



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS SEROGRUPOS  
CAPSULARES A Y D DE *Pasteurella multocida* EN BOVINOS DE  
LA CUENCA LECHEERA DE TIZAYUCA, MÉXICO, MEDIANTE  
PCR MÚLTIPLE**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**VICTOR MANUEL CAMPUZANO OCAMPO**

**ASESORES:**

MVZ. MSP. CARLOS JULIO JARAMILO ARANGO  
DR. RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

A mis padres por brindarme su apoyo, consejo y amor. Por que gracias a eso he podido culminar esta etapa de mi vida y más que esperar que se sientan orgullosos de mí, soy yo quien se siente orgulloso de tener unos padres como ustedes.

A mi hermana, quien hace tiempo dejo de ser mi hermana mayor para convertirse en mi mayor amiga y que siempre estuvo ahí cuando la necesite.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una formación de calidad.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas personas que han formado parte de mi vida y que de alguna manera contribuyeron a que este sueño se vuelva realidad. GRACIAS A TODOS.

A mis asesores:

Carlos Julio Jaramillo Arango y Rigoberto Hernández Castro, por sus importantes consejos y la invaluable motivación durante todo el trabajo, por enseñarme dos aspectos tan diferentes de la medicina veterinaria y que juntos buscaron encontrar el punto donde convergen, por que más que ser mis asesores son mis amigos.

Al Dr. José Juan Martínez Maya, por confiar en mí y por orientarme siempre.

Al Departamento de Medicina preventiva y Salud Pública, por haberme recibido como uno más en su equipo de trabajo.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología, por las facilidades prestadas para este trabajo y en especial al laboratorio de brucelosis y tuberculosis. De este lugar me llevo más que una tesis, me llevo la amistad de todos ustedes: Rosalía, Lucy, Yuliet, Erika, Bety, Alexis, Valeria, Olga, Gaby, Irasema, Uziel, Elihú, José Ángel, Pablo y Jorge. ¡Gracias!.

Gracias al proyecto CONACYT 38590-B, por las facilidades prestadas para este trabajo.

Al jurado de mi tesis:

José Ángel Gutiérrez Pabello, José Juan Martínez Maya, José Antonio Romero López y Miguel Ángel Quiroz Martínez, por sus aportaciones a mi tesis.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

## RESUMEN

CAMPUZANO OCAMPO VICTOR MANUEL; Identificación molecular de los serogrupos capsulares A y D de *Pasteurella multocida* en bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca, México, mediante PCR múltiple. (Bajo la dirección de: MVZ MSP Carlos Julio Jaramillo Arango y Dr. Rigoberto Hernández Castro)

La tipificación que se realiza actualmente para los serogrupos capsulares de *P. multocida* A y D tiene como base la identificación bioquímica y fenotípica mediante las pruebas de hialuronidasa y acriflavina, por lo que se propone la prueba de PCR múltiple para obtener una mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de cepas (n=81) de *Pasteurella multocida* aisladas de bovinos clínicamente sanos (S) y bovinos enfermos de neumonía (E); las cuales fueron identificadas por medio del microsistema API20NE y caracterizadas en los serogrupos capsulares A (80.25%) y D (19.75%) por medio de las pruebas bioquímicas de hialuronidasa y acriflavina. En los bovinos S la frecuencia del Serogrupo S (SA) fue de 86% y del Serogrupo D (SD) fue de 14%; en los bovinos E la frecuencia del SA fue 70.9% y el SD 29.03%. Las diferencias en las frecuencias entre los bovinos S y E sólo fueron significativas para el SD. La tipificación molecular se realizó con la prueba de PCR múltiple en la que el 100% de las cepas se identificaron como SA. La concordancia específica entre la prueba de hialuronidasa y PCR fue 80.25% y entre la prueba de acriflavina y PCR fue de 19.76%. Las técnicas bioquímicas y la prueba de PCR mostraron diferencias en la identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida*, las cepas identificadas como SD por medio de las pruebas bioquímicas fueron clasificadas posteriormente como SA por medio de la PCR, esto se puede deber a la subjetividad de las pruebas bioquímicas que se encuentran influenciadas por la presentación de las características fenotípicas que pueden variar de una cepa a otra.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, serogrupos capsulares, identificación molecular, PCR, acriflavina, hialuronidasa, Tizayuca.

## INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades infecciosas producen múltiples efectos sobre la productividad de los animales, dentro de éstas, las neumonías representan una de las causas más importantes de pérdidas económicas en las explotaciones. A pesar de que la etiología de las neumonías puede ser muy variada se ha reconocido que la de mayor significancia la constituye el llamado complejo respiratorio bovino, que es una de las tres principales causas de desecho. En los Estados Unidos, demostraron que en el ganado de carne el 64% presentó evidencia de neumonía, de los cuáles el 75% corresponden a fiebre de embarque o pasteurelosis pulmonar.<sup>1,2</sup>

Las pérdidas económicas debidas a animales enfermos por neumonía son mucho más importantes que la misma mortalidad, esto debido a los gastos adicionales relacionados con servicios veterinarios, pérdida de peso, conversión alimenticia deficiente, decomisos en rastro y una menor producción de carne y leche.<sup>2,3</sup>

Esta enfermedad representa grandes pérdidas en el ganado destinado a la producción de leche y carne, que se estiman en poco más de un billón de dólares y representa el 30% de la mortalidad en bovinos en Estados Unidos de Norte América y Canadá.<sup>4</sup> En México, poco se conoce de las implicaciones económicas de los problemas neumónicos en la industria bovina. Pijoan y Chávez concluyeron que los costos directos por este problema en bovinos productores de leche en el área de Tijuana, Baja California, van desde los 83.25 a los 501.41 pesos por becerra de reemplazo, y los costos indirectos oscilan de los 235.12 a los 301.07 pesos.<sup>5</sup>

De los casos de neumonía aguda se aísla comúnmente a microorganismos del género *Pasteurella*, por lo cual también se ha denominado a esta enfermedad como pasteurelosis pulmonar, que se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa grave.<sup>6</sup>

### Pasteurelosis pulmonar

La pasteurelosis es una entidad multifactorial, donde se encuentran involucrados factores estresantes de índole físico, fisiológico, ambiental o psicológico; los virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de la parainfluenza 3, virus respiratorio sincitial bovino y adenovirus; así como bacterias del género *Pasteurella*, de las cuales

*Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* se encuentran asociadas con mayor frecuencia, pudiéndose presentar como agentes primarios o secundarios en estos problemas.<sup>1-3</sup>

La enfermedad se desencadena por la persistencia de los factores estresantes, como la lluvia, cambios bruscos de temperatura, sol, vientos, hambre, sed, golpes, sobrepoblación, falta de higiene, mal manejo, transporte inadecuado, destete, mezclar animales de diferentes edades, entre otros; los cuales al presentarse por tiempo prolongado conducen a la hipersecreción de corticosteroides, lo que provoca decremento en la función leucocitaria, que compromete la respuesta inmune del hospedador a los agentes infecciosos.<sup>3,6</sup>

Los agentes virales causan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, también reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, con lo cual se facilita la colonización por parte de *P. multocida* que provoca generalmente una bronconeumonía.<sup>2,6</sup>

La lesión se inicia a nivel del bronquio y se difunde a través del tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos que lo rodean, produciéndose una inflamación de tipo supurativa. Las manifestaciones clínicas van desde la inaparente hasta la mortal, los signos son fiebres de hasta 42°C, anorexia, hipersecreción conjuntival, rinitis mucopurulenta, tos, incremento en la frecuencia respiratoria aunque después se presenta disnea severa que puede conducir a una respiración oral. Los animales afectados extienden el cuello, abducen los miembros anteriores para expandir el volumen de la cavidad torácica, presentan un descenso en producción de leche proporcional al grado de anorexia.<sup>2,3,6</sup>

Los periodos de incubación varían desde 2 hasta 14 días después de la presencia del agente estresante. Los animales con signos severos por lo general mueren en los primeros 25 días del arribo a la engorda, algunos pueden recuperarse en una semana o desarrollar un proceso crónico. La pasteurelisis se presenta con mayor frecuencia en otoño e invierno y tiene relación con la venta del ganado. La morbilidad fluctúa del 5 al 40% y la mortalidad del 5 al 20%.<sup>2,3,7</sup>



## *Pasteurella multocida*

### *Historia*

*Pasteurella multocida* es llamada así en honor de Louis Pasteur, quien trabajando con sangre de aves la descubre en el año 1881, desde entonces ha recibido diferentes nombres; Hueppe (1885) lo denominó con el término de *Bacterium bipolare-multocidum* y Kit (1886) como *Bacterium septicaemia-hemorragica* empleando el termino “septicemia hemorrágica” para describir la enfermedad causada por esta bacteria en las diferentes especies animales y no fue sino hasta el año de 1939 que se le denominó como *Pasteurella multocida*. En el año de 1981 Pohl publica por primera vez el nombre de la familia *Pasteurellaceae*, a la que actualmente pertenece esta bacteria.<sup>8-</sup>

