

# ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR – ANIDADADO PARA LA DETECCIÓN DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

Pulido A<sup>1</sup>, Mogollón JD<sup>2</sup>, Morales HJ<sup>3</sup>, Rincón MA<sup>4</sup>.

Laboratorio de diagnóstico –CEISA- Instituto Colombiano Agropecuario<sup>(2,4)</sup>

Laboratorio de Microbiología – Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina<sup>(1,3)</sup>

Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia

## RESUMEN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la Neumonía enzoótica porcina, una de las enfermedades más importantes en la industria porcina. En la actualidad, el proceso de diagnóstico *ante-mortem* es una de las principales dificultades, dadas la poca sensibilidad y especificidad de las técnicas que se utilizan. El propósito de esta investigación fue estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, utilizando diferentes métodos de extracción del ADN, tanto comerciales como convencionales. Para determinar la sensibilidad de la técnica se realizaron diluciones seriadas al cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae*, cepa J, mantenida en medio Friis. También se evaluaron algunas modificaciones hechas a la mezcla de la reacción de PCR tradicional reportadas en la literatura y, una vez ajustada, la técnica fue aplicada en muestras clínicas como hisopados nasales y lavados traqueobronquiales.

Los mejores resultados fueron obtenidos cuando el ADN se extrajo de la bacteria por calor y se trató con proteinasa K para luego ser utilizado en una reacción de PCR - anidado que no contenía estabilizadores de la Taq-polimerasa, como el glicerol o la seroalbúmina bovina. Bajo estas condiciones, se logró detectar *M. hyopneumoniae* hasta la dilución de 10<sup>-5</sup> de un cultivo puro de la cepa J de referencia y también a partir de algunas muestras clínicas.

**Palabras clave:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCR, hisopado nasal, lavado traqueobronquial.

## STANDARDIZATION AND APPLICATION OF THE PCR – NESTED TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

### ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the causal agent of Swine Enzootic Pneumonia, one of the most important diseases in the swine industry. Presently, the diagnosis ante-mortem is difficult because of the low sensibility and specificity of the techniques currently in use. The purpose of this research was to standardize a nested - Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples from swine. For DNA extraction, different commercial and conventional methods were applied. The sensitivity

1 apulidov@unal.edu.co

of the amplification reaction was determined by using serial dilutions of the *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain J, cultured in medium Friis. In addition, some modifications of the PCR reaction mixture were evaluated, and once the conditions were adjusted, the technique was applied to clinical samples such as nasal swabs and tracheobronchial washings. The best results were obtained when the bacterial DNA was extracted by heat, treated with Proteinase K and then used in PCR reactions without the Taq-polymerase stabilizers, glycerol or BSA. Under these conditions, *M. hyopneumoniae* was detected up to  $10^{-5}$  dilution of a pure culture of the reference Strain J, and also from several clinical samples.

**Key words:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, Nested-Polymerase Chain Reaction, Nasal Swabs, Tracheobronchiolar washings.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, el diagnóstico de la Neumonía enzoótica porcina se realiza teniendo en cuenta la detección de síntomas, tales como la tos no productiva sin fiebre; las sospechas de la enfermedad son confirmadas por la presencia de lesiones macroscópicas que, al ser comparadas con los hallazgos histopatológicos, reportan una sensibilidad del 76% y una especificidad del 71% (Hur-nik *et al.*, citados por Thongkumkoon *et al.*, 2000). El aislamiento del *Mycoplasma hyopneumoniae* en medios de cultivo, por lo general, resulta ser complicado, puesto que es un microorganismo muy exigente para ser cultivado, además de que se encuentra en compañía de otros micoplasmas que son flora normal de las vías respiratorias altas del cerdo. Las técnicas serológicas pueden también ser de ayuda para la detección de anticuerpos; sin embargo, se debe tener en cuenta que esta bacteria comparte antígenos con *M. dispar*, *M. ovipneumoniae*, *M. bovoculi*, *M. hyorhinis* y *M. flocculare* y puede presentar reacciones cruzadas en algunos casos (Sheldrake *et al.*, 1990). Con la tecnología de la biología molecular, una de las pruebas utilizadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la que se demuestra la presencia del agente, gracias a que se amplifica un fragmento del ADN genómico del microorganismo.

Una de las variantes del PCR es la técnica anidada (PCR-n) que ha sido desarrollada y utilizada por el grupo de trabajo de la Universidad de Minnesota, la cual consta de dos reacciones: la primera con cebadores externos y la segunda con iniciadores internos que contienen las secuencias encontradas en la primera amplificación (Calsamiglia y Pijoan, 1998), aspecto que la hace mucho más específica y sensible.

