



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

01674
8

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
División de Estudios de Postgrado

TIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia*
(*Pasteurella*) *haemolytica*-like OBTENIDOS DE AVES CON
ENFERMEDAD REPRODUCTIVA Y RESPIRATORIA .

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

ALFREDO CASTAÑEDA RAMÍREZ

COMITÉ TUTORAL: DR. FRANCISCO SUÁREZ GUEMES
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ



MÉXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A **ALANNA Y TERE** POR CUYA MOTIVACIÓN HE LLEGADO A ESTE MOMENTO EN MI VIDA.

A MIS PADRES **GREGORIA RAMÍREZ Y BARDOMIANO CASTAÑEDA** QUIENES CON SU ESFUERZO Y DEDICACIÓN HICIERON POSIBLE QUE LLEGARA HASTA AQUÍ.

A MIS HERMANOS **CARMEN, ALEJANDRO, JOSÉ LUIS, FRANCISCO, CARLOS, ERIKA Y OCTAVIO** CON QUIENES HE VIVIDO MOMENTOS INOLVIDABLES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A MI COMITÉ TUTORAL: DR. FRANCISCO SUÉREZ GUEMES Y DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ POR SU APOYO Y POR PERMITIRME TRABAJAR EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA NUEVAMENTE Y EN PARTICULAR EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLÉCULAR.

AL DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO POR LA DONACIÓN DE LA CEPA DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

A LA DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ POR PROPORCIONARNOS LAS CEPAS DE *E. coli* Y *P. multocida*.

A LA DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL POR PROPORCIONARNOS AMABLEMENTE EL PLÁSMIDO pKK3535.

AL DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ Y AL DR. DANIEL MARTÍNEZ POR SU APOYO DURANTE LA REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO: LIRIO, ELVIA, ELSA, DANIEL, RIGOBERTO, EDGAR, ESTELA, HÉCTOR, JESÚS VAZQUEZ, MARINO, MARCELA Y XOCHITL POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, PERO ANTE TODO POR SU AMISTAD

AL DR. RAYMUNDO ITURBE POR SUS COMENTARIOS EN LA REDACCIÓN DE ESTA TESIS.

A TODOS LOS MIEMBROS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA POR ACEPTARME EN LA FAMILIA.

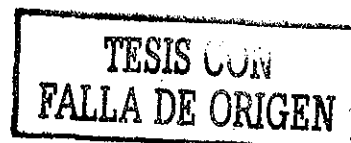
A LOS MIEMBROS DE LA SECCIÓN DE FISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA DE LA UACH POR SU APOYO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) POR HABERME OTORGADO UNA BECA PARA LLEVAR ADELANTE MIS ESTUDIOS.

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SEGUIRME PREPARANDO.



CONTENIDO

Página

| | |
|-------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| HIPÓTESIS..... | 14 |
| OBJETIVOS..... | 14 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 15 |
| RESULTADOS..... | 21 |
| DISCUSIÓN | 32 |
| CONCLUSIONES..... | 38 |
| PERSPECTIVAS | 39 |
| LITERATURA CITADA..... | 40 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | <u>PÁGINA</u> |
|---|---------------|
| FIGURA 1. MAPA GENÉTICO DEL PLÁSMIDO pkk3535 ----- | 18 |
| TABLA 1. RESULTADOS DE LA BIOTIPIFICACIÓN, SEROTIPIFICACIÓN Y ESV DE LAS CEPAS ANALIZADAS ----- | 23 |
| FIGURA 2. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO Y RIBOTIPOS DE UN GRUPO DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 25 |
| FIGURA 3. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO Y RIBOTIPOS DE UN GRUPO DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 25 |
| FIGURA 4. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO Y RIBOTIPOS DE UN GRUPO DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 26 |
| FIGURA 5. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO Y RIBOTIPOS DE UN GRUPO DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 26 |
| FIGURA 6. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO Y RIBOTIPOS DE UN GRUPO DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 27 |
| FIGURA 7. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO Y RIBOTIPOS DE UN GRUPO DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 27 |
| TABLA 2. MATRIZ DE SIMILITUD ENTRE LAS CEPAS ANALIZADAS Y <i>M. haemolytica</i> . ----- | 28 |
| TABLA 3. COMPARACIÓN DE LA SIMILITUD ENTRE LAS CEPAS ANALIZADAS Y LAS CEPAS TIPO. ----- | 30 |
| FIGURA 8. DENDOGRAMA QUE MUESTRA LA RELACIÓN FILOGENÉTICA, EN SEROTIPO Y LA PROCEDENCIA DE LAS CEPAS AVIARES ANALIZADAS ----- | 31 |
| FIGURA 9. PRESENCIA DE PLÁSMIDOS EN VARIAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS ----- | 32 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

TIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like OBTENIDOS DE AVES CON ENFERMEDAD REPRODUCTIVA Y RESPIRATORIA.

Desde 1997 la industria avícola en México se ha visto afectada por un síndrome respiratorio y del aparato reproductor que ha causado pérdidas en la producción de huevo. De los animales enfermos se han aislado bacterias del grupo *Mannheimia haemolytica*(Mh)-like solas o asociadas con otros patógenos. El objetivo de este trabajo es la caracterización de esas bacterias empleando biotipificación, serotipificación y ribotipificación. Se aislaron 44 cepas provenientes de brotes en diferentes partes del país. Las características macroscópicas de las colonias crecidas en agar sangre y la hemólisis observadas, las hicieron compatibles con Mh. Para la ribotipificación, se utilizó como sonda el operón *rrnB* de *E. coli*. En las pruebas bioquímicas, todas las cepas fueron nitrato positivas, lo que las diferencia de *Ornithobacterium* spp. Además, 31 cepas (68.88%) fueron trealosa positivas, once (24.44%) fueron trealosa y arabinosa negativas, dos (4.44%) fueron arabinosa positivas y una cepa (2.22%) fue arabinosa y trealosa positiva. En la serotipificación, 14 cepas (31.11%) reaccionaron con el antisuero A13, once (24.44%) con el T15, dos (2.44%) con el A12, dos (2.44%) con el T4 y una cepa (2.22%) con el A16. Quince cepas no fueron tipificables. Los ribotipos que mostraron estas bacterias presentaron de cuatro a diez bandas, la similitud que mostraron con la cepa de referencia de Mh A1 osciló entre 0 y 45%, con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, fue del 0 al 37%, con *P. multocida* del 0 al 22.5% y con *Haemophilus paragallinarum* del 0 al 24.3%. La similitud entre las cepas aviares analizadas fue de 0 a 96%. Se concluye que los métodos tradicionales de biotipificación y serotipificación empleados con las cepas de Mh provenientes de rumiantes, no son aplicables a las cepas aviares de este estudio. Los resultados de la ribotipificación sugieren que los organismos aislados de aves no corresponden a Mh o a alguna de las cepas empleadas como referencia. Estos aislamientos de aves podrían constituir uno o varios géneros o especies de la familia *Pasteurellaceae*, como ha sido sugerido previamente.

ABSTRACT

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica-like ORGANISMS ISOLATED FROM POULTRY WITH A RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME.

Since 1997 poultry industry in Mexico has been affected by a respiratory and reproductive syndrome, causing losses due to diminishing in egg production. *Mannheimia haemolytica*(Mh)-like organisms alone, and associated with other pathogens have been isolated from sick animals, suggesting its involvement in the disease. The goal in this study was to characterize these bacteria using biotyping, serotyping, and ribotyping. We isolated 44 strains from outbreaks in different parts of the country. The macroscopic characteristics of the colony on blood agar plates, including hemolysis, were those resembling Mh. For the ribotyping we used the *rrn* B operon of *E. coli* as a Probe. In biochemical reactions, all were positive to nitrate reduction, demonstrating that all strains were different to *Ornithobacterium* spp. Thirty one (68.88 %) of the isolates were trehalose positive, 11 (24.44 %) were trehalose and arabinose negative, 2 (4.44 %) were arabinose positive and one strain (2.22%) fermented arabinose and trehalose. The serotyping results demonstrated that fourteen strains (31.11%) had an agglutination reaction with A13 antiserum ; eleven strains (24.44%) with T15; two strains (2.44%) with A12; two strains (2.44%) with T4 and one strain with A16. Fifteen strains (31.11%) were untypeable . The ribotypes of the analyzed strains showed 4 to 10 bands, the similarity between avian strains and Ph A1 reference strain was from 0 to 45 %, with *Actinobacillus pleuropneumoniae* was from 0 to 37%, with *P. multocida* was from 0 to 22.5% and with *Haemophilus paragallinarum* was from 0 to 24.3%. The similarity among avian strains was between 0 to 96 % showing high variability. It was concluded that the traditional serotyping method for Mh designed for ruminants, is not suitable for avian strains. The ribotyping studies suggested that these organisms isolated from diseased poultry, did not correspond to h neither to the reference strains we used, and they had high diversity in genotypes. These avian isolates might constitute one or several new genus of *Pasteurellaceae* as suggested by previous studies.

INTRODUCCIÓN

Una de las industrias más importantes en México es la avícola, ya que la producción de carne de pollo para el año 2001 fue de 1,879,276 ton lo que representa el 42% de la producción de carne a nivel nacional^{1,2}, sin tomar en cuenta la producción de carne de pavo que alcanzó las 27,200 ton. Adicionalmente, el consumo nacional *per capita* de carne de pollo para el mismo año se estimó en aproximadamente 18.79 kg/persona/año³. Por otro lado, la producción de huevo se estimó en aproximadamente 1,829,659 ton que arroja un consumo *per capita* de alrededor de 18.29 kg/persona/año³.

Si se comparan estos datos con la producción nacional de diferentes tipos de carnes, así como con el cálculo del consumo *per capita* de cada una de ellas, se concluye que la fuente de proteína animal que más accesibilidad tiene entre la población de México es la de ave^{1,3}. Esto se debe a que en la actualidad los métodos de producción de huevo y carne de pollo han logrado mayor eficiencia a un menor costo, a la vez que se han generado líneas genéticas con mejores rendimientos, logrando con esto incrementar sensiblemente su producción⁴.

Sin embargo, existen factores que afectan drásticamente esa eficiencia y que repercuten negativamente en la avicultura de nuestro país. Probablemente uno de los factores de mayor impacto en la industria son las enfermedades infecciosas. México se considera endémico para diversos padecimientos de las aves, y aunque existen campañas para reducir sensiblemente el efecto que estos tienen en la producción, siguen causando pérdidas en esta rama de la producción pecuaria⁵. Por esto el control sanitario en las explotaciones avícolas es crucial, ya que la existencia en México de distintas entidades nosológicas en las aves, junto con la potencial aparición de nuevos patógenos, representan un fuerte riesgo para la avicultura en particular y para la producción pecuaria en general.

Existen diversos patógenos que afectan a las aves produciendo pérdidas significativas en la avicultura mundial. Un grupo importante de estos organismos

lo constituyen las bacterias, que producen un conjunto extenso y variado de enfermedades que afectan a esta especie. De estas, las que causan infecciones respiratorias son de mayor impacto ya que, junto con las infecciones entéricas, ocasionan el mayor porcentaje de las enfermedades infecciosas que regularmente son registradas en las explotaciones avícolas⁵. Entre las enfermedades que afectan al tracto respiratorio destacan de forma particular las producidas por bacterias de la familia *Pasteurellaceae* a la que pertenecen diversos patógenos que afectan tanto a las aves domésticas como a las silvestres y son causa de un porcentaje importante de las infecciones respiratorias^{6,7,8}. Esta familia está constituida por los géneros *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Haemophilus* y, recientemente, también los géneros *Lonepinella* y *Mannheimia*⁹.

No se ha informado de cepas que correspondan al género *Actinobacillus sensu stricto* aisladas a partir de aves⁶, aunque la cercanía filogenética entre los géneros *Actinobacillus* y *Pasteurella* se ha establecido con anterioridad⁸. Del género *Haemophilus*, la especie de mayor importancia clínica en aves es *H. paragallinarum*, responsable de la Coriza Infecciosa Aviar¹⁰ que, sin embargo, no es aceptada plenamente en este género⁶. Así mismo, en *Pasteurella* la especie de mayor impacto es *Pasteurella multocida*, causante del Cólera Aviar, una de las principales enfermedades en las aves pues produce enormes pérdidas a nivel mundial^{6,11}. No obstante, existen otras especies que de forma esporádica son causa de infecciones respiratorias como *P. gallinarum*, *P. avium*, *P. volantium* y *P. pneumotropica* así como un grupo importante de cepas fenotípicamente relacionadas con [*P.*] *haemolytica* aisladas de aves enfermas y clínicamente sanas^{6,7,12}.

Los integrantes de la familia *Pasteurellaceae* constituyen un conjunto de bacterias muy heterogéneo que se ha tratado de clasificar apropiadamente en diversas ocasiones^{6,7,8,12}. Además de *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Lonepinella* y *Mannheimia* existen también varios grupos de bacterias semejantes, no clasificadas adecuadamente, que presentan una relación

compleja, fenotípica y genotípica, con esta familia^{6,8,9,12}. Es por esto que, conforme se reportan más secuencias de organismos pertenecientes a *Pasteurellaceae*, los árboles filogenéticos que se generan y permiten comprender su situación taxonómica, sugieren que esta familia debería dividirse en aproximadamente 20 géneros o simplemente reducirse a uno, con base en los dendogramas obtenidos a partir de la secuenciación del ARNr 16S⁶.

La complejidad general de esos resultados indica que es difícil dividir esta familia en géneros fenotípicamente coherentes^{7,8,12}. Esto se debe a que la mayoría de los análisis de secuencias proporcionan información sólo de porciones pequeñas del genoma que, aunque importantes, con la elección de secuencias diferentes para su análisis se puede llegar a conclusiones variables¹³. Tal es el caso de la secuenciación del ADN ribosomal (ADNr) de la unidad 16S, que actualmente es una de las técnicas usadas con más frecuencia para estudios filogenéticos en bacterias por su alta eficiencia. No obstante, esta técnica resulta eficaz solo en la resolución de géneros o grupos taxonómicos más elevados, para categorías inferiores pierde resolución^{13,14}.

Estudios basados en la hibridación ADN:ADN han mostrado que el género *Pasteurella* consiste de al menos 11 especies, algunas de las cuales aún no se han denominado^{8,12}. Además, todos los miembros de esta familia son parásitos y a menudo patógenos en mamíferos, aves y reptiles^{6,8,12}, y aunque *Pasteurella spp* es uno de los géneros de más difícil organización, [*P.*] *haemolytica* es la especie que más problemas ha presentado en su clasificación^{9,15,16}.

