

CARACTERIZACIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* MEDIANTE ANALISIS DE REGIONES REPETIDAS EN TANDEM DE MULTIPLES LOCI (MLVA)

Tamiozzo, P.J.^{*1,3}; Bautista S.¹; Fantoni, G.¹; Lucchesi, P.M.A.^{2,3}; Ambrogio, A.¹

1-Departamento Patología Animal. Fac. Agron. y Veterinaria. Univ. Nac. Río Cuarto. Ruta 36 Km 601. Río Cuarto. Córdoba. República Argentina. 2-Lab. Inmunquímica y Biotecnología-Fac. Cs. Veterinarias- UNCPBA Paraje Arroyo Seco s/n, Tandil, Prov. Bs As. República Argentina. 3-CONICET. *e-mail: ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP). Básicamente, las técnicas de tipificación genotípica pueden dividirse en aquellas no especie específicas (en las cuales es necesario el aislamiento del agente) y aquellas especie específicas (donde no es necesario el aislamiento del agente y puede trabajarse directamente con material genético extraído de la muestra clínica). Amaral de Castro *et al.* (2006) analizaron 22 regiones genómicas que contienen repeticiones en tándem (VNTR) que permitirían diferenciar genéticamente al Mhp. Nuestro laboratorio ha incorporado recientemente esta metodología de análisis de varios loci VNTR (MLVA) para la tipificación de Mhp. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar Mhp mediante MLVA a partir de muestras clínicas de cerdos.

MATERIALES Y MÉTODOS

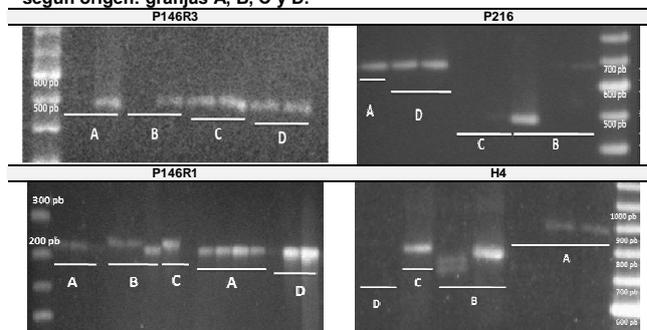
Se utilizaron 20 muestras de lavado bronquial y 20 muestras de hisopados nasales, tomadas de diferentes cerdos provenientes de distintas granjas, que habían dado positivas a Mhp por la nPCR descrita por Calsamiglia *et al.* (1999). El ADN fue extraído utilizando el kit comercial (DNAzol, Invitrogen). De acuerdo al protocolo de MLVA descrito por Amaral de Castro *et al.* (2006) se amplificaron por PCR los loci p146R1, p146R2, p146R3, p216, H4 y H5. Los productos de las PCRs (MLVA) fueron corridos en gel de agarosa al 1,2% a 150 v por 5 horas, teñidos con SYBR green y visualizados en un transiluminador.

RESULTADOS

Todas las muestras de lavado bronquial amplificaron correctamente con el protocolo de MLVA. Con las muestras de hisopado nasal no se obtuvieron amplificaciones, excepto con una de ellas, en la que se obtuvo un producto para el locus P146R1. El locus p146R3 no mostró polimorfismo, los demás loci fueron polimórficos mostrando de 2 a 4 alelos (algunos de ellos mostraron 2 o 3 posibles alelos en la misma muestra).

En la figura 1 se muestran los polimorfismos de algunos de los loci.

Figura 1. Productos de PCR correspondientes a los VNTRs P146R3, P216, P146R1 y H4 en distintas muestras, agrupados según origen: granjas A, B, C y D.



DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el tipo de muestras procesadas, puede decirse que las muestras de elección para este tipo de análisis son los lavados bronquiales por tener mayor carga de microorganismo que el lavado bronquial. Si bien en estudios previos (Amaral de Castro *et al.*, 2006) realizados con cepas puras de Mhp se ha sugerido que el análisis podría realizarse en muestras de hisopado nasal debido a la sensibilidad de las distintas PCRs, el presente estudio señala lo contrario. Sólo una muestra de hisopado nasal fue positivo al PCR del locus P146R1 y provenía de un animal con tos y sin tratamiento antibiótico (dato inédito). Esto, sumado a otras experiencias en nuestro laboratorio y a estudios previos (Sibila *et al.* 2004) coinciden en que el lavado bronquial es el lugar más certero para determinar la presencia de Mhp.

Se ha señalado que los loci más polimórficos eran P146R1, P146R3, H5 y H4 (Amaral de Castro *et al.*, 2006). Los dos primeros se encuentran dentro del gen de una posible adhesina (P146) y los segundos en genes con función desconocida hasta el momento. Nuestros resultados muestran que la zona p146R3 no fue tan polimórfica (mostró sólo un alelo), si bien el número de muestras procesadas fue bajo. Esto sugiere un comportamiento diferencial entre muestras de campo y muestras de cultivo puro utilizadas para la fabricación de vacunas, si bien el rol del polimorfismo no es claro respecto a la funcionalidad de la adhesina que codifica y la mayor o menor patogenicidad del Mhp.

Se observó también, que algunas muestras presentaron 2 ó 3 posibles alelos en el mismo locus. Esto puede deberse a reacciones inespecíficas de los cebadores o a la presencia de diferentes Mhp en la misma muestra (diferentes al menos en esa región).

Por último, se encontró un mayor polimorfismo en una de las granjas respecto de las otras 3. Sorprendentemente, esta granja contaba con una genética distinta a las otras (que eran del mismo origen) por lo que antiguas suposiciones de que el Mhp posee cierta afinidad con determinadas líneas genéticas debería ser profundizado de la misma manera en que se está haciendo para PRRS (Vincent *et al.*, 2009) en otras partes del mundo.

A modo de conclusión creemos que este análisis permitirá conocer la variabilidad genética de Mhp en nuestra región y que un mayor número de muestras deben ser analizadas. Dentro de las principales ventajas de este método es la posibilidad de caracterizar Mhp sin la necesidad de obtener un cultivo puro, que en el caso de este patógeno es muy difícil.

BIBLIOGRAFÍA

- Calsamiglia *et al.* 1999 J Vet D Invest 11(3), 246-251
Amaral de Castro *et al.* 2006. Vet Microbiol 116(4):258-69.
Sibila *et al.* 2004. Vet Rec. 155(2):57-8
Vincent *et al.* 2009. J. Anim. Sci. 84: 49-57.