

# ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DEL CERDO, I. ANÁLISIS DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS

García Avalos M. B.<sup>(1)</sup>; Herrera Zaragoza, L.<sup>(2)</sup>; Alvarado Estrada, K. N.<sup>(3)</sup>, Garcidueñas, C.<sup>(3)</sup>, Guerrero Barrera A.L.<sup>(3)</sup>;

<sup>(1)</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

<sup>(2)</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

<sup>(3)</sup> Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

## RESUMEN

Los problemas respiratorios son la principal causa de muerte en las granjas porcícolas en el mundo. Estas enfermedades pueden ser virales o bacterianas y forman parte del complejo respiratorio porcino, el cual consiste en una sucesión de enfermedades primarias y oportunistas a lo largo del año. El propósito del presente trabajo fue estandarizar las técnicas para detectar las enfermedades respiratorias del cerdo, tanto virales como bacterianas, a partir de muestras de sangre, tejido infectado, alimento, agua, suelo y aire. Así como evaluar el cambio morfológico presente en los tejidos infectados. Para este propósito, se tomaron muestras provenientes las granjas semitecnificada Posta Zootécnica, UAA y Agroindustrias Ceja, tecnificada.

## INTRODUCCIÓN

El complejo respiratorio porcino es causa importantes pérdidas económicas en la industria porcícola, debido al alto índice de morbilidad y mortalidad que provocan (Madsen, et al., 2006; Moguel-Molina, et al., 1998).

En México del 30 al 60% de los cerdos que llegan a los rastros presentan lesiones neumónicas provocadas por patologías respiratorias entre las que destaca el complejo respiratorio porcino, que es causado por una sucesión de infecciones virales y bacterianas, que involucran infecciones por patógenos primarios que tienen la capacidad de mermar el sistema inmune del cerdo, y que así mismo favorecen el desarrollo de otros microorganismos conocidos como patógenos oportunistas, (Brockmeier et al., 2002; Gottschalk, 2005; Williams et al., 2000).

Las enfermedades virales respiratorias son generadas por patógenos primarios y las principales son el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, el virus de influenza, el virus de la pseudorrabia, entre otros, (Brockmeier et al., 2002).

Dentro de los patógenos bacterianos primarios se considera el principal *Mycoplasma hyopneumoniae* (Madsen et al., 2006), pero además encontramos a *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Brockmeier et al., 2002). Como patógenos secundarios u oportunistas, se considera el principal *Pasteurella multocida*, aunque también se presenta *Streptococcus suis*, (Brockmeier et al., 2002; Schoevers et al., 1999).

Con frecuencia se considera que la transmisión de éstas enfermedades se hace por contacto directo entre los cerdos, sin embargo, poco se conoce acerca de la influencia de los factores ambientales que rodean a los cerdos en la granja, que puede ser que incrementen el riesgo de infección de los mismos, (Clark et al., 1991).

De esta forma, el presente trabajo pretende contribuir a la detección de la presencia de patógenos primarios y oportunistas en el ambiente, desarrollando como primer paso la obtención del material genético para estas pruebas, así como registrar en los tejidos a través de técnica histológica y tinción por hematoxilina-eosina, los cambios morfológicos producidos en el tejido infectado.

## METODOLOGÍA

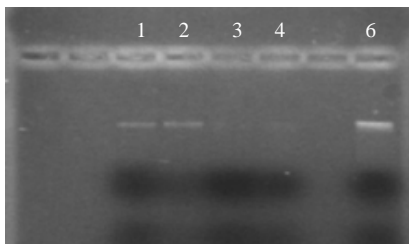
**Toma y procesamiento de muestras.** Se tomaron muestras de agua, alimento y de suelo, además de sangre y orina de quince cerdos del área de engorda. Se realizaron cinco necropsias de cerdos que presentaban síntomas de enfermedad respiratoria, y de dos, muertos el día del muestreo presuntamente por ésta causa. De estos cerdos, se tomaron muestras de 1 cm<sup>3</sup> de tráquea y pulmón, una en fresco para ser preparadas para extracción de ADN y otras fijadas en 10 volúmenes de formalina neutra que fueron procesadas por técnica histológica. Para suelo y alimento, 1 g de cada muestra se diluyó en 2 ml de amortiguador de lisis y de las muestras de sangre se tomó 1 mL, para realizar la extracción de ADN, (Flamm y Hinrich, 1984). Las muestras de agua y orina fueron centrifugadas 15 min a 5000 rpm y la pastilla obtenida fue procesada para realizar la extracción de ADN.