Una vez analizados los reportes de literatura y teniendo en cuenta los problemas actuales a nivel de campo, con esta investigación se pretende estandarizar la técnica de PCR-anidado, utilizando una cepa J de referencia. Se determinó la sensibilidad de la prueba y luego se aplicó para la detección de *M. hyopneumoniae* en hisopados nasales y lavados traqueobronquiales obtenidos a partir de cerdos naturalmente infectados, simplemente para demostrar el funcionamiento de la técnica.

Los resultados demostraron que la técnica de PCR-anidado estandarizada tuvo una sensibilidad de  $10^5$  bacterias, cuando el ADN del micoplasma fue extraído con calor y proteinasa K y la mezcla de reacción no poseía glicerol como estabilizante. Bajo nuestras condiciones se demostró, por primera vez en el país, su habilidad para detectar infecciones naturales en casos de campo. Se com-

probó así la presencia de *M. hyopneumoniae* en cerdos de granjas colombianas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo y mantenimiento de cepas

El mantenimiento de la cepa referencia (*Mycoplasma hyopneumoniae*, cepa J, Universidad de Minnesota, Facultad de Medicina Veterinaria, Grupo de Erradicación de Enfermedades Porcinas) se realizó en medio Friis que está compuesto por 598 ml de agua destilada, 12,5 ml de cada solución de sales de Hank's A y B, 4,1 g de caldo infusión cerebro corazón (Difco-USA) y 4,35 g de caldo PPLO con cristal violeta (Merck-Germany); se ajustó a un pH entre 7,3-7,4 y se esterilizó en autoclave; con posterioridad y por filtración se adicionaron 30 ml de levadura type II 0,09 g/30ml (Sigma-USA), 2,5 ml de bacitracina 5% (Sigma-USA), 2,5 ml de nafticilina 5% (Sigma-USA), 2,5 ml de acetato de talio 5% (Sigma-USA), 4,5 ml de solución de rojo de fenol al 0,6% (Sigma-USA) y finalmente 220 ml de suero porcino certificado libre de Mycoplasma (Gibco-USA) (Hovind-Hougen y Friss, 1991).

A 4 ml de medio Friis se agregó 1 ml de cultivo y se permitió una incubación a 37 °C durante 15 días o más, hasta el momento en que el crecimiento fue evidente, gracias al cambio de pH, el cual se determinó como un cambio de color en el medio cuando el grado de acidez aumentó.

### Extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de la cepa referencia se utilizaron algunos kits comerciales que tienen diferentes bases metodológicas y el método tradicional de calor y proteinasa K, basado en el aislamiento de ácidos nucleicos por destrucción de membranas celulares y denaturación de proteínas acompañantes (Marmur, 1961; García *et al.*, 1995).

**PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems USA) Y Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega-USA).** Se tomaron inicialmente 1,5 ml de medio de cultivo Friis con evidencia de crecimiento del *M. hyopneumoniae*; se hizo transferencia a un tubo Eppendorf® y se continuó con las indicaciones suministradas por cada uno de los productos. El ADN obtenido fue almacenado a 4 °C hasta su uso en no más de una semana; de lo contrario, era almacenado a -20 °C.

**Método tradicional con proteinasa K.** Inicialmente se tomaron 1,5 ml de medio de cultivo con evidencia de crecimiento para transferirlo a un tubo Eppendorf®, luego se realizó una centrifugación a 21.000G durante 20 minutos, después de lo cual el sedimento fue resuspendido en 50 µl de buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Promega-USA). Se incubó durante 1 hora a 56 °C y durante 15 min a 96 °C; posteriormente, se centrifugó 3 min a 16.000G para obtener el ADN en el sobrenadante que se transfirió a un vial nuevo (Marmur, 1961; Mattsson *et al.*, 1995).

El ADN obtenido fue almacenado a 4 °C hasta su uso en no más de una semana; de lo contrario, era almacenado a -20 °C.

### Muestras clínicas

Una vez se estandarizó la técnica utilizando la cepa J de *M. hyopneumoniae*, y con el propósito de determinar el funcionamiento de la prueba, se tomaron muestras de hisopados nasales y algunos lavados traqueobronquiales a un grupo de 48 lechones de 5 a 8 semanas de edad y que procedían de una granja de producción porcina colombiana. Tales cerdos se encontraban ubicados en áreas de aislamiento del Laboratorio Nacional de Diagnóstico - ICA y sin tratamiento alguno. El ADN de estas muestras fue obtenido con la metodología comercial de Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega-USA), muestras que luego se ana-

lizaron por PCR – anidado; además, a partir de los lavados traqueobronquiales se intentó aislamiento de *M. hyopneumoniae* en medio Friis.

