



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

IDENTIFICACION DE *Mannheimia* spp., MEDIANTE
LA SECUENCIACION DE LOS GENES DE LA
SUBUNIDAD 16S ADNr Y *rpoB*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ZAYDY SUÁSTEGUI URQUIJO

Asesores:



Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango

Dr. Rigoberto Hernández Castro

MÉXICO, D.F.

2010



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 ti que siempre me has apoyado, por esas pláticas que me mostraron el mundo desde distintos puntos de vista y así, siempre crecer juntos, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores: Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango por su apoyo, Dr. Rigoberto Hernández Castro por siempre ponerse en nuestro lugar, entendernos y ayudarnos incondicionalmente.

Al Jurado: Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. José Ángel Guadalupe Gutiérrez Pabello, Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Francisco Aguilar Romero, por todas sus sugerencias.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital "Manuel Gea González" y al laboratorio de bacteriología del CENID-MICROBIOLOGIA-INIFAP en Palo Alto.

A mis padres por enseñarme a luchar por lo que quiero y a mis hermanos por su apoyo incondicional.

A mi esposo y a nuestra bebé, por ser los mejores cómplices y ser el combustible para seguir siempre hacia adelante.

A YIN-YIN, por ser mi Ángel de la guarda.

Al los proyectos PAPIIT No.IN208708 Y SEP-CONACyT No. 104031.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Antecedentes Históricos.....	3
Taxonomía de <i>Mannheimia</i>	3
Características del género <i>Mannheimia</i>	4
Técnicas de identificación del género <i>Mannheimia</i>	7
Gen de la subunidad 16S ADNr.....	11
Gen <i>rpoB</i>	12
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Cepas.....	16
Extracción de ADN.....	16
Método 1: Extracción de colonia bacteriana.....	16
Método 2: Tiocinato de Guanidina.....	16
Amplificación de los genes.....	17
Purificación de productos amplificados.....	18
Secuenciación de ADN.....	18
Análisis genético de las secuencias.....	21
Análisis genético de poblaciones.....	22

RESULTADOS.....	24
Cepas.....	24
Extracción de ADN y amplificación de PCR.....	24
Secuenciación de los genes 16S ARNr y <i>rpoB</i>	24
Análisis filogenético del gen 16S ADNr.....	26
Análisis filogenético del gen <i>rpoB</i>	27
Análisis filogenético de los genes 16S ARNr y <i>rpoB</i>	27
Análisis de distancias genéticas.....	28
Estudio genético de poblaciones.....	29
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS.....	39
TABLAS.....	49

RESUMEN

SUÁSTEGUI URQUIJO ZAYDY. Identificación de *Mannheimia* spp., mediante la secuenciación de los genes de la subunidad 16S ARNr y *rpoB* (bajo la dirección de: Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y Dr. Rigoberto Hernández Castro).

Mannheimia es un importante género bacteriano que contiene especies de gran importancia económica debido a la variedad de enfermedades que producen. El género *Mannheimia* pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, la cual en los últimos años ha sufrido diversas modificaciones taxonómicas por la aplicación de métodos moleculares para su clasificación. Este género está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas. En este trabajo se utilizaron 30 cepas de *Mannheimia* spp., de las cuales 15 fueron aisladas de exudado nasal y 15 de pulmón neumónico de bovinos, de dos hatos lecheros de la República Mexicana. Se eligieron dos genes para realizar su identificación por medio de la PCR, el primero es el gen 16S ARNr el cual es usado como un cronómetro universal y el segundo es el gen que codifica para la subunidad beta de ARN polimerasa, *rpoB* que se caracteriza por su aporte en el momento de delinear la filogenia de la familia *Pasteurellaceae*. Por medio de la amplificación y secuenciación de estos genes, se obtuvo una secuencia consenso que se analizó y comparó mostrando una homología del 99% con la cepa de *M. varigena* CCM5786 al utilizar la

subunidad 16S ARNr, en el caso de *rpoB* la homología fue de 99% con la cepa de *M. varigena* CCUG38462, a su vez se realizó un análisis filogenético el cual confirmó que las muestras pertenecen a *Mannheimia varigena*. El árbol filogenético obtenido con las secuencias de *rpoB* refleja las ramas principales del árbol obtenido con las secuencias de 16S ARNr, sólo pequeñas diferencias entre los árboles fueron observadas.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes históricos

La familia *Pasteurellaceae* pertenece al Phylum-Proteobacteria, orden-Pasteurellales, clase-Gammaproteobacteria, tradicionalmente incluía los géneros *Haemophilus*, *Actinobacillus*, y *Pasteurella*, recientemente se han sumado nuevos géneros, en la actualidad son 17 que se encuentran bien definidos; *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Bibersteinia*, *Bisgaard taxa*, *Bisgaardia*, *Chelonobacter*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Mannheimia*, *Nicoletella*, *Pasteurella*, *Phocoenobacter*, *Terrahaemophilus*, *Volucribacter* y dos que están en estudio; *unclassified Pasteurellaceae*, y *unclassified Pasteurellaceae*, (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy) siendo el más prominente *Mannheimia*.

La mayoría de los miembros de la familia colonizan las mucosas del tracto gastrointestinal, genital o de vías respiratorias en vertebrados, incluido el hombre otros mamíferos, aves y reptiles;¹⁻⁴ muchos son patógenos oportunistas y pueden causar enfermedades.