En 1960, Biberstein y col., desarrollaron un sistema de serotipificación mediante una prueba de hemoaglutinación indirecta (HI) encontrando una asociación consistente entre los serotipos y los biotipos reconocidos hasta ese momento¹⁷. Posteriormente, y con base en sus antígenos de superficie, [*P.*] *haemolytica* fue clasificada en 16 serotipos (1 al 16) y en los biotipos T (fermentador de trealosa) que comprende a los serotipos 3, 4, 10 y 15 y el biotipo A (fermentador de arabinosa) que incluye a los 12 serotipos restantes. Sin

embargo, la dispersión genotípica en esta especie es tal, que en los últimos años ha sufrido diversas modificaciones en su clasificación^{9,16,19,20}.

En la actualidad existe una tendencia hacia el reacomodo taxonómico de esta especie bacteriana. En 1999 Oystein y col. propusieron una nueva clasificación para las cepas de [*P.*] *haemolytica* que no fermentan la trealosa, con base en características fenotípicas y genotípicas obtenidas por ribotipificación, electroforesis de enzimas multilocus (EEM), secuenciación del gene 16S del ARNr e hibridaciones ADN:ADN, colocándolas en el nuevo género *Mannheimia* spp. Este nuevo género está compuesto de 5 especies: *M. haemolytica* la cual incluye a los serotipos 1,2, 5-9, 12-14 y 16; *M. granulomatis* incluye a *P. granulomatis* y varios grupos de [*P.*] *haemolytica* no clasificados; *M. glucosida* que incluye a todas las cepas del serotipo 11; *M. ruminalis* comprende a diversas cepas de [*P.*] *haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y, finalmente, *M. varigena* compuesta por un grupo amplio de cepas de [*P.*] *haemolytica* no tipificadas⁹. Por otro lado, desde 1990 también se ha propuesto clasificar a la [*P.*] *haemolytica* biotipo T (serotipos 3,4,10 y 15) como *P. trehalosi*, igualmente basándose en sus características fenotípicas y genotípicas^{20,21,22}.

Al igual que los demás miembros de la familia *Pasteurellaceae*, *Mannheimia haemolytica* se caracteriza por ser una bacteria, gram negativa, no móvil con forma cocobacilar o de bacilo pequeño. Las colonias que forma al crecer en agar sangre son lisas, de color grisáceo y oscilan de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 h de incubación. La mayoría de las cepas producen una hemólisis completa cuando crecen en agar con sangre de bovino. Es también, una bacteria quimiorganotrófica, anaerobia facultativa y capaz de fermentar D-sorbitol, d-xilosa, maltosa y dextrina. No fermenta arabinosa o glucósidos, es negativa a la ornitina descarboxilasa y NPG (β -glucosidasa) y positiva a ONPF (α -fucosidasa)^{9,23,24}.

La *M. haemolytica* es una bacteria que comúnmente se encuentra asociada a infecciones en animales y es causa de importantes pérdidas en la

industria pecuaria pues afecta a los bovinos, ovinos y otros rumiantes domésticos y silvestres en los que produce la "Fiebre de embarque" o pasteurelisis neumónica, que se caracteriza por una reacción inflamatoria fibrino-purulenta en los pulmones²⁵, en donde por lo general se asocia con otros agentes^{16,19,26}. Los serotipos habitualmente asociados a esta enfermedad son el A1, el A2 y con menos frecuencia, el A11 (ahora denominado *M. glucosida*), si bien el serotipo A2 se asocia con más frecuencia con la neumonía enzootica en ovinos¹⁹. De la misma forma, las cepas del biotipo T, (*P. trehalosi*) afectan en primer lugar a ovinos y cabras causando septicemia, aborto y neumonía^{20,21,22}. Por otro lado, cepas con características fenotípicas similares a *M. haemolytica* se han aislado en diversas ocasiones de aves ligeras y pesadas con enfermedad respiratoria, salpingitis o ambas⁷.

Las especies que integran los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus* constituyen un grupo de bacterias con una gran cantidad variedades entrecruzadas entre sí taxonómicamente y en donde las fronteras formales entre especies o, aún, entre géneros son imperceptibles. Por esta razón, muchos aislamientos de ambos géneros permanecen sin identificación a nivel de especie por pruebas de laboratorio rutinarias. Por lo tanto, no es suficiente emplear únicamente el criterio descriptivo convencional para el tratamiento taxonómico de esos problemas^{27,28,29}.

Se han tratado de definir los mecanismos de patogenicidad de algunos de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*, particularmente en el género *Mannheimia*, cuya expresión se relacione directamente con la capacidad de producir enfermedad^{19,25,26}. Se sabe que las cepas de *M. haemolytica* encontradas en los rumiantes presentan diversos mecanismos que les confieren patogenicidad como son:

- a. Una leucotoxina que posee actividad citotóxica sobre neutrófilos y se considera uno de los principales factores de patogenicidad en las infecciones en rumiantes^{6,19,21,25,26,31-33}.

- b. El lipopolisacárido (LPS) con una alta capacidad de inducir una respuesta inflamatoria y el cual se ha sugerido que tiene una fuerte asociación con la leucotoxina^{6,19,25,31}.
- c. Una cápsula que protege a la bacteria de la fagocitosis y de la actividad bactericida del complemento y es la base del esquema de serotipificación^{6,16,19,31}.
- d. Enzimas como la neuraminidasa que facilita la adherencia de los bacterias a la mucosa respiratoria, una metaloglicoproteasa que favorece la invasión de tejidos al incrementar la adherencia y proteasas de IgA que incrementan la colonización bacteriana por la eliminación local de anticuerpos^{6,19,25,26,33}.
- e. Adhesinas, en las cuales se sugiere podrían estar involucrados antígenos específicos de serotipo (aunque no se han identificado con precisión), proteínas de membrana externa, el LPS, la fimbria o el glicocalix^{19,25,32}.
- f. Finalmente, la resistencia a antibióticos, relacionada con la presencia de plásmidos de alto y bajo peso molecular así como la asociada al cromosoma y que se ha identificado en un número considerable de cepas de campo, representa una característica que favorece la inducción de enfermedad por parte de esta bacteria^{19,30}.

De todos estos, la leucotoxina (LktA) se considera el factor de virulencia primario^{33,34,35}. Esta toxina (una citotoxina formadora de poros específica de leucocitos) es miembro de la familia de toxinas RTX ("repeats-in-toxin"), a la que pertenecen también la hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli*, las hemolisinas (ApxIA y ApxIIA) de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la toxina adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella pertussis* y las leucotoxinas de *A. actinomycetemcomitans* (LtxA), y de *A. pleuropneumoniae* (ApxIIIA) ya que comparten características como los mecanismos de activación, de secreción y de toxicidad^{36,37,38}. La leucotoxina de *M. haemolytica* se encuentra codificada en un operón compuesto por los genes *lktA* que codifica para la leucotoxina, *lktC* para una proteína requerida en su activación y *lktB* y *lktD* para proteínas que se requieren en su

secreción. Finalmente, la molécula de superficie CD18 (que funciona como una subunidad de la molécula de adhesión de leucocitos integrina $\beta 2$ y se asocia a CD11a, b, c y d), se ha identificado como el receptor que ocupa esta toxina en los leucocitos de bovinos^{39,40}. Estudios recientes indican que esta toxina también es capaz de inducir la muerte celular en leucocitos por apoptosis aumentando la posibilidad de colonización de la mucosa respiratoria, por la bacteria⁴¹.

Los animales que presentan anticuerpos contra la leucotoxina incrementan fuertemente su probabilidad de superar la infección de modo que, los inmunógenos utilizados actualmente para prevenir la enfermedad tienden a incluir una forma inactivada de esta toxina^{34,35}.

La identificación de *M. haemolytica* en aves había sido poco común, aunque existen algunos informes de ello⁴²⁻⁴⁸. Recientemente, la identificación de bacterias de un complejo denominado [*Pasteurella*] *haemolytica/Actinobacillus salpingitidis*-Like aisladas a partir de infecciones en el tracto reproductivo, vías respiratorias e infecciones sistémicas en pollos y gallinas que ha llamado mucho la atención entre algunos investigadores, se encuentra en proceso de definición taxonómica^{6,7}.

En México existen informes de cinco años a la fecha, que notifican sobre el impacto negativo en la producción avícola nacional debido a la aparición de brotes de una enfermedad respiratoria de tipo corizoide, que puede acompañarse de alteraciones reproductivas y han ocasionado importantes pérdidas en la avicultura⁴⁹. Estos brotes fueron reportados inicialmente en la región de Tehuacan, Puebla, que es una zona avícola importante, principalmente de aves de postura, en donde los casos fueron atribuidos a la presencia de bacterias con características fenotípicas compatibles con *M. haemolytica* en las aves afectadas. Algo que en algunas ocasiones, se ha reportado también en otros países⁴⁵⁻⁴⁸. La edad de las aves enfermas oscila entre 24 y 70 semanas de edad y los brotes se observan en la época de lluvias, aunque también se pueden presentar con cambios bruscos de temperatura o asociados a la

presencia de aflatoxinas en el alimento^{49,50}. La infección es de difusión lenta aunque esta puede ser explosiva y se caracteriza porque las aves ligeras no alcanzan su picó de producción, pudiendo disminuir ésta entre 8 y 10%. También se presenta una reducción en el consumo de alimento, por lo que se observa retraso en el crecimiento en algunos animales así como disminución en la calidad del cascarón. Clínicamente, se observan aves somnolientas y con fiebre, descargas nasales, conjuntivitis que evoluciona a blefaroconjuntivitis, hemorragias petequiales en la periferia de las "orejuelas", cianosis en la cresta y eventualmente otitis. A la necropsia se pueden observar hemorragias petequiales en las pleuras, hidrotorax, traqueitis catarral, pericarditis, peritonitis fibrinosa y salpingitis con folículos atróficos. El aislamiento de estas bacterias se realiza generalmente a partir de la hendidura palatina, tráquea y ocasionalmente del oviducto^{46,47,49}.

Estas bacterias se han aislado en conjunto con otros patógenos (como el virus de la bronquitis infecciosa aviar o *H. paragallinarum*), pero también se han aislado solas, lo cual sugiere que podrían actuar como patógenos únicos, una situación semejante a lo observado en los bovinos y otros rumiantes en las infecciones respiratorias asociadas a *M. haemolytica*⁴⁹.

Diversos autores también han descrito aislamientos de organismos con características fenotípicas y genotípicas que las relacionan con la familia *Pasteurellaceae*, particularmente con *M. haemolytica*, que tampoco han podido clasificar dentro de los géneros reconocidos en esta familia^{6,7,51}. Debido a que la mayor proporción de estas cepas ha sido aislada de aves, a la fecha han sido clasificadas de forma temporal en un grupo denominado [*Pasteurella*] *haemolytica*-like/*Actinobacillus salpingitidis*⁷. Las cepas se han encontrado tanto en procesos infecciosos, como en aves sanas (domésticas y silvestres) y aunque parecen constituir parte de la flora bacteriana normal del tracto respiratorio de pollos, también han sido asociadas con procesos patológicos.

Harbourne (1962), Greenham y Hill (1962) y Harry (1962) por separado, reportan el aislamiento de cepas bacterianas semejantes a [*P*] *haemolytica* a

partir de pollos enfermos y sanos⁴²⁻⁴⁴. En 1974, Hacking y col. también describen el aislamiento de cepas de *P. haemolytica* de parvadas con anomalías en la producción de huevo y en algunas aves con peritonitis y salpingitis y por primera vez asocian la presencia de esta bacteria con la presentación de la enfermedad en aves, sugiriendo su participación como patógeno secundario o aún como primario en dichos brotes⁴⁵. Desde entonces, se han publicado solo algunos reportes con hallazgos semejantes, en donde no se ha definido, de forma categórica, al agente o agentes que participan en la infección, ni se ha profundizado en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad^{7,46-49}.

Dada la escasez de información acerca del aislamiento de cepas semejantes a la *M. haemolytica* de brotes infecciosos en aves, es posible que no representen un riesgo sustancial en la producción aviar. Sin embargo, la patogenicidad potencial que presentan dichas cepas, ya reportada con anterioridad⁷, revela la necesidad de una caracterización y tipificación precisa de estos organismos, dada la importancia económica que representa la industria avícola en casi todo el mundo.

Ultimamente, Christensen y col. (1999), propusieron la creación del nuevo género *Salpingitia*, para las cepas que han sido aisladas de aves y que guardan semejanza con *M. haemolytica*, con *Actinobacillus salpingitidis* o con ambas⁵¹. Estas cepas se han denominado [*P.*] *haemolytica* / *A. salpingitidis*-Like y agrupan a subtipos descritos previamente por Mannheim y col, Bisgaard y col. y Christensen y col.^{7,51}.

Estos hallazgos muestran el alto grado de variabilidad que existe entre cepas fenotípicamente parecidas a *M. haemolytica*, que probablemente compartan factores de virulencia (como la leucotoxina) y que sólo con el empleo de técnicas de genotipificación molecular se podrían identificar diferencias no evidentes a través de la clasificación fenotípica y la serotipificación^{8,12}.

Varias son las técnicas utilizadas con fines de tipificación molecular, entre las que destacan:

- a. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN ADN-ADN: en las cuales se emplea el ADN genómico total para determinar las semejanzas entre 2 cepas bacterianas, con base en las condiciones de desnaturalización y renaturalización que presentan. Esta técnica se ha utilizado frecuentemente para la tipificación de cepas de *M. haemolytica*⁵²⁻⁵⁴.
- b. ELECTROFORESIS DE ENZIMAS MULTILOCUS (EEML): en la que se obtienen patrones de diferentes enzimas metabólicas por tinción selectiva de los sobrenadantes de lisados bacterianos separados por electroforesis en geles de almidón^{20,55}.
- c. ENSAYO DE ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (APAA): también conocido como PCR iniciada arbitrariamente o RAPD y que se basa en el uso de secuencias cortas, generadas al azar, como iniciadores (9 a 10 bases de longitud) que hibridan con suficiente afinidad con secuencias de ADN cromosomal a bajas temperaturas de alineamiento de modo que pueden ser usadas para iniciar la amplificación de regiones del ADN bacteriano. Si dos iniciadores APAA se alinean a pocas kilobases uno de otro en una orientación apropiada, resulta un producto de PCR con la longitud molecular correspondiente a la distancia entre los dos iniciadores. Tanto el número como la localización de esos productos puede variar entre cepas diferentes de una misma especie bacteriana⁵⁶.
- d. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES DEL ARNr O RIBOTIPIFICACIÓN: este es una variación del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) y el ensayo tipo *Southern*, que se basa en el fenómeno de hibridación de secuencias de ácidos nucleicos complementarios. En la ribotipificación se utilizan como sonda los genes que codifican para el ARNr, usualmente el 16S y el 23S, marcados no radioactivamente con enzimas que pueden ser

detectadas con substratos colorimétricos o quimioluminiscentes. Dicha sonda se emplea en el ensayo de hibridación para producir una huella digital (fingerprint) con los fragmentos de ADN genómico con que híbrida. El ADN es previamente cortado con enzimas de restricción y los fragmentos son separados por electroforesis en geles de agarosa⁵³⁻⁵⁷.