### PCR-anidado

El PCR se realizó utilizando dos pares de cebadores para el gen ribosomal 16 S (16S rRNA) en el ADN del *M. hyopneumoniae*; los cebadores externos utilizados fueron los descritos por Mattsson *et al.*, (1995) y los iniciadores para la reacción interna fueron los reportados y utilizados por Calsamiglia *et al.*, (1999a)

Inicialmente se trabajó con una premezcla de 50  $\mu$ l compuesta por Buffer PCR 10X (Promega-USA) (concentración final 1X), MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega-USA) (cf 3mM), dNTPs 10 mM (Promega-USA) (cf 0,5 mM), Forward primer 10  $\mu$ M (InVitrogen-USA) (cf 0,2  $\mu$ M), Reverse primer 10  $\mu$ M (InVitrogen-USA)(cf 0.2  $\mu$ M), Glycerol 50% (cf 5%) (Sigma-USA), y Taq DNA Polimerase 5 U/ $\mu$ l (Promega-USA) (cf 1U), además 5  $\mu$ l del ADN extraído se adicionaron en la primera reacción; para la segunda reacción se tomaron 0,8  $\mu$ l del producto que se amplificó en la primera, de modo que en la última reacción se amplificó un fragmento de 352 bp ubicado dentro del fragmento de 649 bp obtenido en la primer reacción.

Una vez estandarizada la técnica utilizando la cepa J como control positivo, era necesario determinar el efecto de algunas sustancias estabilizadoras de la Taq-Polimerasa utilizadas en las reacciones de amplificación, como el glicerol y la seroalbúmina bovina (BSA) (Promega-USA) cuando se analizaban muestras clínicas. De manera que se realizó una modificación a la premezcla, donde sólo se cambió el glicerol por BSA a una concentración final de 5%, o sin glicerol

y sin BSA. Por último, y después de analizar los resultados, se trabajó con una premezcla de 25  $\mu$ l, en la que se utilizaron los mismos componentes a las mismas concentraciones pero sin glicerol y sin BSA.

Las dos reacciones fueron realizadas bajo diferentes condiciones en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (USA). Para la primera ronda se utilizaron 30 ciclos con un período de denaturación a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 60 °C por 60 segundos y una extensión a 72 °C por 60 segundos. En la segunda ronda, se emplearon 30 ciclos con una denaturación a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 60 °C por 45 segundos y una extensión a 72 °C por 30 segundos (Calsamiglia *et al.*, 1999a; Ruiz y Pijoan, 2002). Por último, los productos obtenidos en la primera y segunda ronda fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Sigma-USA).

### Prueba de sensibilidad

Una vez extraído el ADN a partir de la cepa J de *M. hyopenumoniae*, se evaluó su cantidad y su calidad por medio de espectrofotometría. Para tal fin se realizaron lecturas de absorbancia en las longitudes de onda 260 $\gamma$  y 280 $\gamma$ . Una vez fueron conocidos los valores de concentración y pureza de una alícuota de ADN, se realizaron diluciones seriadas a partir de ella. Adicionalmente, se realizaron diluciones en base 10 a partir de la cepa J crecida en medio Friis después de 15 días de incubación, desde 10<sup>0</sup> hasta 10<sup>-10</sup>, y se extrajo el ADN a partir de cada una de ellas por los métodos descritos anteriormente; posteriormente, se efectuó un análisis PCR-anidado, con lo que se logró determinar la concentración bacteriana a la que fue sensible la técnica.