Taxonomía de *Mannheimia*

Mannheimia haemolytica fue miembro del género *Pasteurella*, el cual produce hemólisis débil en placas de agar sangre de oveja. *M. haemolytica* históricamente fue clasificada en 17 serotipos en base a la prueba de hemaglutinación indirecta de antígenos extraíbles contra superficie capsular.^{5,6} El género fue dividido en dos biotipos A y T, con base en la capacidad

de fermentar arabinosa y trehalosa, respectivamente. En total, se reportan 12 serotipos A y 4 serotipos T. En 1995 Younan y Fodar reportaron el aislamiento del serotipo A17. En 1990, utilizando datos de estudios de hibridación ADN-ADN, propiedades bioquímicas y análisis genético, los biotipos T (serotipos T3, T4, T10 y T15) se reclasificaron como una especie distinta llamada *Pasteurella* (*Bibersteinia*) *trehalosi*. En 1999, utilizando datos de ribotipificación, electroforesis de enzimas multilocus, comparación de las secuencias 16S ARNr y hibridación ADN-ADN, *P. haemolytica* serotipos A fueron reclasificadas en un nuevo género *Mannheimia* para distinguirlos de *P. multocida*. Por lo tanto, los serotipos A de *P. haemolytica* A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 Y A17 se nombraron *Mannheimia haemolytica*. El serotipo 11, el cual no está relacionado con *M. haemolytica*, se renombró como *M. glucosida*.^{1,5-17}

Características del Género *Mannheimia*

El género *Mannheimia* recibe este nombre en tributo a Walter Mannheim, un biólogo alemán quien contribuyó en la comprensión de la taxonomía de la familia *Pasteurellaceae*.^{1,7,18} Este género consta de bacilos cortos gram-negativos teñidos uniformemente. La mayoría de las cepas recién aisladas son capsuladas.¹²

Los requisitos de crecimiento de estos microorganismos son exigentes y requieren de medios con caseína hidrolizada que contiene 15 aminoácidos individuales, una mezcla de sales, vitaminas, galactosa y glucosa. *Mannheimia* spp., requiere una mayor concentración de hierro para la producción de citotoxinas que son necesarias para su crecimiento. Es un microorganismo mesofílico y requiere de una atmósfera de

crecimiento de anaerobiosis facultativas, o bien de una atmosfera de microaerobiosis.^{12,18}

Mannheimia forma colonias circulares rodeadas por una zona angosta de beta-hemólisis. En agar sangre de caballos, oveja y conejo, forma colonias circulares rodeadas por una zona angosta de beta-hemólisis, pero en placas de agar con sangre de corderos de muy corta edad da lugar a una zona doble beta-hemólisis, que aumenta de tamaño a temperatura ambiente. Una característica importante dentro del género *Mannheimia* es que en los primo-aislamientos las cepas pueden crecer en agar MacConkey, mientras las especies del género *Pasteurella* son incapaces de crecer en este medio de cultivo.¹²

El género *Mannheimia* está conformado por un grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas.⁷ En la actualidad hay cinco especies reconocidas dentro del género *Mannheimia*: *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. ruminalis* y *M. varigena*.^{8,9,16}

M. glucosida incluye cepas anteriormente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3A-H y 9, así como las cepas de referencia del serotipo 11.^{11-13,17-19} Esta especie es fenotípicamente heterogénea, pero todas muestran actividad β -glucosidasa. La mayoría de las cepas se han aislado de la cavidad nasal de ovejas. Algunas también se han aislado en casos de neumonía en rumiantes.^{11,12,19,20}

M. ruminalis contiene cepas previamente clasificadas en Bisgaard taxón 18 y consta de cepas no hemolíticas aisladas de rumen de bovinos y ovinos, no han sido asociadas con condiciones de la enfermedad.^{11-13,17,19,20}

M. granulomatis contiene cepas previamente clasificadas como *P. granulomatis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupo 3J.^{11-13,18,19} Su hábitat es el tracto respiratorio de rumiantes domésticos, salvajes y de liebres. Estas cepas se han asociado a neumonía, conjuntivitis purulenta en especies de lepóridos y paniculitis.^{11,12,19,20}

Prueba	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. varigena</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M.ruminalis</i>
Hemolisis	+	+	+	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	d	d	-	-
Indol	-	-	d	-	-
L-Arabinosa	-	d	+	-	-
D-Xilosa	+	+	d	d	d
Manitol	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	-	+	d
Maltosa	+	+	+	+	d
Trehalosa	-	-	-	-	-
Esculina	-	+	-	d	-
NPG	-	+	d	+	-
ONPX	d	d	d	d	-
ONPG	d	+	d	d	+

Fig.1 Caracterización fenotípica de las distintas especies del género *Mannheimia* (Angen et al.1999 a)

M. varigena contiene cepas claramente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36.^{11,12,17-19} Estas cepas de *M. varigena* originalmente eran de tracto respiratorio y tracto intestinal tanto del ganado bovino como porcino y fueron asociados con septicemia, neumonía, enteritis y mastitis.^{11,12,19,20}

M. haemolytica es una bacteria gram-negativa, de forma cocobacilar, encapsulada, no móvil, mesófilica, aerobia y anaerobia facultativa^{5,6,18}; que posee varios factores de virulencia incluyendo cápsula, proteínas de membrana externa,

adhesinas, neuramidasa, lipopolisacáridos, endotoxinas y leucotoxinas.^{1,11,21}

Los serotipos A1 y A2 son los más frecuentes en todo el mundo.⁹ El serotipo A1 es el principal agente causante de la Mannheimiosis bovina, también conocida como fiebre de embarque.^{1,7,10,22-25} El hábitat de los serotipos A1 y A2 es el tracto respiratorio alto y la enfermedad se desarrolla cuando hay una inmunosupresión. Este microorganismo se presenta como patógeno secundario en los casos de pleuroneumonías^{23,26} en las cuales se ven involucrados agentes virales: Virus Parainfluenza 3, Herpes Virus Bovino I, Virus Sincitial Respiratorio Bovino; agentes bacterianos secundarios: *P. multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes* y factores ambientales.^{5,6,21}

Técnicas de identificación bacteriana

Los métodos clásicos para identificar las bacterias se basan en las características observables en las cepas, con predecibles propiedades físicas y bioquímicas en condiciones de crecimiento óptimo. Cuando los microorganismos comunes presentan fenotipos poco frecuentes, la confianza en estas pruebas se puede comprometer para su correcta identificación. Ahora existe una gran variedad de metodologías; pruebas bioquímicas, inmunológicas y moleculares.

