa reacción inflamatoria. Coincidiendo esto, con lo publicado por Nakai y cols., (1986) quienes cultivando fragmentos de epitelio nasal en un medio que contenía DNT de *Pasteurella* o *Bordetella* indujeron cambios morfológico semejantes a los producidos " in vivo " incrementando con esto la adherencia y colonización, lo que implica una disminución o no producción de DNT soportando la hipótesis previa de que *Bordetella bronchiseptica* induce rinitis atrófica aún en ausencia de *Pasteurella multocida*.

Varios autores (Kume y cols., 1988; Rivera y cols., 1986) han reportado la incapacidad de *Pasteurella* para atacar diferentes cultivos celulares, sugiriendo la ausencia de adhesinas en estos extractos, sin embargo algunas cepas de otras especies animales mostraron poseer fimbrias y un ataque más rápido a las células (Glorioso y cols., 1982). Fortin y Jacques (1987) reportaron el 44% de las Pasteurellas aisladas de rinitis atrófica fueron capaces de hemoaglutinar eritrocitos humanos grupo "O", lo que sugiere que estos extractos fueron citoadherentes, aun cuando no confirmaron la presencia de fimbrias mediante microscopia electrónica. Trigo y Pijoan investigando la toxigenicidad de extractos de *Pasteurella multocida* encontraron que todos aquellos aislados de rinitis atrófica fueron toxigénicos y la mayor parte de ellas presentaron fimbrias, las cuales han sido observadas en algunas cepas de *Pasteurella multocida*. Recientemente, dos tipos de fimbrias fueron identificadas en cepas de serogrupo D, la primer fimbria observada es similar a fimbria tipo 1 y la segunda es similar morfológicamente al pili de *Escherichia coli* (Ruffolo y cols., 1997).

Otro descubrimiento interesante es que todas las cepas aisladas de pulmón resultaron ser no toxigénicas y al menos entre el 88 - 90% de estas fueron también no pilliadas. Entre tanto la toxicidad y la pilliación surgen como factores asociados con la rinitis atrófica mientras que la neumonía y la pleuritis se relacionan con cepas serotipo A no toxigénicas y no pilliadas (Davies y cols., 2003).

#### **1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.**

Los principios de esta técnica fueron descritos en 1971 por Kleppe, pero fue hasta 1985 adaptada y desarrollada completamente, por Karry B. Mullis, el cual recibió el Premio Nobel en Química en 1993, por el descubrimiento de esta técnica. En aquella época esta técnica constituyó una señal en biología molecular que permitió la producción a gran escala de copias de segmentos específicos de la ADN.

La técnica de PCR es un método de amplificación enzimático de secuencias específicas de ADN *in vitro*, a partir de dos iniciadores complementarios a los extremos de la secuencia de ADN que se desea amplificar. La enzima Taq polimerasa, en presencia iones de  $Mg^{++}$  extiende el extremo 3' de cada iniciador, complementarios a dicha secuencia. La reacción se lleva cabo en presencia de un exceso de iniciadores que hibridan al nuevo ADN sintetizado en el ciclo anterior, de manera que se convierte en el blanco para la nueva síntesis. Esta reacción ocurre en una serie de ciclos repetitivos que incluyen: desnaturalización de la doble cadena de ADN, hibridación de los iniciadores a los extremos del fragmento de ADN y la extensión de estos iniciadores sobre el ADN molde por la polimerasa termoestable, resultando en la acumulación exponencial del fragmento específico cuya dimensión está definida por los extremos 5' de los iniciadores, ya que el producto de extensión sintetizado en un ciclo sirve como molde en el siguiente ciclo, de manera que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo (Tsirka y Frohman, 2001). Los ciclos necesarios para la amplificación se llevan a cabo en un termociclador, que permite oscilar las temperaturas. A una temperatura del 94°C ocurre la desnaturalización del ADN, o sea, se abre la doble cadena para permitir la hibridación de los iniciadores, en el cual disminuye la temperatura aproximadamente a 72°C, y por último la extensión de las nuevas cadenas, esto representa un ciclo, el cual se repite de 30 a 35 veces, estas condiciones pueden variar según el fragmento genético que se desea amplificar (Barrera y cols.; Wilton, 2002).

La técnica de PCR es muy específica, ya que solamente se amplifica los fragmentos de ADN limitados por los iniciadores, dando lugar a la producción de un fragmento de tamaño determinado, incluso en presencia de otro tipo de ADN no relacionado. El producto de PCR se evalúa y compara con un marcador de peso molecular en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, sobre haz de luz ultravioleta (Metzker y Caskey, 2001, Wilton, 2002 a).

La principal ventaja de la PCR es la sensibilidad y especificidad de la prueba. Pequeñas concentraciones de ADN blanco, correspondientes a bajos número de células bacterianas, pueden ser detectadas en un corto tiempo, pero cambios en las condiciones de la técnica comúnmente afectan los resultados de la amplificación, refiriéndose a tiempo, temperatura, concentración de  $Mg^{++}$  (cofactor), entre otros (Wilton, 2002).

La selección de los iniciadores, que amplifican secuencias de ADN, de genes que codifican factores de virulencia o toxinas, permite la identificación de sólo esos microorganismos potencialmente patógenos. La PCR no distingue entre células viables y no viables, si el segmento de ADN incluye el sitio del iniciador intacto, tanto en el primer caso como en el segundo, lo amplificara. Esto puede ser considerado una ventaja ya que bacterias lesionadas pueden ser detectadas incluso en los animales tratados con antibióticos produciendo reacciones positivas (Metzker y Caskey, 2001; Wilton, 2002a).

Wilson en 1997, menciona la existencia de dos puntos que inhiben la reacción de PCR en un inicio: 1) Interferencia de la lisis celular necesaria para la extracción de ADN y 2) Degradación o captura de ácidos nucleicos; al mismo tiempo expone la existencia de un amplio rango de inhibidores reportados, que en algunos casos no se sabe cómo actúan, entre estos inhibidores se encuentran los restos bacterianos (pared, membrana celular, entre otros), fragmento de ADN no blanco, incluso polvo en los materiales de laboratorio, el talco de los guantes, diferentes tipos de plásticos o celulosa utilizados, la distribución al azar del ADN al estar cerca de los límites de detección, es decir una molécula de ADN puede no estar presente en la alícuota utilizada para realizar la prueba y obtener un resultado falso negativo, la degradación del ADN o cuando éste sea capturado por alguna molécula presente, la presencia de enzimas proteolíticas o desnaturizantes que destruyan o inhiban la actividad de la enzima Taq polimerasa.

## 1.5 Justificación

La actividad porcina en México durante los últimos años ha presentado un importante desarrollo como resultado de trabajar cada vez más sistemas intensivos de producción, así como la adaptación a nuevas tecnologías provenientes de otros países (Quiles, 2001). Esto ha provocado que cada granja presente un sistema biológico diferente, aun cuando los animales, la dieta y las instalaciones sean similares para las granjas, esto sucede por que las interacciones entre los gérmenes favorecen su permanencia y proliferación en el tracto respiratorio porcino (Iglesias y Trujado, 2000).

El mejor ejemplo de colaboración es el que ocurre con *Pasteurella multocida*, el cual es un habitante normal de las vías respiratorias, pero en cuanto existen las condiciones propicias es capaz de causar Rinitis Atrófica Progresiva (PAR) en el animal. Las condiciones propicias para que esto último ocurra a menudo son el resultado de la infección con *Bordetella bronchiseptica*; aunque también intervienen factores físicos y químicos (Nagai y cols., 1994).

El factor de virulencia de *Pasteurella multocida* directamente implicado en la enfermedad es la toxina dermonecrótica (DNT), la cual produce en el animal una caída sustancial del índice de conversión y, por tanto, retraso del crecimiento. La combinación de todos estos factores da lugar a un cerdo de baja calidad.

Un diagnóstico para PAR, no se basa sólo en observaciones clínicas o morfológicas de lesiones, se requiere la identificación de la toxina por medio de pruebas de laboratorio, las cuales requieren mucho tiempo.