**Estandarización de las técnicas de extracción de ADN a partir de muestras de sangre, tejido, orina, suelo, agua y alimento.** Fue empleada la técnica de Flamm y Hinrich (1984), con algunas modificaciones que incluyen para las muestras de sangre, lavados previos con una solución de lisis: Sacarosa 0.32 M, Tris HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Tritón X-100 al 0.75%. El ADN obtenido se analizó en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas a través del Sistema Chemi Doc Bio Rad.

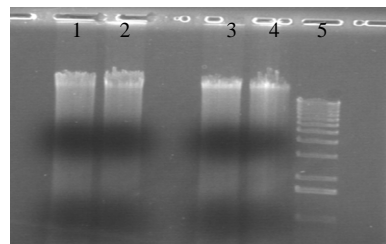
**Técnicas Histológicas.** Los tejidos obtenidos de tráquea y pulmón fijados en formalina neutra al 10 %, fueron procesados a través de la técnica histológica, obteniendo cortes seriados de 4 µm de grosor. Se realizaron dos tinciones, Hematoxilina y Eosina (HE), para evaluar cambios morfológicos presentes en el tejido infectado y tinción de Ácido Periódico Schiff (PAS) para evaluar la presencia de bacterias en tejido, así como la distribución de mucopolisacáridos. Las observaciones se realizaron en un microscopio Leica y las imágenes fueron capturadas con el sistema Pixel View.

## RESULTADOS

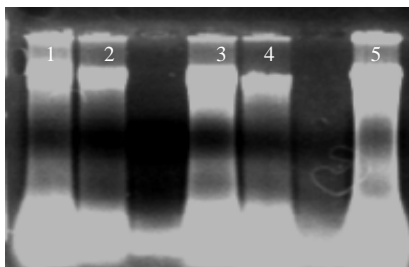
**Estandarización de los métodos de extracción de ADN.** Las figuras 1, 2, 3, 4 y 5 muestran geles de agarosa 0.8 % con ADN obtenido en muestras de suelo, agua, orina, tejidos alimento y sangre respectivamente, extraído por el Método Flamm y Hinrich (1984).



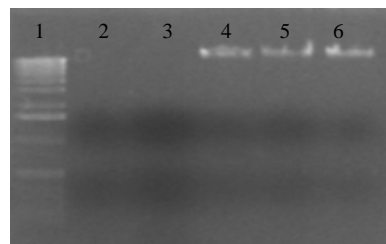
**Figura 1.** ADN extraído de muestras de agua y orina, \*\*. Carriles 1-4 agua, carril 5 orina, en cada carril se agregaron 5 µg de ADN.



**Figura 2.** ADN extraído de suelo, \*\*. Carriles 1-4 suelo, carril 5 marcadores de tamaño molecular λ ladder In Vitro Gene en cada carril se agregaron 5 µg de ADN.



**Figura 3.** ADN extraído de muestras de alimento, \*\*. En cada carril se agregaron 50 µg.

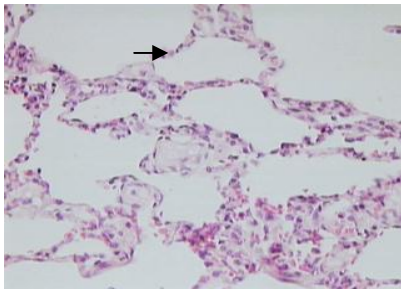


**Figura 4.** ADN extraído de sangre total, \*\*. En cada carril se agregaron 50 µg de ADN.

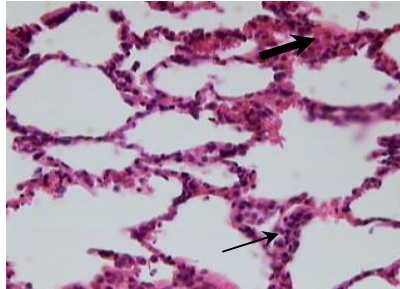


**Figura 5.** ADN extraído de pulmón y tráquea, \*\*. En cada carril se agregaron 50 µg de ADN. Carril 1, Marcadores de peso molecular, carriles 2-3 pulmón, carril 4 tráquea.

