

**DETECCIÓN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN MUESTRAS DE TONSILAS CONSERVADAS A -70°C POR 96 MESES**Tamiozzo, P.J.<sup>1,2\*</sup>; Fantoni, G<sup>1</sup>; Chanique, A<sup>1</sup>; Carranza, A<sup>1</sup>; Pelliza, B<sup>1</sup>; Ambrogi A<sup>1</sup>.

1-Departamento Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km 601. Río Cuarto. Córdoba. República Argentina. 2- CONICET

\*e-mail: [ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar](mailto:ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar)**INTRODUCCIÓN**

La pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) es producida por el *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). La identificación temprana del agente es importante en piaras subclínicamente infectadas para el control de la enfermedad. El aislamiento bacteriológico del App de tonsilas es poco sensible ya que las tonsilas están colonizadas por un sinnúmero de agentes. Se ha demostrado que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es más sensible que el aislamiento convencional (Chiers *et al.*, 2001; Savoyé *et al.*, 2000) e incluso que la PCR previo cultivo aumenta la sensibilidad de PCRs estándar (Fittipaldi *et al.*, 2003), y de PCR anidada o nPCR (Tamiozzo *et al.*, 2007). Estudios anteriores (Fittipaldi *et al.*, 2003) han demostrado que algunas PCRs fueron capaces de detectar el agente en tonsilas a -20°C hasta 4 meses después del muestreo. El objetivo del presente trabajo es demostrar que la nPCR utilizada en estudios anteriores es capaz de detectar el ADN de App por al menos 96 meses en tonsilas conservadas a -70°C.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Se trabajó con tonsilas de cerdos precozmente tratados con antibióticos y llevados a instalaciones nuevas como se ha informado previamente (Tamiozzo *et al.*, 2007). El muestreo de las tonsilas se realizó en matadero a los 150 días de edad. Estos animales no presentaron signos clínicos compatibles con PCP y la serología había dado un 1,4% de seropositivos a los 150 días de edad por lo que se asume que son animales portadores asintomáticos. Las tonsilas fueron procesadas de la siguiente manera: Una vez embebidas en alcohol se flamearon en mechero. Para el aislamiento de App, se tomó con pinza y con bisturí estériles se hizo un corte profundo en la parte media de la misma, un ansa estéril se introduce profundamente en la herida y luego es sembrado en Agar sangre con estría de *Staphylococcus epidermidis*. Posteriormente, esa misma muestra fue cortada en trozos pequeños con tijera y colocadas en morteros de porcelana (todo estéril) a lo que se adicionó 1 mL de solución salina isotónica, se mortereó y el líquido resultante fraccionado en dos, una parte fue guardada en tubo de 1,5 ml, para su posterior procesamiento por nPCR y la otra fracción fue sembrada en Agar PPLO (Difco®). Tanto el agar sangre como el agar PPLO fueron cultivados a 37°C por 24hs. A ninguno de los medios de cultivo se les adicionó ningún agente bactericida o bacteriostático. Posteriormente, tanto al líquido resultante del

procesamiento de la tonsila, como del material crecido en el Agar PPLO (previa cosecha con ansa) se le extrajo el ADN (DNAzol de Invitrogen®) para realizarles la prueba de nPCR (Schaller *et al.*, 2001). Algunas muestras fueron procesadas durante el 2007, otras en 2008 y las últimas en 2010. Se compararon las proporciones independientes de positivos a ambas PCRs (EPIDAT 3.1).

**RESULTADOS**

En el cuadro 1 se muestra los totales de positivos a nPCR (Schaller *et al.*, 2001) con y sin previo cultivo. No se logró aislar App de ninguna muestra. Al comparar las proporciones se obtuvo un  $p=0.0086$ . Las mismas muestras que fueron positivas al nPCR de macerado de tonsilas lo fueron al nPCR previo cultivo en agar PPLO.

**Cuadro 1. Número de positivos sobre el total de muestreos al nPCR con y sin previo cultivo en agar PPLO según el año.**

AÑO	nPCR macerado de tonsilas	nPCR previo cultivo agar PPLO
2007	0/50	8/79
2008	0/16	0/16
2010	1/57	5/57
TOTAL	1/123	13/152

**DISCUSION**

Como muestran los resultados, el ADN de App pudo ser detectado hasta 96 meses después de obtenidas las muestras. Si bien no logró aislarse el microorganismo en ninguna de las muestras, tanto en las más frescas, como las conservadas a -70°C por mucho tiempo. La diferencia de nPCR positivos previo cultivo en agar PPLO respecto a la nPCR sin cultivo previo, sugiere que no sólo el ADN es capaz de detectarse por PCR (ya que no es degradado por ADNasas ni dañado por las bajas temperaturas) sino que los App son viables, ya que son capaces de crecer y aumentar así la cantidad de ADN disponible para la PCR. El hecho disponer de material genético congelado permitiría la realización de estudios retrospectivos, pudiendo incluso, determinar el serotipo capsular del App utilizando técnicas moleculares.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Chiers *et al.* 2001. *Vet Microbiol.* 8; 83 (2): 147-59.  
 Savoyé *et al.* 2000. *Vet Microbiol.* 11; 73 (4): 337-47.  
 Fittipaldi 2003. *et al.* *J Clin Microbiol.* ;41(11): 5085-93.  
 Tamiozzo. *et al.* 2007. *Rev Arg Microbiol.* 39 (1); 177.  
 Schaller 2001. *et al.* *Vet Microbiol.* 2; 79 (1): 47-62.