Una gran variedad de técnicas fenotípicas se han utilizado para identificar y diferenciar a cepas bacterianas: perfiles bioquímicos, fagotipos, serotipificación, perfiles de proteínas de membrana externa y susceptibilidad a quimioterapéuticos, entre otros. Sin embargo, existen desventajas que limitan su uso, como la falta de fagos para cada género bacteriano, la necesidad de cepas de referencia,

o la ausencia de baterías de antisueros para cada género y especie, así como la inestabilidad en la expresión de ciertas características fenotípicas observables en reacciones bioquímicas, aunado a que se ha informado que existe el 10% de las cepas que al ser aisladas no pueden ser tipificadas.²⁷ La identificación basada en las características fenotípicas es un frecuente y serio problema en la familia *Pasteurellaceae*^{3,28} ya que está es compleja y en la actualidad se encuentra en constante reclasificación gracias al avance en las técnicas moleculares por lo que las cepas que en el pasado fueron clasificadas hoy en día se están moviendo constantemente.²⁹ Angen y colaboradores demostraron que la serotipificación no representa un método fiable para la identificación.^{11,17,19} El uso de la biología molecular y las técnicas moleculares han ayudado en la identificación y taxonomía bacteriana desde principios de 1960, proporcionado una nueva visión de la diversidad microbiana y permiten una más rápida descripción con alta resolución de las comunidades microbianas que la proporcionada por el enfoque tradicional de aislamiento de microorganismos.^{30,31} La identificación por secuenciación de genes es más objetiva, no requiere de un crecimiento óptimo o un microorganismo viable y ha añadido la capacidad de definir las relaciones taxonómicas entre las bacterias.³²⁻³⁴

El mundo de la taxonomía molecular fue revolucionado a mediados de 1980 gracias al análisis de secuencias de cronómetros moleculares como ADNr y a mediados de 1990 se utilizó la secuenciación de la subunidad pequeña del gen 16S ARNr, esta es considerada como una herramienta estándar de taxonomía bacteriana, no solo para definir la relación

filogenética, sino como el principal gen de identificación bacteriana.^{31,35,36}

Los métodos moleculares miden la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homólogas. Esta molécula debe estar universalmente distribuida en el grupo que se desea estudiar y debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo.³² El análisis de ADN ha sido utilizado en un gran número de estudios sobre la taxonomía bacteriana y tipificación; también para mejorar nuestra comprensión de los mecanismos básicos de la evolución,³⁷ permitiendo una identificación más rápida y precisa del microorganismo problema. Diversas técnicas moleculares se pueden utilizar en una gran variedad de microorganismos sin necesidad de reactivos específicos para cada especie bacteriana, asimismo y utilizando marcadores genéticos conservados se pueden identificar cepas no tipificables, de igual manera utilizando genes no conservados se puede obtener relaciones filogenéticas entre microorganismos del mismo género y especies, así como de una familia bacteriana.

La comparación de secuencias génicas ha sido la mejor técnica hasta ahora para mejorar la clasificación de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*,^{18,28} la mayoría han sido clasificados por medio del gen 16S ARNr, ya que es un gen universal para la identificación de bacterias.³⁸ La función de 16S ARNr es permanecer constante por largos períodos, por lo que los cambios en esta secuencia es más probable que reflejen cambios al azar que cambios selectivos que pudieran alterar las funciones de las moléculas. Los cambios al azar de estas secuencias son una medida precisa en el tiempo; debido a la capacidad de reproducir esta técnica mostrando el

mismo resultado al trabajar repetidas veces una cepa. Esto tiene especial importancia para la construcción de bases de datos confiables que contengan todas las cepas dentro de una especie la cual los organismos desconocidos puedan ser comparados para su clasificación.³⁹

Para bacterias, micobacterias y hongos, muchos genes blanco han sido reconocidos como instrumentos útiles para su identificación. Los genes blanco que son seleccionados deben ser funcionalmente constantes, que actúen como relojes moleculares del cambio evolutivo microbiano. El gen debe tener un segmento común en todas las bacterias y ser flanqueado por regiones variables o altamente variables. Las regiones conservadas son responsables de la "universalidad" de los genes blancos. Durante la secuenciación de regiones variables o altamente variables generan fragmentos únicos de nucleótidos o secuencias que sirven de "huellas" para las diferentes especies. La secuencia se compara con secuencias de referencia que son depositadas en las bibliotecas públicas o privadas para determinar la relación. El grado aceptable de la diferencia entre las 2 secuencias para la clasificación de género o la especie es variable, dependiendo de los genes blanco y los microorganismos.²²

El gen blanco más comúnmente utilizado para la identificación de bacterias es el 16S ADN_r. La secuenciación parcial del gen 16S ARN_r ha surgido como un método más rápido y preciso para identificar una amplia variedad de bacterias aerobias y anaerobias, una bacteria puede tener una sola copia o múltiples copias de este gen y esto puede hacer difícil la interpretación, cuando existen cambios en los pares de bases entre las variantes copias. Por el contrario, varias copias pueden ser útiles para mejorar la sensibilidad de la

amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sobre todo cuando la aplicación de esta tecnología es directamente en muestras clínicas. Una limitación importante de la secuenciación de 16S ARNr es su incapacidad para discriminar entre todos los taxa bacterianos.³⁴

Gen de la subunidad 16S ARNr

El gen 16S ARNr contiene regiones bien conservadas en todos los organismos que son ideales para el diseño de iniciadores universales, PCR, la secuenciación y la alineación de secuencias. También contiene regiones variables específicas de especie lo que permite la identificación de especies. Por lo tanto, el análisis de la secuencia del gen 16S ADNr se ha convertido en una tecnología de gran alcance para la identificación de bacterias aisladas en laboratorios de diagnóstico clínico de humanos. Este método también ha sido utilizado para identificar o analizar aislamientos clínicos veterinarios.⁴⁰ El tamaño del gen 16S ARNr es de 1,500 pb, codificado por el gen *rrs*.³¹ La molécula consta de aproximadamente 50 dominios funcionales. El número de dominios es importante porque la introducción de cambios selectivos en un dominio no afectará a la secuencia en otros dominios. A medida que el número de dominios incrementa el impacto de los cambios selectivos es menor en las relaciones filogenéticas. Por estas razones, entre otras, es considerado un cronómetro molecular.⁴¹

Las tecnologías de secuenciación actuales pueden leer alrededor de 500-700 pb por reacción. Se ha demostrado que con la aplicación de esta tecnología se reduce el costo y la mano de obra.

El gen 16S ARNr cuenta con 10 zonas hipervariables, la secuencia de las 3 regiones consecutivas hipervariables, V7, V8 y V9 (Fig. 2), ha demostrado ser una herramienta prometedora para el análisis de los agentes infecciosos. Otra región comúnmente utilizada para la identificación bacteriana es 5'-fragmento final del gen 16S ARNr, que trata de 500 pb y las regiones flancos de la V1, V2 y V3.