## RESULTADOS

### Sensibilidad de la técnica PCR-ANIDADO para *Mycoplasma hyopneumoniae*

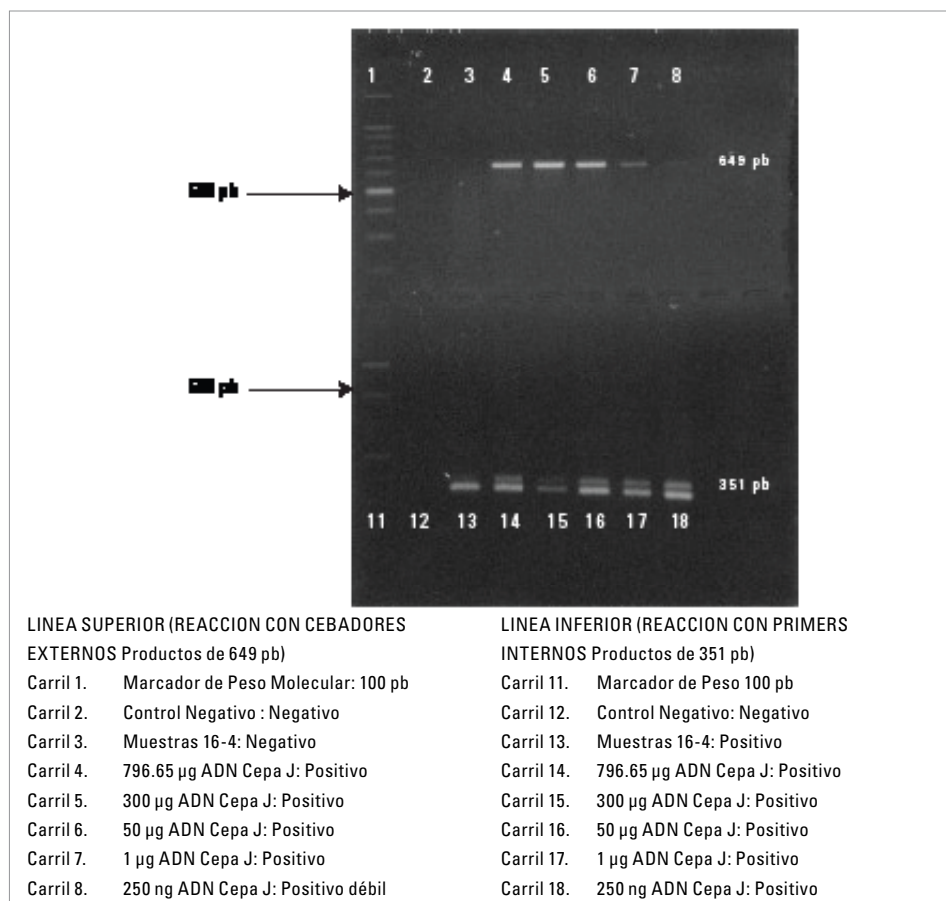
Como es posible observar en la figura 1, la línea superior corresponde a los productos que se obtuvieron en la primera reacción (cebadores externos) y que tenían un tamaño de 649pb; con esto fue posible determinar que el PCR sencillo alcanzó una sensibilidad de hasta 250ng de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*, grado de sensibilidad que logró ser aumentada a una detección mayor de 250ng una vez se realizó la segunda re-

acción con los iniciadores internos (línea inferior), a partir de la cual se obtuvieron productos con un tamaño de 351pb.

De forma adicional, se realizaron diluciones con base 10 a partir de un cultivo puro de cepa J de *M. hyopneumoniae*; los resultados indicaron que la técnica logró ser lo suficientemente sensible hasta una dilución de  $10^{-5}$ , como se observa con claridad en la figura 2.

La sensibilidad de la técnica se aplicó también a algunas muestras de diagnóstico remitidas al laboratorio de medicina porcina del Laboratorio Nacional de Diagnóstico

**Figura 1.** Prueba de Sensibilidad para la Técnica PCR - anidado para *M. hyopneumoniae*



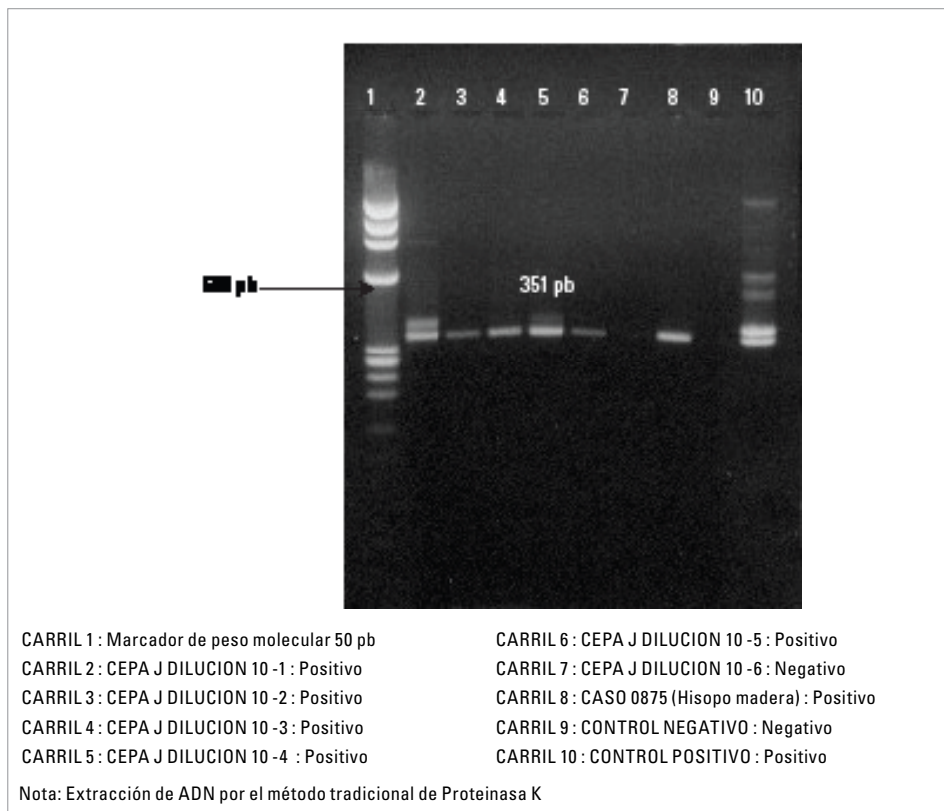
ICA-CEISA; como la muestra 16-4 que el PCR sencillo no logró detectar (figura 1, línea superior, carril 3), mientras el PCR-anidado indica una buena concentración de ADN por la calidad de la señal (figura 1, línea inferior, carril 13).