Por lo tanto una técnica rápida y segura como PCR en la detección de *Pasteurella multocida* toxigénica puede ser una alternativa para el diagnóstico integral de la Rinitis Atrófica Progresiva

## **1.6 Hipótesis**

Si se estandariza la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar la toxina de *Pasteurella multocida* entonces permitirá hallar este microorganismo en muestras de cerdo con Rinitis Atrófica.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Establecer el procedimiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a través de iniciadores específicos al gen ToxA, para la detección de *Pasteurella multocida* toxigénica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estandarización de la extracción y purificación de ADN por medio de lisis por calentamiento y el método de purificación fenol-cloroformo.
- Cuantificación de ADN de *Pasteurella multocida* por medio de espectrofotometría.
- Evaluar la especificidad de los iniciadores para el gen ToxA de *Pasteurella multocida*.
- Estandarización de un procedimiento para la detección de *Pasteurella multocida* toxigénica utilizando la técnica de PCR.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Obtención y Acondicionamiento de Microorganismos

Las cepas utilizadas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D, se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Virología perteneciente al departamento de Microbiología de la Coordinación General de Estudios de Posgrado FES Cuautitlán Campo I.

##### 3.1.1 Cultivo de *Pasteurella multocida*

Las muestras se obtuvieron directamente del criotubo el cual previamente se ha descongelado a temperatura ambiente; con una jeringa estéril se tomó una pequeña cantidad de muestra suficiente como para agregar una gota a dos cajas de medio de cultivo BHI respectivamente, con el asa se hizo una estría que posteriormente se extiende en el medio de cultivo, se incubó 24 horas a 37 °C. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano, una caja de medio de cultivo BHI sirvió para realizar la extracción de ADN, y otra para conservar la cepa, por lo tanto se tuvo que congelar la cepa en SKIM MILK (Difco) a -70°C por 72 horas, posteriormente se introdujo al criocontenedor con nitrógeno líquido.

##### 3.1.2 Identificación de *Pasteurella multocida*.

Se realizaron todas las pruebas bioquímicas primarias, como primer paso de identificación, posteriormente se realizaron algunas pruebas bioquímicas secundarias como MIO, Urea, NO<sub>3</sub>, también se utilizó el medio de Agar Sangre y Mac Conkey como parte de la identificación ver tabla No. 6 (Mac Faddin F. J., 2000).

##### 3.1.3 Tipificación de cepas de *Pasteurella multocida*.

Para tipificar *Pasteurella multocida* tipo A y D, se sembró la cepa en el medio de BHI y se puso una estría de *Staphylococcus aureus* la cual contiene la enzima hialuronidasa, por lo tanto al contacto con su sustrato el ácido hialurónico, el cual está contenido en la cápsula de *Pasteurella multocida* tipo A se degradará (Carter y Rundell, 1975).

### 3.2 Extracción y Cuantificación de ADN de *Pasteurella multocida*

#### 3.2.1 Extracción de ADN por el Método de Fenol-Cloroformo

Se utilizó una cepa de *Pasteurella multocida* de 24 horas en medio BHI, del cual se tomó  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, se resuspendió en 1.5 ml de PBS en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó en una microcentrifuga Beckman Microfuge E™ por 5 minutos a 14,000 rpm, se resuspendió el pellet en 400  $\mu$ l de PBS y se colocó en agua hirviendo durante 10 min. Posteriormente se añadió 250  $\mu$ l de fenol cloroformo isoamyl, mezclando bien y se centrifugó por 2 minutos a 14,000 rpm, enseguida se obtuvo la tasa superior en otro Eppendorf de 1.5 ml, y se añadió 250  $\mu$ l de cloroformo isoamyl, mezclándolo 40X y se centrifugó 2 minutos a 14,000 rpm, se obtuvo de nuevo la tasa superior en un Eppendorf de 0.5 ml añadiendo 12  $\mu$ l de acetato de sodio y 400  $\mu$ l de alcohol 100%, dejando en hielo 10 minutos, posteriormente se centrifugó 15 minutos a 14,000 rpm. Una vez centrifugado se decantó el alcohol y se agregaron 70  $\mu$ l de alcohol al 70% sin resuspender y se volvió a centrifugar 5 minutos 14,000 rpm, y por último se decantó el alcohol y se dejó secar 15 minutos. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de  $ddH_2O$  y se almacenó a 4 °C.

Posteriormente se realizó un corrimiento electroforético para identificar la presencia de ADN, en un gel de agarosa al 1 % p/v, por lo tanto se pesaron 0.3g de agarosa en 30 ml de TAE, se calentó durante 1 minuto en el horno de microondas, y se agregaron 24  $\mu$ l de bromuro de etidio para una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml.

Una vez solidificado el gel se colocó en la cámara de electroforesis, posteriormente se le adicionó el marcador molecular ver **Apéndice D** (ADN Molecular Weight Marker XIII (50-750 bp)) y la muestra de ADN previamente mezclados con 1  $\mu$ l de Loading Buffer, posteriormente se conecta la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se deja 45 minutos a 80 V. Para revelar el Gel de Agarosa se realizó en el transiluminador (GENE GENIUS Bio Imaging System).

#### 3.2.2 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Posterior a la extracción y detección de ADN, se tomó 1  $\mu$ l de este y se diluyó en 99  $\mu$ l de agua desionizada para tener una dilución 1:100, enseguida se tomaron 5 lecturas de

absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (Cary NE UV-Visible Spectrophotometer) para calcular la concentración del ADN en la extracción se realiza de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Abs. 260 nm} \times \text{Factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml ADN}$$

Para conocer la pureza del ADN se realizó el cociente de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, por lo tanto si el valor se encuentra entre 1.8, el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares; valores por debajo de 1.8, indican contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol.

### 3.3 Iniciadores para PCR

En el estudio se utilizó un par de iniciadores específicos para la secuencia del gen ToxA (**Apéndice C**), en el cual la secuencia de cada iniciador es referida por Lichtensteiger y cols., (1996). Cada iniciador empleado estaba acompañado de una hoja descriptiva de las características correspondientes, donde se encontró la cantidad total de nanomoles de cada iniciador; con este dato se procedió a realizar la suspensión de los iniciadores a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  (solución stock) de cada uno. También se preparo una solución de trabajo a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , para cada uno de los pares de iniciadores. El cálculo para resuspender cada iniciador, así como las características de cada uno de ellos se encuentra en el **Apéndice A**.

#### 3.3.1 Dilución de Iniciador ToxA F

Este iniciador se resuspendió con 597.8  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada para obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

Secuencia 5'-CTTAGATGAGCGACAAGG-3'

#### 3.3.2 Dilución de Iniciador ToxA R

El liofilizado se resuspendió con 1010.3  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada para obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se tomó 1  $\mu\text{l}$  de concentración 100  $\mu\text{M}$  y se diluyo con 9  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada para formar una alícuota de trabajo de 10  $\mu\text{l}$  a concentración de 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente de cada iniciador.

Secuencia 5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3'

### 3.4 Estandarización de PCR para *Pasteurella multocida*

El Kit utilizado para la estandarización de PCR para *Pasteurella multocida* es de la marca QIAGEN® Taq ADN Polymerase (Taq ADN Polymerase, QIAGEN PCR Buffer 10x, Q-Solution 5x, MgCl<sub>2</sub> 25 mM), los dNTP's son de marca SIGMA (dTTP, dATP, dGTP y dCTP de concentración 10mM).

#### 3.4.1 Volumen de Reactivos de PCR

El protocolo que se utilizó para la detección de un fragmento del gen ToxA de *Pasteurella multocida* es el que se presenta en la tabla No. 8.

Tabla No. 8 Concentración y volumen de reactivos para PCR

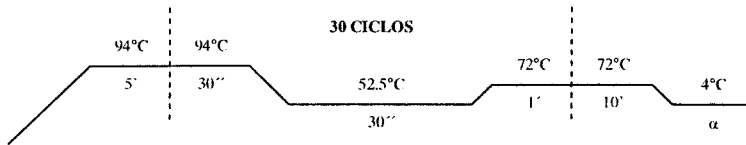
Reactivos	Reactivos		Volumen (μl) por Reacción
	Concentración inicial	Concentración final	
ADN molde		50 ng/μl	1
Q-Solution	5x	1x	5
PCR Buffer	10x, 15mM MgCl <sub>2</sub>	1x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	0.5
dNTP's			
dTTP	10 mM	0.2 mM	0.5
dATP	10 mM	0.2 mM	0.5
dGTP	10 mM	0.2 mM	0.5
dCTP	10 mM	0.2 mM	0.5
Iniciadores			
ToxA F	10 μM	0.4 μM	1
ToxA R	10 μM	0.4 μM	1
Taq polimerasa	1 U/μl	1U	1
Agua			11
Volumen de Rx			25

\* El Volumen (μl) por reacción se calculan en el **Apéndice B**

Todo el volumen se colocó y se mezcló en un tubo Eppendorf de 0.6 ml

### 3.4.2 Parámetros de Amplificación

Las condiciones de amplificación fueron en un inicio referidas por Lichtensteiger y cols., (1996), y que posteriormente se adecuaron para así realizar la PCR, a continuación se muestran los tiempos, temperaturas y numero de ciclos.