11

*P. multocida* es el integrante del género *Pasteurella* más ampliamente estudiado; se encuentra como habitante normal de la membrana mucosa del tracto respiratorio alto y tracto digestivo de mamíferos y aves tanto silvestres como domésticos, pudiendo afectar también al hombre.<sup>12</sup>

Las cepas de *P. multocida* se han clasificado en 5 serogrupos capsulares A, B, D, E y F cada uno es generalmente asociado pero no restringido completamente, a un hospedero. Asimismo, se clasifican en 16 serotipos somáticos designados del 1 al 16 y se han dividido en 4 subespecies con base en la secuencia de la subunidad 16S ARNr: *Pasteurella multocida multocida*, *Pasteurella multocida gallicida*, *Pasteurella multocida septica* y recientemente *Pasteurella multocida tigris*.<sup>13-17</sup>

### Distribución

*P. multocida* afecta a una gran variedad de especies de mamíferos y aves tanto silvestres como domésticos y es considerado un patógeno altamente variable debido a la diversidad observada entre los 5 serogrupos capsulares. Esta bacteria se encuentra distribuida por todo el mundo, pero existen zonas en las que prevalecen ciertos serogrupos los cuales se encuentran relacionados a un hospedero produciendo diversas enfermedades.

En el caso particular de México sólo se tiene reportada la existencia de los serogrupos capsulares A y D. En el cuadro 1 se muestran las enfermedades más frecuentes producidas por *P. multocida* y los serogrupos involucrados en dichos problemas.<sup>18-24</sup>

**Cuadro 1.** Enfermedades más comunes producidas por *P. multocida* y los serogrupos que se encuentran involucrados.

<i>Enfermedad producida</i>	<i>Serogrupo involucrado</i>	<i>Distribución</i>
Septicemia hemorrágica en ganado bovino y búfalos	B y E	Asia, África Central y Sur de Europa
Rinitis atrófica del cerdo	D	No se ha delimitado su <u>región geográfica</u>
Rinitis purulenta en el conejo	A y D	Distribución mundial
Cólera aviar	A y F	Distribución mundial
Problemas neumónicos en ovinos, caprinos y cerdos.	A y D	Distribución mundial
Neumonía fibrinosa o fiebre de embarque en bovinos.	A y D	Distribución mundial
Septicemia en el ganado bovino.	F	Estados Unidos y Europa

Amna *et al.* (2004), Catry B *et al* (2005), Jaramillo *et al.* (1987) y Boyce *et al.* (2004).

### Características morfológicas de *P. multocida*

Es un pequeño cocobacilo Gram negativo, inmóvil, no hemolítico, encapsulado que mide 0.3-1.0  $\mu\text{m}$  de ancho por 1.0-2.0  $\mu\text{m}$  de largo, puede crecer bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas y microaerofílicas, después de incubarse por 18-24 h forma colonias que miden de 1 a 2 mm de diámetro presentando tres variaciones: mucoides, lisas iridiscentes y lisas no iridiscentes. Con la tinción de Wright presentan una típica tinción bipolar. Crece bien en medios enriquecidos como agar sangre, agar chocolate y agar Mueller Hinton, pero no crece en agar MacConkey, el rango de temperatura para su crecimiento es de 25-40°C siendo la óptima 37°C.<sup>9,10,13,17</sup>

### Características bioquímicas de *P. multocida*

*P. multocida* es positiva a las reacciones de oxidasa, catalasa, producción de indol, ornitina descarboxilasa, reducción de nitritos a nitratos y reacciona negativamente a las pruebas de urea, gelatinasa, H<sub>2</sub>S, rojo de metilo, lisina descarboxilasa, arginina descarboxilasa, utilización de citrato y producción de gas, además de que fermenta carbohidratos como xilosa, sorbitol, manosa, galactosa y glucosa. (Cuadro 2). Las

cepas de *P. multocida* muestran variación en la habilidad de fermentación de carbohidratos, muchas cepas de perros y gatos difieren en las propiedades de fermentación comparadas con las obtenidas de bovinos, borregos, cerdos y aves de corral.<sup>10,13</sup>

### Factores de virulencia

Entre los factores relacionados con la patogénesis de la pasteurelosis están, la cápsula, endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (OMP), fimbria, exotoxinas, plásmidos de virulencia y otros factores que aún se están investigando y detallando.<sup>15, 25</sup>

**Cuadro 2.** Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de cepas de *P. multocida*.

Prueba bioquímica	Reacción
Hemólisis	-
Catalasa	+
Oxidasa	+
Indol	+
Reducción de nitritos a nitratos	+
Ornitina descarboxilasa	+
Producción de H <sub>2</sub> S	+
Rojo de metilo	-
Glucosa	+
Trealosa	+
Manitol	+
Dulcitol	-
Sorbitol	+
Producción de gas	-

Adaptado del Manual de Bergis (2000), Catry *et al.* (2004), Blackall *et al.* (1997).

### *Cápsula*

La cápsula se encuentra en la superficie de muchas bacterias, participando determinantemente en el acceso de ciertas moléculas a la membrana celular, en la adherencia a la superficie de las células eucariotas, incrementando la tolerancia a la desecación, interfiriendo con la fagocitosis y reduciendo la acción del complemento. Aislamientos de *P. multocida* pueden ser diferenciados serológicamente por antígenos capsulares en 5 serogrupos (A, B, D, E y F).<sup>26,27</sup>

La composición de la cápsula ha sido investigada sólo en los serogrupos A, B, D, y F. El material capsular de todas las cepas del serogrupo A contienen ácido hialurónico, un polímero de ácido D-glucorónico y N-acetil-glucosamina. Las cepas del serogrupo D han demostrado ser susceptibles a la heparinasa y la condroitinasa pero no así a la hialuronidasa, lo cual pone de manifiesto la presencia de heparina y sulfato de condroitina. Mientras que el material capsular del serogrupo F sólo es susceptible a la condroitinasa con lo cual se menciona como elemento constitutivo al sulfato de condroitina. En el caso del serogrupo B los elementos constitutivos encontrados son la fructosa, manosa, glucosa y glucosamina.<sup>25-27</sup>

La cápsula representa un importante papel en la protección de la bacteria ante los mecanismos de inmunidad del hospedero, aunque aparentemente mutantes acapsuladas de algunas cepas permanecen virulentas. La secuencia de nucleótidos del locus que sintetiza la cápsula de *P. multocida* se ha identificado y agrupado en tres regiones funcionales.<sup>26,28</sup>

### *Lipopolisacárido (LPS).*

El LPS es el mayor factor de virulencia en las enfermedades producidas por *P. multocida* y juega un papel esencial en la septicemia hemorrágica de los búfalos. Este LPS tiene las mismas funciones de las endotoxinas de las bacterias Gram negativas: pirogénica, activación de macrófagos, inducción del factor de tumoración, activación de la cascada de la coagulación, agregación de plaquetas, estimula la inmunidad humoral y es considerado un antígeno protector. Este LPS es el causante de los 16 serotipos somáticos anotados del 1-16.<sup>25</sup>

### *Toxinas.*

Las cepas de *P. multocida* producen toxinas en particular las del serogrupo D, que producen una dermonecrotoxina (DNT) de aproximadamente 146 kd codificada por el gen cromosomal *ToxA*.<sup>25,29</sup>

Esta DNT tiene acción citotóxica en células de pulmón de embriones de bovino, produce atrofia esplénica en ratón y atrofia de los huesos turbinados en diferentes especies incluidos los cerdos, ratas, conejos y cabras.

Esta toxina es causante de la rinitis atrófica en el cerdo. En otros hospederos se ha encontrado también la producción de toxinas como en las aves de corral, bovinos, cabras, perros y conejos.

