DIAGNOSTICO DE *DICHELOBACTER NODOSUS* POR LA TECNICA DE PCR

Cattáneo, M.[1]; Alzugaray, F.[1]; Bermúdez, J.[1]

[1] Área de Bacteriología. Departamento de Ciencias Microbiológicas. Facultad de Veterinaria. UdelaR. Uruguay.

catta1973uy@yahoo.es

Resumen

El Foot rot es la enfermedad infecciosa más importante de los ovinos, con una alta prevalencia en las majadas del Uruguay. El agente etiológico transmisible es un bacilo anaeróbico estricto *Dichelobacter nodosus*. El objetivo de este trabajo es poner a punto la técnica de PCR para la identificación de *Dichelobacter nodosus*. Se estandarizaron las técnicas de PCR para el diagnóstico de esta bacteria y la identificación de los diferentes serogrupos. Esta técnica mostró ser sensible y especifica que nos permitirá sustituir la técnica de inmunofluorescencia directa utilizada para el diagnóstico de los serogrupos.

Summary

Foot rot is the most important infectious disease in sheep in Uruguay, with high prevalence in herds. The agent is an estrict anaerobic bacillus *Dichelobacter nodosus.* The aim of this work is to develop a PCR technique to identify *Dichelobacter nodosus.* PCR techniques were estandarized to diagnose the presence of the bacteria and to identify different serogroups. It showed to have good sensitivity and specificity, so it could replace direct inmunofluorescence for serogroup identification.

Introducción

El Foot rot es una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan la producción ovina. Es de distribución mundial y esta presente en nuestro país. La enfermedad es producida por la acción combinada de dos microorganismos, *Dichelobacter nodosus* (*D. nodosus*) y *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum)* (Beveridge, 1941; Roberts, 1969; Bermúdez, 1992). Estos actúan sinérgicamente, invadiendo la epidermis del espacio interdigital, causando necrosis progresiva y llegando en los casos más avanzados a provocar el total desprendimiento de la pezuña por la acción combinada de las proteasas del *D. nodosus* (Skerman, 1975; Depiazzi, 1979). El agente transmisible es el *D. nodosus*, un bacilo, Gram negativo, anaeróbico estricto, el cual sobrevive sólo dos semanas en las pasturas (Thorley, 1976). El poseer filamentos de superficie llamados "pili" y teniendo estos los determinantes antigénicos más importantes, permiten su clasificación serológica mediante técnicas de aglutinación. Esta clasificación los agrupa en nueve serogrupos denominados de A-I (Claxton, 1983). El diagnóstico de esta enfermedad se realiza por aislamiento de *D. nodosus*, el cual es lento y tedioso, y la identificación serológica por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD). Se ha desarrollado la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de una secuencia que codifica para el rARN 16s de *D. nodosus* y la de un multiplex PCR para la identificación de los diferentes serogrupos (Dhungyel, 2002; Moore, 2005).

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica de PCR para la identificación de *Dichelobacter nodosus*.

Materiales y Métodos

Se estandarizó la técnica de PCR para la identificación de *D. nodosus* mediante la identificación de la secuencia 16S rADN y la puesta a punto de la multiplex PCR para identificar los serogrupos en base a las diferencias que existen en los genes que codifican para las fimbrias en donde se utilizó un forward en común y nueve primers reverse serogrupo específico.

Identificación de *D. nodosus* mediante PCR

El ADN se extrajo con el kit comercial (Zymo Research, USA) utilizando PBS y ALN (agua libre de nucleasa). Los oligonucleótidos utilizados son 5' TCGGTACCG-AGTATTTCTACCCAACACCT 3´ y 5´ CGGGGTTA-TGTAGCTTGC 3´ que amplifican un fragmento de 783 pb (La Fontanie, 1993; Wani, 2004).

Multiplex PCR

La amplificación para la PCR multiplex se utilizó el mismo protocolo descripto en el paso anterior aumentando la concentración de primers forward (2,5 veces) en comparación con el primers reverse (Dhungyel, 2002).

Tabla 1: Primers utilizados en la PCR multiplex.

Primer name	Nucleotide sequence	Position in *fimA*	Product size (bp)	GenBank name accession number
FP	5′ CCTTAATCGAACTCATGATTG 3′	26 46		X52403
RA	5′ AGTTTCGCCTTCATTATATTT 3′	421 441	415	X52403
RB	5′ CGGATCGCCAGCTTCTGTCTT 3′	286 309	283	X52404
RC	5′ AGAAGTGCCTTTGCCGTATTC 3′	331 351	325	X52405
RD	5′ TGCAACAATATTTCCCTCATC 3′	325 345	319	X52389
RE	5′ CACTTTGGTATCGATCAACTTGG 3′	367 389	363	X52407
RF	5′ ACTGATTTCGGCTAGACC 3′	250 267	241	X52408
RG	5′ CTTAGGGGTAAGTCCTGCAAG 3′	283 305	279	X52409
RH	5′ TGAGCAAGACCAAGTAGC 3′	412 435	409	X52390
RI	5′ CGATGGGTCAGCATCTGGACC 3′	194 215	189	X52410

Resultados

Identificación de *D. nodosus* mediante PCR

Todas las cepas estudiadas fueron positivas para la banda de 738 pb. En la figura 1 se observa la presencia de la banda de 738 pb en las cepas 14A, C5, LO y SN, salvo en la cepa SN extraída con PBS lo cual podría deberse a algún problema en la extracción.

