APLICACIÓN DE LA PCR A TIEMPO REAL EN LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN YEYUNO DISTAL EN LECHONES EN TRANSICIÓN

Castillo, M.[1]; Martín-Orúe, S.M.[1]; Badiola, I[3].; Martín, M.[2]; Manzanilla, E.G[1].
(1)Departament de Ciència Animal i dels Aliments. (2) Departament de Sanitat i Anatomia. Universitat Autònoma de Barcelona. (3) Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). 08193 Bellaterra. Barcelona

INTRODUCCIÓN

La reciente prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha generado un especial interés en el estudio de los efectos de la dieta sobre la microflora y la salud intestinal. En el estudio de la ecología intestinal, el uso de técnicas microbiológicas tradicionales es en ocasiones complicado debido a la laboriosidad de dichos métodos y a la necesidad de analizar las muestras en pocas horas tras el muestreo.

El desarrollo en los últimos años de la PCR cuantitativa a tiempo real aparece como una posible alternativa a los métodos tradicionales debido a la rapidez en la obtención de resultados y a la posibilidad de la conservación de las muestras.

No hemos encontrado trabajos que evalúen la utilidad de esta técnica en muestras de contenido digestivo. Por ello el objetivo de este experimento fue la comparación de resultados obtenidos mediante PCR cuantitativo con otro método utilizado para la cuantificación del total de la población microbiana como la técnica de tinción por DAPI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental: se utilizaron 32 lechones cruzados (Landrace x Large White) x Pietrain recién destetados (20 ± 2 dias) con un peso inicial de 6,0 ± 0,4 kg seleccionados de un total de 200.

Se utilizó un diseño en bloques al azar para comparar 4 tratamientos (control, CTRL; acidificante (Gustor®), ACID; antibiótico (Maxus®), ATB y un aditivo comercial a base de extractos de plantas, Xtract®). Dichos aditivos se añadieron a una dieta pre-estarter comercial (60% cereales, 20% productos lácteos, 8% soja y 5% pescado LT) en las siguientes concentraciones: ACID: 3kg/tm, ATB: 0,4 kg/tm y Xtract® 300 ppm. Todas las dietas fueron subministrados *ad libitum*. Tras el sacrificio a los 42 días de vida, se extrajo el tracto gastrointestinal y se recogió contenido de yeyuno distal de cada uno de los animales. Para la tinción con DAPI las muestras (1g MF) se conservaron en formaldehido y para la PCR se diluyó 1 g MF con 3 ml de etanol 96 %.

Tinción DAPI: los contajes totales se determinaron tras la filtración por membrana y tinción con 4', 6 diamindino-2-fenilindol (DAPI) (Porter y Feig 1980).

PCR cuantitativo: tras la centrifugación de 2 ml de la suspensión etanólica de las muestras (5 min. 13.000 x g) se procedió a la extracción y purificación del DNA del precipitado mediante el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se amplificó un fragmento de 315 pares de bases del gen de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano utilizando el sistema SyBr Green (cuantifica la cantidad total de

DNA bicatenario amplificado). Se utilizaron los *primers* (F-tot GCAGGCCTAACACATGCAAGTC y R-tot CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT) adaptados de Marchesi et al. (1998) y Amann et al. (1995) para adecuarlos a las condiciones necesarias a su uso con SyBr Green, utilizando el Software Primer Express de Applied Biosystems.

La amplificación se llevó a cabo con ABI 7900 HT Sequence Detection System (Perkin Elmer) utilizando el SyBr Green Core kit en un volumen final de 25 µl. Se emplearon para cada reacción: 2,5 µl de buffer SyBr Green 10x, 3 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl dNTPs (2,5 mM), 0,25 µl amperasa (AmpErase UNG® 1 U /µl), 0,125 µl de AmpliTaq Gold® (5 U/µl),1 µl primer forward (12,5 µM), 1 µl primer reverse (12,5 µM), 2 µl DNA (dilución 1/10). Las condiciones de la amplificación fueron 2 min. 50°C, 10 min. 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg. 95°C y 1 min. 60°C. La especificidad del producto amplificado se evaluó mediante el análisis de curvas de disociación una vez finalizada la reacción de PCR.