### *Fimbria*

La colonización de la superficie de las células del hospedero por parte de la bacteria, es frecuentemente mediada por adhesinas y fimbrias. La participación en la adhesión por parte de la fimbria a la superficie del hospedero usualmente se encuentra relacionada con la virulencia.<sup>15</sup>

La fimbria tipo IV participa en la adherencia al epitelio del hospedador, facilitando el proceso infeccioso de *P. multocida*, sin embargo, todavía no se sabe si esta colonización es importante para la progresión de la pasteurelosis. El crecimiento bajo condiciones microaerófilas aumenta la expresión de esta fimbria por parte de *P. multocida*. La fimbria de los serogrupos A, B y D se ha aislado y caracterizado, identificándose 2 tipos de fimbria en las cepas del serogrupo D, la primera muy similar a la fimbria tipo I y la segunda es morfológicamente similar al pili de *E. coli*.<sup>25,30</sup>

### *Plásmidos de virulencia.*

Se han recuperado plásmidos de cepas de *P. multocida* aisladas de varias especies animales. Estos plásmidos le confieren resistencia a antibióticos (Factor R) como las tetraciclinas, sulfonamidas, cloranfenicol, estreptomycin, además de ser una herramienta epidemiológica útil en la identificación de cepas con el mismo fenotipo. Las cepas de ave contienen plásmidos correlacionados con la resistencia al complemento. *P. multocida* puede ser fácilmente transformada con plásmidos mediante electroporación. La identificación de los perfiles de los plásmidos ha sido utilizada para la identificación de cepas y es considerado como un marcador de su virulencia.<sup>25,31,32</sup>

### *Proteínas captadoras de hierro.*

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de muchas bacterias incluyendo a *P. multocida*. Por su toxicidad inherente los niveles libres de hierro disponibles son limitados y *P. multocida* es una de las bacterias que han desarrollado múltiples mecanismos para la captación de hierro mediante sistemas que implican la síntesis y liberación de moléculas de bajo peso molecular, llamadas sideróforos que tienen gran afinidad por el hierro y que lo capturan de las moléculas del huésped. Esta capacidad ha sido observada solo en las cepas de origen bovino, los sideróforos pueden ser relacionados también con la proteína que se une a hemoglobina pero la estructura y el mecanismo de acción, además de los genes responsables de la expresión son diferentes. Más del 2.5% del genoma de *P. multocida* codifica para proteínas involucradas en la captación y adquisición de hierro.<sup>12,33</sup>

### Importancia en la salud pública

*P. multocida* se encuentra como flora normal de la cavidad oral en el 70-90% de los gatos y en el 50-66% de los perros y constituye la especie predominantemente aislada en infecciones de heridas por mordedura de estos animales en el hombre. Entre los factores que inciden en el riesgo de infección está el tipo y extensión de la lesión, la localización de la herida, el tiempo de solicitud de atención médica y las características del paciente, especialmente la edad y su condición inmunológica.<sup>9,34</sup>

De las cepas aisladas de infecciones humanas relacionadas con la mordedura de perros y gatos, el 60% corresponden a *P. multocida multocida* y el 40% restante a *P. multocida septica*, *P. canis* y en menor frecuencia a *P. dagmatis* y *P. stomati*. De las dos principales subespecies de *P. multocida* que afectan al humano, *P. multocida multocida* causa con mayor frecuencia infecciones respiratorias, mientras que *P. multocida septica* es aislada preferentemente de infecciones de heridas.<sup>34,35</sup>

*P. multocida* provoca diversas categorías de infección: infecciones de piel y tejidos blandos, que son las infecciones más frecuentes, infecciones respiratorias e infecciones invasivas en una gran variedad de tejidos y órganos. Los casos de septicemia son excepcionales. La infección que con más frecuencia se presenta es la cutánea, los abscesos se presentan en el 40% de los casos así como linfangitis y adenopatía regional

en el 20% y un 10% de los casos se presenta como artritis séptica, osteomielitis, tendosinovitis y meningitis.<sup>9,34,35</sup>

Existen también infecciones respiratorias de las cuales la neumonía es la presentación más frecuente y más del 90% de los casos ocurren en individuos inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas debilitantes subyacentes, como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasias o neoplasias.<sup>34,35</sup>

### Métodos para la identificación de *P. multocida*

La primera identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida* se realizó mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta (HAI), la cual presenta complicaciones por la dificultad en la preparación del antisero y los antígenos específicos para los diferentes serogrupos, además de la existencia de reacciones cruzadas de *P. multocida* con algunas bacterias Gram negativas como *Neisseria catarrhalis* y *Yersinia pseudotuberculosis*, entre otras que se pueden encontrar como flora normal o transitoria en bovinos pudiendo sensibilizarlos.<sup>37,13</sup> Las pruebas de hialuronidasa y acriflavina son pruebas no serológicas para el reconocimiento de los serogrupos capsulares A y D respectivamente. Estas pruebas se basan en la despolimerización de la cápsula de ácido hialurónico del serogrupo A (SA) en presencia de *Staphylococcus aureus* (productora de la enzima hialuronidasa) y la floculación de las cepas del serogrupo D (SD) en presencia de acriflavina.<sup>37,38</sup> Otras técnicas se han desarrollado para realizar la serotipificación de este organismo incluyen la aglutinación específica, protección pasiva en modelo ratón, precipitación-difusión en agar, contraelectroforesis; sin embargo las más utilizadas para la realización de estudios epidemiológicos son las pruebas de hialuronidasa y acriflavina.<sup>22,23,36,39,40</sup>

Todas las pruebas mencionadas anteriormente se han realizado con base en las características fenotípicas, sin embargo las condiciones de cultivo pueden influenciar la expresión de estas características como son la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, y con ello disminuir la sensibilidad y la especificidad de los métodos basados en estas características para la identificación bacteriana.<sup>41</sup>

### Pruebas moleculares para la identificación de *P. multocida*

Las pruebas fenotípicas proveen limitada información e insuficiente caracterización en la realización de estudios epidemiológicos que requieren de la adecuada diferenciación de aislamientos fenotípicamente similares. Durante la última década, las técnicas de caracterización genómica han complementado o reemplazado métodos de tipificación tradicional debido a que poseen mayor versatilidad, facilitan la identificación y una rápida detección de organismos, la determinación de su posición taxonómica y la investigación de la relación genética intra-especies. Los enfoques moleculares tales como la hibridación de ADN y la amplificación del ácido nucleico, han permitido la detección bacteriana directamente de muestras clínicas, reduciendo dramáticamente el tiempo requerido para la identificación.<sup>42,43</sup>

Inicialmente el equipo y los reactivos requeridos eran costosos y pocos laboratorios podían adquirirlos. En años recientes la optimización de las técnicas y la disponibilidad de equipamiento han permitido que estos métodos puedan incorporarse como pruebas de rutina en laboratorios de todo el mundo.<sup>42</sup>

Se han desarrollado diversas técnicas moleculares con variabilidad específica y poder de discriminación, que permiten ampliar el conocimiento que se tiene acerca de *P. multocida*, con la finalidad de facilitar y hacer más precisa su identificación. Prueba de ello son la implementación de técnicas como la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de endonucleasas de restricción (REA), ribotipificación, gel de electroforesis de campo de pulsos y electroforesis de enzimas multilocus.<sup>11,44</sup>

### PCR para la identificación de *P. multocida*

El ADN genómico codifica todas las secuencias de información hereditaria responsables de la replicación microbiana, virulencia, especificidad de hospedador y habilidad de evadir la respuesta del sistema inmune, un completo conocimiento del genoma de un patógeno provee toda la información necesaria para la investigación, prevención y tratamiento de las enfermedades. El genoma completo de *P. multocida* se ha determinado y secuenciado en la cepa PM70. Este contiene un cromosoma de 2,



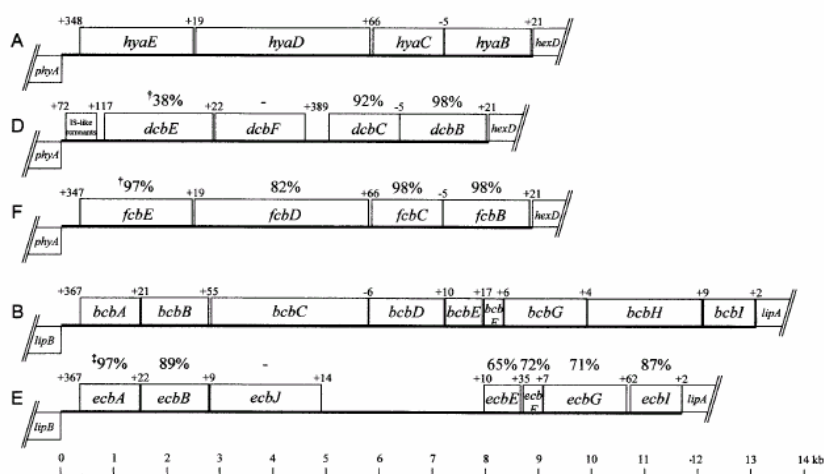
257,487 pb, con un rango de G+C de 37.7-45.9% y contiene 2,014 marcos abiertos de lectura (ORF's), 6 operones ARNr y 57 ARNt. <sup>45</sup>

Los métodos serológicos de identificación para los serogrupos de *P. multocida* se han centrado en las propiedades fenotípicas de la cápsula, motivo por el cual se ha estudiado el loci que codifica para la síntesis de ésta. La organización del locus de la cápsula es altamente conservado (Figura 1), con genes que se organizan en 3 regiones funcionales. Las regiones 1 y 3 codifican para la síntesis de proteínas involucradas en el transporte de los polisacáridos que conforman la cápsula. <sup>28</sup>

La región 2 contiene genes involucrados en la síntesis de los polisacáridos capsulares, esta región se considera específica para cada uno de los serogrupos. Cada serogrupo expresa un diferente tipo de polisacárido y por lo tanto requiere de un diferente subconjunto de genes para la síntesis del polímero específico de azúcar. <sup>28</sup>

El loci capsular de la cepa M1404 contiene 9 genes, los cuales están involucrados en la síntesis y transcripción de la cápsula. Estos ORF's son designados como bcbABCDEFGHI.