La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Techne modelo Progene™.

## 3.5 Corrimiento electroforético

### 3.5.1 Producto Amplificación de ADN

El gel de agarosa que se utilizó para las muestras de productos de amplificación se preparo al 1.5 % p/v, por lo tanto se peso 0.6g de agarosa en 30 ml de TAE, se calentó durante 1 minuto en el horno de microondas, y se agregaron 24  $\mu$ l de bromuro de etidio para una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml.

Una vez solidificado el gel se colocó en la cámara de electroforésis cubierto con TAE al 5 %, las muestras se adicionaron en los carriles una vez mezclada con 1  $\mu$ l de Loading Buffer, el marcador molecular (ADN Molecular Weight Marker XIII (50- 750 bp)) se coloca en el primer carril, posteriormente se conecta la cámara de electroforésis a la fuente de poder y se deja 45 minutos a 80 volts. Posteriormente el revelado del Gel de Agarosa se realiza en el transiluminador GENE GENIUS Bio Imaging System.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cepa de Microorganismos

#### 4.1.1 Identificación de *Pasteurella multocida*.

En la Tabla No. 9 se muestran las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de *Pasteurella multocida*, iniciando por las pruebas bioquímicas primarias, y algunas pruebas secundarias cruciales para su identificación, además de utilizar algunos medios de cultivo como proceso de identificación. Al observar los resultados de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D muestra una diferencia al ser sembrada en agar MacConkey, sin embargo los datos contenidos en la Tabla No. 6 (Mac Faddin, 2000), demuestra que las cepas pueden ser variables en este medio.

Tabla No.9 Resultados de Pruebas realizadas a las cepas de *Pasteurella multocida*.

Pruebas	Tipo A	Tipo D
Pruebas Bioquímicas Primarias		
Gram	Cocobacilos (-)	Cocobacilos (-)
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Motilidad	-	-
O/F	A/A	A/A
Pruebas Bioquímicas Secundarias		
Indol	+	+
Ureasa	-	-
NO <sub>3</sub>	+	+
Medios de Cultivo		
β-hemólisis	-	-
Mac Conkey	-	+

#### 4.1.2 Tipificación de cepas de *Pasteurella multocida*.

Se llevo a cabo la tipificación de la cepa de *Pasteurella multocida* tipo A, con el empleo de una estria de *Staphylococcus aureus*, observando como resultado positivo la descapsulación de la colonia a las condiciones de 37 °C por 24 horas, por lo tanto un resultado negativo identifico la cepa de *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D.

## 4.2 Extracción, Purificación y Cuantificación de ADN de *Pasteurella multocida*

### 4.2.1 Extracción de ADN por el Método de Fenol-Cloroformo.

Posteriormente a la tipificación e identificación de las cepas, se prosiguió a realizar la extracción del ADN, realizándose 3 extracciones por cada cepa tomando bacteria a concentraciones de 0.5, 1 y 2 del nefelometro de McFarland e identificando la intensidad de la fluorescencia del bromuro de etidio, obteniendo los resultados de la Figura No. 8, donde se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular (Marker XIII) y en los carriles 2 al 7 se encuentran las muestras bacterianas que se sometieron a la extracción, observándose que las bandas están a la misma distancia y localizadas por arriba de 2642 pb que es la banda más grande del marcador de peso molecular.

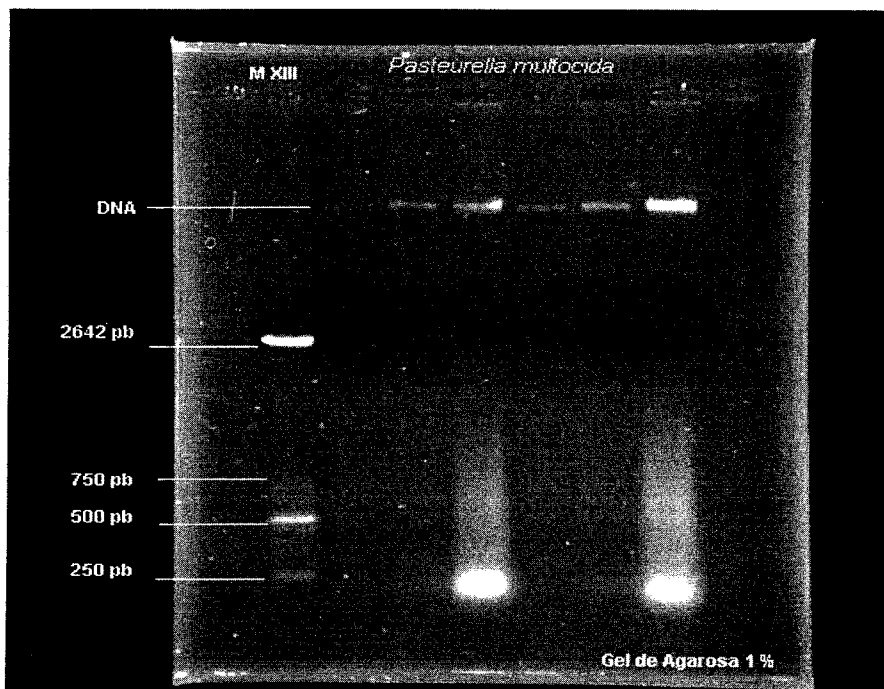


Figura No. 8. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. En el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular Marker XIII, en los carriles 2 al 4 son muestras de *Pasteurella multocida* tipo A con tres alicuotas diferentes, en los carriles 5 al 7 son muestras de *Pasteurella multocida* tipo D con tres alicuotas diferentes.



#### 4.2.2 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Para realizar la cuantificación de ADN se utilizaron las muestras que presentaron mayor intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio en la Figura 8, las cuales corresponden a los carriles 4 y 7 de las cepas de tipo A y D respectivamente; de estas muestras se hicieron diluciones 1:100, tomando 5 lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm de cada cepa, y calculando el promedio el cual nos sirvió para realizar el cociente de 260 nm y 280 nm para cada cepa, este resultado nos proporciono estimar la relación de los ácidos nucleicos con respecto a las proteínas, ver Tabla No. 10.

Tabla No. 10 Absorbancias de las muestras de ADN de *Pasteurella multocida* tipo A y D

Cepa	<i>P. multocida</i> tipo A		<i>P. multocida</i> toxigénica tipo D	
	260 nm	280 nm.	260 nm	280 nm
	0.0900	0.0463	0.1020	0.0548
	0.0901	0.0466	0.1018	0.0540
	0.0902	0.0466	0.1017	0.0539
	0.0903	0.0469	0.1018	0.0540
	0.0905	0.0468	0.1019	0.0539
Promedio	0.0902	0.0466	0.1018	0.0541
Pureza	1.9356		1.8817	

Posteriormente se estandarizo la concentración de ADN extraído a 50 µg/ml, diluyendo las muestras de ADN de cada cepa de *Pasteurella multocida* tipo A y D (Tabla No. 11), para obtener un volumen de 100 µl a la concentración deseada.

Tabla No 11. Concentración de las muestras de ADN de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y D

Cepa	Concentración en µg/ml	Volumen de dilución
A	451	11.1
D	509	9.8

### 4.3 Especificidad de los Iniciadores

Se realizó una amplificación utilizando los oligonucleotidos ToxA, ilustrándose en la Figura 9, en donde los carriles 1 al 3 contienen muestras de ADN de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A, *Pasteurella multocida* tipo D toxigenica y *Haemophilus parasuis* respectivamente, mostrando que efectivamente conteníamos ADN molde estandarizado a 50  $\mu\text{g/ml}$  como materia prima para realizar la PCR; en los carriles 4 al 6 se muestran los productos de PCR, en donde solo existe amplificación en el carril 5 dando como resultado 2 bandas amplificadas; en el carril 7 se muestra el control negativo de la amplificación.