- e. SECUENCIACIÓN DEL ADN: aunque genes como el *hsp65* o el *groEL* han sido utilizados con fines taxonómicos o en estudios filogenéticos, las secuencias más empleadas son los genes para las fracciones 16S y 23S del ARNr⁵⁸. Una fuente de los genes ARNr son fragmentos de ADN generados al azar que, sin embargo, requieren de una selección de entre los demás. La forma más rápida de seleccionarlos es por medio de PCR, pues la naturaleza altamente conservada de éstos permite su amplificación con iniciadores "universales" que pueden alinearse a secuencias conservadas de los genes ARNr de prácticamente todos los microorganismos. En principio, la PCR llevada a cabo con esos iniciadores amplifica los genes ARNr de todos los tipos de organismos en una muestra, los tipos particulares de genes en la muestra son separados por un paso de clonación para entonces ser secuenciados^{27,53,58}.

En los últimos años, los métodos de genotipificación que tienen como base el estudio del polimorfismo del ADN bacteriano, han mostrado un alto poder de discriminación en la diferenciación de cepas y superioridad sobre la mayoría de los métodos de tipificación fenotípica utilizados con más frecuencia⁵⁶⁻⁵⁹. No obstante, algunos de esos métodos requieren un alto nivel de tecnología y equipo sofisticado, como es el caso de la electroforesis de geles por pulsos de campo (EGPC), o demandan sondas específicas, de disponibilidad limitada, para ciertos microorganismos (por ejemplo sondas de ADN clonado al azar o sondas de genes específicos)⁵⁷. Es por esto y gracias a que la ribotipificación utiliza una sonda universal (genes ARNr), además de ser una tecnología bastante simple

(en particular a partir del advenimiento de los sistemas de marcado no radioactivo), que ha sido muy utilizada para la diferenciación de cepas y con fines filogenéticos.

Del mismo modo, también ha sido demostrada la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de los marcadores estudiados y aunque puede haber alguna limitación en esta cualidad, se ha demostrado que la ribotipificación tiene un alto potencial de diferenciación, en particular entre los miembros de la familias *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae*, así como en otros géneros y especies bacterianas^{57,60,61}. Además, si bien existen procedimientos con una capacidad de diferenciación un poco mayor, como la EGPC, el costo por muestra analizada también es mayor en comparación con la ribotipificación^{56,57} y, gracias a la automatización de esta última, dicho costo disminuye^{57,60}.

Finalmente, la adecuada clasificación y caracterización de las variedades de *M. haemolytica*-like aisladas de aves en nuestro país, depende de una identificación precisa de estos organismos, de la determinación del grado de participación que tienen en la producción de enfermedad y de la caracterización de sus principales mecanismos de patogenicidad. Estos elementos, en conjunto, permitirán establecer las bases para la obtención de inmunógenos eficaces, que permitan el control de los brotes y así, reducir al mínimo su impacto económico negativo en la avicultura nacional. Además, se podría lograr una organización taxonómica más adecuada de los miembros de esta especie, con base en características genotípicas más que fenotípicas.

El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización fenotípica y genotípica de diversas cepas de *M. haemolytica*-like aisladas de aves, así como la determinación de la relación filogenética que guardan con otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, ya que en México no se cuentan con antecedentes de la caracterización de esta clase de organismos y a nivel internacional es muy escasa la información con la que se cuenta sobre el estudio de las mismas.

HIPÓTESIS

Las cepas de *M. haemolytica*-like aisladas de aves en México son distintas a *M. haemolytica* y *P. thehalosi* que afectan a otras especies animales, pudiendo conformar un nuevo género.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la biotipificación, serotipificación y genotipificación de cepas de *M. haemolytica*-like obtenidas de aves con enfermedad respiratoria y reproductiva, con el fin de aportar bases para su identificación y clasificación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Determinar las características de crecimiento, morfológicas y bioquímicas de estas cepas y determinar su relación con *M. haemolytica*.
- b. Serotipificar los aislamientos de estas bacterias obtenidas de aves en diferentes regiones del país, empleando el sistema de serotipificación utilizado para *M. haemolytica* de rumiantes y determinar los serotipos más frecuentes con base en este sistema.
- c. Tipificar estos aislamientos por medio de ribotipificación y determinar su relación con bacterias de los géneros *Manheimia* spp , *Pasteurella* spp *Haemophilus* spp y *Actinobacillus* spp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Las cepas de *M. haemolytica*-like aisladas de aves en México son distintas a *M. haemolytica* y *P. thehalosi* que afectan a otras especies animales, pudiendo conformar un nuevo género.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la biotipificación, serotipificación y genotipificación de cepas de *M. haemolytica*-like obtenidas de aves con enfermedad respiratoria y reproductiva, con el fin de aportar bases para su identificación y clasificación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Determinar las características de crecimiento, morfológicas y bioquímicas de estas cepas y determinar su relación con *M. haemolytica*.
- b. Serotipificar los aislamientos de estas bacterias obtenidas de aves en diferentes regiones del país, empleando el sistema de serotipificación utilizado para *M. haemolytica* de rumiantes y determinar los serotipos más frecuentes con base en este sistema.
- c. Tipificar estos aislamientos por medio de ribotipificación y determinar su relación con bacterias de los géneros *Manheimia* spp , *Pasteurella* spp *Haemophilus* spp y *Actinobacillus* spp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y EXÁMENES BACTERIOLÓGICOS.

Se obtuvieron un total de 44 aislamientos de *P. haemolytica*-like de aves de postura y engorda provenientes de los estados de Yucatán, Querétaro, Jalisco y Puebla, obtenidas a partir de muestras de tráquea, pulmones y oviducto. Se sembraron en agar sangre de bovino al 5% a 37C para determinar la morfología de las colonias y la producción de hemólisis completa. Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas de crecimiento en Mc Conkey, la producción de indol, oxidasa, catalasa y nitratos, así como pruebas de fermentación de los azúcares arabinosa y trealosa para su identificación y biotipificación^{23,24}. Todas las cepas se conservaron en glicerol al 10% en caldo infusión cerebro-corazón (ICC) a -70C hasta su uso.

Se utilizaron como testigos las siguientes cepas:

- a. [*Pasteurella*] *haemolytica* A1 de referencia, amablemente proporcionada por el Dr. G.H. Frank (National Animal Disease Center, Ames, IA, USA), crecida en agar infusión cerebro corazón (ICC) adicionado con 5% de sangre de bovino.
- b. *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 serotipo 11 de origen canadiense, crecida en agar chocolate y en caldo ICC adicionado con 0.1% de NADH y 2% de suero equino a 37C con 5% de CO₂.
- c. *Pasteurella multocida* serotipo D crecida en agar BHI aislada de un caso clínico de campo.
- d. *Haemophilus paragallinarum* cepa W crecida en agar chocolate y en caldo ICC adicionado con 0.1% de NADH y 2% de suero equino a 37C con 5% de CO₂ y aislada de muestras clínicas.
- e. *Escherichia coli* crecida en agar LB y aislada también de muestras clínicas.

Las cepas obtenidas de muestras clínicas fueron aisladas en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Fac. de Med. Vet. Y Zoot. UNAM y pertenecen al cepario del mismo.

2. SEROTIPIFICACIÓN.

La serotipificación de los aislados de campo se realizó utilizando el método de hemoaglutinación pasiva de acuerdo a la técnica descrita por Biberstein¹⁷ contra los 16 serotipos que se reconocen en *M. haemolytica* de rumiantes, empleando los 16 antisueros respectivos, también proporcionados por el Dr. G.H. Frank (National Animal Disease Center, Ames, IA, USA). Brevemente, un cultivo de 18 horas de cada cepa de *M. haemolytica*-like, crecida a 37C en agitación a 200 rpm, fue inactivada en baño maría a 56C por 30 min en agitación a 150 rpm. Posteriormente, se agregó el 1% (v/v) de un paquete de glóbulos rojos frescos de bovino, lavados previamente 3 veces con solución buffer de fosfatos PBS 0.15 M e incubándose a 37C por 60 minutos en agitación a 150 rpm, para su sensibilización. Terminada la incubación, los glóbulos rojos sensibilizados se lavaron nuevamente 3 veces con PBS 0.15 M y se resuspendieron en la misma solución amortiguadora. Finalmente, se realizaron 6 diluciones dobles seriadas con cada uno de los 16 antisueros iniciando con una dilución 1:2 y se confrontaron con un volumen constante de glóbulos rojos sensibilizados con cada una de las cepas problema.

3. RIBOTIPIFICACIÓN.

a. *Elaboración de sondas.* Para la tipificación genética de estos aislamientos por ribotipificación, se utilizó como sonda, en los ensayos de hibridación, al operón *rnmB* que codifica para el ARN ribosomal de *E. coli* [contenido en el plásmido pKK3535⁶² (fig.1)]. Brevemente, el plásmido pKK3535 que contiene el operón *rnmB*, se introdujo en la cepa de *E. coli* JM110 (F'[traD36 proA+ proB+ lacIq delta(lacZ)M15] dam dcm supE44 hsdR17 thi leu thr rpsL lacY galK galT ara tonA tsx delta(lac-proAB) lambda-) (Stratagene, La Jolla, Cal.) por transformación con cloruro de calcio⁶³. El ADN del plásmido se extrajo por los métodos de lisis alcalina o ebullición, previamente descritos⁶³ y se purificó con el sistema GENE CLEAN (GibcoBRL, Rockville, Maryland). Posteriormente, se digirió con la enzima *Bcl* I a 50C por 2 h. El fragmento de 5.5 kb que contiene al operón fue purificado con el sistema Qiaex II (Qiagen, Hilden, Germany) y marcado con fosfatasa alcalina de forma directa

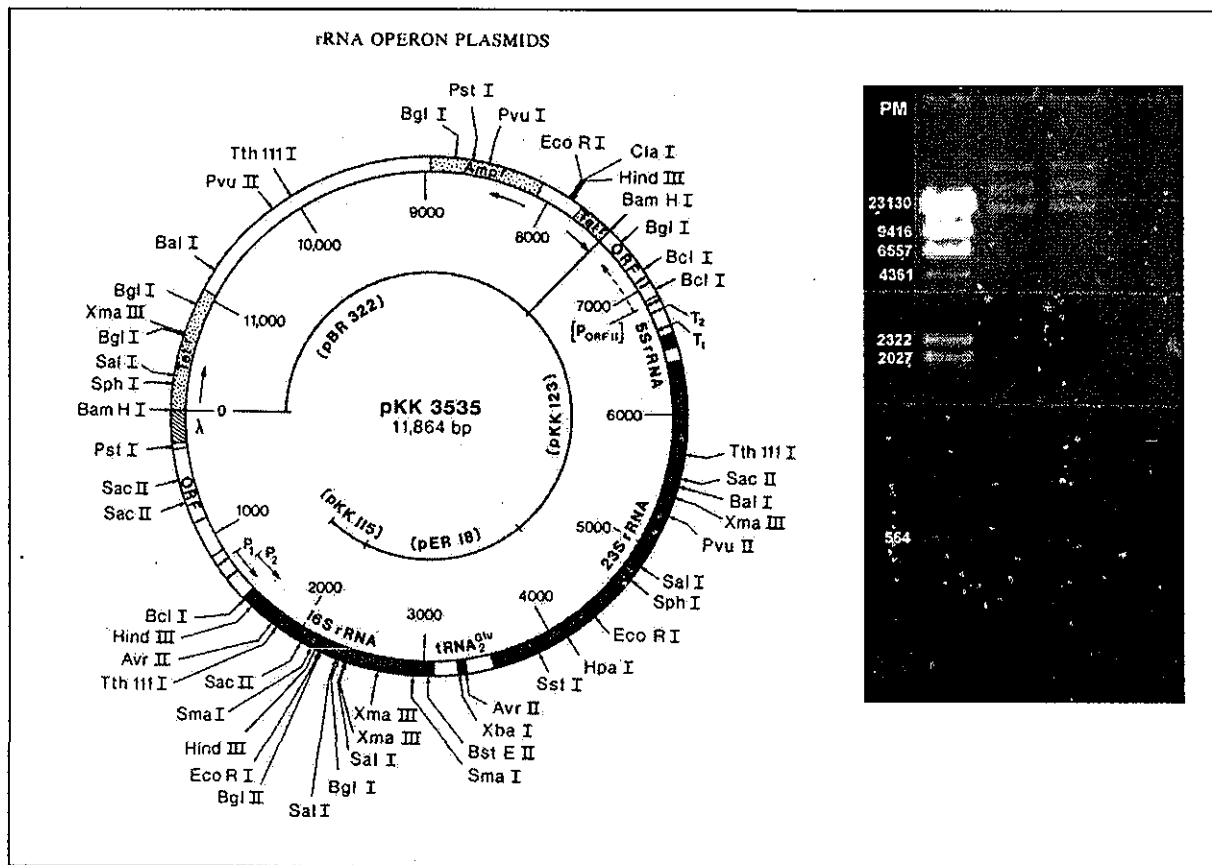


Fig.1 Mapa de restricción del plásmido pPK3535⁶² que contiene al operón *rnsB* e imagen del mismo en un gel de agarosa al 0.8%

con el sistema ALK PHOS Direct (Amersham Biosciences. Piscataway, NJ), conservándose en glicerol a -20C hasta su uso, de acuerdo con las instrucciones del productor. También se empleó el sistema BioPrime (GibcoBRL, Rockville, MD) en donde el marcaje de sondas se efectúa por medio de primers aleatorios cuya extensión es realizada por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, con el empleo de una mezcla de dNTPs en los cuales el dCTP esta marcado con biotina (biotina-14-dCTP). Esta última sonda se utilizó con el sistema de hibridación PhotoGene (GibcoBRL, Rockville, MD).