### Extracción de ADN

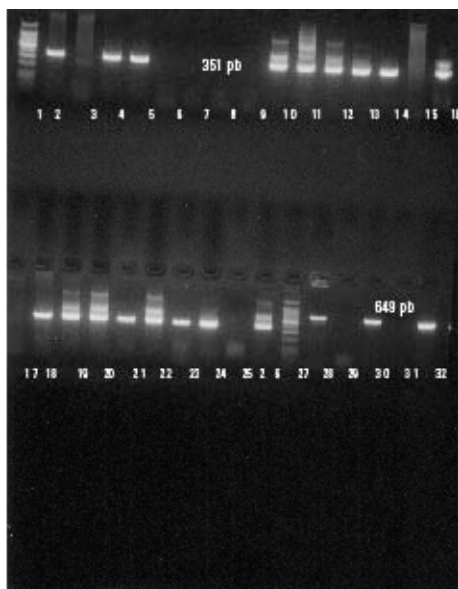
Los métodos de extracción evaluados mostraron sólo un logaritmo de diferencia. La detección con el método de extracción de ADN a partir de la cepa J con proteinasa K llegó hasta  $10^{-5}$  (figura 2), con PrepMan, la dilución mínima que se detectó fue  $10^{-4}$  (figura 3, línea superior, carriles 10 al 14) y con el método de extracción de Kit Wizard, el límite de detección estuvo en  $10^{-2}$ .

Teniendo en cuenta que el método de extracción de ADN a partir de las muestras era otra variable que podía interferir en la sensibilidad de la técnica para lograr detectar la baja cantidad de micoplasma en las fosas nasales de los cerdos, fue necesario probar el método tradicional de proteinasa K, PrepMan y Wizard. Por tal razón, fueron muestreados cuatro lechones de 6-8 semanas de edad que se encontraban en las unidades de aislamiento del ICA, sin tratamiento alguno y sin el efecto de vacunas. Tres de los cuatro cerdos fueron positivos con el método tradicional y negativos con PrepMan (figura 3, línea superior, carriles 2 al 9) y Wizard.