Con la identificación completa del loci capsular de *P. multocida* serotipo B:2 y con la identificación de los genes específicos para el serogrupo dentro de la región 2 se han obtenido datos complementarios de la composición de la cápsula. Esto ha permitido en la última década ampliar la información acerca de *P. multocida* con lo cual se han podido desarrollar sistemas de identificación moleculares, permitiendo una rápida y precisa identificación de este microorganismo. <sup>27,28</sup>



**Figura 1.** Organización genética de la región del loci de aislamientos representativos de los 5 serogrupos capsulares de *P. multocida* (A, B, D, E, y F) los números entre las cajas indican la distancia en pares de bases entre la última base del gen anterior y la primera base del siguiente gen.

## Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR consiste en hacer copias de pequeños fragmentos de ADN blanco en un tubo, la molécula de ADN es copiada por una ADN polimerasa que usa desoxirribonucleótidos para construir una nueva banda usando los principios básicos del proceso de replicación natural del ADN, todo lo anterior nos permite amplificar una región de ADN en un billón de veces en pocas horas.<sup>42</sup> El uso de esta técnica nos permite eliminar problemas éticos relacionados con el uso de animales de laboratorio para el aislamiento de este microorganismo, la elaboración de antisueros y los problemas que involucra la preparación e interpretación de las pruebas fenotípicas y bioquímicas. La PCR toma un papel importante en el laboratorio clínico debido a la rapidez y la mayor certeza en la identificación, pudiendo obtener un resultado más preciso y reducir significativamente el tiempo de procesamiento de la muestra.<sup>46,47,48</sup>

Para el desarrollo de la PCR múltiple que permite la identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida* se diseñaron iniciadores específicos con el siguiente criterio de selección: los iniciadores fueron localizados dentro de los genes establecidos para cada uno de los serogrupos (*hyaD*, *bcbD*, *dcbF* *ecbJ* y *fcbl*) y el fragmento amplificado para cada gen permitió diferenciar a cada serogrupo. Los genes se encuentran dentro de la región 2 del loci que codifica para la síntesis capsular.<sup>47,48</sup>

Para el caso particular de los serogrupos presentes en nuestro país, los genes a amplificar son *hyaD-hyaC* para el SA que codifica para la síntesis de ácido hialurónico y el gen *dcbF* para el SD que codifica para la síntesis de una glicosil transferasa.<sup>27,47</sup>

## Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR consiste en hacer copias de pequeños fragmentos de ADN blanco en un tubo, la molécula de ADN es copiada por una ADN polimerasa que usa desoxirribonucleótidos para construir una nueva banda usando los principios básicos del proceso de replicación natural del ADN, todo lo anterior nos permite amplificar una región de ADN en un billón de veces en pocas horas.<sup>42</sup> El uso de esta técnica nos permite eliminar problemas éticos relacionados con el uso de animales de laboratorio para el aislamiento de este microorganismo, la elaboración de antisueros y los problemas que involucra la preparación e interpretación de las pruebas fenotípicas y bioquímicas. La PCR toma un papel importante en el laboratorio clínico debido a la rapidez y la mayor certeza en la identificación, pudiendo obtener un resultado más preciso y reducir significativamente el tiempo de procesamiento de la muestra.<sup>46,47,48</sup>

Para el desarrollo de la PCR múltiple que permite la identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida* se diseñaron iniciadores específicos con el siguiente criterio de selección: los iniciadores fueron localizados dentro de los genes establecidos para cada uno de los serogrupos (*hyaD*, *bcbD*, *dcbF* *ecbJ* y *fcbl*) y el fragmento amplificado para cada gen permitió diferenciar a cada serogrupo. Los genes se encuentran dentro de la región 2 del loci que codifica para la síntesis capsular.<sup>47,48</sup>

Para el caso particular de los serogrupos presentes en nuestro país, los genes a amplificar son *hyaD-hyaC* para el SA que codifica para la síntesis de ácido hialurónico y el gen *dcbF* para el SD que codifica para la síntesis de una glicosil transferasa.<sup>27,47</sup>

## Justificación

La tipificación que se realiza actualmente para los serogrupos capsulares de *P. multocida* A y D tiene como base la identificación bioquímica y fenotípica mediante las pruebas de hialuronidasa y acriflavina, por lo que se propone la prueba de PCR múltiple para obtener una mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico.

## HIPÓTESIS

La identificación molecular de los serogrupos capsulares A y D de *P. multocida* permitirá encontrar diferencias entre los serogrupos identificados con pruebas bioquímicas convencionales de hialuronidasa y acriflavina.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar a nivel molecular cepas de los serogrupos capsulares A y D de *P. multocida* aisladas de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos y enfermos de neumonía.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las cepas de *P. multocida* mediante el sistema API20 NE para bacilos Gram negativos no enterobacterias y no exigentes.
- Tipificar las cepas *P. multocida* mediante las pruebas de hialuronidasa y acriflavina.
- Determinar la presencia de los genes *hyaD-hyaC* para el serogrupo A y del gen *dcbF* para el serogrupo D de *P. multocida* por medio de PCR múltiple.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Origen y características de las cepas

Las cepas de *P. multocida* (n=81) fueron obtenidas de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos de neumonía (S) (n=50) y clínicamente enfermos de neumonía (E) (n=31), en un muestreo previo en un complejo lechero en Tizayuca, Hidalgo, México, como parte del proyecto CONACYT G38590-B. Las cepas fueron identificadas en forma preliminar mediante siembra en agar sangre, tinción de Gram y pruebas bioquímicas convencionales de oxidasa, TSI, indol, citrato y urea.

### Procesamiento de las cepas

La identificación definitiva, la tipificación capsular, las pruebas bioquímicas (hialuronidasa y acriflavina) y la tipificación molecular se llevaron a cabo en el laboratorio 2 de Investigación del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y en el laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### Identificación definitiva

La identificación final se realizó mediante el sistema comercial para bacilos Gram negativos, no enterobacterias y no exigentes API20NE (bioMérieux, Francia), este sistema estandarizado consta de una galería con 20 microtubos, 8 de ellos ensayos enzimáticos y 12 ensayos de asimilación. Para la inoculación de los ensayos enzimáticos se tomó una asada de cultivo bacteriano y se resuspendió en 5 ml de medio estéril (proporcionado por el fabricante) hasta obtener una densidad de 0.5 en la escala de McFarland, inoculando los tubos (135 µl) y no las crestas de los microtubos. La inoculación de los ensayos de asimilación se realizó tomando 200 µl de la solución salina bacteriana preparada anteriormente, este volumen fue transferido a un medio enriquecido API AUX (proporcionado por el fabricante) y homogeneizado, para con ello inocular los ensayos de asimilación esta vez rellenando los tubos y las crestas (200 µl). Esta galería fue incubada a 29°C y se realizaron dos lecturas a las 24 y 48 horas. Los resultados positivos y negativos se obtuvieron mediante cambios de color que

demonstraron la utilización o no de los sustratos contenidos en los microtubos, estos resultados fueron ingresados en el software API WEB (proporcionado por el fabricante) para así poder determinar el género y la especie bacteriana. Todos los procesos se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante.

### Tipificación capsular

La tipificación capsular se realizó por medio de pruebas bioquímicas descritas por Carter y Rundell para las cepas de serogrupo A y Carter y Subronto para las del serogrupo D.<sup>37,38</sup>

### *Prueba de hialuronidasa*

Las cepas se sembraron en agar sangre y fueron cruzadas con una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* productora de hialuronidasa, se incubaron durante 18 horas. Al siguiente día se realizó la lectura; los resultados se interpretaron de la siguiente manera: las colonias del SA mostraron una disminución en el tamaño de la cápsula cerca de la cepa nodriza; mientras que las del tipo D no mostraron cambio alguno. Los controles positivo y negativo fueron: una cepa de *P. multocida* SA de referencia donada por el Dr. GH Frank y el Dr. B. Briggs, NADC, USDA, y una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , respectivamente.<sup>37</sup>

### *Prueba de acriflavina*

Se tomó una asada de cada cepa de *P. multocida* y se depositó en tubos de plásticos estériles con 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) (BD Bioxon, Becton Dickinson. México) y se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se eliminaron 2.5 ml del sobrenadante, para después ser resuspendidos con 0.5 ml de una solución de acriflavina neutra 1:1,000; la reacción se visualizó a los 5 minutos. La presencia de un “flóculo” nos proporcionó el resultado positivo para las cepas del SD. El control positivo fue una cepa de referencia del SD y como control negativo se utilizó una cepa de la bacteria *E.coli* DH5 $\alpha$ .<sup>38</sup>

## Tipificación molecular

### *Extracción de ADN*

Para realizar la extracción de ADN, se colocó una asada de la muestra bacteriana en 200µl de agua estéril la cual se sometió a una temperatura de 92°C durante 15 minutos, se centrifugó a 6000xg durante 15 minutos, y se tomaron 5 µl del sobrenadante que se utilizaron como templete de ADN en la mezcla para PCR.

