

TIPIFICACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* A TRAVÉS DE LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS GENÓMICOS QUE CODIFICAN PARA LAS TOXINAS APX I, II Y III Y LA PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA *OmlA*

Zbrun M. Virginia¹; Zielinski Gustavo C^{1,3}, Cane Fernando², Pereyra Norma^{2,3}, Sarradell Javier³. ¹ INTA, EEA Marcos Juárez, Cba.; ²Instituto de Porcinotecnia, MAGIC, Sta Fe; ³Fac. Cs. Vet., UNR, Casilda, Sta Fé. E mail: gzielinski@mjuarez.inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

Actinobacillus pleuropneumoniae (App), agente de la pleuroneumonía infecciosa del cerdo, es una especie compleja taxonómicamente debido a la existencia de dos biotipos y al menos 15 serotipos diferentes. Los serotipos se definen por la diferente composición de polisacáridos de su pared celular, que condicionan su inmunogenicidad. Las pruebas tradicionales para tipificar App, (hemoaglutinación indirecta, inmunodifusión,) son complicadas para montar y exigen reactivos artesanales no disponibles en el mercado. El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados de la caracterización genómica de una limitada colección de aislamientos de App, definiendo de esta manera su serotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de App: se cultivaron en medios artificiales convencionales muestras de pulmones de animales sospechosos de pleuroneumonía que procedían de brotes clínicos de enfermedad o pulmones de frigorífico con lesiones bronconeumónicas.

Amplificación genómica: se utilizó la prueba de la cadena de polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmentos genómicos codificantes de las toxinas *Apx I*, *Apx II* y *Apx III* y de distintas variaciones del gen que codifica a la proteína de membrana externa *OmlA* según esquema publicado por Gram y cols (2000), definiendo de esta forma los serotipos de pertenencia.

- Primers utilizados amplificación del gen *omIA*
 - LPF 5'-AAGGTTGATATGTCCGCACC-3'
 - LPR1 5'-TTTATAATGGTACCATCTTCGC-3'
 - LPR 2 5'-TTTTACTAGAATGGTCATATTOC-3'
 - LPR 3 5'-TATTTGGAGCTGTTTTGTTGAT-3'
 - LPR 4 5'-ACCTGCAATCTTATTATTAATCG-3'
- Fragmentos *amplificados*:
 - LPR1 809pb *omIA* 1 (serotipos: 1, 9, 11, 12)
 - LPR 2 687pb *omIA* 2 (serotipos: 4, 8)
 - LPR 3 577 pb *omIA* 3 (serotipos: 3, 4, 6, 7)
 - LPR 4 418 pb *omIA* 4 (serotipos: 5^a, 5b, 10)
- Primers utilizados para la amplificación de los genes de *apxI*, *II* y *III*
 - Apx I* AIF 5'-ATGGCTAACTCTCAGCTCG-3'
 - AIR 5'-CGCTTTACCGATATTGCCTA-3'
 - Apx II* AIIF 5'-TCATTCTCTACAGAATGGGG-3'
 - AIIR 5'-CAACGAGTAACGCAACTGG-3'
 - Apx III* AIIF 5'-ACGGAAGTGTGGTAACGG-3'
 - AIIR 5'-AGCAGCAACTTTAGTGCTTG-3'
- Fragmentos *amplificados*:
 - Apx I: 826pb (Serotipos: 1, 9, 11, 5, 10)
 - Apx II: 1069pb (Serotipos: 1, 9, 11, 2, 8, 3, 4, 5, 6, 7, 12)
 - Apx III: 635pb (Serotipos: 2, 8, 3, 4, 6)

En la tabla siguiente *puede* visualizarse los criterios para serotipificación según los fragmentos genómicos amplificados (Gram, Ahrens y cols. 2000):

Ser ot.	ap xl	ap x II	apx III	om IA I	om IA II	om IA III I	om IA IV V	om IA V V
1,9, 11	+	+		+				
2,8		+	+		+			
3,6		+	+			+		
4		+	+				+	
5	+	+						+
7		+				+		
10	+							+
12		+		+				

RESULTADOS

En la tabla siguiente se observa los resultados de la caracterización genómica que se realizó en 16 brotes procedentes de granjas de la prov. de Santa Fé, Córdoba y Bs As.

Lugar	Serotipo	N brotes
Arroyito (Cba)	1,9 ú 11	1
Ms Jz (Cba)	1,9 ú 11	2
Ch. La (Sta Fe)	1,9, ú 11	6
Ch. La (Sta Fe)	5	1
C de Bus (Cba)	7	1
Colon (Bs As)	1,9 ú 11	1
F. Var (Bs As)	1,9 ú 11	1
Tortu (Sta. Fe)	1,9 ú 11	1
Arm (Sta Fe)	1,9 ú 11	1
Sta. Euf (Cba)	3 ó 6	1

DISCUSIÓN

Aunque este es un trabajo preliminar, realizado sobre una cantidad limitada de aislamientos procedentes de brotes clínicos de enfermedad, y por tanto puede no reflejar fehacientemente la prevalencia relativa real de los distintos serotipos en el campo, puede observarse que sobre 16 brotes el serotipo 1 es el mas prevalente. El test utilizado no distingue al serotipo 1 de los serotipos 9 y 11, pero no hay antecedentes de la existencia de estos últimos en Argentina. Sin embargo también se identificaron aislamientos pertenecientes a los serotipos 7, 3 y 5, revelando la multiplicidad de ellos en las áreas geográficas consideradas.

Este trabajo, si bien incompleto, enfatiza la importancia del conocimiento de los distintos serovares de App en las granjas del país a fin de optimizar los programas de control de la enfermedad al impedir la mezcla de serotipos en un mismo establecimiento y mejorar los de prevención inmunológica.

BIBLIOGRAFÍA

Gram T, Ahrens P, Andreasen M, Nielsen JP. Vet. Microbiology, 75:43-57, 2