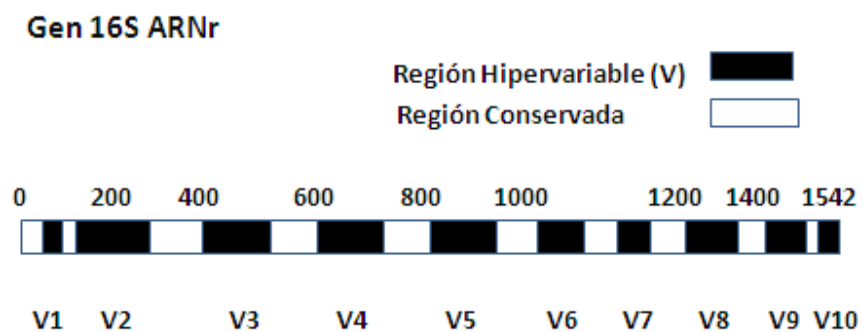


Fig. 2. Esquema del gen 16S ARNr (~1500 pb), localizado en la subunidad ribosomal (30S). Las zonas claras representan las regiones conservadas que son el objetivo de la amplificación por PCR y la secuencia de ADN de la bacteria.

Gen *rpoB*

Morse et al., informó por primera vez la universalidad del gen *rpoB* en las bacterias. El origen antiguo del gen indica que tiene el potencial para ser utilizado como un cronómetro molecular de gran alcance.⁴² Desde el trabajo del pionero Rowland et al., la secuenciación del gen *rpoB* ha sido utilizado, para la identificación molecular de las bacterias en la microbiología clínica. Entre los principales genes de bacterias, *rpoB* ha surgido como una de las pocas posibilidades de candidatos para el análisis filogenético y

de identificación bacteriana.⁴³ La ARN polimerasa (ARNP) es una enzima crucial en el proceso de transcripción y es el objetivo final de las vías reguladoras controlando la expresión del gen en todos los organismos vivos. ARNP en las bacterias es responsable de la síntesis de ARNm, ARNr y ARNt. El núcleo de la enzima ARNP (400kda) está formado por cinco subunidades, incluyendo un α -dímero, β subunidad, β' subunidad y ω subunidad. Estas subunidades se convierten en una holoenzima tras la unión de una subunidad σ , que inicia la transcripción de los promotores. La mayoría de la función catalítica de ARNP se lleva a cabo por la β subunidad, que es codificada por el gen *rpoB*.⁴⁴

El gen *rpoB* contiene regiones alternadas, conservadas y variables. Varios estudios han indicado que la región hipervariable, del gen *rpoB* es la más adecuada para la identificación y discriminación filogenética en los niveles de especies y subespecies. Esta región se encuentra entre las posiciones 2300 a 3300 y puede ser secuenciado usando sólo una par de iniciadores para PCR.⁴⁴

El gen de la ARN polimerasa de la subunidad beta, *rpoB*, se usa como una alternativa al gen 16S ARNr en la identificación de especies y ha sido utilizado satisfactoriamente para la elaboración de relaciones filogenéticas en varios grupos de bacterias y normalmente tiene un poder discriminatorio más alto que el 16S ARNr a nivel especie.^{7,31,34,44,45} En este sentido y utilizando a varios miembros de la familia *Pasteurellaceae*, se ha demostrado que al emplear a los genes 16S ARNr y *rpoB* existe una buena base filogenética en la familia.^{7,32,46} Además de la utilización de secuencias parciales de *rpoB* para el

delineando de relaciones filogenéticas, el gen también se ha aplicado para mejorar el diagnóstico.⁴⁷

Para la clasificación de una especie es necesaria la formación de un grupo monofilético basado en 16S ARNr y haciendo un análisis filogenético de la secuencia.³¹ La secuenciación del gen 16S ARNr y el análisis filogenético se han aplicado a la taxonomía bacteriana. Aunque el gen 16S es, sin duda excelente para la clasificación de las bacterias desde el nivel de dominio a la familia o género, carece de una resolución por debajo de ese nivel.⁴⁸ Desafortunadamente, 16S ARNr no es una medida perfecta que incluya divergencias entre bacterias por lo que es necesario el uso de otros marcadores. Junto con el gen 16S ARNR, *rpoB* ha ayudado a delinear nuevas especies de bacterias y perfeccionar el análisis de la comunidad bacteriana. La correcta identificación de agentes bacterianos de relevancia clínica es de suma importancia para poder conocer la patogenia y epidemiología de infección causada por cepas bacterianas, así como para conocer la biología de cada microorganismo y desarrollar las medidas necesarias para su prevención y control.

Hipótesis

La secuencia de los genes 16S ARNr y *rpoB*, permitirá la determinación de la especie de *Mannheimia* spp., y su relación filogenética con la familia *Pasteurellaceae*.

Objetivos

1.-Identificar la especie de cepas de *Mannheimia* spp., mediante la secuenciación de los genes 16S ARNr y *rpoB*.

2.-Determinar la relación filogenética de las cepas de *Mannheimia* spp., con miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Material y Métodos

Cepas

Se utilizaron 30 cepas de *Mannheimia* spp., de las cuales 15 fueron aisladas de exudado nasal recolectadas en un complejo productor de leche localizado en el Valle Central de México y 15 de pulmón neumónico de bovinos lecheros recolectadas en el rastro de Gómez Palacios en el estado de Durango. Las cepas fueron identificadas en estudios previos utilizando pruebas convencionales de cultivo y pruebas bioquímicas; así como por el micrométodo de identificación API 20E (BioMerieux, Durham, NC, USA. Inc).

Extracción de ADN

Método 1: Extracción de colonia bacteriana

Las cepas fueron sembradas en agar sangre (5% sangre de oveja) y se incubaron a 37°C por 24 h en aerobiosis. Posteriormente, el cultivo fue colocado en 200µl de agua estéril y se sometió a ebullición por 15 mín., después se centrifugó por 5 min a 11,015xg; 10µl del sobrenadante fue tomado como template de ADN para los ensayos de amplificación de ADN.

Método 2: Tiocinato de Guanidina

Las cepas fueron sembradas en agar sangre (5% de oveja) y se incubaron a 37°C por 24 h en aerobiosis. El cultivo fue colocado en 500µl de agua estéril y centrifugado a 5,507xg durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se agregó 550µl de solución de lisis (tiocianato de guanidina 5M [Sigma,St.