**Figura 2.** Prueba de Sensibilidad para la Técnica PCR – anidado para *M.hypopneumoniae*.



**Figura 3.** Comparación de algunos métodos de extracción de ADN para *Mycoplasma hyopneumoniae*



**LÍNEA SUPERIOR:**

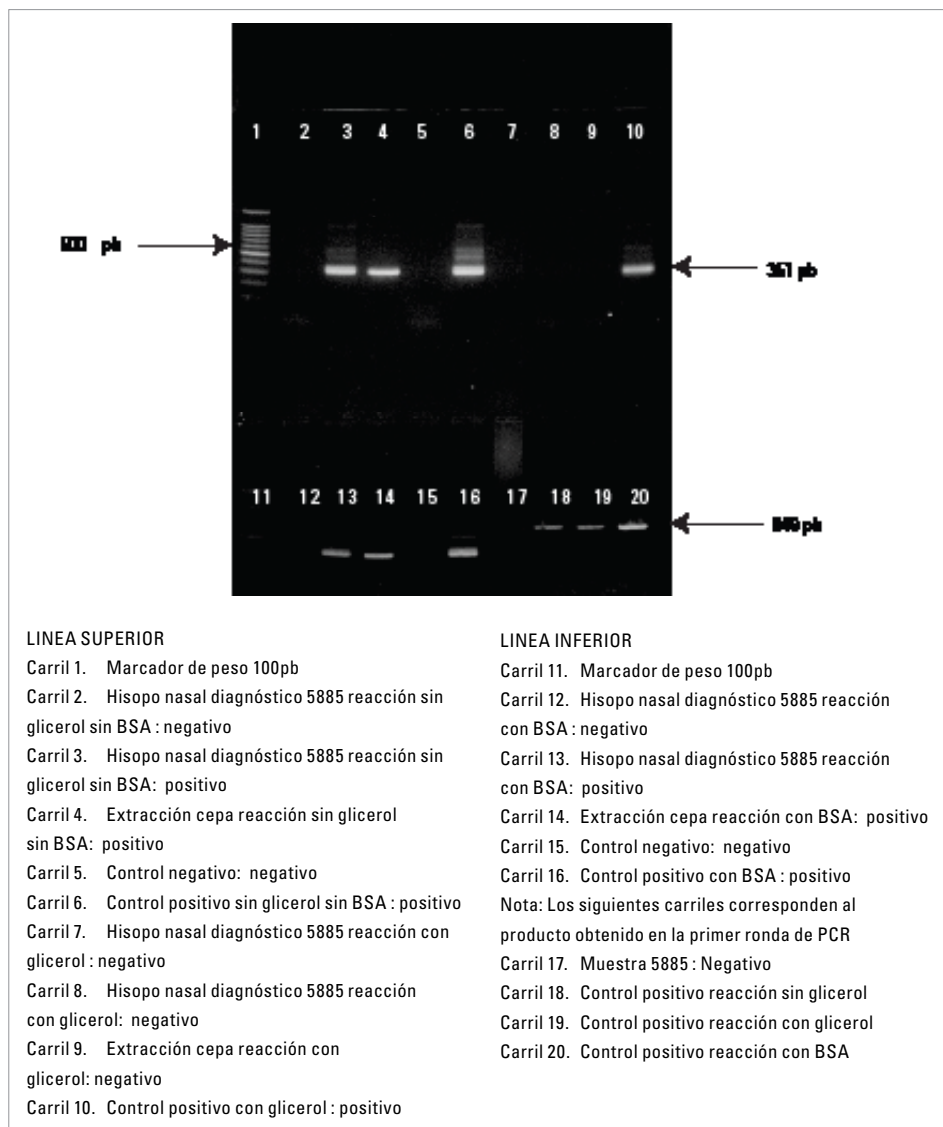
- Carril 1. MARCADOR PESO 100pb
- Carril 2. CERDO ICA 1 extracción proteinasa K positivo
- Carril 3. CERDO ICA 2 extracción proteinasa K negativo
- Carril 4. CERDO ICA 3 extracción proteinasa K positivo
- Carril 5. CERDO ICA 4 extracción proteinasa K positivo
- Carril 6. HISOPO CERDO ICA 1 extracción con prepman negativo
- Carril 7. HISOPO CERDO ICA 2 extracción con prepman negativo
- Carril 8. HISOPO CERDO ICA 3 extracción con prepman negativo
- Carril 9. HISOPO CERDO ICA 4 extracción con prepman negativo
- Carril 10. cepa 10 -0 prepman 200 y lavados Isoprop-Acetato-Etanol positivo
- Carril 11. cepa 10 -1 prepman 200 y lavados Isoprop-Acetato-Etanol positivo
- Carril 12. cepa 10 -2 prepman 200 y lavados Isoprop-Acetato-Etanol positivo
- Carril 13. cepa 10 -3 prepman 200 y lavados Isoprop-Acetato-Etanol positivo
- Carril 14. cepa 10 -4 prepman 200 y lavados Isoprop-Acetato-Etanol positivo
- Carril 15. Muestra diagnóstico pulmón extraída con Promega negativo
- Carril 16. Control Positivo positivo

**LÍNEA INFERIOR**

- Carril 17. Muestra diagnóstico hisopo extraído con proteinasa K negativo
- Carril 18. Muestra diagnóstico hisopo extraído con proteinasa K positivo
- Carril 19. Muestra diagnóstico hisopo extraído con proteinasa K positivo
- Carril 20. Prueba de control positivo positivo
- Carril 21. Prueba de control positivo positivo
- Carril 22. Prueba de control positivo positivo
- Carril 23. Prueba de control positivo positivo
- Carril 24. Prueba de control positivo positivo
- Carril 25. Control negativo negativo
- Carril 26. Control positivo positivo
- Carril 27. Marcador de peso 100 pb
- Carril 28. Producto de la primer ronda muestra ubicada en el carril 4 positiva
- Carril 29. Producto de la primer ronda muestra ubicada en el carril 5 negativa
- Carril 30. Producto de la primer ronda muestra ubicada en el carril 6 positiva
- Carril 31. Producto de la primer ronda muestra ubicada en el carril 7 negativa
- Carril 32. Producto de la primer ronda muestra ubicada en el carril 10 positiva

Nota: Para la realización de estas reacciones no se incluyó glicerol en la premezcla de reacción.

**Figura 4.** Uso del glicerol y BSA en la amplificación del fragmento de 351 pb de *M. hyopneumoniae* a partir de muestras clínicas



### Optimización de las condiciones de la técnica

Con el fin de aplicar la técnica en muestras clínicas, se realizaron algunas variaciones a los componentes de la premezcla para la reacción de PCR-anidado. Procesando la

muestra 5885 remitida al laboratorio de medicina porcina del ICA-CEISA, se realizaron variaciones utilizando o no BSA o glicerol en la reacción. Se observó que el glicerol estaba actuando como un factor que disminuía la sensibilidad en la reacción de PCR-anidado (figura 4, línea superior, carriles 2-3 y 7-8);



los resultados son iguales y reproducibles cuando hay ausencia de glicerol y BSA o en presencia de BSA (figura 4, línea superior, carriles 2-3 y 12-13).