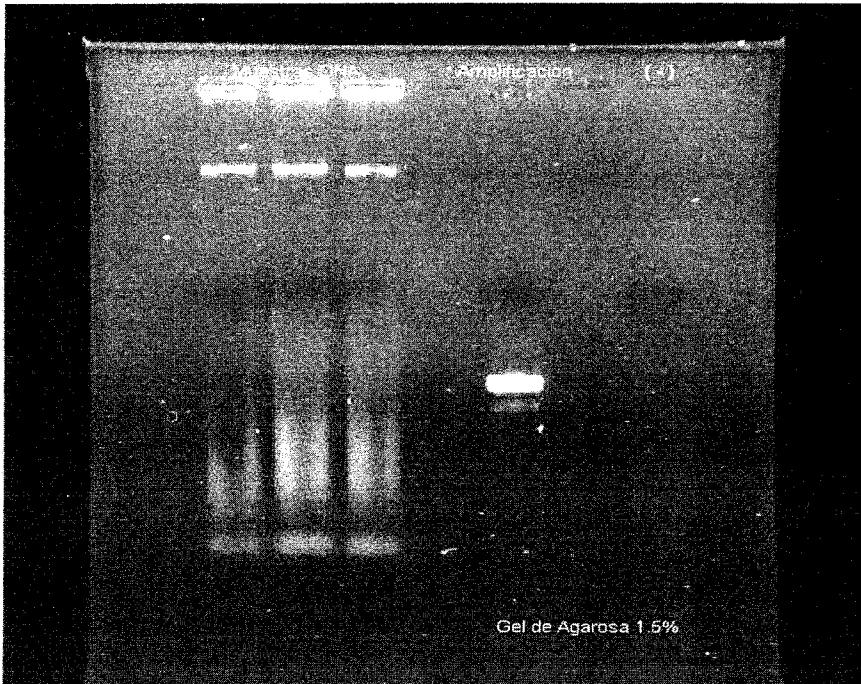


Figura No. 9. Corrimiento electroforético piloto en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio 50  $\mu\text{g/ml}$ . En los carriles 1 al 3 son muestras de ADN de las bacterias *Pasteurella multocida* tipo A y D y *Haemophilus parasuis* respectivamente, en los carriles 4 al 6 son productos de amplificación de acuerdo con el orden de las bacterias anteriores, en el carril 7 se muestra el control negativo de la amplificación.

#### 4.4 Estandarización de PCR para *Pasteurella multocida* Toxigénica

Se volvió amplificar la cepa de *Pasteurella multocida* tipo D con el protocolo de PCR descrito, e ilustrándose en la Figura 10, donde en el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra el DNA con una banda de alto peso molecular localizada por arriba de 2642 pb, en el carril 3 se muestra el producto de amplificación del DNA molde del carril 2, donde se observan 3 bandas de aproximadamente 865 pb, 760pb, y 450 pb, calculadas por medio del GeneTools from Syngene, en el carril 4 se colocó el control negativo de la amplificación.

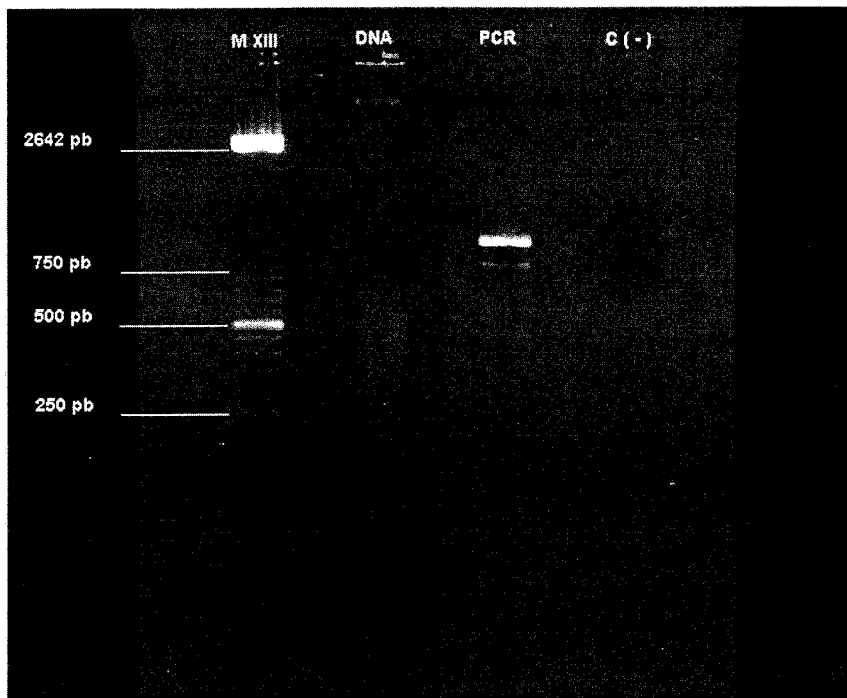


Figura No. 10. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio 50 µg/ml. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Marker XIII, en el carril 2 se encuentra la muestra de ADN de *Pasteurella multocida* tipo D utilizada, en el carril 3 se observa el producto de amplificación de la misma cepa y en el carril 4 se muestra el control negativo de la amplificación.

## 5. DISCUSIÓN

En México las enfermedades de los cerdos han sido divididas principalmente en afecciones del sistema respiratorio, digestivo, nervioso y otros sistemas; donde el 53.5% corresponden a las enfermedades respiratorias (Torres y cols. 2000). *Pasteurella multocida* es uno de los agentes bacterianos aislados con mayor frecuencia a partir de pulmones neumónicos y del tracto respiratorio superior de cerdos, por lo tanto este estudio se desarrollo como aplicación practica para detectar cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida*. La estandarización de la técnica de PCR se llevo a cabo de manera satisfactoria ya que con la metodología empleada podemos estudiar *Pasteurella multocida* toxigénica en el laboratorio, para buscar alternativas en el control de la enfermedad de Rinitis Atrófica Progresiva.

Como primer paso en la estandarización de la PCR para la detección del gen ToxA es la obtención de muestras de ADN de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D, utilizando la metodología de extracción referida por Lichtensteiger y cols. (1996), los cuales demostraron que la utilización de ADN molde de *Pasteurella multocida* obtenido por la lisis bacteriana provocada por calentamiento sin efectuar un método de purificación, es una alternativa para la detección del gen ToxA por medio de PCR. Wilson, (1997) menciona que las soluciones de la extracción por lisis bacteriana provocada por calentamiento, contienen una pureza muy baja de los ácidos nucleicos por la existencia de restos celulares, los cuales pueden inhibir la PCR. Por lo tanto, este estudio necesitaba la estandarización del método de extracción y purificación para tener muestras más puras con respecto a los ácidos nucleicos al eliminar restos celulares y así evitar posibles variables que interfirieran con la PCR, dando lugar a la purificación de los ácidos nucleicos de las muestras de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D con el método de Fenol-Cloroformo el cual remueve principalmente proteínas de soluciones acuosas (Wiley, 2002).

Una forma para identificar la presencia de ADN y al mismo tiempo conocer la variabilidad en la eficacia de la lisis bacteriana y la purificación de los ácidos nucleicos, fue por medio de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, dando como resultado (Figura No.8) bandas de alto peso molecular al compararlo con el marcador utilizado, por lo tanto, estas muestras corresponden a los ácidos nucleicos; por otro lado, la variación de la eficiencia de la lisis bacteriana y la purificación se evaluó al realizar por triplicado la

extracción y purificación de ADN de cada cepa de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D al tomar cantidades de bacteria a concentraciones de 0.5, 1 y 2 del nefelometro de McFarland demostrando en la misma Figura No. 8, la presencia de 3 intensidades diferentes de fluorescencia para cada cepa y que al comparar la radiación emitida a las mismas concentraciones existía poca variabilidad entre cada cepa, por lo tanto, el método de lisis por calentamiento y la purificación por el método de Fenol-Cloroformo nos proporcionó muestras de ADN de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D, con la mínima variación en el contenido de ADN.

Una vez obtenido el ADN el siguiente paso era conocer la pureza de las muestras con respecto a proteínas y poderlo cuantificar. Sambrook y cols. (1989) reconocen dos métodos en donde la cantidad de ácido nucleico puede ser estimada por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio o simplemente por espectrofotometría el cual es mas exacto, empleando muestras de ADN con cantidades insignificantes de contaminantes, y donde se puede estimar la pureza de ácidos nucleicos con respecto a proteínas, al realizar el cociente de lecturas de absorbancia de 260 nm y 280 nm, donde los ácidos nucleicos absorben a una longitud de onda de 260 nm, y las proteínas a 280 nm; en consecuencia las preparaciones puras de ADN tiene valores iguales o mayores de 1.8.

Por lo tanto para realizar la cuantificación se tomaron las alícuotas que presentaron mayor fluorescencia, (Figura No. 8) que correspondían a la concentración de 2 de McFarland de cada cepa de *Pasteurella multocida*. Primero se les realizó lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm para obtener la pureza de ADN, mostrando que las alícuotas de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D eran efectivamente puras al observar los resultados de la Tabla No. 10; y por lo tanto la cuantificación por medio de espectrofotometría pudo ser realizada, mostrando que la cepa de *Pasteurella multocida* tipo A contenía una menor concentración con respecto a la cepa de *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D (Tabla No.11) corroborando este resultado con la Figura No. 8, observamos que efectivamente el carril 4 que corresponde a la cepa *Pasteurella multocida* tipo A tiene una menor intensidad de fluorescencia que el carril 7 correspondiente a la cepa de *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D.