### PCR

La tipificación molecular se realizó por medio de un PCR múltiple tomando como base el protocolo descrito por Townsend *et al.*<sup>47</sup> Para el SA los genes a amplificar fueron *hyaD-hyaC* que codifican para la síntesis de ácido hialurónico, por medio de los iniciadores 5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3' y 5'-TTGCCATCATTGTCAGTG-3' y para el SD el gen a amplificar fue *dcbF* que codifica para la síntesis de una glicosil transferasa del operón capsular, para lo cual se emplearon los iniciadores 5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' y 5'-CATCTACCCACTCAATATCAG-3'. Se colocaron 32.5 µl de agua destilada estéril, 5µl de amortiguador 1x PCR, 3 µM MgCl<sub>2</sub>, 1.6 µM de dNTP'S, 3.6 µM de cada uno de los iniciadores, 5 µl de ADN y 2.5 U de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen. Ventura California USA), la amplificación se realizó en un termociclador (PCR express Termo, Termo Hybaid. Waltham, MA) bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, elongación a 56.5°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos. La extensión final se realizó a 72°C por 5 minutos. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta su visualización.

La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 KB Plus (Invitrogen). El tamaño del producto de amplificación para el SA fue de 1,044 pb y para el SD de 657 pb. En cada PCR múltiple se utilizaron cepas de referencia de *P. multocida* SA y *P. multocida* SD y como control negativo se utilizó una cepa de *E. coli* DH5α.

Adicionalmente, la prueba de PCR se aplicó a muestras de ADN de: *E. coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Brucella abortus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemophilus paragallinarum* y *Staphylococcus aureus*, para corroborar la especificidad de la misma.

### Análisis estadístico

Se realizó con el Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados versión 3.0 (EPIDAT), Organización Panamericana de Salud (OPS/OMS) 2003.

Con los datos obtenidos se calcularon las frecuencias de los serogrupos (A y D) identificados en cada uno de grupos de bovinos (S y E) según la caracterización capsular o molecular.<sup>16</sup>

La determinación de la concordancia entre los resultados de las pruebas de PCR y los resultados de las pruebas de hialuronidasa y acriflavina, se llevó a cabo mediante el cálculo de la concordancia absoluta y la concordancia específica y la prueba de Kappa. 49,50

## RESULTADOS

### Identificación de cepas mediante API20NE

De acuerdo a los valores establecidos por el software API WEB, de las 81 cepas analizadas el 97.53% (79/81) mostró un porcentaje de identificación del 96%, y una tipicidad de 1 a *P. multocida* y el 2.5% (2/81) mostró un porcentaje de identificación del 65.5% y un tipicidad de 0.84.

Los porcentajes de resultados positivos a las pruebas bioquímicas contenidas en la galería API20NE fueron los siguientes: reducción de nitritos a nitratos (NO<sub>3</sub>) 100%, formación de índol (TRP) 100%, B-galactosidasa (PNG) 2.7% y oxidasa (OX) 100%. El resto de las pruebas de la galería resultaron negativas como se muestra en el Cuadro 3.



**Cuadro 3.** Características bioquímicas de cepas de *P. multocida* aisladas de exudado nasal de bovinos en Tizayuca, Hidalgo, México.

<b>Pruebas bioquímicas</b>	<b>% Positivos</b>
Oxidasa	100
Indol	100
Triptofano	100
Reducción de nitritos a nitratos	100
Citocromo oxidasa	100
B-galactosidasa	2.47
TSI	0
Hemólisis	0
Citrato	0
Arginina dihidrolasa	0
Ureasa	0
Esculina	0
Gelatina	0
Reducción de nitritos a nitrógeno	0
Fermentación de glucosa	0
Arabinosa	0
Manosa	0
Manitol	0
N-acetilglucosamina	0
Maltosa	0
Gluconato potásico	0
Ácido capríco	0
Ácido adipíco	0
Malato	0
Citrato Trisódico	0
Ácido fenilacético	0
Glucosa	0

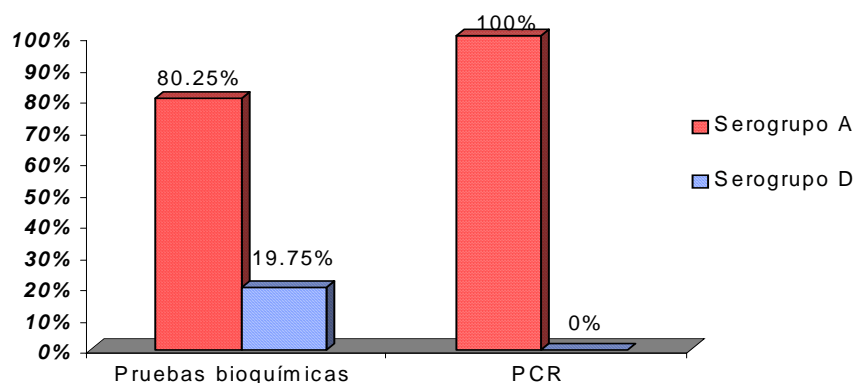
### Tipificación capsular

Mediante la prueba de hialuronidasa el 80.25% (65/81) de las cepas fue positivo para el SA y por medio de la prueba de acriflavina el 19.75% (16/81) fue positivo para el SD. (Figura 2)

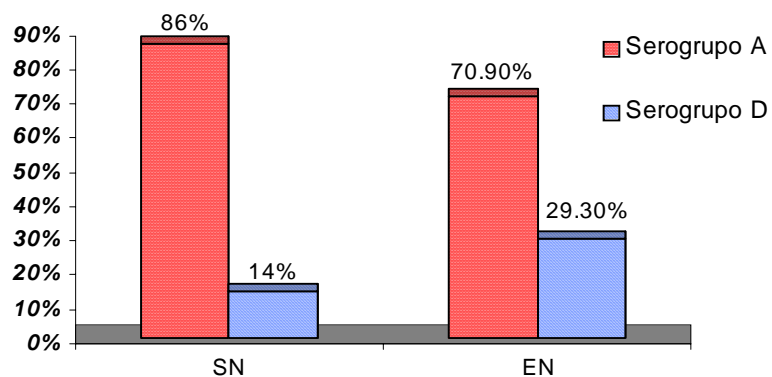
En los bovinos S la frecuencia del SA fue de 86% (43/50) y el SD 14% (7/50); en los bovinos E la frecuencia del SA fue 70.9% (22/31) y el SD 29.03% (9/31). (Figura 3)

Las diferencias en las frecuencias entre los bovinos S y E sólo fueron significativas para el SD.

**Figura 2.** Frecuencia de los serogrupos capsulares de *P. multocida* mediante pruebas bioquímicas y PCR.



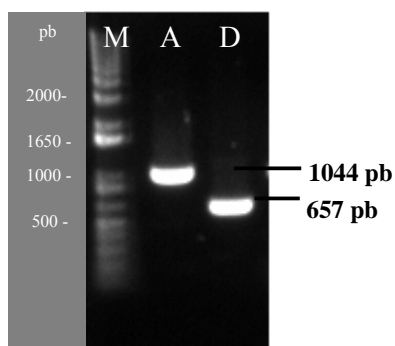
**Figura 3.** Frecuencias de los serogrupos capsulares de *P. multocida* en bovinos S y E mediante las pruebas de hialuronidasa y acriflavina.



S: bovinos clínicamente sanos  
E: bovinos enfermos de neumonía

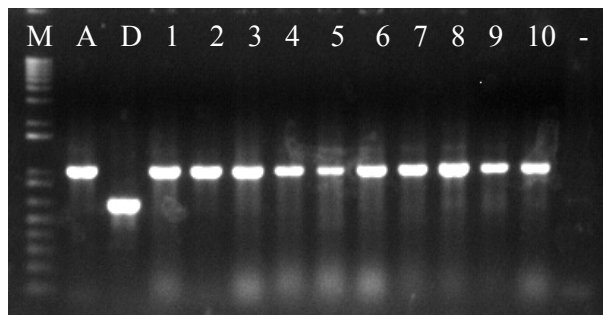
## Tipificación molecular

Mediante la prueba de PCR se amplificaron los genes *hyaD-hyaC* para el SA y el gen *dcbF* para el SD cuyos productos de amplificación tuvieron un peso molecular esperado de 1044 pb para el SA y de 657pb para el SD (Figura 4), que concuerdan con lo publicado por Townsed *et al.* (2001).