- b. *Digestión del ADN genómico e hibridación.* El ADN genómico de cada una de las cepas aisladas se obtuvo por medio del método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)⁶⁴, digiriendo parcialmente 5 µg del ADN de cada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una con la enzima *HindIII* (GibcoBRL, Rockville, Md) a 37C por 4 h agregando la mitad de la enzima las primeras 2 horas y la otra mitad las 2 horas posteriores. Esta enzima se ha utilizado previamente con resultados satisfactorios²⁸. Posteriormente, se separaron los fragmentos de la digestión por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% durante 16 a 18 horas a 40 mV, se visualizaron con el empleo de luz ultravioleta y se fotografiaron utilizando el equipo Fluor S Multimager (BioRad, Hercules, Cal.). Transcurrido este proceso, las muestras se transfirieron en un aparato de vacío (Vacuum Blotter, BioRad Hercules, Cal.) a papel de nylon (GibcoBRL, Rockville, MD) en solución SSC 10X (NaCl 1.5 M, Citrato de sodio 0.15M) durante 90 minutos con una presión de 130 mm Hg de vacío total, de acuerdo a las instrucciones del productor.

- c. *Hibridación*. El procedimiento se inició con un período de prehibridación de 30 min con la solución amortiguadora de hibridación del sistema ALK PHOS Direct, que contiene NaCl 0.5M y su reactivo bloqueador al 4%, seguido de la hibridación durante toda la noche, después de añadir la sonda a la misma solución. Finalizado este paso, se realizó un protocolo de lavados a la membrana con una solución de lavado primaria (urea 2M, SDS 0.1%, fosfato de Na 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10mM y reactivo bloqueador 2%) y posteriormente con una solución de lavado secundaria (Tris 50mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM).
- d. *Generación de la señal y revelado*. Finalmente, se generó la señal quimoluminiscente al añadir el substrato proporcionado en el equipo, un dioxetano estable, por 5 min. para posteriormente, exponer la película radiográfica (Kodak) con las membranas durante 1 h. Después del período de exposición, la película fue revelada y la imagen capturada con el equipo FluorS Multimager (Bio-Rad Hercules, Cal.). Para el análisis de los patrones de bandas obtenidos se utilizó el programa Diversity Database (Bio-Rad Hercules, Cal.) en la obtención de las matrices de similitud y los dendogramas de relación simple (Simple Linkage).

e. *Sistema PhotoGene (Gibco BRL):* Con este sistema, se realizó un primer paso de prehibridación a 42C en agitación con una solución de prehibridación que contiene formamida adicionada con ADN de esperma de salmón (GibcoBRL, Rockville, MD), previamente sometido a desnaturalización por ebullición, seguida de un periodo de hibridación por toda la noche en una solución de hibridación adicionada con ADN de esperma de salmón y la cantidad necesaria de sonda marcada, previamente desnaturalizados. Después, se realizaron lavados de la membrana primero con solución SSC 5X con 0.5% (p/v) de SDS a 65C; posteriormente, con solución SSC 0.1X con 1% (p/v) de SDS a 50C y finalmente, con SSC 2X a temperatura ambiental. Al final de este proceso, se realizó la fijación de un conjugado Estreptavidina-Fosfatasa alcalina adicionado a una solución bloqueadora (3% de albúmina sérica bovina) a 65C. Por último, se aplicó el reactivo de detección proporcionado en el equipo {4-metoxi-4-(3-fenil fosfato)spiro[1,2-dioxetano-3,2'-adamantano]} a temperatura ambiente, después de lo cual, se expusieron las membranas a la película radiográfica (Kodak) y se tomó la imagen con el equipo Fluor S Multi-Imager (Bio-Rad Hercules, Cal.).

4. ENSAYO SIMPLE VISUAL (ESV).

Utilizando algunas de las cepas aviares de este estudio y tomando como testigos positivos 2 cepas de campo de *M. haemolytica* previamente identificadas por serotipificación como A1, se realizó un ESV con base en la técnica descrita por Gentry y col.⁶⁵ diseñada para el análisis de cepas de origen rumiante. Brevemente, se eligieron 10 cepas con hemólisis completa, así como 2 cepas de *M. haemolytica* A1 aisladas de campo y se sembraron en agar sangre de bovino al 5% durante 18 h a 37C, después de lo cual, se obtuvieron 2-3 colonias para ser sembradas en medio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, Rockville, MD) en agitación a 200 RPM durante 6h. Pasado este tiempo, se centrifugaron los cultivos a 4,900 x g por 5

min. para obtener los sobrenadantes y congelarlos a -70C hasta su uso. Por otro lado, se obtuvo el paquete leucocitario de muestras de sangre de bovinos clínicamente sanos utilizando una solución de citratos y dextrosa (citrato de sodio 27.2 mM, ácido cítrico 2.86 mM, dextrosa 113.7 mM y NaCl 71.8 mM) como anticoagulante y conservador. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1,700 x g por 5 min. para obtener el paquete leucocitario, separándolo de los eritrocitos por lisis hipotónica con agua destilada seguida de la adición de PBS 0.15 M a doble concentración para centrifugar nuevamente a 1,700 x g por 5min. El paquete celular de varios tubos se combinó para repetir el procedimiento de lisis una vez más, después de lo cual se lavaron dos veces con PBS 0.15 M para, finalmente, diluir las células hasta obtener una concentración de 1×10^7 células por ml en RPMI adicionado con 5% de SFB.

Se realizaron 10 diluciones dobles de los sobrenadantes con un volumen inicial de 100 μ l en placas de 96 pozos con fondo plano y un volumen de 360 μ l (Corning, N.Y.) dejando 2 pozos por dilución como testigos. Posteriormente se agregaron 100 μ l de la suspensión leucocitaria y se incubaron a 37C con 5% de CO₂ por 1 h. Terminado el tiempo las placas fueron centrifugadas a 300 x g durante 10 min, el sobrenadante se eliminó invirtiendo las placas y el paquete celular se fijó con 100 μ l de formalina al 10% en PBS 0.15 M por 30 min. En seguida se agregaron 100 μ l de una solución de cristal violeta al 0.5% en cada pozo por 10 min para después decantar invirtiendo las placas y lavar con agua corriente. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron a simple vista, un estrato celular intacto fue registrado como un resultado negativo mientras que la completa ausencia de estrato celular, o la presencia de solo un remanente del mismo, se registró como toxicidad o un resultado positivo.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.

A partir de aves con signos de infección respiratoria, cabeza hinchada y baja en la postura o alteración de la calidad del cascarón, se aislaron 44 cepas bacterianas en agar sangre de brotes de campo provenientes de los estados de Yucatán, Querétaro, Jalisco y Puebla las cuales fueron obtenidas a partir de muestras de tráquea, pulmones y oviducto (Tabla 1). Las colonias aisladas fueron productoras de hemólisis completa y presentaron características coloniales macroscópicas coincidentes con *M. haemolytica*. En las pruebas bacteriológicas, todas las cepas tuvieron reacción negativa al indol, sólo 42 crecieron en McConkey y todas tuvieron una reacción positiva a los nitratos lo que las hace compatibles con *M. haemolytica*. En la fermentación de azúcares, treinta y un aislamientos (68.88%) fueron trealosa positivos, 11 (24.44%) no fermentaron arabinosa o trealosa, 2 (4.44%) fueron fermentadoras de arabinosa y solo una fermentó arabinosa y trealosa (2.22%) (Tabla1).

2. SEROTIPIFICACIÓN.

En la serotipificación, 14 cepas (31.11%) presentaron el serotipo A13; 11 (24.44%) el serotipo T15; 2 (4.44%) el serotipo A12; 2 (4.44%) el serotipo T4 y una (2.22%) el serotipo A16. No obstante 15 de todas estas cepas presentaron algún nivel de reacción cruzada con otros antisueros y 15 (33.33%) resultaron no tipificables. Cada muestra fue analizada al menos 2 veces y se realizó simultáneamente la tipificación de dos cepas de campo de origen bovino que presentaron el serotipo A1 con títulos entre 1:64 y 1:96. No se observó una relación clara entre el serotipo mostrado y la biotipificación, aunque la mayor proporción (61.5%) de las cepas que mostraron el serotipo A13 fueron fermentadoras de trealosa y solo una fermentó arabinosa. En las que presentaron el serotipo T15, el 72.72%, también se observó la fermentación de trealosa, como era esperado, y solo una fermentó arabinosa. El patrón mostrado por las cepas no tipificables fue similar, la mayor proporción de las cuales

(78.57%) presentó fermentación de trealosa y 3 (21.43%) no fermentaron arabinosa o trealosa (tabla 1).

3. RIBOTIPIFICACIÓN.

La obtención de los ribotipos se realizó con el uso del sistema AlkPhos (Amersham) ya que con el sistema BioPrime-PhotoGene (Gibco BRL), la producción de sondas fue menos eficiente. En esta ribotipificación se observaron

Tabla 1. Características fenotípicas y serotipificación de las cepas analizadas

| IDENTIFICACIÓN | ORIGEN | SEROTIPIFICACIÓN | HEMOLISIS | ARABINOSA | TREALOSA | NITRATOS | ESV |
|----------------|-------------|--------------------------|-----------|-----------|----------|----------|-------|
| MA-1 | YUCATAN | A13(8), T15(4) | + | - | - | + | - |
| MA-2 | YUCATAN | A13(4) | + | - | - | + | - |
| MA-3 | QUERETARO | A12(16) | + | - | + | + | - |
| MA-4 | QUERETARO | A13(4) | + | - | + | + | - |
| MA-5 | YUCATAN | A15(4) | + | - | - | + | - |
| MA-6 | YUCATAN | nt | + | - | + | + | - |
| MA-7 | YUCATAN | T15(4) | + | - | + | + | - |
| MA-8 | GUADALAJARA | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-9 | YUCATAN | A13(8), T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-10 | nd | A13(4), T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-11 | YUCATAN | A13(16), T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-12 | YUCATAN | T15(16), A12(8), A13(8) | + | - | + | + | nd |
| MA-13 | GUADALAJARA | A13(8), T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-14 | GUADALAJARA | A13(8), T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-15 | YUCATAN | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-16 | YUCATAN | A13(16), T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-17 | YUCATAN | A13(8) | + | - | + | + | nd |
| MA-18 | YUCATAN | T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-19 | YUCATAN | A13(12) | + | - | + | + | nd |
| MA-20 | nd | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-21 | nd | A13(24), T15(12) | + | + | - | + | nd |
| MA-22 | PUEBLA | T15(4) | + | - | + | nd | nd |
| MA-23 | PUEBLA | T15(4) | + | + | - | + | nd |
| MA-24 | PUEBLA | A13(4) | + | - | - | + | nd |
| MA-25 | nd | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-26 | nd | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-27 | nd | T4(24), T15(6), A16(6) | + | - | - | + | - |
| MA-28 | nd | T4(24), T15(12), A16(12) | + | - | + | + | - |
| MA-29 | QUERETARO | T15(8) | + | - | + | + | nd |
| MA-30 | QUERETARO | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-31 | QUERETARO | nt | + | + | - | + | nd |
| MA-32 | PUEBLA | nt | + | - | - | + | nd |
| MA-33 | QUERETARO | T15(16), A16(8) | + | - | + | + | nd |
| MA-34 | QUERETARO | T15(4) | + | - | + | + | nd |
| MA-35 | QUERETARO | A16(16), A12(8) | + | - | + | + | nd |
| MA-36 | QUERETARO | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-37 | QUERETARO | nt | + | - | - | + | nd |
| MA-38 | QUERETARO | A12(8), A16(4) | + | - | - | + | nd |
| MA-39 | QUERETARO | nt | + | - | + | + | - |
| MA-40 | GUADALAJARA | A13(4) | + | - | - | + | nd |
| MA-41 | GUADALAJARA | T15(8) | + | - | - | + | nd |
| MA-42 | GUADALAJARA | T15(8) | + | - | + | + | nd |
| MA-43 | GUADALAJARA | nt | + | - | + | + | nd |
| MA-44 | GUADALAJARA | nt | + | - | + | nd | nd |
| MA-45 | GUADALAJARA | nt | ± | - | - | + | nd |
| BO-1 | GUADALAJARA | A1(64) | + | - | - | + | +(16) |
| BO-2 | GUADALAJARA | A1(96) | + | - | + | + | +(16) |

nt= no serotipificable. No produjo reacción con algún antisuero o produjo reacción con el mismo título con 2 o más antisueros; nd= no determinado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

entre 4 y 10 bandas por cepa, en 41 ribotipos de las 44 cepas aisladas (figuras 2 al 7), para determinar la reproducibilidad del ensayo se repitió 3 veces la ribotipificación de un grupo de 10 cepas elegidas al azar en las que se mantuvo la presentación de bandas de forma constante (datos no mostrados). En las cepas testigo se presentaron 12 bandas en *M. haemolytica*; 12 en *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 11 en *Pasteurella multocida* y 9 en *Haemophilus paragallinarum*. En *E. coli* se observaron las 7 bandas que corresponden a las copias del operón del *rnbB* que posee esta bacteria⁶⁶.

La similitud genotípica entre las cepas aviarias y la cepa de *M. haemolytica* A1 de referencia, osciló entre el 0 y el 45%. Las cepas aviarias también presentaron variaciones genotípicas entre sí, aún entre cepas provenientes de la misma zona, en las que se determinaron similitudes que oscilaron entre el 0 y el 96%. Entre las cepas aviarias y *A. pleuropneumoniae* se observó una semejanza entre 0 y 36.9 %, al compararlas con *P. multocida*, la similitud osciló entre el 0 y el 22.5% y en la comparación con *H. paragallinarum* la semejanza estuvo entre el 0 y el 24.3% indicando que no existe parentesco entre estas cepas y las utilizadas como testigo. Sorprendentemente, al compararlas con *E. coli* la similitud estuvo entre el 0 y el 66.2% (con 4 cepas con un porcentaje \geq al 50%). Estas comparaciones fueron determinadas con la obtención de una matriz de similitud calculada a través del coeficiente *Dice* (Tabla 2) y que se hallan enlistadas en la Tabla 3 con fines comparativos.