Posteriormente para terminar la estandarizaron de la extracción de ADN de las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D, se realizó la dilución de las soluciones de la extracción para mantener una concentración de trabajo de

50 µg/ml. Demostrando en la Figura No. 9. en los carriles 1 y 2 que corresponden a las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D que efectivamente muestran una intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio similar.

Un segundo paso en la estandarización de la técnica de PCR era saber si los iniciadores adquiridos con la secuencia de Lichtensteiger y cols. (1996) eran específicos a la secuencia del gen ToxA, por lo que se realizó una PCR piloto con el ADN molde ya estandarizado de *Pasteurella multocida* tipo A, *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D y una cepa extra de *Haemophilus parasuis* la cual se obtuvo del laboratorio que también se encontraba estandarizado. Resultados obtenidos de los productos de amplificación de PCR, ilustrados en la Figura No. 9, muestra que existen tres bandas de alto peso molecular y que emiten la misma intensidad de fluorescencia identificándolas como muestras de ADN molde de las bacterias respectivamente descritas; por otro lado en los carriles 4 al 7 se encuentran los productos de PCR, en donde el carril 7 es el control negativo y al compararlo con los carriles 4 y 6 muestran similitud indicando que no existe amplificación excepto para el carril 5 donde existe un doble bandeo como producto de la amplificación. Estos resultados permiten comprobar que al estar presente la muestra de ADN molde de *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D y al identificar un doble bandeo como producto de la amplificación, se trate de una cepa toxigénica, y que los resultados esperados para *Pasteurella multocida* tipo A y *Haemophilus parasuis* fueran los adecuados al no contener el gen de la toxina; por lo tanto el uso de estos iniciadores es satisfactoria con respecto especificidad en la amplificación del gen ToxA.

Sin embargo Lichtensteiger y cols. (1996), reportaron que la identificación del gen de la toxina de *Pasteurella multocida* por medio de la técnica de PCR, es a través de la observación de una banda de 846 pb. Por lo tanto, para estandarizar la técnica de PCR y detectar la amplificación de un fragmento del gen ToxA de la cepa ya conocida de *Pasteurella multocida* toxigénica tipo D ilustrada en la Figura No. 9 se realizaron varias reacciones, y así eliminar la banda inespecífica que corresponde a la de menor fluorescencia emitida por el bromuro de etidio, al variar la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la temperatura de alineamiento, a pesar de estos cambios no se pudo eliminar la presencia de esta banda, y más aun, se presentó otra banda inespecífica de menor peso molecular, ilustrando los resultados en la Figura No. 10 donde la banda que presenta mayor intensidad de

fluorescencia indica que es el fragmento que se amplificó en mayor cantidad en comparación con las otras dos, indicando que son bandas inespecíficas, por lo que se calcularon los pesos moleculares de las tres bandas con el programa de GeenTools from System que mostró los resultados de 865 pb, 750 pb y 450 pb respectivamente. La banda que emite mayor fluorescencia y a la cual se calculó su peso molecular de aproximadamente 865 pb es la que esperábamos tener como único resultado. Y que los productos de PCR que corresponden a regiones inespecíficas de los carril No. 5 de la Figura No. 9 y el carril No. 4 de la Figura No. 10, se relacionan a una contaminación o degradación de los iniciadores, puesto que en la Figura No. 9 se presentó una banda inespecífica y al realizar posteriormente ampliaciones con la variación de la concentración de  $MgCl_2$  y temperaturas de alineamiento con el mismo ADN ya estandarizado se observó en la Figura No. 10 una banda más, sin embargo su identificación implica que se realicen estudios de secuenciación o simplemente el cambio de nuevos iniciadores.

La utilización de PCR en el diagnóstico de *Pasteurella multocida* toxigénica tiene muchas ventajas, una de ellas es que permite la detección del agente etiológico en poco tiempo en comparación con las pruebas microbiológicas y toxicológicas. Entre sus desventajas que se pueden encontrar, son los falsos negativos, como la concentración de los componentes de la reacción que no se hayan estandarizado; también se pueden presentar falsos positivos, cuando los productos y soluciones están contaminadas con reacciones anteriores o si los iniciadores son homólogos a las secuencias de otros genes; tanto los falsos positivos como los falsos negativos pueden ser eliminados con la técnica de PCR estandarizada para la detección del gen ToxA, además de que al realizar la reacción de muestras no conocidas como toxigénicas y no toxigénicas introducir un control positivo y un control negativo.

Esta técnica de PCR nos permite la detección rápida del gen ToxA de cepas de *Pasteurella multocida* toxigénicas, además de permitir a los médicos veterinarios realizar un diagnóstico integral de la enfermedad de Rinitis Atrófica Progresiva (PAR) y poder realizar a tiempo el tratamiento adecuado, beneficiando a la Porcicultura Nacional con un control en el complejo respiratorio porcino, al clasificar el tipo de Rinitis Atrófica (RA) asociada a los animales.

## 6. CONCLUSIONES

La técnica de extracción y purificación ADN fue estandarizada por medio de la técnica de lisis bacteriana por calentamiento y la metodología de Fenol-Cloroformo respectivamente.

Las muestras de ADN se acondicionaron a 50 µg/ml por medio de espectrofotométrica.

Los iniciadores utilizados presentan especificidad al gen ToxA de *Pasteurella multocida* toxigénica.

La técnica de PCR fue estandarizada para la detección del gen ToxA de *Pasteurella multocida* toxigénica.



## 7. REFERENCIAS

1. **Ackermann, M.R., De Bey, M. C., Register, K. B., Larson, D. J., Kinyon, J. M. (1994).** Tonsil and Turbinate Colonization by Toxigenic and Non-Toxigenic Strain of *Pasteurella multocida* in Conventionally Raised Iowa Swine. IPVS Vol. 13, pp. 162.
2. **Ackermann, M.R., Rimler, R.B., Thurston, J. R. (1991).** Experimental Model of Atrophic Rhinitis in Gnotobiotic Pigs. Infection and Immunity Vol. 59, No. 10, pp. 3626- 3629.
3. **Barrera, H B., Ortiz, R. L., Rojas, A M. Resendez, D. P.** Reacción en Cadena de la Polimerasa. Ciencia y Desarrollo.
4. **Boyce, J. D., Chung, J. Y., Adler, B. (2000).** *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. Journal of Biotechnology Vol. 83 pp. 153-160.
5. **Roe, A. B.,** Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Oklahoma, Norman, Oklahoma. [http://www.genome.ou.edu/protocol\\_book/protocol\\_part1.html](http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_part1.html)
6. **Buys, W.E.C.M., Smith, H.E., Kamps, A.M.I.E., Kamp, E.M., Smits, M.A. (1990).** Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida ssp. multocida*. Nucleic Acids Research Vol. 18, No. 9.
7. **Carter, G. R., Rundell, S. W. (1975).** Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. The Veterinary Record. pp.343.
8. **Carter, G. R., Subroto, P. (1973).** Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with Acriflavine. American Journal Veterinary Research. pp. 293-294.
9. **Ciprián, C. A., Mendoza, E. S., Garcia, M. C. (1994).** Primer Ciclo Nacional Afecciones Respiratorias del Cerdo. Memorias.
10. **Choi, C., Chae, C. (2001).** Enhanced Detection of Toxigenic *Pasteurella multocida* Directly from Nasal Swabs Using a Nested Polymerase Chain Reaction. Veterinary Journal. Vol. 162, pp. 255-258.
11. **Chul, A. B., Hwan, K. B. (1985).** Toxigenicity and Capsular Seotypes of *Pasteurella multocida* Isolated from Pneumonic Lungs of Slaughter Pigs. IPVS Taegu, Korea, pp. 165.
12. **Davies, L. R., MacCorquodake, R., Baillie, S., Caffrey, B. (2003).** Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. Journal of Medical Microbiology. Vol. 52, pp. 59-67.
13. **Davies, L. R., MacCorquodake, R., Reilly, S. (2004).** Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. Vet. Microbiology. Vol. 99, pp 145-158.
14. **de Jong, M. F. (1999)** en libro Diseases of Swine, 8a Edición. Editorial Iowa State University Press. United States of America.
15. **de Jong, M. F., Bartelse, A. (1980).** The influence of management and housing on the isolation frequency of *Bordetella bronchiseptica* in piglet populations. IPVS 6:212.
16. **de Jong, M. F., Borts, G. H. A. (1985).** Selective medium for the isolation of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. The Veterinary Record. Vol. 9, pp. 167.