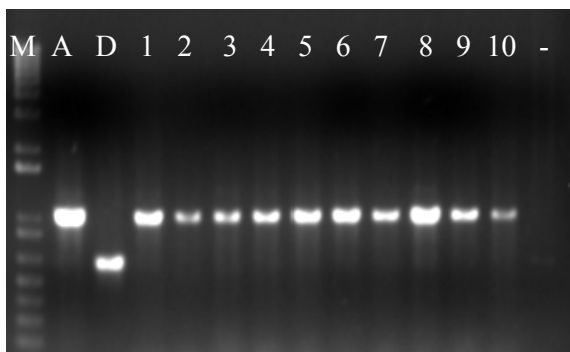


**Figura 4.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Cepa de Referencia A, (D) Cepa de Referencia D

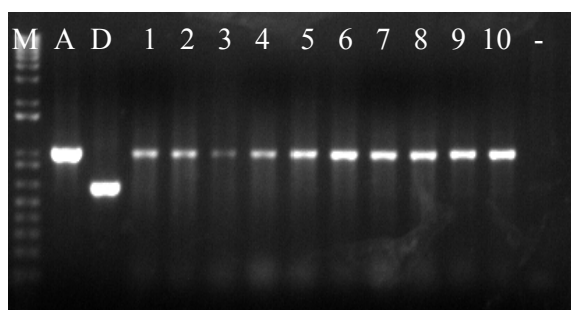
Por medio de la PCR múltiple, en las cepas de campo se logró la amplificación de un producto de ~1044 pb, en el 100% de las cepas (n=81) (Figura 2), que corresponde al SA de *P. multocida* (Figuras 5-13)



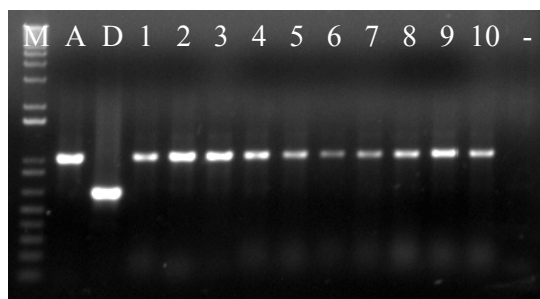
**Figura 5.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Control A, (D) Control D, (1) Cepa 1 (2) Cepa 3, (3) Cepa 8, (4) Cepa 11 (5) Cepa 12., (6) Cepa 15, (7) Cepa 17, (8) Cepa 18, (9) Cepa 20, (10) Cepa 42, (-) Control negativo.



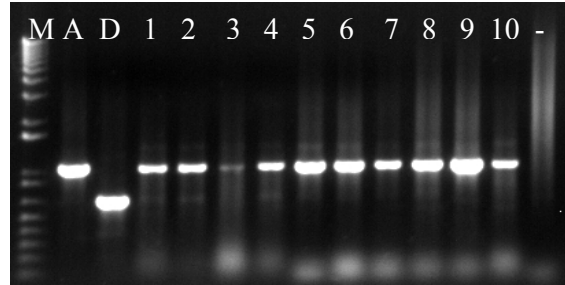
**Figura 6.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 47, (2) Cepa 48, (3) Cepa 51, (4) Cepa 52 (5) Cepa 53, (6) Cepa 55, (7) Cepa 62, (8) Cepa 65, (9) Cepa 66, (10) Cepa 71, (-) Control negativo.



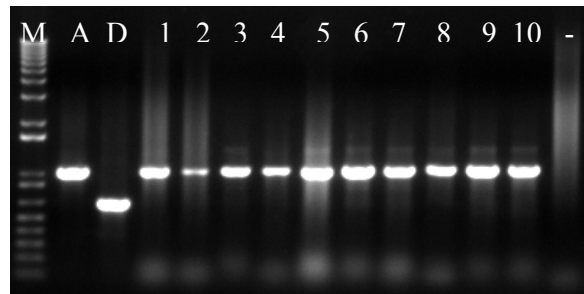
**Figura 7.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 72, (2) Cepa 73, (3) Cepa 81, (4) Cepa 82, (5) Cepa 83, (6) Cepa 84, (7) Cepa 85, (8) Cepa 86, (9) Cepa 87, (10) Cepa 88, (-) Control negativo.



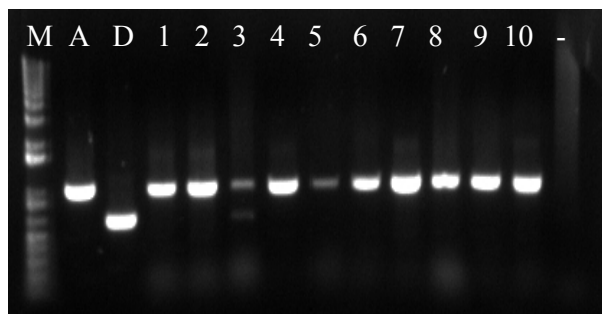
**Figura 8.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 89 (2) Cepa 90, (3) Cepa 91, (4) Cepa 93 (5) Cepa 95, (6) Cepa 96, (7) Cepa 97, (8) Cepa 98, (9) Cepa 99, (10) Cepa 100, (-) Control negativo.



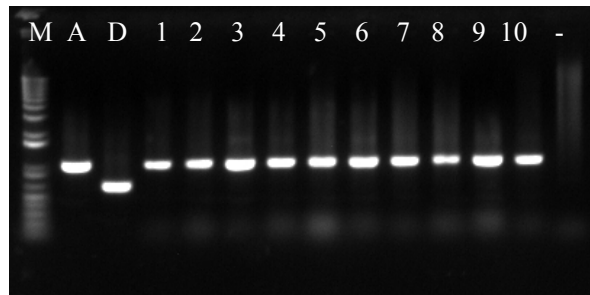
**Figura 9.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 101, (2) Cepa 104, (3) Cepa 109, (4) Cepa 110, (5) Cepa 111, (6) Cepa 112, (7) Cepa 113, (8) Cepa 114, (9) Cepa 116, (10) Cepa 119, (-) Control negativo.



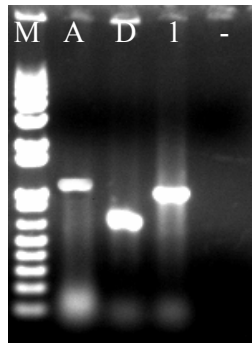
**Figura 10.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador (A) Referencia A, (D) D, (1) Cepa 122 (2) Cepa 123, (3) Cepa 124, (4) Cepa 125 (5) Cepa 126, (6) Cepa 127, (7) Cepa 130, (8) Cepa 131, (9) Cepa 134, (10) Cepa 135, (-) Control negativo.



**Figura 11.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 145, (2) Cepa 150, (3) Cepa 151, (4) Cepa 152, (5) Cepa 153, (6) Cepa 154, (7) Cepa 155, (8) Cepa 156, (9) Cepa 157, (10) Cepa 158, (-) Control negativo.

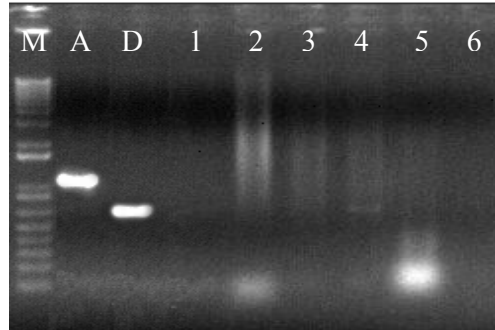


**Figura 12.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 159 (2) Cepa 160, (3) Cepa 168, (4) Cepa 169 (5) Cepa 175, (6) Cepa 183, (7) Cepa 184, (8) Cepa 189, (9) Cepa 191, (10) Cepa 213, (-) Control negativo.



**Figura 13.** Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) Cepa 225, (-) Control negativo.

La aplicación de la prueba de PCR al ADN de las bacterias: *E. coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Brucella abortus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemophilus paragallinarum* y *Staphylococcus aureus*, no mostró producto alguno de amplificación, esto pone de manifiesto la especificidad de los iniciadores y por lo tanto de la prueba.



**Figura 14.** Producto de amplificación de PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Referencia A, (D) Referencia D, (1) *E. coli*, (2) *Mannheimia haemolytica*, (3) *Brucella abortus*, (4) *Corynebacterium pseudotuberculosis*, (5) *Haemophilus paragallinarum*, (6) *Staphylococcus aureus*.