### Muestras clínicas

Todos los 48 hisopos nasales analizados por PCR-anidado fueron negativos. En contraste, el 8,3% de los lavados traqueobronquiales de esos animales fueron positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* por la técnica de PCR-anidado; sin embargo, de ninguno de ellos fue posible aislar el microorganismo.

### DISCUSIÓN

Uno de los propósitos de esta investigación fue lograr estandarizar la técnica de PCR-anidado para ser utilizada en otro momento como prueba diagnóstica de elección en nuestro medio; para alcanzar de una manera confiable este objetivo fue necesario determinar la sensibilidad de la técnica.

Por medio de diluciones realizadas a partir de una muestra de ADN de una cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae*, se logró determinar que el método de PCR sencillo era sensible hasta una concentración de 250ng de ADN; en contraste, un hallazgo satisfactorio fue el aumento de la sensibilidad cuando se utilizó el PCR-anidado, ya que, como se pudo observar en los resultados, la intensidad de la señal va disminuyendo gradualmente a medida que las diluciones se hacen mayores, hasta el punto que dicha señal se hace imperceptible a simple vista; se observa claramente que cuando es utilizado el PCR-anidado, el positivo débil de la reacción sencilla se hace fácilmente interpretado como positivo, en vista de que la señal del producto obtenido es mucho más alta.

Para saber exactamente cuántas bacterias era capaz de detectar la técnica, se realizaron diluciones seriadas de la cepa J en crecimiento y se extrajo el ADN por tres métodos diferentes, a partir de los kit

comerciales de PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems-USA), del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega-USA) y de la metodología tradicional de tratamiento con calor y proteinasa K, reportada por Marmur (1961). De acuerdo con los resultados obtenidos, y a pesar de haber utilizado tecnologías comerciales de alta confiabilidad, se encontraron diferencias importantes entre estos resultados, como la alteración del grado de sensibilidad. El método de proteinasa K demostró ser sensible hasta una dilución de  $10^{-5}$ ; el kit de PrepMan, aunque cercano al anterior, disminuyó la sensibilidad en un logaritmo, llegando a detectar el microorganismo en la dilución  $10^{-4}$  y por último, el kit Wizard Promega fue sensible sólo hasta la dilución  $10^{-2}$ . Como estos resultados fueron obtenidos a partir de un medio de cultivo con la cepa referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en el que la concentración bacteriana es bastante alta, es posible pensar que en muestras clínicas, donde la cantidad de microorganismos es mucho menor, la sensibilidad de la prueba podría disminuir de manera apreciable.

Esta disminución en el grado de sensibilidad con el método Wizard Promega podría explicarse por la cantidad de lavados que implica esta metodología que, de acuerdo a la información suministrada por el productor, se basa en el protocolo tradicional de extracción de ADN por Fenol-Cloroformo-Isopropanol. Sin embargo, dada la bajísima cantidad de ADN obtenida a partir de muestras clínicas, el efecto de dichos lavados podría producir una pérdida importante de ADN que posiblemente conduzca a falsos negativos debido a la disminución sustancial de la sensibilidad en la prueba. Esta gran desventaja hizo que se descartara la posibilidad de seguir utilizando esta metodología en el procesamiento de muestras clínicas (Loens *et al.*, 2003).

Una vez se definió el método de extracción ideal, era necesario conocer el efecto de algunos compuestos estabilizadores de la Taq polimerasa, como el glicerol y la seroalbúmina bovina (BSA). El glicerol se comporta como un agente inhibidor de la reacción (figura 4, carriles 4, 9 y 14); sin embargo, cabe resaltar el comportamiento de los controles positivos (figura 4, carriles 6, 10 y 16) frente a las variables que se analizaron; es posible suponer que estos resultados obedecieron al efecto que tiene el glicerol en la reacción cuando actúa sobre una baja concentración de ADN, induciendo falsos negativos. Este efecto desapareció cuando la cantidad de material genético era bastante alta, como ocurrió con los controles positivos; otro punto que se debió tomar en cuenta antes de implementar la técnica en muestras clínicas.