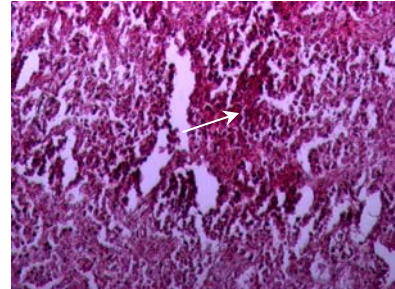
**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** En las siguientes figuras puede apreciarse la diferencia morfológica, entre un tejido pulmonar de apariencia normal (6) y otro con hemorragia masiva (8).



**Fig. 6.** Tinción HE del parénquima alveolar aumento total 400X. El aspecto morfológico es normal. La flecha señala un tabique interalveolar con aspecto normal.



**Fig. 7.** Tinción de HE del parénquima alveolar aumento total 400X. Se observa infiltración de células del sistema inmune en los tabiques alveolares, señalada con la flecha delgada y hemorragia señalada con la flecha gruesa.

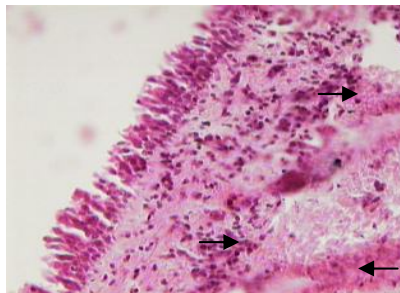


**Fig. 8.** Tinción de HE del parénquima alveolar aumento total 400X . Parénquima alveolar con hemorragia masiva, señalada con la flecha y con una pérdida evidente de los espacios alveolares.

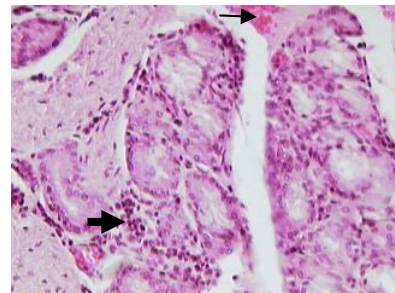
En las figuras 9 y 10 se muestra hemorragia asociada a bronquiolo y a tráquea. La figura 11 muestra un acercamiento de la capa submucosa de la tráquea, con infiltración de células del sistema inmune en la región de las glándulas y con hemorragia.



**Fig. 9.** Tinción de HE de un bronquiolo, a 400 aumentos. La flecha delgada muestra infiltración de células del sistema inmune a la lámina propia de la mucosa, mientras que la flecha gruesa muestra hemorragia asociada a la capa mucosa, por debajo de la muscular.

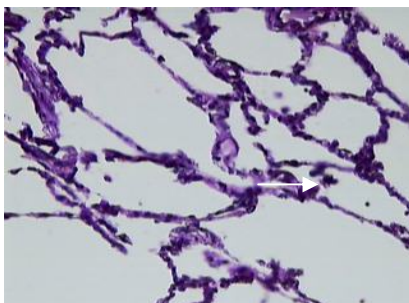


**Fig. 10.** Tinción de HE, aumento total 400X. Tráquea. La flecha señala hemorragia asociada a la capa submucosa de la tráquea.

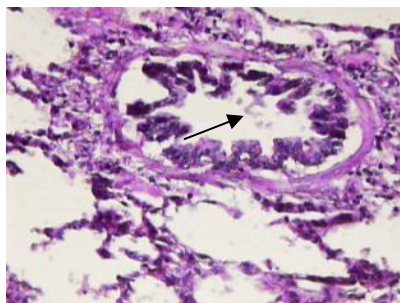


**Fig. 11.** Tinción de HE, aumento total 100X. Capa submucosa de la tráquea. La flecha delgada señala hemorragia, la flecha delgada, la infiltración de las células del sistema inmune.

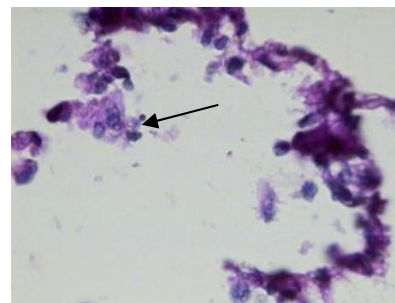
**Tinción con PAS.** Las siguientes figuras muestran la tinción de PAS, en las figuras 12-13 puede observarse la presencia de cúmulos de bacterias asociados a alvéolos y bronquiolos, con un acercamiento de 1000X (figura 14).