Louis, MO. USA, EDTA 0.1 M [Sigma, St. Louis, MO. USA] y sarcosil 0.05% [Amresco, Solon, Ohio, USA] peso/volumen) y se mezcló 5-10 min. Posteriormente, se agregaron 250µl de acetato de amonio 7.4 M y se dejó en hielo por 10 min.

Se adicionaron 500µl de cloroformo-alcohol-isoamílico (Merck, México) (24:1 V/V) y mezcló durante 4-5 min, centrifugándose a 13,769xg durante 5 min y se recogió el sobrenadante, este paso se repitió dos veces. Por último se tomo el sobrenadante y se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol (Merck, México), y se lavó con alcohol al 70% en tres ocasiones, centrifugándolo por 10 min a 17,900xg. Se dejó secar el ADN y se resuspendió con 50-100µl de agua estéril grado biología molecular (Sigma, St. Louis, MO. USA).

Amplificación de los genes

Los genes 16S y *rpoB* fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la siguiente metodología.

Para el gen 16S ARNr se utilizaron los iniciadores (5'-ATTGAAGAGTTTGATCATGG-3') y (5'-TACCTTGTTACGACTTCACC-3') los que amplificaron un fragmento de 1091(~1100pb)⁴⁶, estos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen 16S de *M. haemolytica* con el número de acceso AF224287. La preparación de PCR fue con un volumen final de 50µl de los cuales 32µl fueron de agua grado biología molecular, 3µl de Mg 50 Mm, 5µl de buffer; 2µl dNTP's 10 Mm, 1µl de cada iniciador a 25 picomoles, 1 unidad de ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 µl de template de ADN.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 min a 94°C, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 56°C por 30 seg, 72°C por 1 min y la extensión final 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio a una concentración final de 10mg/ml, el producto esperado fue de aproximadamente 1,100 pb.

En el caso del gen *rpoB* los iniciadores fueron (5'-CACAACCTTTCGCAATTTATG -3') y (5'-TTGTTGAGTTGAGATGTCCA-3') los cuales amplifican un fragmento de 517 pb, los iniciadores fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *rpoB* de *M. varigena* y depositado en el *GenBank* con el número de acceso AY362962. La preparación de PCR fue con un volumen final de 50µl de los cuales 32 de agua grado biología molecular, 3µl de Mg, 5 de buffer; 2µl dNTP, 1 µl de cada iniciador, 1 unidad de ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10µl de template de ADN.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 min a 94°C como desnaturalización inicial, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 49°C por 40 seg, 72°C por 1 min y la extensión final a 72°C por 6 min. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa fueron visualizados en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a una concentración final de 10mg/ml.

Purificación de productos de amplificación

Los dos genes (16S y *rpoB*) fueron purificados utilizando el sistema comercial QIAquick (Qiagen, Ventura, CA. USA).

Se realizó el corte del gel que contenía la banda deseada, se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml y se le agregaron 300µL de buffer DEA (tiocianato de guanidina) encargado de disolver la agarosa y eliminar el bromuro de etidio para dejar libre el ADN, se incubó a 50° por 10 min (o hasta que estuviera completamente disuelto), se colocó la columna en el tubo y se transfirió el líquido a la columna, centrifugándolo a 16,523xg por un min, se sacó la columna y colocó en otro tubo estéril al cual se le agregaron 500µL de solución de lavado, se centrifugó a 16,523xg por 30 segundos, se sacó la columna y se colocó en otro tubo al cual se le agregaron 750µl de solución de lavado, centrifugándolo a 16,523xg por 30 segundos, la columna se cambió de tubo y se centrifugó a 16,523xg por 1 min, y al final se le agregó 50µl de agua estéril y se centrifugo a 16,523xg por 1 min.

Secuenciación de ADN

Cada producto amplificado fue secuenciado en ambos sentidos mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing, utilizando el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. Las secuencias de ambas cadenas de los productos de PCR fueron alineados, y se obtuvo una secuencia consenso.

La secuencia de nucleótidos de los dos genes fue comparada con la base de datos del *GenBank* para buscar la homología con otros microorganismos de la familia *Pasteurellaceae*.

Los porcentajes de similitud entre las secuencias fueron determinadas mediante el uso del National Center of Biotechnology Information (NCBI). Para el análisis

filogenético, todas las secuencias utilizadas en este estudio fueron ajustadas en la misma dirección. La alineación fue hecha por medio del programa Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Los números de acceso de las secuencias de los genes de muestran en las figuras 3 y 4.

Rastro Gómez Palacios, Torreón.		Centro del Valle de México	
No de acceso	GenBank Cepa	No de acceso	GenBank Cepa
GQ861078	TOR1	GQ869546	TZY1
GQ861079	TOR2	GQ869547	TZY2
GQ861080	TOR3	GQ869548	TZY3
GQ861081	TOR4	GQ869549	TZY4
GQ861082	TOR5	GQ869550	TZY5
GQ861083	TOR6	GQ869551	TZY6
GQ861084	TOR7	GQ869552	TZY7
GQ861085	TOR8	GQ869553	TZY8
GQ861086	TOR9	GQ869554	TZY9
GQ861087	TOR10	GQ869555	TZY10

```

tgatgcagccatgccgctgaatgaagaaggccttcgggtgtaaagttcttcggtagcgaggaaggtgctttgtaataagacaagcaa
ttgacgttaactacagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccggtaatacggggggtgcaagcgttaactcggataactggg
cgtaaagggcacgcaggcggacttttaagtgagatgtgaaagccccgggcttaacctgggaattgcatttcagactgggagctagagtac
tttagggaggggtagaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatgtggaggaataccgaagcgaaggcagcccttgggaatgta
ctgacgctcatgtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgtagtccacgccgtaaacgctgtcgattggggattgggct
ttaagcttggtgccgtagcctaactgataaatcgaccgctggggagtagcggccgcaagggttaaaactcaaatgaattgacgggggccc
gcacaagcgggtggagcatgtggttaattcgtatgcaacgcgaagaaccttactactcttgacatccagagaatctgtagagatacaga
gtgccttcgggaactttgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgttgaaatgttgggtaagtccgcaacgagcgcaaccctt
atcctttgtccagcgatttgggtcgggaactcaaaggagactccgggtgataaacgggaggaaggtggggatgacgcaagtcatcatgg
cccttacgtagtagggctacacagctgctacaatggcgtatacagagggcagcagccagcagtggtgagcgaatctcaaaagtagctt
aagtcggattggagctgcaactcagctcatgaagtcggaatcgtagtaatcgaatcagaatgttcggtgaaatcgttcccgggcc
ttgtacacaccgccgtcacacatgggagtggtgtaccagaagtagatagcttaacctcggggggcggtttaccacggatgatt c