Por otro lado y para hacer una comparación entre la relación filogenética existente entre las cepas, su procedencia y el serotipo que presentaron, se obtuvo un dendograma, de relación simple, en el que se observa la formación de seis grupos o clusters (Rt1 al Rt6) tomando como criterio una semejanza \geq 70%, que se considera una similitud mínima para cepas de la misma especie y la formación de 2 grupos con base en una semejanza \geq 50%, mínima considerada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

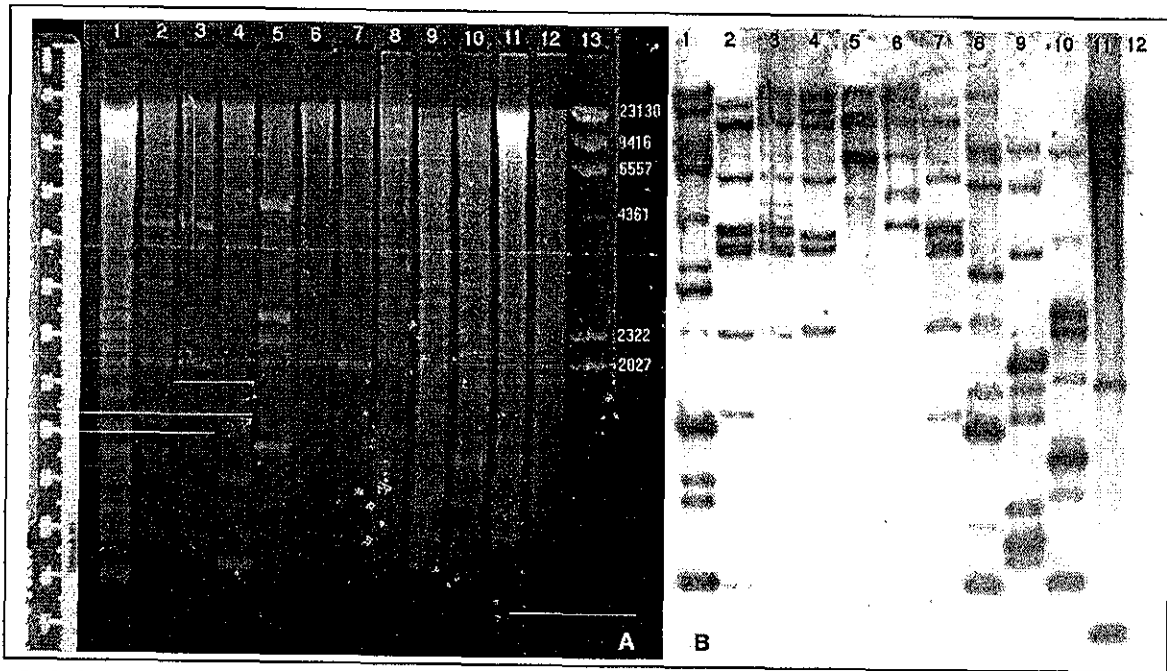


Fig. 2. A: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN digerido de 6 cepas aviarias (carriles 1 al 6), de las cepas tipo (7=*M. haemolytica*, 8= *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 9= *Pasteurella multocida*, 10= *Haemophilus paragallinarum*, 11= *E. Coli* y 12= ADN de humano como negativo) así como el marcador de Peso Molecular (carril 13) λ Hind III. B: Membrana de nylon con los ribotipos de las cepas del panel A después de realizar una transferencia tipo Southern blot.

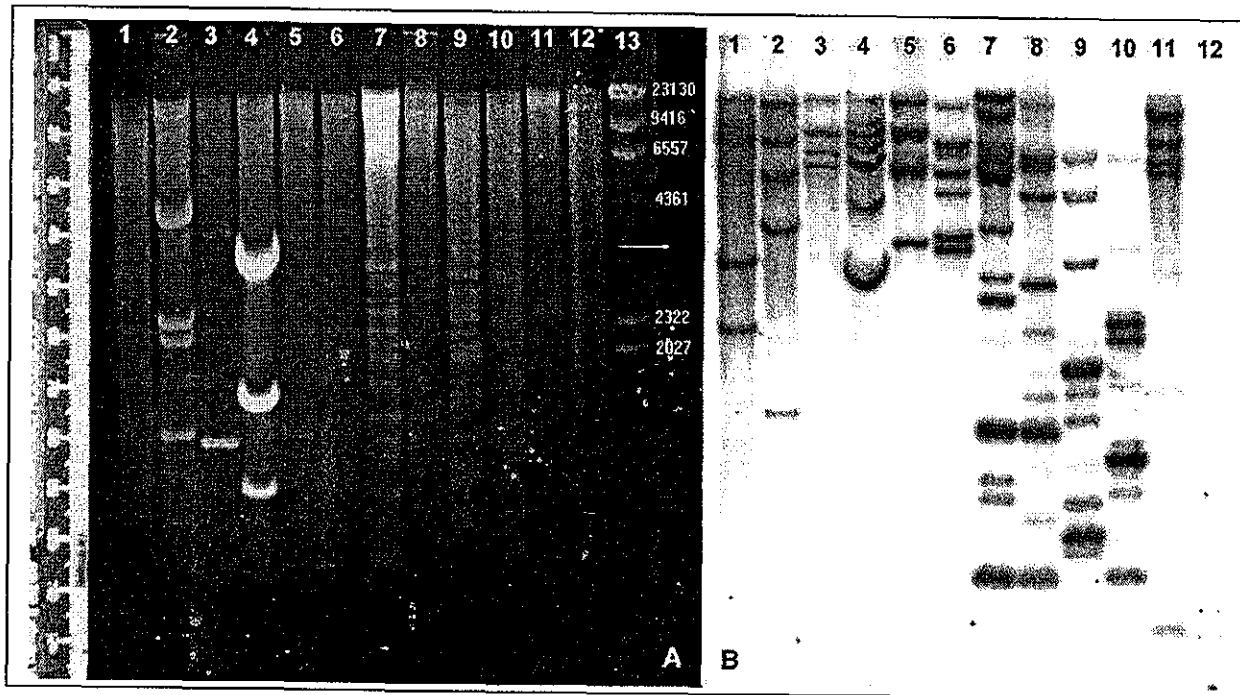


Fig. 3. A: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN digerido de 6 cepas aviarias (carriles 1 al 6), de las cepas tipo (7=*M. haemolytica*, 8= *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 9= *Pasteurella multocida*, 10= *Haemophilus paragallinarum*, 11= *E. Coli* y 12= ADN de humano como negativo) así como el marcador de Peso Molecular (carril 13) λ Hind III. B: Membrana de nylon con los ribotipos de las cepas del panel A después de realizar una transferencia tipo Southern blot.

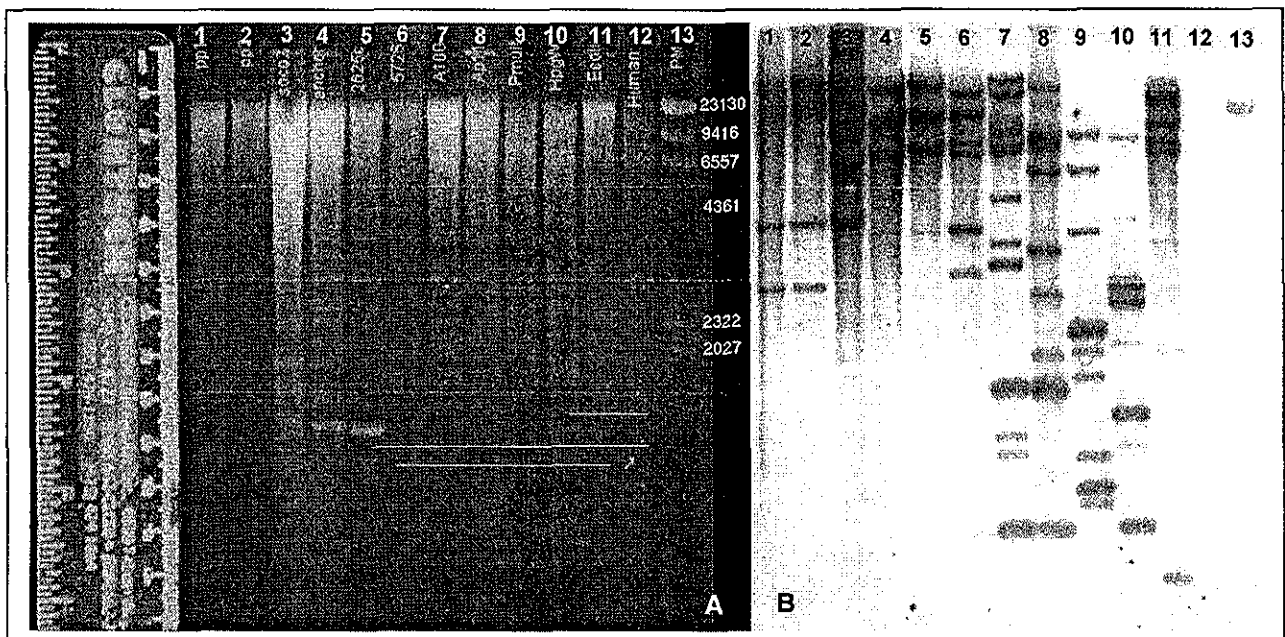


Fig. 4. A: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN digerido de 6 cepas aviares (carriles 1 al 6), de las cepas tipo (7=*M. haemolytica*, 8= *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 9= *Pasteurella multocida*, 10= *Haemophilus paragallinarum*, 11= *E. Coli* y 12= ADN de humano como negativo) así como el marcador de Peso Molecular (carril 13) λ Hind III. B: Membrana de nylon con los ribotipos de las cepas del panel A después de realizar una transferencia tipo Southern blot.

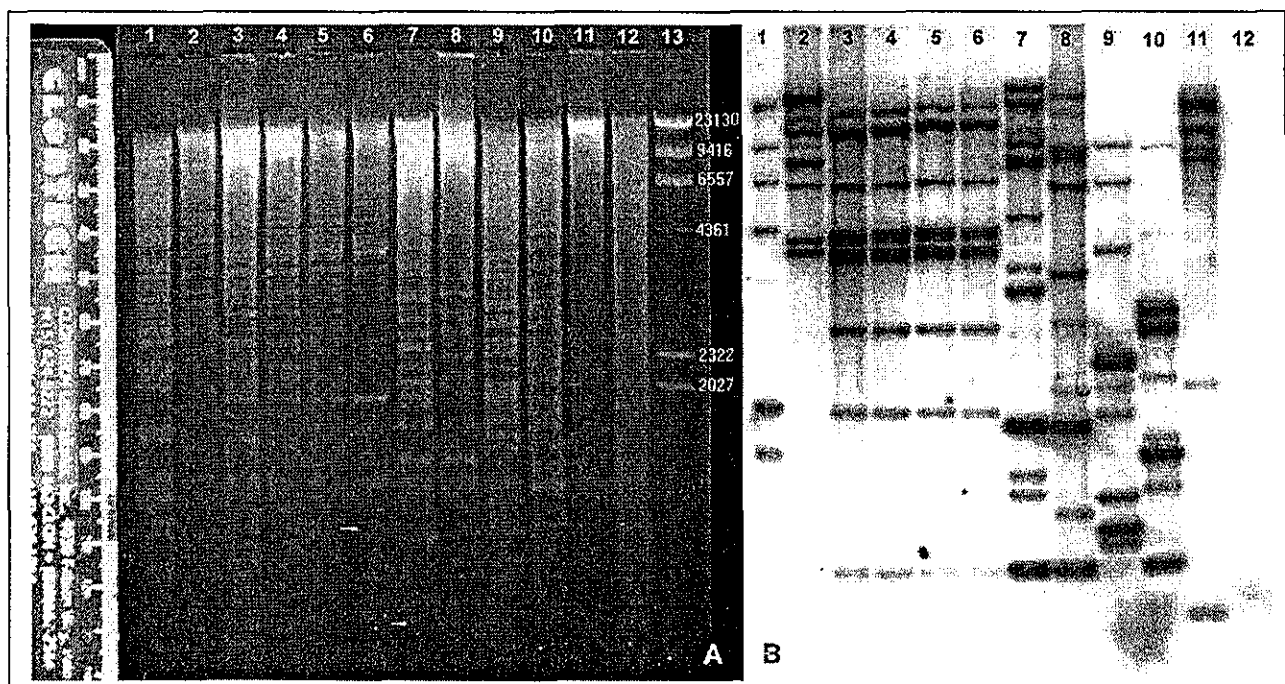


Fig. 5. A: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN digerido de 6 cepas aviares (carriles 1 al 6), de las cepas tipo (7=*M. haemolytica*, 8= *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 9= *Pasteurella multocida*, 10= *Haemophilus paragallinarum*, 11= *E. Coli* y 12= ADN de humano como negativo) así como el marcador de Peso Molecular (carril 13) λ Hind III. B: Membrana de nylon con los ribotipos de las cepas del panel A después de realizar una transferencia tipo Southern blot.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

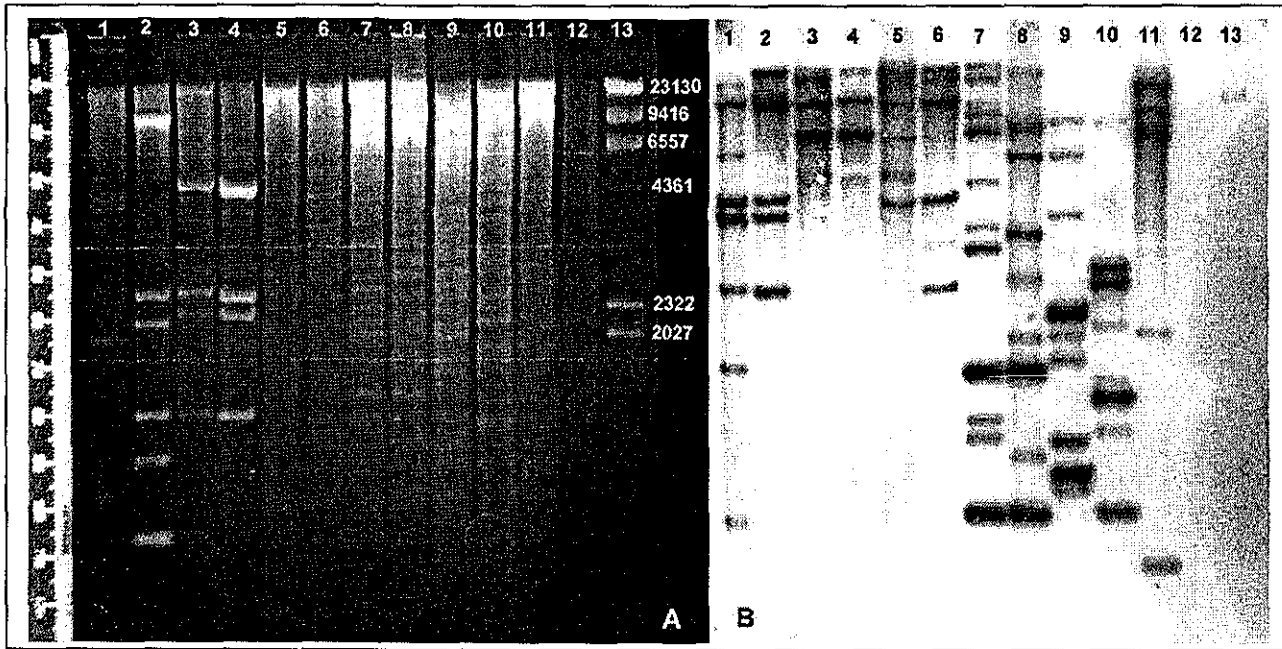


Fig. 6. A: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN digerido de 6 cepas aviares (carriles 1 al 6), de las cepas tipo (7=*M. haemolytica*, 8= *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 9= *Pasteurella multocida*, 10= *Haemophilus paragallinarum*, 11= *E. Coli* y 12= ADN de humano como negativo) así como el marcador de Peso Molecular (carril 13) λ Hind III. B: Membrana de nylon con los ribotipos de las cepas del panel A después de realizar una transferencia tipo *Southern blot*.