17. **de Jong, M. F., Del, M. L., Tentenburg, G. L. (1980).** Atrophic Rhinitis Patogenicity Test for *Pasteurella multocida* isolates. IPVS Copenhagen pp. 211.
18. **Jong, M. F., Oosterwoud, R. A., (1977).** Treatment with oxytetracycline hydrochloride in the prevention of atrophic rhinitis in baby pigs. Tijdschr Diergeneeskd. Vol. 102, pp. 266.
19. **Donnio, P. Y., Lerestif-Gautier, A. L., Avril, J. L. (2004).** Characterization of *Pasteurella* spp. Strains Isolated from Human Infections. J. Comp. Path. Vol. 130, pp. 137-142.
20. **Estrada, R. (1997).** Causas de las Enfermedades Respiratorias. Revista Cerdos. Vol 8 pp. 20-22.
21. **Foget, N. T., Nielsen, J. P., Jorsal, S. E. (1989).** Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies.
22. **Foget, N. T., Nielsen, J. P., Pedersen, K. B. (1988).** Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal Clinical Microbiology. Vol. 26, pp. 1419-1420.
23. **Fortín, M., Jacques, M., (1987).** Hemagglutination by *Pasteurella multocida* of porcine origin. Journal Clinical Microbiology. Vol. 25, No. 5, pp.938-939.
24. **Fraga, N. J., Rodriguez, J., Fuentes, O., Castex, M., Fernández, C. A., (2004).** Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. Rev Cubana Med Trop, Vol. 56, No. 3, pp. 208-213.
25. **Frymus, T., Wittenbrink, M. M., Petzoldt, K., (1986).** Failure to demonstrate adherence of *Pasteurella multocida* involved in atrophic rhinitis to swine nasal epithelial cells. Zentralbl Veterinarmed B.. Vol. 33, No. 2, pp. 140-144.
26. **Gautam, R., Kumar, A.A., Singh, V.P., Singh, Vijendra R., Dutta, T.K., Shivachandra, S.B. (2003).** Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. Research in Veterinary Science.
27. **Glorioso, C. J., Jones, W. G., Rush, G. H., Pentler, J. L., Darif, A. C., Coward, E. L. (1982).** Adhesion of Type A *Pasteurella multocida* to Rabbit Pharyngeal Cells and Its Possible Role in Rabbit Respiratory Tract Infections. Infection and Immunity. Vol. 35, No. 3, pp. 1103-1109.
28. **Hamilton, T. D. C., Roe, J. M., Hayes, C. M., Webster, A. J. F. (1998).** Effects of Ammonia Inhalation and Acetic Acid Pretreatment on Colonization Kinetics *Pasteurella multocida* within Upper Respiratory Tracts of Swine. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 36, No. 5, pp. 1260-1265.
29. **Hamilton, T. D. C., Roe, J. M., Webster, A. J. F. (1996).** Synergistic Role of Gaseous Ammonia in Etiology of *Pasteurella multocida*- Induced Atrophic Rhinitis in Swine. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 34, No. 9, pp. 2185-2190.
30. **Hollis, G. (2004).** Como Reaccionan los Cerdos al Estrés Ambiental y la Productividad. SWINE. Vol. 77, pp. 21 – 23.
31. **Hunt, L. M., Adler, B., Townsend, K. M. (2000).** The Molecular Biology of *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology Vol 72, pp 3-25.

32. **Iglesias, S., Trujado, M. (2000).** Modelos de Interacciones que Ocurren en el Complejo Respiratorio Porcino. *Veterinaria Mexico*. Vol. 31, No. 1.
33. **Jacques, M., Parent, N., Fotry, B., (1988).** Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* TO porcine nasal and tracheal epithelial cells. *Journal Veterinary Research*. Vol. 52, pp. 283-285.
34. **Kamps, A. M. I. E., Buys, W. E. C. M., Kamp, E. M., Smits, M. A. (1990).** Specificity of DNA Probes for the Detection of Toxigenic *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 28, No. 8, pp. 1858-1861.
35. **Lariviere, S., Leblanc, L., Mittal, K.R., Martineau, G. P. (1992).** Characterization of *Pasteurella multocida* from Nasal Cavities of Piglets from Farms with or without Atrophic Rhinitis. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 30, No. 6, pp. 1398-1401.
36. **Lichtensteiger, C. A., Steenbergen, S. M., Lee, R. M., Polson, D. D., Vimr, E. R. (1996).** Direct PCR Analysis for Toxigenic *Pasteurella multocida*. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 34, No. 12, pp. 3035-3039.
37. **MacFaddin, F. J., Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica, 3ª Edición, Editorial Medica Panamericana. 2000. pp. 628-629.**
38. **Mefford, D. E., Vinson, R.A., Swafford, W. S., Pinkston, M. L., (1983).** The efficacy of long-actingoxytetracycline and/or *Bordetella/Pasteurella* bacterin in a swine herd with enzootic atrophic rhinitis. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* Vol. 78, pp. 1911.
39. **Mendoza, E. S. E., (1985).** Localizacion del Gene Responsable de la Producción de la Exotoxina de *Pasteurella multocida* tipo D. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlan, UNAM.
40. **Mendoza, S., y Pijoan, C. (2001).** El Estudio de PCR y las Enfermedades Respiratorias. Tercer Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo. UNAM Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación FES-Cuautitlan. pp 85 – 101.
41. **Metzker, M. L., Caskey, T. C. (2001).** Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia Of Life Sciences*.
42. **Nagai, S., Someno, S., Yagihashi, T. (1994).** Differentiation of Toxigenic from Nontoxigenic Isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 32, No. 4, pp. 1004-1010.
43. **Nakai, T., Kume, K., Yoshikawa, H., Oyamada, T., Yoshikaw, T., (1986).** Changes in the nasal mucosa of specific-pathogen-free neonatal pigs infected with *Pasteurella multocida* or *Bordetella bronchiseptica*. *Research Center for Veterinary Science*. Vol. 48, pp. 693-701.
44. **Nakai, T., Kume, K., Yoshikawa, H., Oyamada, T., Yoshikaw, T., (1988).** Adherence of *Pasteurella multocida* or *Bordetella bronchiseptica* to the swine nasal epithelial cell in vitro. *Infection Immunity*. Vol. 56, No. 1, pp. 234-240.
45. **Penny, R. H. C. (1977).** The Influence of Management Changes on the Disease Picture in Pigs. *Vet Annu.* 17:111.
46. **Pedersen, K. B., (1983).** Cultural and serological diagnosis of atrophic rhinitis in pigs.

47. Pijoan, A. C., (2004). Sistema multisitios que favorece la producción de credos. Revista UNAM Comunidad. Vol. 17, No. 9, pp. 18.
48. Petersen, S. K. (1990). The complete nucleotide sequence of the *Pasteurella multocida* toxin gene and evidence for a transcriptional repressor, TxaR. Molecular Microbiology Vol. 4, No. 5, pp. 821-830.
49. Roth, J. A. (2001). Pulmonary immunology. American Association of Swine Veterinarians. pp.463-466.
50. Ruffolo, G. C., Tennent, M. J., Michalski, P. W., Adler, B. (1997). Identification, Purification, and Characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida*. Infection and Immunity. Vol. 65, No. 1, pp. 339-343.
51. Rutter, J. M. (1983). The Virulence of *Pasteurella multocida* in Atrophic Rhinitis of Gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. Research Veterinary. Vol 34, pp. 287 – 295.
52. Rutter, J. M., Rojas, X. (1982). Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: Differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. Veterinary Record. Vol 110, pp. 531-535
53. Smith, I. M., Giles, C. J. (1980). Vaccines for Atrophic Rhinitis. Pig farming Suppl (Octubre). Vol. 83
54. Straw, B. E. (1986). Slaughter check methodology. Animal Association of Swine Practitioner; pp. 35-40.
55. Thomson, C. M. A., Chanter, N., Wathes, C. M. (1992). Survival of Toxigenic *Pasteurella multocida* in Aerosols and Aqueous Liquids. Applied and Environmental Microbiology Vol. 58, No. 3, pp. 932-936.
56. Torres, L. M. A., Ramírez, P. R. G. (1999). Enfermedades de los Porcinos Diagnosticadas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán Durante los Años de 1988 a 1997. Rev Biomed; Vol. 10, pp. 93 – 101.
57. Torres, L. M. A., Williams, J. de J., Castro A F. J., Salazar, F. M. del R. (2000). Frecuencia de rinitis atrófica y grado de lesión de los cornetes nasales de cerdos en Yucatán, México. Rev Biomed; Vol. 11, pp. 99 - 105.
58. Townsend, M. K., Boyce, D. J., Chung, Y. J., Frost, J. A., Adler, B. (2001). Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, pp. 924-929.
59. Tsirka, S. E., Frohman, M. A. (2001). Polymerase Chain Reaction (PCR): Specialized Reactions. Encyclopedia Of Life Sciences.
60. Van Der Heyden, P. J., Kamp, E. M., Pals, J. W., Tatenboug, G. J., (1984). Isolation and characterization of a heat-labile dermonecrotxin from *Pasteurella multocida* proceedings. IPVS, Belgica.
61. Watt, M. J., Swiatlo, E., Wade, M. M., Champlin, R. F. (2003). Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. FEMS Microbiology Letters, Vol. 225, pp. 9 -14.
62. Wiley, J., (2002). Manipulation of DNA. Current in Molecular Biology. Supplement No 59. pp. 2.1.1-2.1.10.

