

IDENTIFICACIÓN DE *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* MEDIANTE UN ENSAYO DE PCR BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *OMLA*

Ma. Virginia Zbrun*, Luciana Sequin**, Leonardo Vanzetti**, Gustavo Zielinski*. 2006.
V° Congreso de Producción Porcina del Mercosur.
Sanidad Animal y **Lab. de Biotecnología, EEA Marcos Juárez. INTA.
www.produccion-animal.com.ar

[Volver a: V° Congreso](#)

INTRODUCCIÓN

La pleuroneumonía porcina es una enfermedad difundida en todo el mundo y caracterizada por provocar alta mortalidad, reducción de la producción y aumento en los costos de producción de los establecimientos afectados. Clínicamente se caracteriza por producir un cuadro neumónico severo asociado a pleuritis fibrinosa que a la primoinfección puede afectar a todas las categorías del establecimiento.

Esta enfermedad es producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), bacteria gram negativa, NAD dependiente (biovariedad 1). A su vez, ésta biovariedad fue subdividida en 15 serotipos de acuerdo a sus antígenos de superficie (LPS y polisacáridos de membrana).

Este trabajo tuvo como principal objetivo la identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante la amplificación por PCR del gen *omla* que codifica para una proteína de membrana externa, común a todos los serotipos de la biovariedad 1. Ésta técnica, descrita por varios autores (Savoye et al, 2000) permite hacer una identificación rápida y específica del patógeno, obviando o perfeccionando mas trabajosas técnicas bacteriológicas convencionales de identificación taxonómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas: Se utilizaron 9 serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (cepas de referencia internacional), existentes en el cepario del Laboratorio de Bacteriología del grupo de Sanidad Animal de la EEA M. Juárez. También se utilizaron 6 cepas de campo de establecimientos de la zona identificadas a través de pruebas bioquímicas como App. Como control negativo para la prueba se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* y una cepa de campo de *Haemophilus parasuis* filogenéticamente relacionada con el patógeno. Se las sembró en caldo M96 y agar sangre (suplementado con NAD) realizándose la incubación a 37°C durante 48 hs en aerobiosis.

Extracción del ADN: para la obtención del ADN bacteriano, se utilizó la técnica descrita por Gram et. al. (2000) con modificaciones, partiendo de cultivos puros del microorganismo. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su uso.

Primers: para la amplificación del gen *omla* se utilizaron los oligonucleótidos LPF y *omla*AR publicados por Savoye, et. al. (2000).

Condiciones de la PCR: se utilizó el protocolo descrito por Fitipaldi et. al (2003), con modificaciones. Se preparó la reacción en 25 µl totales, utilizando 2 µl de ADN por muestra con 35 ciclos de amplificación,. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, documentados por medio de una cámara digital. Para determinar el tamaño de las bandas se usó un marcador de 100pb (Invitrogen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los 9 serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizados en el ensayo, se obtuvo el fragmento esperado de 950pb correspondiente al gen *omla* (**figura 1**). En las 6 cepas de campo, identificadas bioquímicamente como *Actinobacillus pleuropneumoniae* se visualizó un fragmento de amplificación del mismo tamaño (no mostrado). En los controles negativos no se observó la amplificación del fragmento génico elegido.

De acuerdo a la bibliografía consultada y a los resultados obtenidos en éste trabajo consideramos que ésta técnica de PCR es útil como herramienta para hacer una rápida identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Además se podría utilizar como paso previo para montar un PCR Multiplex que permita agrupar en serotipos a aislamientos de éste microorganismo, muy importante en la epidemiología de la enfermedad.

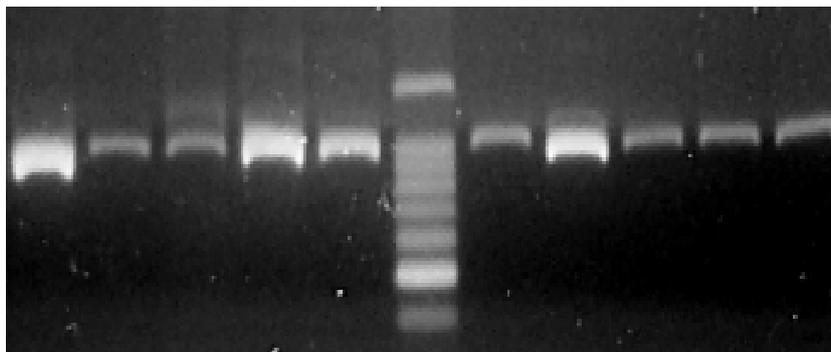


Figura 1: Visualización de la banda amplificada del gen *omlA* de *App*
Calles 1-11: Serotipo 1, 2, 3, 4, 5; Marcador PM, Serotipo 6, 8, 11, 12, 9.

BIBLIOGRAFÍA

- C. Savoye, J. L. Jobert, F. Berthelot-Hérault, A. M. Keribin, R. Cariolet, H. Morvan, F. Madec, M. Kobisch., 2000. *Vet. Microbiol.* 73, 337-347.
- N. Fittipaldi, A. Broes, J. Harel, M. Kobisch, M. Gottschalk, 2003. *J. of Clinical Microbiol.* p5085-5093
- P. Ahrens, M. Andreasen, J. P. Nielsen, 2000. *Vet. Microbiol.* 75, 43-57.

[Volver a: Vº Congreso](#)