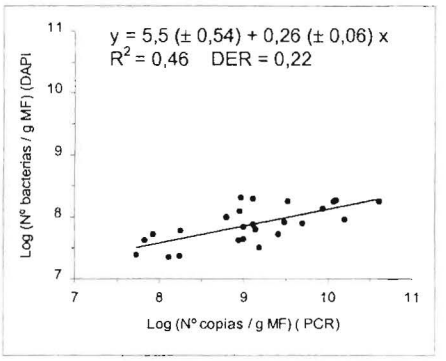
Para el calibrado se utilizaron como estándares concentraciones conocidas del gen completo del 16S rRNA obtenido mediante PCR a partir de cultivos puros de *Escherichia coli* (CECT cepa: 515NT). Se incluyeron patrones con 10, 10^2, 10^3, 10^4 y 10^5 copias por reacción.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el procedimiento GLM y REG de SAS (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especifidad de los *primers* se comprobó constatando la ausencia de amplificación con DNA extraído de plasma porcino. El producto obtenido no fue superior (289 ± 79.5) al detectado en las muestras control a las que no se añadió DNA (239 ± 54,3 copias/reacción). Valores similares de amplificación en la muestras control han sido descritos por otros autores (Suzuki et al., 2000; Nadkarni et al., 2002) y son atribuibles a la presencia DNA residual de E. coli en los reactivos utilizados para la amplificación. La ausencia de sustancias inhibidoras en el DNA extraido se evaluó testando diferentes diluciones de algunas de las muestras. Para diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000 los resultados fueron de $2{,}6x10^4$, $2{,}0x10^3$ y $3{,}6x10^2$ copias/reacción respectivamente.

Figura 1. Regresión entre tinción DAPI (bacterias/g MF) y PCR (copias 16S rDNA/gr MF).



El valor medio de la tinción DAPI fue de 7,8 (DER 0,37) log bact./g MF y el de PCR de 9,2 (DER 0,78) log copias/g MF. Diferencias de dos órdenes de magnitud han sido descritas por otros autores comparando resultados entre PCR y contajes tradicionales (Bach et al., 2002, Nadkarni et al., 2002). Esta diferencia podría explicarse, al menos en parte, por la multiplicidad de copias del gen 16S rDNA por célula bacteriana que, aunque variable, se sitúa entre 1-10 (Fogel et al., 1999). En la Fig. 1 se muestra relación existente entre el número de bacterias/g MF contabilizadas por la tinción DAPI (log10) y el de copias/g MF determinado mediante PCR (log10). Ambos parámetros mostraron una relación significativa ($p < 0,001$) con un coeficiente de regresión r^2 de 0,46. El rango de distribución de los valores fue superior con PCR (7,7 a 10,6 log copias/g MF) que con DAPI (7,0 a 8,3 log bact./g MF).

Por otra parte no se detectaron diferencias en los recuentos totales entre los diferentes tratamientos con ninguno de los dos métodos (Tabla 1).

	CTRL	ACID	XTRACT	ATB	RSD	SIGNIFICACIÓN
DAPI	7.88	7.59	7.85	7.80	0,366	NS
PCR	9.43	9.25	9.04	8.89	0,775	NS

Tabla 1. Valores medios (log10) obtenidos mediante DAPI (nºde bacterias/ml contenido intestinal) y PCR (nº de copias del gen 16S/g MF contenido intestinal) (NS: P>0.1)

De estos resultados podemos concluir que la cuantificación del total de bacterias en el contenido yeyunal mediante PCR mostró una correlación significativa con el contaje por DAPI y el mayor rango de distribución de los valores con la técnica PCR indicaría una mayor sensibilidad en la detección de diferencias en el crecimiento microbiano intestinal.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el marco del Proyecto CYCIT AGL01-2621-C02-01

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amann R. , Ludwig W. Schleifer K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cell without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59, 143-169.

Bach H. J., Tomanova J., Schloter M., Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 49, 235-245.

Fogel G. B., Collins C. R., Li J., et al. (1999). Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microbial Ecology*, 38, 93-113.

Marchesi R. J., Takuichi S., Weightman A. J., et al. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2), 795-799.

Nadkarni M. A. , Martin F. E., Jacques N. A., Hunter N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148, 257-266.

Porter K. G., Feig Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*. 25, 943-948

SAS Institute Inc. (1999) Version 8.1, Cary N.C.

Suzuki M. T., Taylor L. T., DeLong E. F. (2000). Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Populations via 5'-Nuclease Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, nº 11, 4605-4614.