63. **Wilson, G. I., (1997).** Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, No. 10, pp. 3741-3751.
64. **Wilton, S. (2002).** Direct Sequencing of PCR Products. *Encyclopedia Of Life Sciences*.
65. **Wilton, S. (2002a).** Long-Range PCR. *Encyclopedia Of Life Sciences*.

## 8. APÉNDICE

### A. Iniciadores

#### Primer ToxA F

$$T_m = 50.2 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$OD_{260} = 59.78 \text{ nmol} = 0.33 \text{ mg}$$

$$MW = 5,572.7$$

Secuencia = 5'-CTTAGATGAGCGACAAGG-3'

#### Primer ToxA R

$$T_m = 50.3 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$OD_{260} = 101 \text{ nmol} = 0.58 \text{ mg}$$

$$MW = 5,756.8$$

Secuencia = 5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3'

### Cálculos para preparar Primer ToxA F a 100 $\mu\text{M}$ y 10 $\mu\text{M}$

De acuerdo con la relación

$$100 \mu\text{M} = 0.1 \text{ } \eta\text{moles} - 1 \mu\text{l}$$

Y si ToxA F = 59.78  $\eta\text{moles}$  implica que:

$$0.1 \text{ } \eta\text{moles} - 1 \mu\text{l}$$

$$59.78 \text{ } \eta\text{moles} - x$$

$$x = 597.8 \mu\text{l}$$

Por lo tanto se resuspendió el cebador con 597.8  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada para obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se necesitaron alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  que serán utilizadas para 10 reacciones.

Por lo tanto la relación siguiente, nos permitirá saber que volumen tomar de la alícuota de 100  $\mu\text{M}$ .

$$C_o V_o = C V$$

$$\frac{(10 \mu\text{M})(10 \mu\text{l})}{(100 \mu\text{M})} = V$$

$$V = 1 \mu\text{l}$$

Esto implica que se necesitara 1  $\mu\text{l}$  de concentración de 100  $\mu\text{M}$ , para preparar 10  $\mu\text{l}$  a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

**Cálculos para preparar Primer ToxA R a 100  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$**

Por lo tanto si ToxA R = 101.03  $\eta\text{moles}$

$$\begin{array}{rcl} 0.1 \eta\text{moles} & - & 1 \mu\text{l} \\ 101.03 \eta\text{moles} & - & x \\ & & x = 1010.3 \mu\text{l} \end{array}$$

Por lo que se resuspendió el cebador con 1010.3  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada para obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Consecuentemente se realizó una segunda dilución para obtener la concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

## B. Volúmenes de Reacción

- Q-solution, 5x

Concentración inicial: 5x  
Volumen inicial:  $x_1$   
Concentración final: 1x  
Volumen final: 25  $\mu$ l

$$\frac{(1x)(25\mu l)}{5x} = x_1$$
$$x_1 = 5\mu l$$

- QIAGEN PCR Buffer, 10x 15 mM

Concentración inicial: 10x  
Volumen inicial:  $x_2$   
Concentración final: 1x  
Volumen final: 25  $\mu$ l

$$\frac{(1x)(25\mu l)}{10x} = x_2$$
$$x_2 = 2.5\mu l$$

- MgCl<sub>2</sub>, 25 mM

- Contenido en QIAGEN PCR Buffer

Concentración inicial: 15 mM  
Volumen inicial: 2.5  
Concentración final: x  
Volumen final: 25  $\mu$ l

$$\frac{(15\text{ mM})(2.5\mu l)}{25\mu l} = x$$
$$x = 1.5\text{ mM}$$

Si necesitamos 2 mM y solo tenemos 1.5 mM nos hace falta la diferencia, del cual se toma de la alícuota de concentración de 25 mM.

- MgCl<sub>2</sub>, 25 mM

Concentración inicial: 25 mM  
Volumen inicial: x  
Concentración final: 0.5 mM  
Volumen final: 25  $\mu$ l

$$\frac{(0.5\text{ mM})(25\mu l)}{25\text{ mM}} = x$$
$$x = 0.5\mu l$$

- dNTP's ( dTTP, dATP, dGTP y dCTP), 10 mM

Concentración inicial: 10 mM  
Volumen inicial: x  
Concentración final: 0.2 mM  
Volumen final: 25  $\mu$ l

$$\frac{(0.2\text{ mM})(25\mu l)}{10\text{ mM}} = x$$
$$x = 0.5\mu l$$

- Iniciadores (ToxA F, ToxA R), 10  $\mu$ M

Concentración inicial: 10  $\mu$ M  
Volumen inicial: x  
Concentración final: 0.4  $\mu$ M  
Volumen final: 25  $\mu$ l