Los hallazgos reportados por Mattsson *et al.*, (1995), Caron *et al.*, (2000) y por Sibila *et al.*, (2004), sugieren que los hisopados nasales eran las muestras menos eficientes para detectar el *Mycoplasma hyopneumoniae*. Teniendo en cuenta además que Kobisch (2001) recomendó que la mejor muestra para diagnóstico de neumonía enzootica era el lavado traqueobronquial, se decidió muestrear lechones procedentes de una granja de producción porcina convencional para observar la eficiencia de la técnica en lavados traqueobronquiales bajo nuestras condiciones. Para tal efecto, se muestrearon cerdos que permanecieron todo el tiempo en unidades de aislamiento. A partir de ellos se obtuvo muestra de hisopado nasal y de lavado traqueobronquial. Debido a la gran cantidad de inhibidores de la Taq polimerasa que podrían estar presentes en este tipo de muestras (Baumeister *et al.*, 1998) y a que se sospechaba de la existencia de una buena colonización de esta región por gran cantidad de micoplasmas, se decidió realizar la extracción de ADN con el método de Wizard Promega; sin embargo, los resultados

no fueron lo suficientemente confiables para establecer conclusiones precisas. Aunque nuestros resultados fueron sólo del 8,3% de positividad a partir de lavados traqueobronquiales, es posible suponer que de haber utilizado el método convencional de calor y proteínasa K para la extracción de ADN, los hallazgos podrían haber revelado una mejor positividad a partir de estas muestras, como lo describe la literatura.

La técnica de PCR-anidado ha sido recomendada por varias razones, como el hecho de aumentar la sensibilidad del PCR sencillo, así como por tener algunas ventajas, como eliminar pruebas costosas y largas, además de pruebas radiomarcadas que son muy riesgosas.

## CONCLUSIÓN

Se concluyó que bajo las condiciones de trabajo estandarizadas en nuestro laboratorio, la técnica de PCR-anidado mostró una sensibilidad hasta una dilución de  $10^{-5}$  de un cultivo puro de *M. hyopneumoniae* y se pudo detectar un fragmento de 351 pb del genoma del *Mycoplasma hyopneumoniae* en muestras de campo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Instituto Agropecuario Colombiano (ICA) y al convenio ICA - Asociación Colombiana de Porcicultores (ACP) así como el Fondo Nacional de la Porcicultura (FNP) por el apoyo económico y técnico para la realización de la presente investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baumeister A, Runge M, Ganter M, Feenstra A, Delbeck F and Kirchhoff H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. Journal of Clinical Microbiology 36(7):1984-1988, 1998.

2. Calsamiglia M and Pijoan C. PCR based diagnostics for profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* shedding. Allen D Lemna Swine Conference, pp. 54-56, 1998.
3. Calsamiglia M, Pijoan C and Trigo, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. Journal Veterinary Diagnostic Investigation 11: 246-251, 1999a.
4. Calsamiglia M, Pijoan C and Bosch GJ. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and nested PCR technique. Swine Health Prod 6: 263-268, 1999b.
5. Calsamiglia M, Collins J and Pijoan C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. Veterinary Microbiology 76: 299-303, 2000.
6. Caron J, Ouardani M and Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in Pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. Journal of Clinical Microbiology 38 (4): 1.390-1.396, 2000.
7. García M, Jackwood W, Levisohn S and Kleven H. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. sinoviae*, and *M. iowae* by multi-species Polymerase Chain Reaction and restriction fragment length polymorphism. Avian Diseases 39: 606-616, 1995.
8. Hovind-Hougen K and Friis NF. Morphological and ultrastructural studies of *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. Research in Veterinary Science 51: 155-163, 1991.
9. Kobisch M. *M. hyopneumoniae* detection. In: Respiratory Diseases Pig Progress, pp 12-13. June, 2001.
10. Loens K, Ursi D, Goossens H and Leven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. Journal of Clinical Microbiology 41: 4915 – 4923, 2003.
11. Marmur J. A procedure for the Isolation of Deoxyrinucleic Acid from Micro – organis-ms. Journal Mol Biol 3: 208 – 218, 1961.
12. Mattson J, Bergström K, Wallgren P and Johandosn KE. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene. Journal of Clinical Microbiology 33(4): 893-897, 1995.
13. Ruiz A and Pijoan C. Use and interpretation of N-PCR from nasal swabs for *Mycoplasma hyopneumoniae* diagnosis. Proceedings of the 17<sup>th</sup> IPVS Congress, vol. 2, Iowa, pp. 79, 2002.
14. Sheldrake RF, Gardner IA, Saunders MM and Romalis LF. Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. Australian Veterinary Journal 36(2): 39-42, 1990.
15. Sibila M, Calsamiglia M, Segalés, Nofrarias M, Lopez-Soria S, Espinal A, Segalés J, Riera P, Llopat D and Artigas C. Correlation between localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in respiratory airways, macroscopic and microscopic lung lesions in a longitudinal study. Proceedings of the 18 th IPVS Congress, vol. 1, Hamburg, Germany, pp.194, 2004.
16. Thongkumkoon P, Damrongwatanapokin T, Wongsawang S and Sarikaputi M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from field samples using a PCR technique. The 16th IPVS. Australia, pp. 450, 2000 .