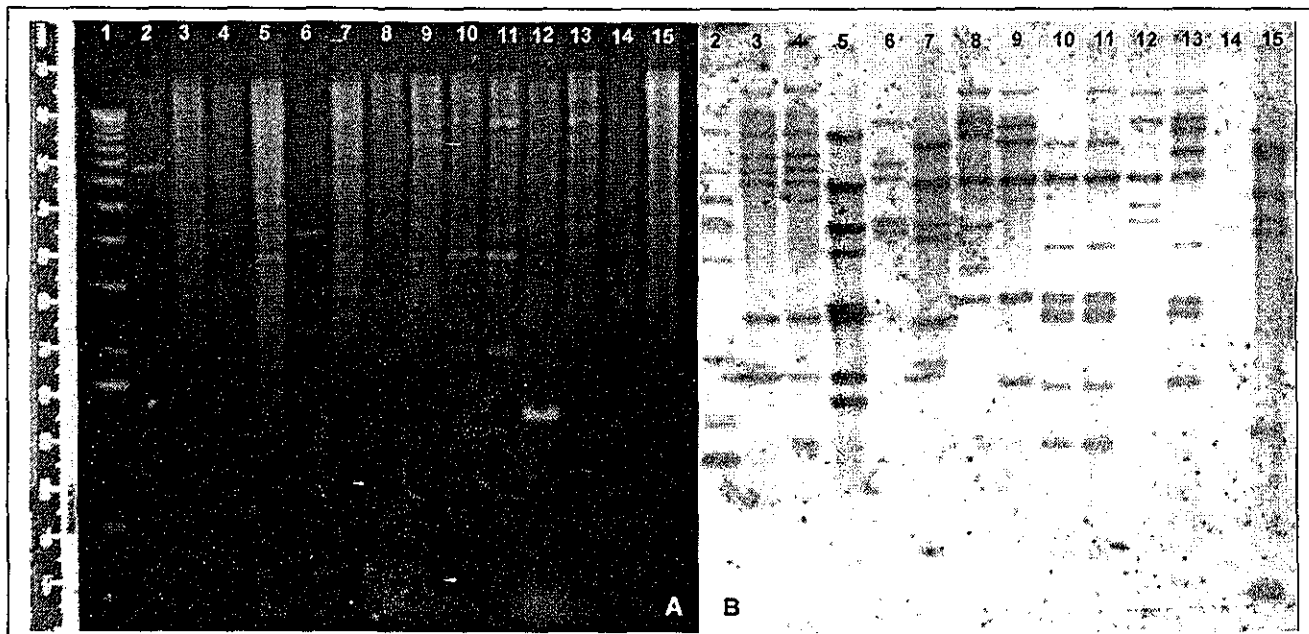


Fig. 7. A: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN digerido de 6 cepas aviares (carriles 1 al 6), de las cepas tipo (7=*M. haemolytica*, 8= *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 9= *Pasteurella multocida*, 10= *Haemophilus paragallinarum*, 11= *E. Coli* y 12= ADN de humano como negativo) así como el marcador de Peso Molecular (carril 13) λ Hind III. B: Membrana de nylon con los ribotipos de las cepas del panel A después de realizar una transferencia tipo *Southern blot*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

para cepas del mismo género (Fig. 8) con base en estudios de hibridación ADN-ADN y ribotipificación.

Con esta comparación, se puede observar que los ribotipos Rt-1y Rt-3 están constituidos por cepas del mismo origen (Guadalajara y Yucatán respectivamente) y probablemente el Rt-4 también tenga esta misma condición, sin embargo 2 cepas tienen un origen no determinado. El Rt-5 contiene cepas del mismo serotipo (A13) aunque sus procedencias son distintas, sin embargo, junto con el ribotipo Rt-3 constituyen un grupo donde predomina el serotipo A13 aunque no poseen una conexión filogenética. Por otro lado, el ribotipo Rt-6 contiene cepas en donde predomina el serotipo T15 aunque tienen diferente procedencia geográfica.

La relación filogenética entre las cepas aviares y las cepas testigo es muy distante como se observa en la Fig. 8, siendo con *M. haemolytica* con quien guardan el mayor parentesco (45%), con *A. pleuropneumoniae* la relación alcanzó un 36.9%, con *P. multocida* un 22.5% y con *H. paragallinarum* un 24.3% lo que no las relaciona siquiera a nivel de género.

En el ensayo simple visual realizado para la determinación de la producción de leucotoxinas, con 10 de las cepas aviares de este estudio y 2 cepas de *M. haemolytica* origen bovino aisladas de campo e identificadas como A1, se observó un resultado positivo con las cepas de *M. haemolytica* A1 de origen bovino hasta la dilución 1:16, sin observarse reacción positiva alguna con las cepas de origen aviar analizadas..

Por último, en aproximadamente 30 de las cepas analizadas se observó la presencia de uno o más plásmidos, con un Peso Molecular aproximado de entre 600 y 9 500 pb, durante la extracción del ADN genómico de las mismas, en las que se empleó el método del CTAB (Fig. 9).

Tabla 3. Porcentajes de similitud* entre cepas de *M. haemolytica*-like analizadas en este trabajo y las diferentes cepas testigo.

| | Ap | Ec | Hp | Pm | |
|------|------|------|------|------|------|
| Ma23 | 0 | Ma9 | 0 | Ma11 | 0 |
| Ma14 | 4.3 | Ma1 | 0 | Ma11 | 0 |
| Ma45 | 7.6 | Ma23 | 0 | Ma13 | 0 |
| Ma24 | 7.9 | Ma42 | 9.9 | Ma4 | 0 |
| Ma7 | 8.2 | Ma21 | 10.1 | Ma34 | 0 |
| Ma39 | 9 | Ma32 | 10.5 | Ma31 | 0 |
| Ma29 | 9.1 | Ma43 | 10.5 | Ma30 | 0 |
| Ma21 | 9.1 | Ma14 | 11.9 | Ma36 | 0 |
| Ma30 | 10.1 | Ma12 | 13.1 | Ma33 | 0 |
| Ma1 | 10.2 | Ma18 | 14.5 | Ma35 | 0 |
| Ma5 | 10.3 | Ma7 | 15.5 | Ma40 | 0 |
| Ma3 | 11.9 | Ma31 | 16.7 | Ma18 | 0 |
| Ma31 | 13.5 | Ma40 | 17.4 | Ma32 | 0 |
| Ma40 | 14 | Ma5 | 17.6 | Ma26 | 2.1 |
| Ma42 | 14 | Ma22 | 17.7 | Ma25 | 2.2 |
| Ma27 | 14.2 | Ma39 | 18 | Ma10 | 2.6 |
| Ma36 | 14.5 | Ma2 | 18.6 | Ma20 | 2.6 |
| Ma43 | 14.6 | Ma20 | 19.6 | Ma24 | 2.6 |
| Ma22 | 15.3 | Ma36 | 19.9 | Ma14 | 2.7 |
| Ma6 | 16.1 | Ma30 | 20.3 | Ma21 | 2.7 |
| Ma18 | 16.7 | Ma35 | 23.4 | Ma7 | 2.8 |
| Ma26 | 16.8 | Ma33 | 24 | Ma23 | 2.9 |
| Ma33 | 16.9 | Ma45 | 25.2 | Ma5 | 3.1 |
| Ma25 | 17.3 | Ma17 | 25.5 | Ma8 | 4.6 |
| Ma11 | 17.9 | Ma16 | 27 | Ma3 | 5.4 |
| Ma28 | 17.9 | Ma15 | 28.9 | Ma28 | 5.7 |
| Ma20 | 18 | Ma19 | 30.3 | Ma43 | 7.1 |
| Ma13 | 18.3 | Ma6 | 30.5 | Ma42 | 7.2 |
| Ma34 | 18.9 | Ma27 | 31.2 | Ma22 | 7.3 |
| Ma35 | 19 | Ma3 | 31.3 | Ma27 | 11.4 |
| Ma2 | 22.6 | Ma26 | 33.7 | Ma39 | 12 |
| Ma17 | 23.6 | Ma25 | 36.4 | Ma17 | 13.1 |
| Ma12 | 24.3 | Ma8 | 36.6 | Ma19 | 13.2 |
| Ma15 | 24.3 | Ma29 | 36.8 | Ma6 | 13.8 |
| Ma16 | 24.4 | Ma34 | 38.9 | Ma1 | 14 |
| Ma8 | 24.5 | Ma28 | 39 | Ma45 | 15.6 |
| Ma32 | 27.2 | Ma24 | 40.2 | Ma16 | 15.8 |
| Ma19 | 28.6 | Ma10 | 53.5 | Ma12 | 16.3 |
| Ma4 | 29 | Ma4 | 64.3 | Ma2 | 17.7 |
| Ma10 | 31.3 | Ma13 | 65.2 | Ma15 | 19.9 |
| Ma9 | 36.9 | Ma11 | 66.2 | Ma9 | 24.3 |
| PhA1 | 42.7 | PhA1 | 32.3 | PhA1 | 22.1 |
| Ec | 31 | Ap | 31 | Ap | 20.8 |
| Hp | 20.8 | Hp | 6.2 | Ec | 6.2 |
| Pm | 13 | Pm | 6.8 | Pm | 12 |
| | | | | PhA1 | 6.5 |
| | | | | Ap | 13 |
| | | | | Ec | 6.8 |
| | | | | Hp | 12 |

* El cálculo se realizó a través de la determinación del coeficiente "Dice" con el programa Diversity Database (BioRad). Las cepas fueron enlistadas en orden ascendente de acuerdo al porcentaje de similitud con la cepa testigo respectiva. Las cepas testigo se enlistaron en forma descendente. Ap: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Ec: *E. coli*, Hp: *Haemophilus paragallinarum*, Pm: *Pasteurella multocida*.



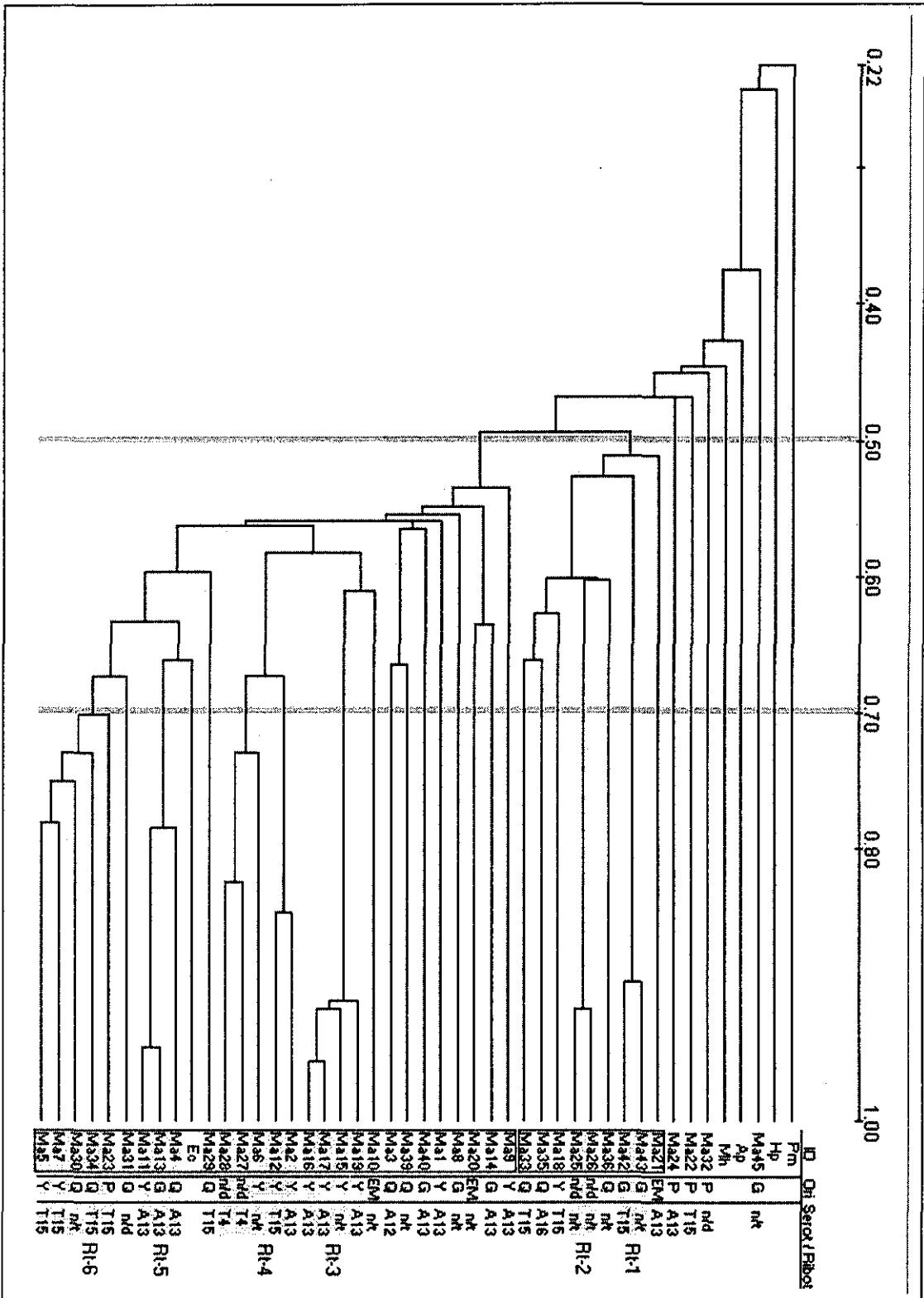


Fig 8 Dendrograma en el que se observa la concordancia entre la relación filogenética, el serotipo y la procedencia de las cepas aviares, así como su relación con las cepas testigo. Mh *M. haemolytica*, Ap, *A. pleuropneumoniae*, Pm *P. multocida*, Hp *H. paragallinarum* y Ec *E. coli*. Rt: Ribotipo, n/t no tipificable, nd no determinado. G Guadaluajara, P Puebla, EM Estado de México, Y Yucatán y Q Querétaro.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

