

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE PCR MÚLTIPLE PARA EL DIAGNÓSTICO DE *BRUCELLA OVIS*, *ACTINOBACILLUS SEMINIS* E *HISTOPHILUS SOMNI* EN SEMEN DE CARNEROS.

MULTIPLEX PCR STANDARDIZATION FOR *BRUCELLA OVIS*, *ACTINOBACILLUS SEMINIS* AND *HISTOPHILUS SOMNI* IN RAM SEMEN DIAGNOSTIC.

Galvez CEA¹, Yañez AJR¹, Martínez JVM¹, Acosta S R¹, Velilla AV², Acosta DJP^{*1}

¹Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Balcarce, Argentina.

jpacosta00@hotmail.com

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, progresiva, de presentación clínica o subclínica, caracterizada por la inflamación del epidídimo, que desencadena en forma secundaria degeneración testicular determinando finalmente esterilidad del semental.

Los principales microorganismos involucrados son *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*.

El diagnóstico bacteriológico en semen de estos tres microorganismos resulta muchas veces engorroso por la presencia bacterias contaminantes del mismo o del prepucio que enmascaran el crecimiento de estos microorganismos exigentes y en el caso de *Brucella ovis* también de crecimiento lento, por lo tanto la implementación y estandarización de una prueba de **PCR** múltiple para diagnosticar en forma precisa y rápida la presencia de los mismos y nos permitirá eliminar portadores antes de que aparezcan lesiones clínicas de epididimitis y garantizar la venta de semen libre dichos microorganismos.

Para la estandarización de la prueba se obtuvieron muestras de semen de carneros libres de los tres microorganismos determinado por bacteriología clásica, dichas muestras fueron contaminadas con bacterias pertenecientes a las siguientes cepas: *Brucella ovis* (REO 198), *Actinobacillus seminis* (ATCC 15768) e *Histophilus somni* (ATCC 2336).

La extracción del DNA en el semen contaminado se realizó con el kit comercial (DNeasy Blood and Tissue, Lab Qiagen).

Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la literatura (Saunders *et al.* 2007. Aust. vet. J. 85:72) y el kit de PCR Múltiple (Lab Qiagen).

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C/5min seguida de 35 ciclos a 94°C/30s, 58°C/90s, 72°C/90s con una extensión final a 72°C/10 min.

Los productos de amplificaron obtenidos fueron de 690pb para *B. ovis*, 436pb para *A. seminis* y de 313pb para *H. somni*.

Proyecto financiado por PROMEP 2008