$$\frac{(0.4\mu M)(25\mu l)}{10\mu M} = x$$
$$x = 1\mu l$$

- Taq ADN Polymerase, 1 Units/ $\mu$ l

Solo se toma un 1  $\mu$ l de la alícuota



## C. Secuencia de Nucleótidos del Gen ToxA

```

1 aacaaggaa aatagctaga ttgacagata tggataaat cataaataat atttataaat
61 tacgcccctt gacctagagg ggccttttta ttacatcaaa aaaataaaccc caaacactgc
121 gaattcttgg ggtttttatt ataaccaaaa ttacatcaaa gttttattaa gtaagcatta
181 tcttacttta ggaataaact aacatagagg ttatggatag gaaaacaaa ctttttttta
241 actcagattt tactgtaaaa ggaataaagt ccgatgaaat ttttagaaga tttgttactg
301 atcatcctga caagcaatta aacaatgtaa aatggaaaga agtttttatt aatcgttttg
361 gtcagatgat gctagatact cctaaccga gaaagattgt agaaaaattt attaatgaag
421 ggcttgaaaa acaaggcctg aaaaatagat atcctgaaac tacatatttc aacatttttt
481 catcttctga cagctccgat gggaaagctt ttcatataaa ctctttatca gaatcctatc
541 gagttactga tgcctgccta atgaatattt ttgtggagcg ttattttgat gattgggact
601 tgtaaatag cttagccagt aatggaatat atcagtagg aaaagaagga gctttatttc
661 ctgatcatga ttatggcca gaatataacc ctgtttgggg accaaacgaa caaatttacc
721 atcttagatg gattgcagat atcctttatg ctgctccgt atgggatgaa ttaaaaaat
781 acttcatgga gattggcaa aaatagctc agctttatca cgaatgta tctgtacatc
841 ttcttgaat ggctattcag caatatacac gacaaacgct tactgtgaa ggctttctta
901 tggttgtaa cacatattat ggcaataagg aagaagtcca aataacttca ctgatattct
961 atgataacc ttccactgat ataatttga tagagcaaaa agggctctct actcctaaag
1021 tgatacttta cattcctgga ggaacacaac cattttgta attcttaat ccagatgatc
1081 tgaacaatg gattgcatgg catttaaaag atacaaca taatggccga tctcgaacac
1141 atcttctgct aaaaacacgt caggaaggag aaacgtttac aggtatagat aaagcacttc
1201 aatatattgc agaagagtc cctgaatggc ctgccaataa atacatcctt tataatccga
1261 cacatttga aacagaaaat ttatttaaca tcatgatgaa gcgaaacgaa cagcggatgc
1321 ttgaagatag tgatgtacag attagatcaa atccagaagc taccctgac tatgtccttt
1381 cattactga aacctttatt tcacagtta ctgcaataga tatgttagta ccagcagtag
1441 gtatcccaat taattttgcc ctatcagta cagcattagg acttagctg gatattgtag
1501 ttaatggaga ttcatatgaa aagagaaaat atggaattgg gtccttaagt caatctgatc
1561 tattcacagg aattaatctt attccagtta ttccggaac cgcagaattt ttatcttctt
1621 tctctagaac agaagaagat attccagctt ttctcactga agaacaagct tttagctaac
1681 gctttgaaat agtgaagaa gaattacatt ctatccacc ttatgtctct cctcggagaa
1741 ttactgacga aaattacat aaaattcgct ttgtacgctt taacaatgaa atcaacctt
1801 tagttgtgtt acgaagatta ggaggaata aatttatcag aatcagcctc ataacattcc
1861 aggaataaaa aggttcttta gtaagtgaag ttataatcc agtgaactaa aaaaagctact
1921 actgaagcaa tgcataacta tttaggggct cctcttatcg tctttccgct atvggattg
1981 aaggtgtttg gacaccagag gattataaag caagagcttc cgttattgga aagcctattg
2041 gagaatcata taaaagaata tttagcacaac tacaagaat acataacagt aatatcttag
2101 atgagcgaca aggtttatg catgaaactc ttgagcttat tgactttat gaagatcgc
2161 aacctcttcc agagcgtttg aatgcttttc gtgaaactgc tactcaatta gaaaagcgtc
2221 tttatcttcc tgaatggaa gcattaaaaa aacaaact actagacttct acaaaaggg
2281 ctggtgcgcc tgatttttta ctctgtacag ccatgataga aatggctgga aaaaaccagtg
2341 aaagcacgce tgatttaata cgttttgcct tcccaagatac agtaatttca gcgccttttc
2401 gggatattgc tgggtgcgatt ccagaggcaa tagactttcc tgtaaaatga gtaatagaag
2461 acatatctgt atttgataaa atacagacaa attactggga acttctcgtc tatgaaagct
2521 ggaacgaagg aagtaatagc cgattactgc ctggtttggc acgtgaatgc caaagcaagg
2581 ggatgttaag taagtgtcgt atcatagaaa atagccttta tattggacat agotatgaag
2641 aaatgtttta cagcattctc ccatattcaa accaggtttg agggccttat gaattatc
2701 ctttcaactt tttagctatg ctccaagaag tacaaggtga tttagatttt gagcaggcct
2761 ttgcccacag taacttttcc aatactcttg ttctgtatgc actatcctta atgaaaaata
2821 cgatgttact tacagaaagt tttagattata caccttggga tgetattat ggagatatta
2881 attatgatga acaatttgct gcaatgtcta ttaatgaaag catagaaaaa tgotatgaa
2941 cctatagagg tgtggcattc caaaactctt caaaaagtat tgacttttcc ctaaaatc
3001 taaccacatt cattgataat ggactaacgc aatgtctat atctgattta ccgtatgata
3061 ttgtgcaaca agaaatctct caattcttac aaggaagtaa tgaatggaaa acacttgatg
3121 ccatgttatt taacttagat aaaggagata ttaatgtgtc ttccagaaag ctctgcaat
3181 cagcaaaaaga taataatata aaatttagag ctataggcca ttccagaaat tctgttccgc
3241 catttaataa ccttataaag tctttatatt ataaagaaa tataatagct gaagcaattg
3301 aaaaactaga tcgagaaggt caaaaattg ttgtatttgc tgatgctct ctgctcaaca
3361 gcaagcctgg gacaggtcgt cctatgccaag gactagtcca atatttataa ataccagcaa
3421 ctgtagtaga tagcagtggt gcatggcaat tcttccaga ttgacttcca agcagatctc
3481 ctattgaaat tacagagtta gaaaattggc aagtcttaac tctccacaag ggtaagatc
3541 ttggattaaa gcaatttaag ttaacggcag gttttccaac agacaagaag cgtctacctc
3601 ttttagagaa ttgcgtttct gaagatttaa ggaagaattt aatgcaaaa attgatgcaa
3661 taaaaatga tggaaaatg aatagtttag tgtgtatgga agctggctct tgtgattcag
3721 taagccctaa ggtagctgcc cgtctaaag atatggggtt agaagctggg atgggtgctt
3781 ctattacctg gtggagactg gaaggcggga tggaaatttc acatcagatg actacactg
3841 ctctctttaa atttgctgg aaagagtttg ccgtggatgc ttcaactata caattttag
3901 acgaccaatt agatacaact atcctgatc tacctgtaga ttgattggct ttgaaatag
3961 ctcaagaaa tgggctattt aatccttttg tggaaatgt tagtaaaa ca ggaacatgt
4021 tagcactctt catgcctcct cttttcaaaa agcctcgtct acaagagcca ctataactaa
4081 ttaaaaactg tattaagcc ttatattata aggctttaat ttcttctcaa gaattttaa
4141 gtagaagaat caaaatcaat gagatagata aaatcaaat ttattaccaa tacaacttct
4201 ttaagtatac tttttgaatt ttttgcgta ataaatttat ataccctta actcaataaa
4261 agaagttatt gaaagttta aatcttgtga gcaagatgaa gatataattt cagcaatcga
4321 tcttattagc gcttcaata gaaggcgtg ggatgcagtg gaacaagat tggctctag

```

Figura 11. Secuencia completa de nucleótidos del gen de la toxina de *Pasteurella multocida*.

Fragmento amplificado de 846 pb

Iniciadores ToxA F y ToxA R

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.  
FOR *IN VITRO* USE ONLY.

# DNA Molecular Weight Marker XIII (50–750 bp)

50 base pair ladder

Cat. No. 1 721 925

50 µg  $\cong$  1 A<sub>260</sub> unit

50 µg (200 µl) for 50 gel lanes

Version 4, Jan. 2003

Store at -15 to -25° C

## Product overview

<b>Formulation</b>	Solution in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.
<b>Concentration</b>	250 µg/ml
<b>Size distribution</b>	Fragment mixture prepared by cleavage of a specially constructed plasmid with restriction endonucleases. The mixture contains 15 double stranded DNA fragments with the following base pair lengths: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 and an additional band of 2642 bp. The 250 bp and 500 bp banding pattern is two to three times brighter.
<b>Application</b>	<p>The DNA Molecular Weight Marker XIII allows accurate sizing of DNA fragments generated by PCR or restriction digest separated on agarose gels. The DNA molecular weight marker can be used in conjunction with DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)* for precise size determination.</p> <p>Electrophoretic separation of this molecular weight marker results in a regular pattern. The fragments have 5'-protruding ends which can be labeled by filling in reactions using e.g. [<sup>32</sup>P]-dTTP and [<sup>32</sup>P]-dGTP, or using DIG-11-ddUTP* and Terminal Transferase*.</p>

**Typical analysis** The DNA fragment mixture shows the ladder with 15 bands and an additional band of 2642 bp in agarose gel electrophoresis as shown in the figure.

**Separation conditions** Apply 1 µg DNA per lane on a 2% Agarose MP\* gel.

**Stability/ Stability** The unopened reagent is stable at -15 to -25°C until the expiration date printed on the label.

**Note:** This product is shipped on dry ice. Once thawed we recommend further storage at 2-8°C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

## Related Products

(see German Version)

**Printed Materials** LabFAQs „Find a Quick Solution“ 2 115 972  
Molecular Weight Markers for Nucleic Acids 1 630 024  
or available at  
[http://www.roche-applied-science.com/prod\\_inf/applic/mwm.pdf](http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/applic/mwm.pdf)  
Restriction Enzyme Ordering Guide 1 629 522  
Restriction Enzyme Poster 3 358 175

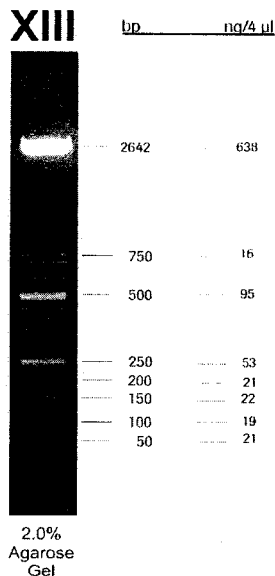


Fig.: Separation of 1 µg DNA molecular weight marker XIII on a 2% agarose gel. Ethidiumbromide stain.

\* available from Roche Applied Science

## How to contact Roche Applied Science

[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

to order, solve technical queries, find product information, or contact your local sales representative.

[www.roche-applied-science.com/pack-insert/1721925a.pdf](http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1721925a.pdf)

Please visit our new Online Technical Support Site