### Evaluación de la concordancia

No fue posible calcular la concordancia mediante la prueba de Kappa debido a que ninguna cepa fue identificada como SD mediante la PCR.

La concordancia específica (Verdaderos positivos) entre la prueba de hialuronidasa y PCR fue de 80.25% y entre la prueba de acriflavina y PCR fue de 19.76%.

## DISCUSIÓN

La pasteurelosis pulmonar representa grandes pérdidas económicas en la industria bovina a nivel nacional, por ello toma importancia la identificación y caracterización de los agentes etiológicos implicados en esta enfermedad para, así poder aplicar las medidas de diagnóstico, tratamiento y prevención adecuadas.<sup>1</sup>

Se ha demostrado que las principales bacterias encontradas en estos problemas respiratorios en el ganado bovino son *M. haemolytica* y *P. multocida*, y de esta última, se han identificado a los serogrupos A y D como los responsables de ocasionar la pasteurelosis neumónica en el país.<sup>1-3</sup>

El crecimiento y la identificación fenotípica de las cepas utilizadas en este estudio se llevó a cabo mediante los métodos convencionales de crecimiento en agar sangre e identificación de la morfología. La determinación del comportamiento bioquímico de las cepas se llevó a cabo mediante la aplicación del sistema de identificación API20NE para bacilos Gram negativos, no enterobacterias y no exigentes, que ha demostrado ser un método de fácil aplicación y de alta confiabilidad para la identificación del género y la especie bacteriana y que ha sido usado satisfactoriamente en aislamientos de *P. multocida* y *M. haemolytica*.<sup>50,51</sup>

Los resultados obtenidos por medio de este sistema mostraron un alto porcentaje de identificación y una tipicidad completa a *P. multocida* en todos los aislamientos. No se presentaron diferencias entre los grupos S y E.

La utilización de las pruebas bioquímicas de hialuronidasa y acriflavina para la caracterización fenotípica de cepas de *P. multocida* ha sido reportada por diversos autores, que mencionan que son una herramienta útil de fácil realización que disminuye muchos de los problemas presentes en la identificación mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta, pero también presentan problemas relacionados con su limitada certeza, la confusión de resultados y las condiciones de cultivo que influyen en la expresión de algunas de las características fenotípicas de estas cepas, pudiendo llegar a presentar resultados falsos negativos o falsos positivos, además de requerir de



personal técnico con amplia experiencia en la realización e interpretación de estas técnicas.<sup>36,43</sup>

Las frecuencias en la identificación capsular mediante estas pruebas a nivel mundial son muy variadas y según algunos autores el principal serogrupo encontrado en problemas neumónicos es el A, con porcentajes que pueden ir desde 80 hasta un 100%. Trabajos similares se han realizado en ovinos, caprinos, cerdos y aves alrededor del mundo, donde el serogrupo más frecuentemente encontrado es el A con porcentajes que van desde 77 hasta 97.3%, mientras que del SD el rango es de 0.02 hasta un 27%.<sup>47,52</sup>

Los resultados encontrados en el presente trabajo (SA 80.25% y SD 19.75%), en los que predominan el SA, son similares a los reportados por otros autores en el país, García *et al.*<sup>20</sup>, a partir de exudado nasal encontraron un 100% de cepas SA, mientras que a partir de pulmones neumónicas Blanco *et al.*,<sup>23</sup> reportan 61% para el SA, 25% SD y 14% de cepas no tipificables y Jaramillo *et al.*,<sup>24</sup> obtuvieron que el 100% de cepas pertenecieron al SA.<sup>23,24</sup>

Diversos autores han propuesto la técnica de PCR como una herramienta para la rápida detección y caracterización de los serogrupos capsulares ya que por su versatilidad la prueba puede ser útil para el diagnóstico de rutina de la pasteurelosis en las diferentes especies y en la realización de estudios epidemiológicos, sin tener que recurrir a las pruebas fenotípicas, las cuales pueden llevar semanas antes de obtener un resultado.<sup>52-55</sup>

La PCR múltiple ha demostrado tener una alta especificidad para la caracterización de los distintos tipos capsulares de las cepas de referencia de *P. multocida* de origen bovino, ovino, porcino y aviar, y en la mayoría de los aislamientos de campo.<sup>47</sup>

En el presente trabajo se realizó la estandarización del protocolo de Townsend *et al.*,<sup>47</sup> para la PCR múltiple que amplifica los genes *hyaD-hyaC* para el SA y el gen *dcbf* para el SD.<sup>47</sup>

Estudios realizados, utilizando la PCR para la caracterización molecular de los serogrupos capsulares de *P. multocida* en aislamientos de origen bovino, reportan elevados porcentajes de identificación para el SA que van del 92.3 al 99%, estos

resultados son similares a los hallazgos de este trabajo en los que el 100% de los aislamientos correspondieron al SA.<sup>56,57</sup>

La comparación de los resultados entre las pruebas bioquímicas (hialuronidasa y acriflavina) y la técnica de PCR concuerdan en la identificación de las cepas del SA pero no así con las del SD, ya que ninguna cepa identificada como SD mediante la prueba de acriflavina pudo ser identificada como tal por la PCR, lo cual nos confirma que estas cepas son SA; esto puede deberse a los problemas que enfrentan las pruebas fenotípicas, en las que las condiciones del cultivo puede influenciar la expresión de los atributos fenotípicos como la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, asimismo las cepas de *P. multocida* presentan tres variantes: mucoides, lisas iridiscentes y lisas no iridiscentes, todo ello puede generar confusión en la identificación de este organismo.<sup>13,41,42</sup>

Adicionalmente, se ha comprobado que la restricción de hierro reduce la cantidad del material capsular de *P. multocida*, además de que estas cápsulas que son carbohidratos por naturaleza, se pierden con frecuencia después de varios subcultivos, como fue el caso de las cepas utilizadas en este trabajo.<sup>41,42,58</sup>

No fue posible calcular la concordancia mediante la prueba de Kappa debido a que ninguna cepa fue identificada como SD mediante PCR. La concordancia específica entre la prueba de hialuronidasa y PCR muestra ser mayor que la obtenida entre la prueba de acriflavina y PCR, lo que sugiere una menor sensibilidad por parte de la prueba de acriflavina.

La caracterización molecular de cepas de *P. multocida* realizada en el presente trabajo demuestra la sencillez y factibilidad de la PCR en la tipificación capsular, lo cual concuerda con lo demostrado en otras investigaciones. La obtención de ADN de colonia mediante la técnica de choque térmico reduce significativamente el tiempo requerido para el diagnóstico de este microorganismo a partir de muestras clínicas.

En la epidemiología y otros campos de la microbiología aplicada, se requieren de métodos seguros para la identificación y caracterización de cepas bacterianas.

Un avance importante para los laboratorios es considerar la adopción de nuevos métodos de identificación y diferenciación, sin embargo esta nueva generación de pruebas no están exentas de limitantes y contrariedades, la prueba de PCR requiere de evaluaciones rigurosas para demostrar su conveniencia de uso, que en conjunto con la tipificación serológica pueden ser usadas para la correcta clasificación de aislamientos de *P. multocida* en la realización de estudios epidemiológicos.<sup>53, 59, 60</sup>

La identificación de los serogrupos capsulares de *Pasteurella multocida* es un paso importante en la prevención y tratamiento de la pasteurelisis neumónica en bovinos productores de leche. Así como para conocer la situación epidemiológica de este microorganismo en la región de Tizayuca, Hidalgo, México. Así mismo permite optimizar el desarrollo de inmunógenos e identificar fallas potenciales en la vacunación; además de que ayuda a la caracterización de los brotes producidos por esta bacteria.

Es necesario analizar un mayor número de cepas en el marco de estudios epidemiológicos realizados en diferentes zonas del país, para conocer la situación de esta bacteria en el país.