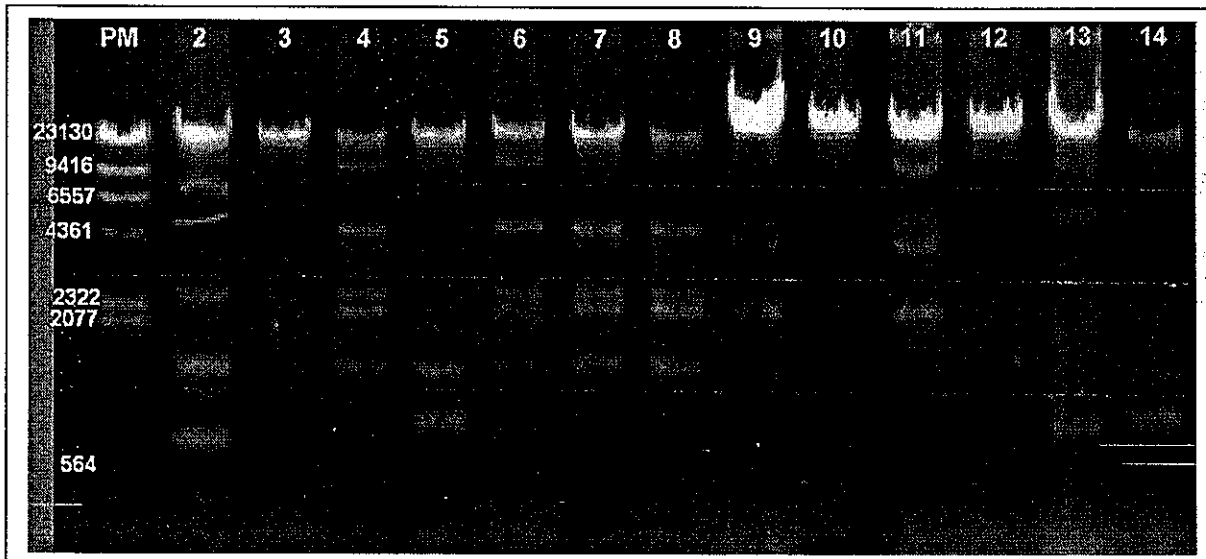


Fig. 9. Gel de agarosa al 0.8% en donde se muestra el ADN genómico de varias cepas (carilles 2-14) con la presencia de plásmidos de diferente Peso Molecular. PM= λ HindIII.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En los últimos años han surgido nuevos elementos en la taxonomía de la familia *Pasteurellaceae* y, por lo tanto, en la identificación de los aislamientos de bacterias pertenecientes a la misma^{7,8,9}. La identificación de especies o grupos taxonómicos relacionados con esta familia aún representa un serio problema, sobretodo desde el punto de vista clínico⁶⁸.

La mejor comprensión de la epidemiología y virulencia de esos organismos depende de criterios correctos en su identificación, por lo cual, es necesario profundizar en la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de campo que presentan alguna relación con esta familia. En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de diversos aislados obtenidos de aves provenientes de varias regiones del país, en donde se han presentado de forma sistemática brotes infecciosos con características clínicas y aislamientos bacterianos que tienen semejanza entre sí^{49,50}. El examen bacteriológico mostró que la mayoría de las cepas obtenidas poseen características morfológicas y bioquímicas coincidentes con la especie *M. haemolytica*, una situación que también ha sido reportada en otros países^{7,47,48}. Estos hallazgos respaldan la tesis de que, la marcada variación fenotípica y genotípica encontrada entre miembros de esta especie bacteriana, aislados de diferentes especies animales, ha dificultado su identificación y clasificación, así como obtención de inmunógenos apropiados para la protección de los animales susceptibles.

Una de las primeras consecuencias que han tenido estas observaciones fue la reciente reclasificación de *P. haemolytica* en el género *Mannheimia* spp, propuesto a finales de 1999, después de practicar extensos estudios de caracterización fenotípica y genotípica en una gran cantidad aislamientos⁹.

Aunque las cepas analizadas en este trabajo presentan características fenotípicas que sugieren una relación estrecha con *M. haemolytica*, mostraron

una reacción hemolítica más intensa cuando fueron crecidas en agar con sangre de bovino, que es indicativo de la producción de algunas citotoxinas⁶⁷, y que ha sido reportado anteriormente con cepas aisladas de aves⁴⁵⁻⁴⁷. Además, aún cuando los organismos investigados coinciden significativamente en el examen bacteriológico con *M. haemolytica*, la fermentación de azúcares fue otra característica que se presentó de forma inusual en estas cepas, sobre todo en la fermentación de los azúcares arabinosa y trealosa que se utiliza como un criterio substancial en la biotipificación^{23,26,69}. Estas cepas exhibieron diferencias entre sí en la fermentación de estos azúcares, ya que se identificaron cepas fermentadoras únicamente de arabinosa (2, 4.44%), fermentadoras de arabinosa y trealosa (1, 2.22%), no fermentadoras de alguno de estos azúcares (11, 24.44%) y fermentadoras únicamente de trealosa (31, 68.88%).

Esta situación ya ha sido encontrada con anterioridad, en un estudio extenso con cepas de *M. haemolytica* obtenidas de varias especies animales, Mutters y col. encontraron que el patrón de fermentación de azúcares, así como la homología del ADN con cepas tipo, cambia frecuentemente entre cepas obtenidas de varias especies, por lo que proponen un reacomodo en la familia *Pasteurellaceae*⁸. Angen y col.⁹ plantean la creación del género *Mannheimia* spp considerando únicamente las cepas incapaces de fermentar de trealosa, que forman el grupo más variado, pues las que fermentan este azúcar ya se clasifican en la especie *P. trehalos*²⁰. A pesar de esto, las cepas trealosa negativo analizadas en ese estudio, mostraron variaciones en la fermentación de otros azúcares generando varios posibles subgrupos taxonómicos.

Con el objetivo de determinar la distribución en nuestro país de los aislamientos objeto de este trabajo, se realizó la serotipificación de los mismos con base en la técnica descrita por Biberstein¹⁷ para la tipificación de cepas de rumiantes, encontrando que no existe una relación entre los serotipos establecidos para *M. haemolytica* y estas cepas. Este método mostró poca eficacia en la tipificación de los aislamientos de aves, debido a que algunas cepas no produjeron reacción con los diferentes antisueros o llegaron a

presentar reacción cruzada con dos o más. Esta situación ya ha sido reportada¹⁵ aún cuando los antisueros empleados en la técnica aparentemente no generan reacciones cruzadas cuando se tipifican cepas aisladas de rumiantes¹⁷. A pesar ello, se encontró que un porcentaje importante de los organismos analizados en este trabajo coincidieron con el serotipo A13 (31.11%) y con el T15 (24.4%), el 11.1% coincidió con varios otros serotipos, pero la mayoría (33.33%) no pudieron ser tipificados. Esta situación también fue reportada por Angen y col. al realizar la serotipificación de cepas aviares, concluyendo que este no es un método adecuado para su tipificación y que son necesarios métodos adicionales para su caracterización¹⁵.

La ribotipificación es una técnica de tipificación molecular basada en el método de *Southern Blotting*^{63,64} en la cual se emplea como sonda, al operón ribosomal (*rnmB*) de *E. coli* que es considerado una sonda universal¹³. La utilización de la ribotipificación en la identificación y tipificación genética de organismos miembros de la familia *Pasteurellaceae*, así como de otros géneros y especies bacterianas, ha sido utilizada en varias ocasiones donde ha mostrando ser un método práctico, con un alto poder de discriminación y un bajo costo⁷⁰⁻⁷². De hecho, la reclasificación taxonómica de *M. haemolytica* fue realizada con el uso de técnicas de biotipificación, EEML, ribotipificación y secuenciación del gene 16S RNAr demostrando su utilidad en este proceso⁹.

Debido a la inconsistencia genética que se observa entre los integrantes del género *Pasteurella*, la tipificación de cepas de *M. haemolytica* se ha practicado en diversas ocasiones en busca de una reorganización coherente de este género, en el que inicialmente eran clasificadas. Esta variabilidad genética también fue detectada con la ribotipificación de las cepas aviares en este trabajo. La variación observada entre estas cepas, cuyos porcentajes de similitud se encontraron entre el 0 y el 96%, demuestra que podría tratarse de organismos pertenecientes a varias especies o, inclusive, a más de un género, lo que ya ha sido propuesto con anterioridad⁷.

En 1985, Mutters y col. realizaron una caracterización de las especies integrantes del género *Pasteurella*, excluyendo a *M. haemolytica* biotipos A y T, así como otras especies de este género⁸, determinando la existencia de varios grupos taxonómicos de clasificación incierta, que sirvieron como base de la creación del género *Mannheimia*, ya reconocido en la actualidad.

No obstante, en este proceso se han identificado en varias ocasiones, una gran cantidad de cepas de difícil clasificación, que fenotípicamente son clasificadas como *M. haemolytica*, a pesar de provenir de diferentes especies, y que en muchos casos son de origen aviar^{6,73}. En 1985, Piechulla y col. realizaron un estudio extenso con cepas de *Pasteurella* / *Actinobacillus*-like aisladas de aves, y determinaron que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* con base en la identificación de características fenotípicas, porcentajes de G+C y homología ADN-ADN, sugiriendo un acomodo de ellas en la especie *Actinobacillus salpingitidis*, que ya había sido propuesta con anterioridad⁷. En nuestra investigación, los porcentajes de similitud identificados entre las cepas aviares y *A. pleuropneumoniae* alcanzaron un máximo de 36.9%, sugiriendo que no presentan una relación filogenética a nivel de género, con base en criterios previamente establecidos (porcentajes de similitud >50%) para determinar este parentesco.

Previamente ya han sido encontradas relaciones filogenéticas lejanas entre cepas de *P. haemolytica* / *Actinobacillus*-Like y los géneros *Actinobacillus*, *Haemophilus* y [*Pasteurella*] motivando su exclusión de los mismos, pero confirmando su pertenencia a la familia *Pasteurellaceae*, quizás de forma más cercana al género *Actinobacillus*, lo cual difiere a lo encontrado en esta investigación en donde la relación de las cepas aviares analizadas fue mayor con *M. haemolytica* (45%). Además, también se ha encontrado que la relación entre dichas cepas y la familia *Enterobacteriaceae* es relativamente cercana¹². El hallazgo de cepas con ribotipos que alcanzan un porcentaje $\geq 50\%$ de similitud con *E. coli*, indica una cercanía filogenética, probablemente a nivel de género, que ha sido reportada anteriormente¹² con la obtención de ribotipos de cepas de

[*Pasteurella*] *haemolytica*/Actinobacillus-Like, entre otras, en donde se observó una relación cercana con esta familia y de forma particular con *E. coli*. Esto coincide con el análisis de los ribotipos obtenidos en 4 cepas aviares en este trabajo.

Por otro lado, pese a que la información referente al aislamiento y tipificación de cepas aviares de *M. haemolytica*-like es escasa, sabemos que los brotes infecciosos en los que estas se ven involucradas, no adquieren las dimensiones como las ocasionadas por otros patógenos aviares, por ejemplo el cólera aviar o la coriza infecciosa aviar⁴⁶⁻⁵⁰. Asimismo, es posible inferir, con base en la información existente, así como por los resultados de este trabajo, que las cepas aisladas de aves de *M. haemolytica*-like se pueden encontrar tanto en animales sanos como enfermos^{6,7} y que debido a esto, probablemente se comporten como patógenos oportunistas.

Quizá, el aislamiento único de algunas de las cepas analizadas en este trabajo, se haya debido a la falta de aplicación de métodos de diagnóstico para otras enfermedades, virales o por intoxicación, que se hubiesen comportado como el factor concomitante que permite una proliferación posterior de las bacterias en estudio. Se puede afirmar también, que debido a que los porcentajes de similitud de estas cepas con *M. haemolytica*, *A. pleuropneumoniae*, *H. paragallinarum* y *P. multocida*, son mayores a 40%, pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* y probablemente formen uno o varios géneros diferentes a los existentes en la misma como ya ha sido propuesto con anterioridad^{12,51}.

Esto último se puede presumir por la determinación de la existencia de 2 *clusters* o grupos filogenéticos (con 9 y 28 cepas, respectivamente) con grupos bacterianos de una similitud menor al 50% entre sí, que podrían representar dos géneros distintos. Además, la identificación de 6 grupos filogenéticos, Rt-1 a Rt-6, de los cuales dos pertenecen al primero de los grupos anteriores y los cuatro restantes al segundo, indica la existencia de varias especies o subgrupos

bacterianos que, sin embargo, requieren de un estudio más extenso que comprenda cepas aisladas en diversas partes del mundo e incluya otros métodos de tipificación para una caracterización más precisa.