```

Fig.3. Números de acceso para las cepas de *M. varigena* obtenidas con el gen 16S ARNr depositadas en el *GenBank*, las cepa TOR10 incluye TOR11, TOR12, TOR13, TOR14 y TOR15, la cepa TZY10 incluye TZY11, TZY12, TZY13, TZY14 y TZY15. La secuencia de *M. varigena* 16S TOR1.

Rastro Gómez Palacios, Torreón.		Centro del Valle de México	
No de acceso GenBank	Cepa	No de acceso GenBank	Cepa
GU017975	TOR1	GU198214	TZY1
GU017976	TOR2	GU198215	TZY2
GU017977	TOR3	GU198216	TZY3
GU017978	TOR4	GU198217	TZY4
GU017979	TOR5	GU198218	TZY5
GU017980	TOR6	GU198219	TZY6
GU017981	TOR7	GU198220	TZY7
GU017982	TOR8	GU198221	TZY8
GU017983	TOR9	GU198222	TZY9
GU017984	TOR10	GU198223	TZY10
GU017985	TOR11	GU198224	TZY11
GU017986	TOR12	GU198225	TZY12
GU017987	TOR13	GU198226	TZY13
GU017988	TOR14	GU198227	TZY14
GU017989	TOR15	GU198228	TZY15

```

taacgctctgtccgattgtcgtgctctaagaacggaattaacgctgccgccacagaaccactgttgagttgagatgcatataactgaac
ttcttcgggttgaataaacctgactcaccctgctgacggcaagttacataagtatcagtaaagcggagtttcatctaagttgagttcgct
gagcaatgatattattgctcttcaatcgtgataagctcgtctcttctgttacttgaccatcaaccactttacggaatggcgtttctaaac
cgtagttattggtacgacacacagaaagtgagttgatcaaaccgatgttggaccctctggggttcaattggacacaaacgaccgtag
tgagtcgggtgtacgtctcgaacctcaaagccccacgctcacgggttaaaccaccggacctaatgcagaaatacggcgtttgtcgtaa
cctctgaacgccggtattttggtccataaattgcgaagttgtgag

```

Fig.4. Números de acceso para las cepas de *M. varigena* obtenidas con el gen *rpoB* depositadas en el *GenBank* y la secuencia de *M. varigena rpoB* TZY15.

Análisis genético de las secuencias

Se utilizó el programa Modeltest (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>)⁴⁹ para determinar el mejor modelo de evolución que se ajusta a los datos analizados. Los modelos de sustitución de nucleótidos escogidos fueron: Hasegawa-Kishino-Yano con tasa gamma (HKY+G) para las secuencias del *rpoB*, el modelo Hasegawa-Kishino-Yano con tasa gamma y sitios invariables (HKY+G+I) fue empleado para las secuencias del gen 16S ADNr y para ambos marcadores (*rpoB* + 16S ADNr) se empleo el modelo de Tiempo General Reversible con distribución gamma y sitios invariables (GTR+G+I). Con estos modelos de evolución se generaron árboles filogenéticos en el programa Mr. Bayes

versión 3.1.2 (<http://mr bayes.csit.fsu.edu/>).⁵⁰⁻⁵² Para la reconstrucción filogenética, se realizó el análisis con diez millones de generaciones, recolectando los árboles mejores soportados (valores de verosimilitud bajos) cada 100 generaciones con los cuales se realizó un árbol de consenso de mayoría, los arboles con soportes estadísticos bajos fueron descartados de este análisis. Para la visualización gráfica de los árboles obtenidos se utilizó el programa TreeView(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)⁵³ La especie *P. multocida* fue empleada como grupo externo, por tratarse de un género cercano evolutivamente al grupo de estudio (M). Para determinar el valor de similitud las diferencias genéticas entre especies se construyó una matriz de distancias de Kimura dos parámetros y otra matriz identificando el número de diferencias nucleotídicas entre cada uno de los individuos analizados, empleando para ello el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>) versión 3.0.⁵⁴

Análisis genético poblacional

Se utilizaron estadísticas de población genética para investigar y describir la estructura genética entre las poblaciones de *M. varigena* en dos diferentes regiones de México. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) y F de Wright se calcularon con ARLEQUIN 3.5.1.2 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>) y DNAsp versión 5 (<http://www.ub.es/dnasp/>). El coeficiente de correlación de genes de diferentes individuos en la misma población (F_{st}) y el índice de migración (Nm) interpretado como el número

absoluto de los organismos migrantes que entran en cada uno de las subpoblaciones en cada generación, se calcularon en las poblaciones a través de cada grupo principal para evaluar la variación genética entre las poblaciones dentro de cada secuencia ITS-2.

Resultados

Cepas

Las cepas que sembradas en agar sangre (5% sangre de oveja) y se incubaron a 37°C por 24h en aerobiosis, mostraron actividad hemolítica y microscópicamente se observaron cocobacilos Gram-negativos no-móviles.

Extracción de ADN y amplificación PCR

Se realizó extracción de ADN por Método 1 y 2 de las 30 muestras el cual fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5%. El ADN extraído se utilizó en la preparación de PCR y de esta se obtuvieron productos amplificados del gen 16S ADNr mostrando una banda de ~1,100 pb (Fig. 5).

Asimismo el ADN fue utilizado para amplificar el gen *rpoB*, de donde se obtuvo un producto amplificado de ~500pb (Fig. 6).

Secuenciación 16S ADNr y *rpoB*

Las secuencias obtenidas del gen 16S ADNr TOR 1-15 y TZY 1-15 se compararon con la base de datos del *GenBank* y se encontró una homología del 100% con la cepa de *M. varigena* H39 DQ301927, 97% *M. granulomatis* ATCC49244 NR_024899, 97% *M. ruminalis* HPA93 AY425287, 96% *M. glucosida* P733 CCUG 38460 AF053892, 91% *M. haemolytica* A1 82 EU177424.