## CONCLUSIONES

- Las técnicas bioquímicas y la prueba de PCR mostraron diferencias en la identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida*, las cepas identificadas como SD son verdaderamente SA, esto se debe a la subjetividad de las pruebas bioquímicas que se encuentran influenciadas por la presentación de las características fenotípicas que pueden variar de una cepa a otra.
- Las pruebas de hialuronidasa y acriflavina no permiten una identificación confiable debido a que se pueden presentar resultados falsos positivos.
- La prueba de PCR múltiple permitió identificar de una manera más confiable y sencilla los serogrupos capsulares A y D de *P. multocida*.
- Debido a la versatilidad, rápida detección e identificación de la prueba de PCR, se propone como una herramienta en la realización de estudios epidemiológicos, y como una técnica que puede ser utilizada en el diagnóstico rutinario de la pasteurelisis neumónica.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Clasificación clínica y tratamientos del complejo respiratorio bovino. Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/bovotecnia/BtRgCliC003.htm>. Citado julio 2007.
2. Trigo FJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet* 1987; 4: 1-37.
3. Muerte súbita asociada a pasteurelosis neumónica en bovinos. Disponible en <http://www.miagropecuaria.com/publicaciones/pfizeraasteurelosismuertesubita.pdf> Citado marzo 2007.
4. Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia. *Frontiers in Biosciences* 2001; 1(6): 1128-1150
5. Pijoan AP, Chávez DJA, Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Méx* 2003; 34 (4):333-342.
6. Trigo TFJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pastereurelosis pulmonar bovina. *Vet. Mex.* 1991; XXII (2):131-34.
7. Alonso de León M, Ramos LY, Izquierdo NP, Rodríguez SE. Análisis de la presentación de pasteurelosis bovina. *Rev. Proa. Anim* 2002; 14: 57-60.
8. A study of the hemorrhagic septicemia *Pasteurellae*. Disponible en <http://jb.asm.org/cgi/reprint/37/1/69.pdf> Citado ago 2007.
9. *Pasteurella multocida*. Disponible en: [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/pmultocida.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/pmultocida.htm) . Citado ene 2007.
10. Holth JB, Krieg NR, Sneath HAP, Stanley JT, Williams T. *Bergey's Manual of the determinative Bacteriology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2000.
11. Blackall PJ, Miflin JK. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathology* 2000; 29: 271-287.
12. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 265:1-10.
13. Carter GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv Vet Sci* 1967:321-379.
14. Rimler RB, Rhoades KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida* *J Clin Microbiol* 1987; 25 (4):615-618.
15. Boyce JD, Lo RYC, Wilkiel L, Adler B. *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, editors. *Thoen Pathogenesis of bacterial infections in animal*. CO, Carlton Australia: Blackwell publishing 2004: 273-294.
16. Capitini CM, Herrero IA, Patel R, Ishitani MB, Boyce TG. Wound Infection with *Neisseria weaveri* and a Novel Subspecies of *Pasteurella multocida* in a Child Who Sustained a Tiger Bite. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34: 74-6.
17. Christensen H, Kuhnert P, Busse JH, Frederiksen CW, Bisgaard M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; 57:166-78.
18. Wilson AM, Morgan JM, Barger EG. Comparison of DNA Fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 255-59.
19. Amna B. El Tayeb, Teresa Y. Morishita<sup>1</sup>, Elisabeth J, Angrick. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic

- serotyping, and restriction endonuclease analysis. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 121–25.
20. García HE, Trigo TFJ, Sánchez-Mejorada PH, Aguilar RF. Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. *Vet Méx* 1988; 19: 199-201.
  21. Catry B, Chiers K, Schwarz S, Kehrenber C , Decostere A, De-Kruifl A. Fatal Peritonitis Caused by *Pasteurella multocida* Capsular Type F in Calves *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1480–83.
  22. Blanco VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suárez GF. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aisladas a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet. Méx.* 1993; 24 (2): 107-112.
  23. Blanco VFJ, Trigo FJ, Jaramillo LM, Aguilar RF. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneuemonic lesions in cattle and sheep from México. *Lat.- Amer. Microbiol.* 1995; 37:121-126.
  24. Jaramillo ML, Aguilar RF, Trigo TFJ. Serotipificación de *Pastereulla haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pastereulla multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros de México. *Vet. Mex.* 1987; 18:185-88.
  25. Seleim RS. Review: major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. Disponible en [http:// www.priory.com/vet/pasteurella.htm](http://www.priory.com/vet/pasteurella.htm) Citado dic. 2006.
  26. Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect. Immun.* 2000: 3463-3468.
  27. Boyce JD, Chung JY, Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Biotechnol J* 2000; 83: 153-63.
  28. Boyce JD, Cheng J Y, Adler B. Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M104 (B:2). *Vet Microbiol* 2000; 72: 121-34.
  29. Lichtensteiger AC, Steenbergen MS, Lee MR, Polson DD, Vimr RE. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3035-39.
  30. Ruffolo GG, Tennent MJ, Michalski PW, Adler B. Identification, Purification, and Characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 1997; 65: 339–343.
  31. Rúbies X, Casal JB, Pijoan C. Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid. *Vet Microbiol* 2002; 84: 69–78.
  32. Kehrenberg C, Schwarz S. Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 773–75.
  33. Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida*. Disponible en [http://www.tdx.cesca.es/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-1222103-150439/mbg1de1.pdf](http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1222103-150439/mbg1de1.pdf) Citado 17 septiembre 2007.
  34. Microorganismos asociados a infecciones por mordeduras de perros y gatos. *Mon. Electr. Patol.Vet* 2005;2:1-16.
  35. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, Hooper DC. *Pasteurella multocida* infection. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine* 1984; 63:133-53.

36. Chengappa MM, Carter GR, Baile EW, Identification of type D *Pasteurella multocida* by counterimmunoelectrophoresis. J Clin Microbiol 1986; 24: 721-23.
37. Carter GR, Subronoto P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavin. Am J Vet Res 1973; 34:293-294.
38. Carter GR, Rundell SW. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet Rec 1975; 96:343.
39. Madsen,EB, Bisgaard M, Mutters R, Pedersen KB. Characterization of *Pasteurella* species from lungs of calves with pneumonia. Can J Comp Med 1985; 49:63-67.
40. Buttenschon J, Rosendal S. Phenotypical and genotypical characteristics of paired isolates of *Pasteurella multocida* from the lungs and kidneys of slaughtered pigs. Veterinary Microbiology 1990; 25: 65-75
41. Jacques M, Bélanger M, Diarra MS, Dargis M, Malouin F. Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and in vivo. Microbiology 1994; 140: 263-70.
42. Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol. 2000; 72: 3-25.
43. Catry B, Baele M, Opsomer G, Kruif A, Decostere A, Haesebrouck F. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. Vet Microbiol 2004;98:251-260.
44. Christensen H, Angen O, Olsen EJ, Bisgaard M. Revised description and classification of atypical isolates of *Pastereulla multocida* from bovine lungs based on genotyping characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. Microbiology 2004; 150: 1757-67.
45. May JB, Zhang Q, Lin LL, Paustian LM, Whittam ST, Kapur V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. Proc Natl. Acad. Sci. 2001;98: 3460-65.
46. Christensen H, Bisgaard M, Larsen J, Olsen JE. PCR-detection of *Hemophilus paragallinarum*, *Hemophilus sommus*, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia* spp., *Pasteurella trehalosi*, and *Pasteurella multocida*. In: Sachse K, Frey J, editors. Methods in molecular biology. Totowa NJ: Humana Press Inc 2002: 257-74.
47. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. J Clin Microbiol 2001; 39: 924-929.
48. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJS. 1998. Development of PCR assays for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. Journal of Clinical Microbiology 1998;36:1096-1100.
49. Merino CE. Observaciones y mediciones en: Moreno AL, Cano VF, García RH. Epidemiología clínica, México. McGraw Hill 1994:80-83.
50. Dever AGE. Mediciones epidemiológicas en Epidemiología y administración de servicios de salud. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de Salud. 1991:77-114
51. Boerlin P, Siegrist HH, Burnens PA, Kuhnert P, Mendez P, Prétat G, Hienhard R, NicoletIJ. Molecular Identification and Epidemiological Tracing of *Pasteurella multocida* Meningitis in a Baby. Journal of Clinical Microbiology 2000; 28: 1235–1237

52. Hayasshimoto N, Aiba T, Itoh K. Identification procedure for *Pasteurella pneumotropica* in microbiologic monitoring of laboratory animals. *Exp. Anim.* 2005; 54:123-129
53. Blackall PJ, Pahoff JL, Bowles R. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet Microbiol* 1997; 57: 357-360. .
54. Shivachandra SB, Kumar AA, Chaudhuri P. Molecular characterization of Avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup-A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR. *Vet Res Commun.* Article in press.
55. Kalorey DR, Yuvaraj S, Vanjari SS, Gunjal PS, Dhanawade NB, Barbudde SB, Bhandarkar AGComp. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Immunol Microbiol Infect Dis.* Article in press.
56. Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kießling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol* 2006; 114:304-317.
57. Davies LR, MacCorquodale R, Reilly S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary Microbiology* 2004; 99: 145-58.
58. DeRosa CD, Mechor DG, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock RT. Comparison of *Pasteurella* spp. Simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of Clinical microbiology* 2000;38 :327-32.
59. Wilson AM, Rimler BR, Hoffman JL. Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1518-24.
60. Dabo MS, Debey MB; Montelongo M, ConferWA. Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with an rRNA probe. *J. Med. Microbiol* 1999; 48: 279-86.