**Fig. 12.** Tinción de PAS del parénquima alveolar, aumento total 400X. La flecha muestra un cúmulo de células bacterianas.



**Fig. 13 .** Tinción de PAS, aumento total 400X. Bronquiolo, la flecha señala la presencia de bacterias.



**Fig. 14.** Tinción de PAS, aumento total 1000X. Acercamiento de un alveolo, que presenta destrucción del epitelio alveolar y presencia de microorganismos, señalados con la flecha.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

**Estandarización de los métodos de extracción de ADN.** Como se aprecia en las figuras 1-5, la extracción de ADN para alimento y tejidos muestra un gran nivel de degradación del material genético, así como una gran cantidad. Es probable que este tipo de muestras contengan una gran diversidad de microorganismos que estén favoreciendo este resultado debido a la presencia de endonucleasas bacterianas.

**Técnicas Histológicas.** En las figuras 6-11 teñidas con HE, puede observarse la variación de la arquitectura pulmonar, mientras que en la imagen 6 se muestra la característica estructural con los espacios aireados óptimamente vacíos y delimitados por tabiques finos o septos alveolares, en las subsecuentes se observa la pérdida de esos espacios vacíos, que ahora presentan células del sistema inmunitario, así como la aparición de hemorragia, lo cual nos habla de que presentan una lesión. En las figuras 12-14, se encuentran las muestras provenientes de tejido pulmonar y traqueal de cerdos que fueron teñidas con PAS, las cuales muestran la infiltración de células del sistema inmune, además de cúmulos bacterianos, lo cual muestra un indicio de enfermedades bacterianas asociadas a las lesiones encontradas en el sistema respiratorio de los cerdos de las granjas bajo estudio.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo fue realizado un análisis de muestras de pulmón y tráquea de cerdo, por técnicas histológicas HE y PAS, además de un análisis de muestras de agua, orina, suelo y sangre, de las cuales fue extraído material genético. Al finalizar tal análisis, fueron encontrados en los tejidos, cambios morfológicos que indican la presencia de daño en el mismo, debido a la aparición de infiltrado de células inmunitarias, así como la presencia de hemorragia.

A su vez, gracias a la técnica de PAS puede observarse la aparición de cuerpos extraños que presumimos son microorganismos, específicamente bacterias, causantes del daño encontrado en el tejido muestra.

Tales coincidencias en el presente análisis nos hacen suponer que las lesiones encontradas en el tejido son causadas por bacterias, que aunque no se especifican, dañan al sistema respiratorio porcino, afectando claramente el tejido pulmonar y traqueal de los cerdos en cuestión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brockmeier, S., Halbur, P., Thacker, E., Porcine Respiratory Disease Complex. ASM Press, USA. 2002; 231- 258.
- Clark K., Freeman J., Scheldt A., Knox K., “Investigating the transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in a swine herd with enzootic pneumonia”. Vet Med., 1991; 16:543-550.
- Flamm, R. K., Hinrichs., D. J., Thomashow, M. F. Introduction of PAMβ1 into Listeria monocytogenes plasmid. Infect. Immun. 1984; 44: 157-161.
- Gottschalk, M. “Tendencias actuales en el control de Actinobacillus pleuropneumoniae, haemophilus parasuis y streptococcus suis”. Av. Tecnol. Porc.2005; 2 (1): 17 – 38.
- Joon Tam, Mohd M. A., Bahaman, A. R. Development of solid - based paper strips for rapid diagnosis of Pseudorabies infection. Trop. Biomed. 2004. 21(2):121-34.
- Madsen, M. L., Nettleton, D., Thracker, E. L., Minion, F. C. Transcriptional profiling of Mycoplasma hyopneumoniae during iron depletion using microarrays. Microbiology. 2006; 152(Pt 4): 937-44.

- Moguel-Molina, J.R., Williams, J. de J., Gutiérrez-Ruiz E., “Identificación de granjas seropositivas a Mycoplasma hyopneumoniae y exploración de potenciales factores de riesgo relacionados a su presentación en 33 granjas porcinas del estado de Yucatán, México”. Rev Biomed., 1998; 9:167-175.
- Schoevers, E., Leengod, L., Verheijden, J., & Niewold, T. “Effects of Enrofloxacin on Porcine Phagocytic Function. Antimicrobial Agents and Chemotherapy”.1999; 43:2138-2143.