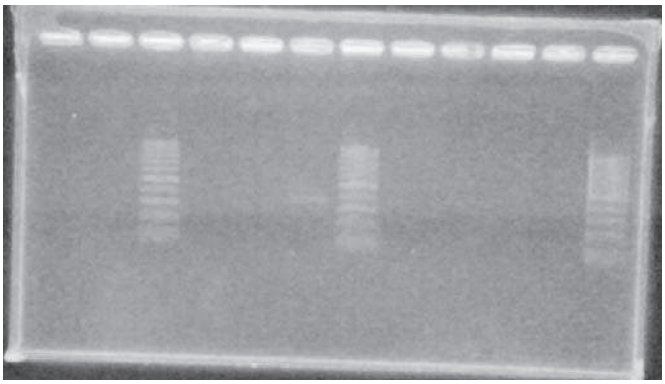

Figura 1: 1. Cepa 14 A extraída con ALN; 2. Cepa 14 A extraída con ALN; 3: Cepa 14 A extraída con PBS; 4: Cepa C5 extraída con ALN; 5: Cepa C5 extraída con PBS; 6: Cepa LO extraída con ALN; 7: Cepa LO extraída con ALN; 8: Cepa LO extraída con PBS; 9: Cepa SN extraída con ALN; 10: Cepa SN extraída con ALN; 11: Cepa SN extraída con PBS; 12. MPM 100 pb.

Multiplex PCR

Todas las cepas estudiadas fueron positivas para el serogrupo E. En la figura 2 se observa la cepa 14 A con los primers para cada serogrupo y se observa la banda correspondiente al serotipo E.

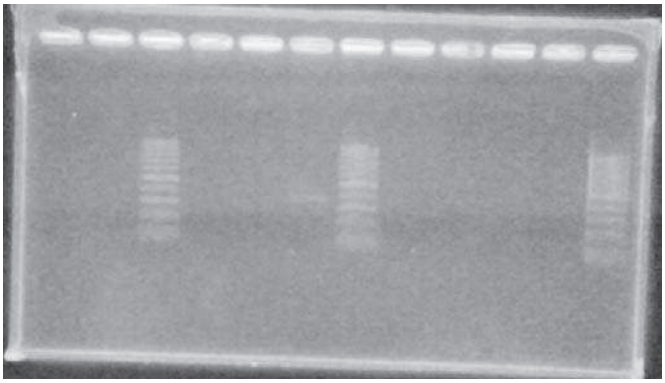

Figura 2: Cepa 14 A con 1. Serotipo A, 2. serotipo B, 3. MPM 100 pb, 4. Serotipo C, 5. Serotipo D, 6. serotipo E, 7. MPM 100 pb, 8. Serotipo F, 9. Serotipo G, 10. Serotipo H, 11. Serotipo I, 12. MPM 100 pb.

Discusión y Conclusiones

La técnica mostró ser sensible y específica para la identificación de *D. nodosus*. Si bien solo se identificó por la técnica de PCR multiplex el serogrupo E esta mostró ser eficaz ya que todas las cepas estudiadas fueron positivas al mismo serogrupo por IFD. Se continuará con la identificación de los restantes serogrupos y la identificación molecular a partir de medios de transportes sin la necesidad del aislamiento. Es prioridad la puesta a punto del PCR para su uso como técnica de diagnóstico en sustitución de la IFD debidoa que no se dispone en el mercado de anticuerpos fluorescentes contra *D. nodosus* y por su mayor sensibilidad y especificidad.

Referencias Bibliográficas

Bermúdez J., Piquet M., Hirigoyen D. (1992). Serogrupos de *D. nodosus* en el Uruguay. Enfermedades podales de los Rumiantes. Editorial Hemisferio Sur. pp: 110-118.

Beveridge W.I.B. (1941). Foot rot in sheep a trassmisible disease due to infection with *Fusiformis nodosus*. Bull. Counc. Sci. Industry Res. 140: 1-5.

Claxton P.D., Ribeiro L.A., Egerton J.R. (1983). Classification of *Bacteroides nodosus* by agglutination test. Aus. Vet. J. 60: 331-334.

Depiazzi J.L., Richards R.B. (1979). A degrading proteinace test to distinguish benign and virulent ovine isolates of *Bacteroides nodosus*. Aus. Vet. J. 55: 25-28.

Dhungyel OP, Whittington RJ, Egerton JR. (2002) Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of D. nodosus in sheep with footrot prior to vaccination. Mol Cell Probes;16:285–96

La Fontaine S, Egerton JR, Rood JI. (1993) Detection of *Dichelobacter nodosus* using species specific oligonucleotides as PCR primers. Vet Microbiol;35:101–17.

Roberts D.S., Egerton J.R. (1969). The aetiology and pathogenesis of ovine Foot rot. J. Comp.Path. 79: 217-227.

Moore L.J., Wassink G.J., Green L.E., Grogono–Thomas R. (2005). The detection and characterization of *Dichelobacter nodosus* from cases of ovine footrot in England and Wales. Vet. Microbiol. 108: 57–57.

Skerman T.M. (1975). *Bacteroides nodosus*, the causative agent of contagious Foot rot in sheep. Biology and pathology of anaerobic bacteria. Symp, Bucharest, 1975. pp: 327-333.

Thorley C.M. (1976). A simplified method for the isolation of *Bacteroides nodosus* from ovine Foot rot and studies on its colony morphology and serology. J. Applied Bac. 40: 301-309.

Wani, SA, Samanta, I., Buchh, AS, Bhat, MA. (2004) Molecular detection and characterization of *Dichelobacter nodosus* in ovine footrot in India. Research in Veterinary Science 83: 141-144.