El ESV es una técnica empleada para la detección cualitativa de la leucotoxina, que ha probado ser útil en los ensayos practicados con cepas de rumiantes. Sin embargo, es probable que esa eficiencia esté relacionada directamente con las condiciones de cultivo e inducción a la producción de citotoxinas aplicadas con dichas cepas. Dado que la temperatura corporal del ave es mayor que en los mamíferos, quizás represente una condición crítica para detección de esta clase de toxinas. Además, el uso de células provenientes de ave podría resultar más conveniente por la especificidad relativa que muestran. Por lo tanto, el hecho de haber obtenido resultados negativos en el ESV practicado con 10 cepas aviares, podría indicar que las cepas no son productoras de leucotoxinas, requieren condiciones diferentes de crecimiento para la producción de la misma o los leucocitos empleados no son susceptibles a la acción de esas toxinas a pesar de haber producido reacciones hemolíticas al crecer en agar sangre de bovino al 5%, lo cual podría indicar la producción de citotoxinas^{35,67}.

Adicionalmente, es significativo el hallazgo donde aproximadamente el 75% de las cepas analizadas (datos no mostrados) presentó plásmidos de alto y bajo Peso Molecular, observados al realizarse las extracciones de ADN cromosomal, ya que, en la práctica clínica de campo, se tienen informes de resistencia bacteriana a diversos antibióticos en los brotes infecciosos asociados con las cepas analizadas en este trabajo, con quienes, es probable, existe una relación directa³⁰. Además, la cantidad de cepas que presentan esta característica, podría ser mayor al emplear protocolos de extracción de ADN específicos para plásmidos.

El uso de la ribotipificación y la tipificación fenotípica, como únicas herramientas de caracterización, no permitieron una clasificación taxonómica

apropiada de las bacterias en estudio. Esto hace necesario el uso de otras técnicas moleculares como la EEML y la secuenciación de genes ribosomales, que permitan obtener más elementos para este fin⁶⁸. Además, la similitud clínica de las infecciones producidas por estas cepas en las aves y las producidas por *M. haemolytica* en los rumiantes, podría sugerir la existencia de mecanismos de patogenicidad semejantes, lo cual sería necesario caracterizar, así como identificar las moléculas estructurales de superficie que permitan un diseño adecuado de inmunógenos, que sean eficaces en la prevención de los brotes infecciosos que ocasionan estas cepas, pues podrían tener repercusiones importantes en la avicultura nacional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

Después del análisis de los resultados obtenidos, se concluye que:

- a) El método tradicional de caracterización bioquímica y serotipificación de *M. haemolytica* aplicado a las cepas aisladas de rumiantes, no permitió identificar adecuadamente a organismos semejantes provenientes de aves, ya que los criterios utilizados en las primeras no son aplicables a las segundas, por la alta frecuencia de reacciones inespecíficas observadas.
- b) Las cepas estudiadas no corresponden a las especies *M. haemolytica*, *P. multocida* o *H. paragallinarum* y poseen una relación lejana con especies del género *Actinobacillus* dado el bajo porcentaje de similitud que presentaron, además de que es posible identificar genotipos muy diversos en las cepas aviares.
- c) El ensayo simple visual realizado a una temperatura de 37C para la inducción de la producción de citotoxinas y el uso de leucocitos de bovino para detección de las mismas, no permitió identificar la presencia de leucotoxinas en las cepas analizadas.
- d) La presencia de plásmidos en un alto porcentaje de las cepas analizadas podría estar relacionado con los reportes existentes de resistencia a antibióticos observado con estas cepas en el campo.

PERSPECTIVAS

1. Se sugiere la ribotipificación de un mayor número de estas cepas provenientes de diferentes zonas geográficas pues, a pesar de coincidir en su morfología colonial y fermentación de azúcares con *M. haemolytica*, podrían constituir una o varias especies o subespecies, distintas del género *Mannheimia* o un nuevo género de la familia *Pasteurellaceae*, como ya se ha sugerido anteriormente, con aislamientos provenientes de aves .
2. Es recomendable la realización de un ESV bajo diferentes condiciones como son el empleo de la temperatura corporal de los pollos para la inducción de leucotoxinas y el uso de leucocitos de ave para determinar su presencia.
3. Es importante, determinar la relación que pudiera existir entre la presencia de los perfiles de plásmidos en estas cepas y su resistencia a antibióticos.

LITERATURA CITADA

1. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2002. Producción pecuaria 1990-2000. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA. Disponible en URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/sagar3.htm>.
2. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2002. Pronóstico de producción pecuaria 2001. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA. Disponible en URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/sagar3.htm>.
3. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2002. XII Censo General de Población y Vivienda 2000. Principales resultados del XII Censo General de Población y Vivienda 2000. INEGI. Disponible en URL: <http://www.inegi.gob.mx>
4. Zandler DV, Bermudez AJ and Mallinson ET. 1997. Principles of diseases prevention: diagnosis and control. *In*: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Mc Dougald LR and Saif YM (Eds.) Diseases of poultry (pp. 3-45) Tenth edition. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
5. Kleven SH and Glisson JR. 1997. Multicausal respiratory diseases. *In*: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Mc Dougald LR and Saif YM (Eds.) Diseases of poultry (pp. 1008-1012) Tenth edition. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
6. Christensen JP and Bisgaard M. 1997. Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. *Avian Pathol.* 26: 461-483.
7. Piechulla K, Bisgaard M, Gerlach H and Mannheim W. 1985: Taxonomy of some recently described avian *PASTEURELLA* / *ACTINOBACILLUS*- like organisms as indicated by deoxyribonucleic acid relatedness. *Avian Pathol.* 14: 281-311.
8. Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W and Mannheim W. 1985. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 309-322.

9. Angen O, Muters R, Caugant DA, Olsen JE and Bisgaard M. 1999: Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov. *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:67-86.
10. Bragg RR, Greyling JM and Verschoor JA. 1997. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol.* 26:595-606.
11. Carter GR. 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv. Vet. Sci.* 11: 321-379.
12. De Ley J, Mannheim W, Muters R, Piechulla K, Tytgat R, Segers P, Bisgaard M, Frederiksen W, Hinz KH and Vanhoucke M 1990. Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 126-137.
13. Liu S, Schryvers AB, Sanderson KE and Johnston RN. 1999. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J. Bacteriol.* 181:6747-6755.
14. Kolbert CP, and Persing DH. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 2:299-305.
15. Angen O, Quirie M, Donachie W and Bisgaard M. 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet. Microbiol.* 65: 283-290.
16. Lo RYC, McKerral LJ, Hills TL and Kostrzynska M. 2001. Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect Immun.* 69:4458-4464.
17. Biberstein EL 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Berges, T. and Norris, J.R. *Methods in Microbiology*, 10: 253-269.
18. Burrows LL, Olah-Winfield E y Lo RYC. 1993: Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.* 61:5001-5007.
19. Highlander SK. 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front. Biosci.* 6:1128-1150.

20. Sneath PH and Stevens M. 1990. *Actinobacillus rosii* sp nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella betti* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trahalosi* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:148-153.
21. Green AL, DuTeau NM, Miller MW, Triantis JM and Salman MD. 1999. Polymerase chain reaction techniques for differentiating cytotoxic and noncytotoxic *Pasteurella trahalosi* from Rocky Mountain bighorn sheep. A.J.V.R. 60:583-588.
22. Davies RL, Arkinsaw S and Selander RK. 1997. Genetic relationships among *Pasteurella trahalosi* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis. Microbiol. 143:2841-2849.
23. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK and Carter, GR. 1994. Clinical veterinary microbiology. Wolfe Publishing. pp.254-258. USA.
24. Carter GR 1990. *Pasteurella* and *Francisella*, p. 129-142. In GR Carter and JR Cole, Jr. (ed). Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology, 5th ed Academic Press, San Diego, Calif. USA.
25. Ackermann RM and Brogden KA. 2000. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Microb. Infect. 2:1079-1088.
26. Lo RYC. 2001. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. Vet. Microbiol. 83:23-35.
27. Pace NR. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science. 276:734-740.
28. Kodjo A, Villard L, Bizet C, Martell JL, Sanchis R, Borges E, Gauthier D, Maurin, F. and Richard, Y. 1999. Pulse-field gel electrophoresis is more efficient than ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. J. Clin. Microbiol. 37(2): 380-385.
29. Christensen H, Angen O, Mutters R, Olsen JE and Bisgaard M. 2000: DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1095-1102.
30. Murphy GL, Robinson LC and Burrows GE 1993. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemoytica* A1 isolates from cattle within a feedlot. J. Clin. Microbiol. 31:2303-2308.

31. Li J and Clinkenbeard K. 1999. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 67:2920-2927.
32. Jaramillo LF, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G and Zenteno E. 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiol.* 10:31-37.
33. Fedorova ND and Highlander SK. 1997: Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect. Immun.* 65(7): 2593-2598.
34. Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE and Rinehart C. 2000. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect. Immun.* 68(7): 3916-3922.
35. Chidambaram M, Sharma B, Petras SF, Reese CP, Froshauer M and Weinstok GM. 1995. Isolation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.* 63:1027-1032.
36. Westrop G, Hormozi K, Da Costa N, Parton R and Coote J. 1997. Structure-function studies of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* and the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* by heterologous C protein activation and construction of hybrid proteins. *J. Bacteriol.* 179:871-879
37. Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Sieck GC and Maheswaran SK. 1998. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect. Immun.* 66:2836-2844.
38. Wang Z, Clarke C and Clinkenbeard K. 1998. *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin-Induced Increase in Phospholipase A2 Activity in Bovine Neutrophils. *Infect. Immun.* 66:1885-1890.
39. Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM and Stewart GC. 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84: 337-356.
40. Li J, Clinkenbeard KD and Ritchey JW. 1999. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet. Microbiol.* 67:91-97.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

41. Wang JF, Kieba IR, Korostoff J, Guo TL, Yamaguchi N, Rozmiarek H, Billings PC, Shenker BJ and Lally ET. 1998. Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb. Pathog.* 25: 317–331.
42. Harbourne JF. 1962. A haemolytic cocco-bacillus recovered from poultry. *Avian Dis.* 74: 566-567.
43. Harry EG. 1962. A haemolytic coccobacillus recovered from poultry. *Vet. Rec.* 74: 640.
44. Greenham LW and Hill TJ. 1962. Observations on an avian strain of *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Rec.* 74: 861-862.
45. Hacking WC and Pettit JR. 1974. *Pasteurella haemolytica* in pullets and laying hens. *Avian Dis.* 18: 483 - 486.
46. Addo PB and Mohan K 1985. Atypical *Pasteurella haemolytica* type A from poultry. *Avian Dis.* 29:214-217.
47. Shaw DP, Cook DB, Maheswaran SK, Lindeman CJ and Halvorson DA. 1990. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. *Avian Dis.* 34:1005-1008.
48. Léorat J et Mogenet L. 1996. Étiologie bactérienne des pathologies respiratoires de la dinde: utilisation pratique de l'association injectable colistine-spectinomycine. *Revue Méd. Vét.* 147(4): 291-300.
49. Gómez-Díaz CA, Galindo F y García L 1999. Experiencias de campo con *Pasteurella haemolytica* y uso de una bacterina experimental. *Memorias del Curso de enfermedades respiratorias de las aves.* Febrero, México, D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Aviares 1999:22-25.
50. Aguirre J. 1999. Trabajos experimentales con *Pasteurella haemolytica* en pollos de engorda. *Memorias del Curso de enfermedades respiratorias de las aves.* Febrero, México, D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Aviares 1999:1-2.
51. Chirstensen H, Mutters R, Piechulla K and Bisgaard M. 1999. Phylogenetic relationship among phenotypes of avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica* or *Actinobacillus salpingitidis* with proposal of *Salpingitia* gen. nov. 1999 HAP's Conference. A1.7. SouthAfrica & Australia.

52. Goris J, Suzuki K, De Vos P, Nakase T and Kersters K. 1998. Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can. J. Microbiol.* 44:1148-1153.
53. Johnson JL 1984. Bacterial classification III. Nucleic acids in bacterial classifications. p. 8-12 . *In* Krieg NR and Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1, Williams & Wilkins, USA
54. Christensen H, Angen O, Mutters R, Olsen JE and Bisgaard M. 2000. DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1095-1102.
55. Davies RL, Arkinsaw S and Selander RK 1997. Genetic relationships among *Pasteurella trehalosi* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis. *Microbiology*, 143: 2841-2849.
56. Olive DM and Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1661-1669.
57. Bingen E H, Denamur E, and Elion J. 1994. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:311-327.
58. Kolbert CP and Persing DH. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 2:299-305
59. Sneath PHA 1984. Bacterial classification II. Numerical taxonomy p. 5-7. *In* Krieg NR and Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1, Williams & Wilkins, USA.
60. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Kusters K, Toelstra A, Verhoef J and Schmitz FS. 2000. Molecular surveillance of european quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. using automated ribotyping. *J Clin Microbiol.* 38:3636-3645.
61. Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P and Pang T. 1995. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33:1070-1074.
62. Brosius J, Ullrich A, Raker MA, Gray A, Dull TJ, Gutell RR and Noller HF. 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rnmB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid*, 6:112-118.

63. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
64. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. 1996. Current protocols in molecular biology. Vol. 1:2.4.1-2.4.5. Ed. John Wiley & Sons. USA.
65. Gentry MJ, Confer AW and Kreps JA. 1985. Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J. Clin. Microbiol. 22: 968-972.
66. Keener J. and Nomura M. 1996. Regulation of ribosome synthesis. In Neidhardt FC (Editor in Chief). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. 2nd edition. Vol.2. ASM Press. Washington, USA.
67. Murphy GL, Whitworth LC, Clinkenbeard KD and Clinkenbeard PA. 1995. Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 63: 3209-3212.
68. Kuhnert P, Boerlin P, Emler S, Krawinkler M and Frey J. 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. Int. J. Med. Microbiol. 290: 599-604.
69. Gyles CL and Thoen CD. 1993. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. Iowa State University Press pp. 216-223.
70. Chaslus-Dancla E, Lesage-Decauses MC, Leroy-Setrin S, Martel JL, Coudert P and Lafont JP (1996). Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. Vet. Microbiol. 52:91-102.
71. Fussing V, Barfod K, Nielsen R, Møller K, Nielsen JP, Wegener HC and Bisgaard M. 1998. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. Vet. Microbiol. 62:145-162.
72. Muhairwa AP, Christensen JP and Bisgaard M. 2001. Relationships among *Pasteurellaceae* isolated from free ranging chickens and their animal contacts as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing. Vet. Microbiol. 78: 119-137.

73. Angen Ø, Ahrensa P and Bisgaard M. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet. Microbiol.* 84:103–114 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE /
DE LA BIBLIOTECA