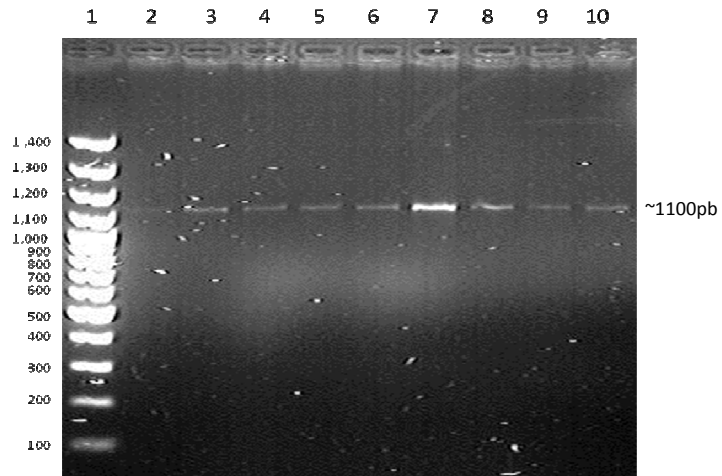


Fig. 5. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Amplificación de la subunidad 16S ADN_r, carril 1.- marcador de peso molecular 100 pares de bases; carriles 2 al 10.- aislamientos de *Mannheimia* spp.

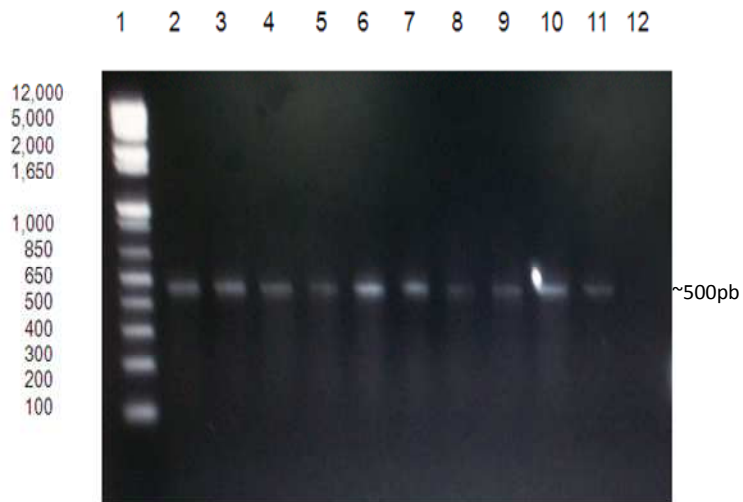


Fig. 6. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Amplificación del gen *rpoB*. Carril 1.- marcador de peso molecular 1 kb ladder plus; carriles 2 al 11.- aislamientos de *Mannheimia* spp; carril 12.- Control negativo.

Las secuencias obtenidas del gen *rpoB* TOR 1-15 y TZY 1-15 se compararon con la base de datos del *GenBank* y se encontró una homología del 99% con la cepa de *M. varigena* CCUG 38462 AY362962, 92% *M. granulomatis* ATCC 49244 AY362960, 92% *M. granulomatis* 557923 GQ856691, 92% *M. glucosida* CCUG 38457 AY362959.

Análisis filogenético del gen 16S ADNr

Los análisis de variación genética revelan que el gen 16S ARNr con 1,091 pb presenta un 16% de sitios variables y 14% de sitios filogenéticamente informativos. Con esta información se realizó la reconstrucción filogenética de las especies *Mannheimia* utilizando las siguientes secuencias del gen 16S ARNr obtenidas del *GenBank*: *M. granulomatis* AF053901, DQ301925, DQ301924, NR024899, *M. ruminalis* AY425288, Y425287, NR024898, *M. haemolytica* AF060699, DQ301920, DQ301923, DQ301922, NR024896, *M. varigena* NR_024897, DQ301943, DQ301926, DQ301927 y como grupo externo *Pasteurella multocida* FJ231207.

En el árbol filogenético se pueden identificar 5 clados o grupos estadísticamente bien definidos, el primero de ellos representado por *M. granulomatis* con un valor de *bootstrap* de 61% y 100% de probabilidad posterior. Un segundo clado formado por cepas de *M. ruminalis* con valor de *bootstrap* y probabilidad posterior de 100%. Un tercer clado formado por *M. haemolytica* con valor de *bootstrap* de 98% y probabilidad posterior de 100%, un cuarto clado por *M. glucosida* con un valor de *bootstrap* de 99% y probabilidad posterior de 100% y finalmente un quinto clado formado por *M. varigena*, y por las

cepas analizadas en este trabajo (TOR7, TXY9, TOR8, H39, TOR1, TOR4, TOR5, TXY3, TZY7, TZY4, TZY5, TZY2, TOR2, TOR9, TOR10, TZY10, TOR3, TZY1, TZY8, TZY6, TOR6) con valor de *bootstrap* de 92% y probabilidad posterior de 100%.

Análisis filogenético del gen *rpoB*

Los análisis de variación genética para este gen revelan un 30% de sitios variables y 14% de sitios filogenéticamente informativos. Basados en esta información se realizó la reconstrucción filogenética utilizando las siguientes secuencias del gen *rpoB* obtenidas del *GenBank*: *M. granulomatis* GQ856691, AY362960 *M. ruminalis* AY362961 *M. haemolytica* AY170217, EU177426, EU177428, EU177427, EU177431, EU177425, EU177429 *M. varigena* AY362962 y como grupo externo *P. multocida* FL268770.

Para el gen de *rpoB* se pudo identificar los mismos 5 clados: el primero de ellos representado la especie *M. ruminalis*. Un segundo clado formado por cepas *M. glucosida*. Un tercer clado formado por *M. haemolytica*, un cuarto clado representado por *M. granulomatis* y finalmente un quinto clado formado por *M. varigena* y por las cepas identificadas en este trabajo. Todos estos clados soportados con valores de *bootstrap* y probabilidad posterior mayores a 84 y 78% respectivamente.

