

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL CASEOSO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN OVINOS

Marcellino R.¹, Raineri M.¹, Mignaqui A.², Santana J.³

¹INTA, EEA Bariloche, Grupo de Salud Animal, Bariloche, Río Negro, Argentina. e-mail: marcellino.romanela@inta.gov.ar

²INTA CONICET, EEA Bariloche, Grupo de Salud Animal, Bariloche, Río Negro, Argentina.

³AER Río Gallegos, EEA INTA Santa Cruz, Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La linfadenitis caseosa (LAC), es una enfermedad causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Se caracteriza por la formación de abscesos en ganglios y órganos.

La infección en los ovinos produce un material caseoso de color blanco-crema o verdoso, consistencia viscosa y adherente, en algunos casos se observa material calcificado (Fig. 1). El diagnóstico de rutina es el cultivo bacteriológico y la identificación del agente. Alternativamente podrían utilizarse métodos más rápidos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Sin embargo, la consistencia adherente o calcificada del material caseoso hace que su utilización para estos métodos sea poco reproducible y confiable.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si un tratamiento previo en muestras de material caseoso permite optimizar los resultados de la técnica de PCR para la determinación de *C. pseudotuberculosis*. A futuro se pretende evaluar si las muestras procesadas de esta forma pueden ser utilizadas para la detección de *C. pseudotuberculosis* por ELISA.



Fig. 1: material caseoso de consistencia viscosa y adherente

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 58 muestras de órganos y ganglios de 46 ovinos con sospecha de LAC de la provincia de Santa Cruz.

Cultivo bacteriano: se abrieron los abscesos y se tomaron muestras para el aislamiento e identificación de *C. pseudotuberculosis*.

Tratamiento de la muestra: se procesaron de forma directa mezclando 50 mg de material caseoso con 150 µl de resina Chelex (Biorad) (Fig. 2a) o realizando un homogenato disgregando 50 mg de material con 200 µl de agua destilada estéril utilizando un pilón (Fig. 2b). Luego 100 µl de homogenato fueron agregados a 150 µl de resina Chelex.

Extracción de ADN: luego de incubar 20 min a 65 °C y 8 min a 100 °C, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante recuperado. El ADN extraído se utilizó como templado en una PCR utilizando primers para el gen de la toxina fosfolipasa D producida por *C. pseudotuberculosis*, obteniendo un producto de 203 pb.

Los resultados de la PCR (muestra directa vs. homogenato) fueron analizados mediante el test X2 ($p < 0.05$), al igual que la comparación con los resultados obtenidos por cultivo.



Fig. 2a: procesamiento directo de la muestra.

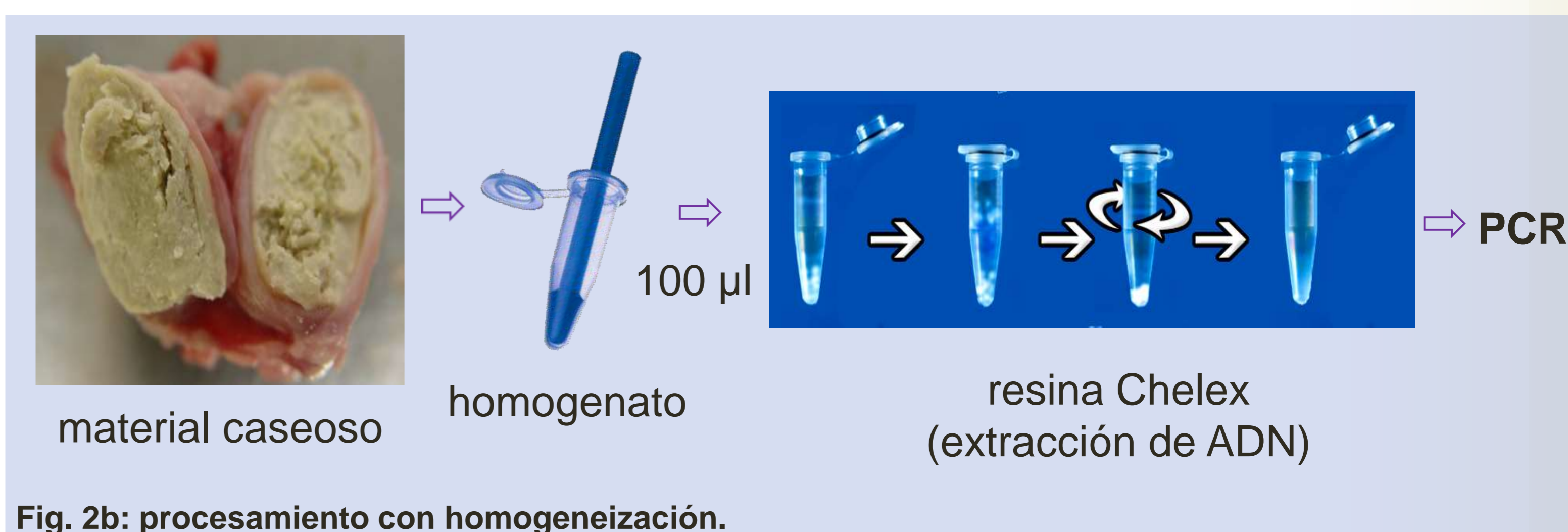


Fig. 2b: procesamiento con homogeneización.

RESULTADOS

En el 100% de las muestras se aisló *C. pseudotuberculosis* (Fig. 3), coincidiendo con los resultados obtenidos por la técnica de PCR con homogeneización previa. Sólo una muestra resultó negativa por PCR cuando no se realizó el homogenato. La mitad de las muestras que fueron homogeneizadas previamente mostraron un incremento en la intensidad de la banda obtenida por PCR, mejorando su visualización (Fig. 4).



Fig. 3: Aislamiento *C. pseudotuberculosis*



Fig. 4: Intensidad de las bandas obtenidas con ambos procesamientos líneas 1-5 muestras, M: Marcador de peso molecular.

DISCUSIÓN

La concordancia entre los resultados obtenidos por cultivo y la PCR con el homogeneizado previo indica que este tratamiento debería tenerse en cuenta al procesar muestras con sospecha de LAC, ya que mejora la visualización de la banda amplificada por PCR, disminuyendo la repetición de muestras dudosas, reduciendo costos y demoras.

A futuro se pretende evaluar si la técnica de homogeneización permite obtener antígenos que puedan ser evaluados por ELISA.

BIBLIOGRAFÍA

- Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Díaz Y, Álvarez L, Callejo R, Prieto M, Jodor N, Jensen O. 2007 Rev Arg Microbiol 39:44-6
- Marcellino R., Santana J. 2016. XXI Reunión Científico Técnica de la AAVLD
- Pacheco LGG, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahía RC, et al. 2007 J Med Microbiol 56:480-486

Financiación: Proyectos INTA PNSA 1115055 - REDGEN 1137041