Análisis filogenético de los genes 16S ADNr y *rpoB*

Un tercer árbol filogenético fue generado con las secuencias de los genes 16s y *rpoB* sumando un total de 1,600 pb. Los

resultados obtenidos soportaron los resultados anteriores. En este nuevo árbol se observa una mayor relación filogenética entre *M. varigena* y las cepas identificadas en este trabajo, y estas a su vez muestran menor distancia evolutiva con *M. granulomatis* que con las otras especies de *M. haemolytica*, *M. glucosida* y *M. ruminalis*.

Análisis de distancias genéticas

Se calcularon las diferencias de los nucleótidos entre una de las secuencias analizadas, además se calcularon las distancias genéticas empleando el método de Kimura de dos parámetros.

Las diferencias de nucleótidos de *M. varigena* obtenida del *GenBank* con las secuencias analizadas en este estudio mostraron alta similitud, es decir 4 nucleótidos de diferencia con la secuencia de *rpoB* y de 0 a 16 nucleótidos con el gen 16S ADNr (Tabla 2). Indicando una similitud de 99.2% para *rpoB* y 98.5% para 16S ADNr. Para las otras especies dentro del género *Mannheimia* los valores de similitud fueron menores a 90.5%(49/517) para *rpoB* y 97.4%(28/1091) para 16S ADNr.

Las muestras analizadas en este estudio mostraron distancias genéticas menores o iguales a 0.01 con el gen *rpoB* mientras que para 16S ADNr fueron de 0.02 comparadas con las secuencias de *M. varigena* publicadas en el *GenBank*. En contraste con las otras especies del género *Mannheimia*, cuyas distancias genéticas fueron mayores a 0.08 para *rpoB* y 0.03 para 16S ADNr (Tabla 3).

Estudio Genético Poblacional

Los análisis de genética poblacional con el gen *rpoB* mostraron una separación entre las poblaciones correspondientes a los aislados de Tizayuca y los aislados de Torreón, entre estas dos poblaciones se detectaron los índices de $F_{st}=0.64$ y $N_m=0.29$, lo cual indica una alta diferenciación genética y un bajo valor de migración. Para las secuencias del gen 16S no se pudo realizar el análisis poblacional debido a la alta similitud entre las secuencias de las poblaciones analizadas.

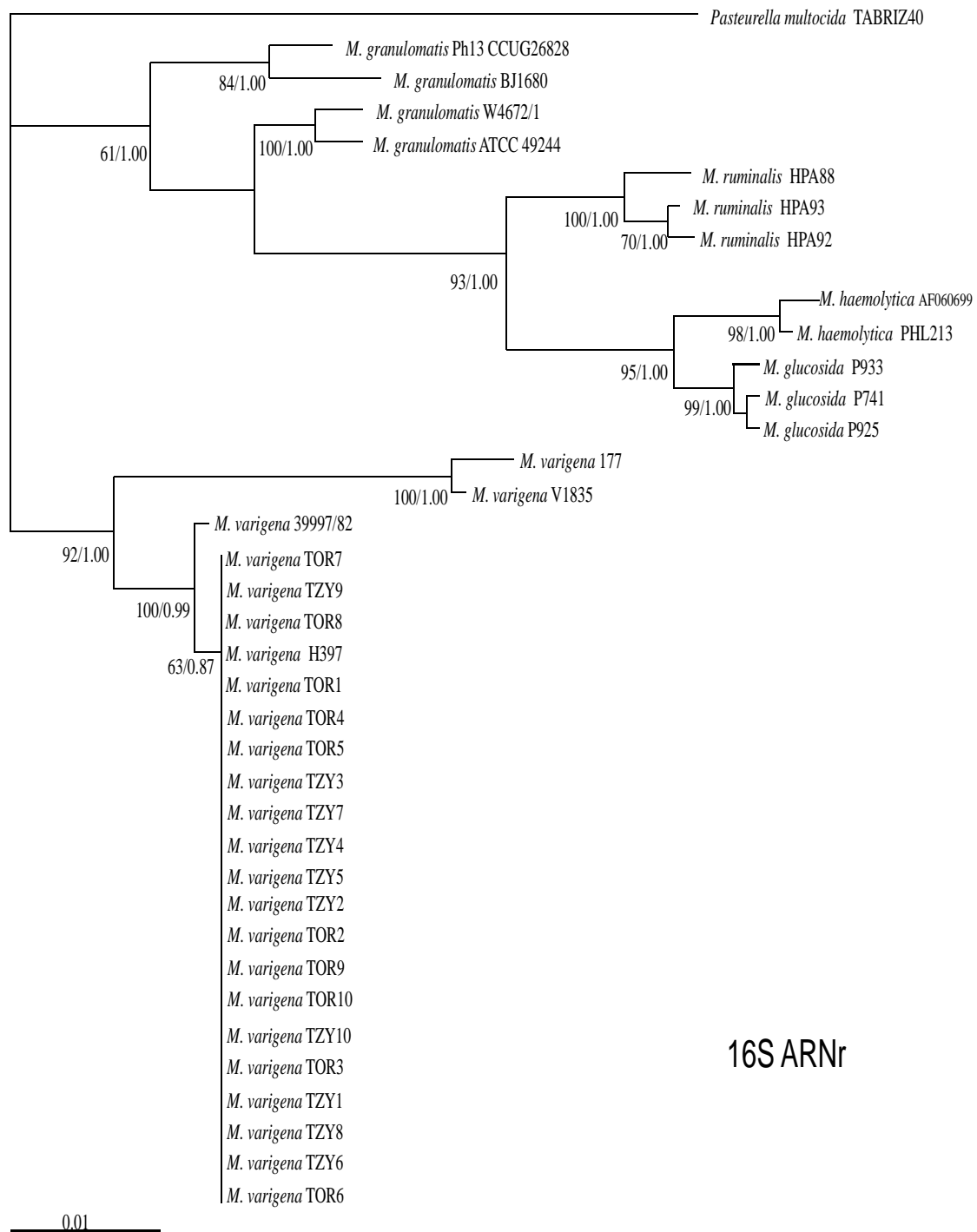


Fig. 4. Árbol filogenético de las secuencias de *M. varigena* usando el gen de 16S ARNr. Los números en los nodos indican valores de *Bootstrap* y probabilidad posterior del análisis de UPGMA y Bayesiano.

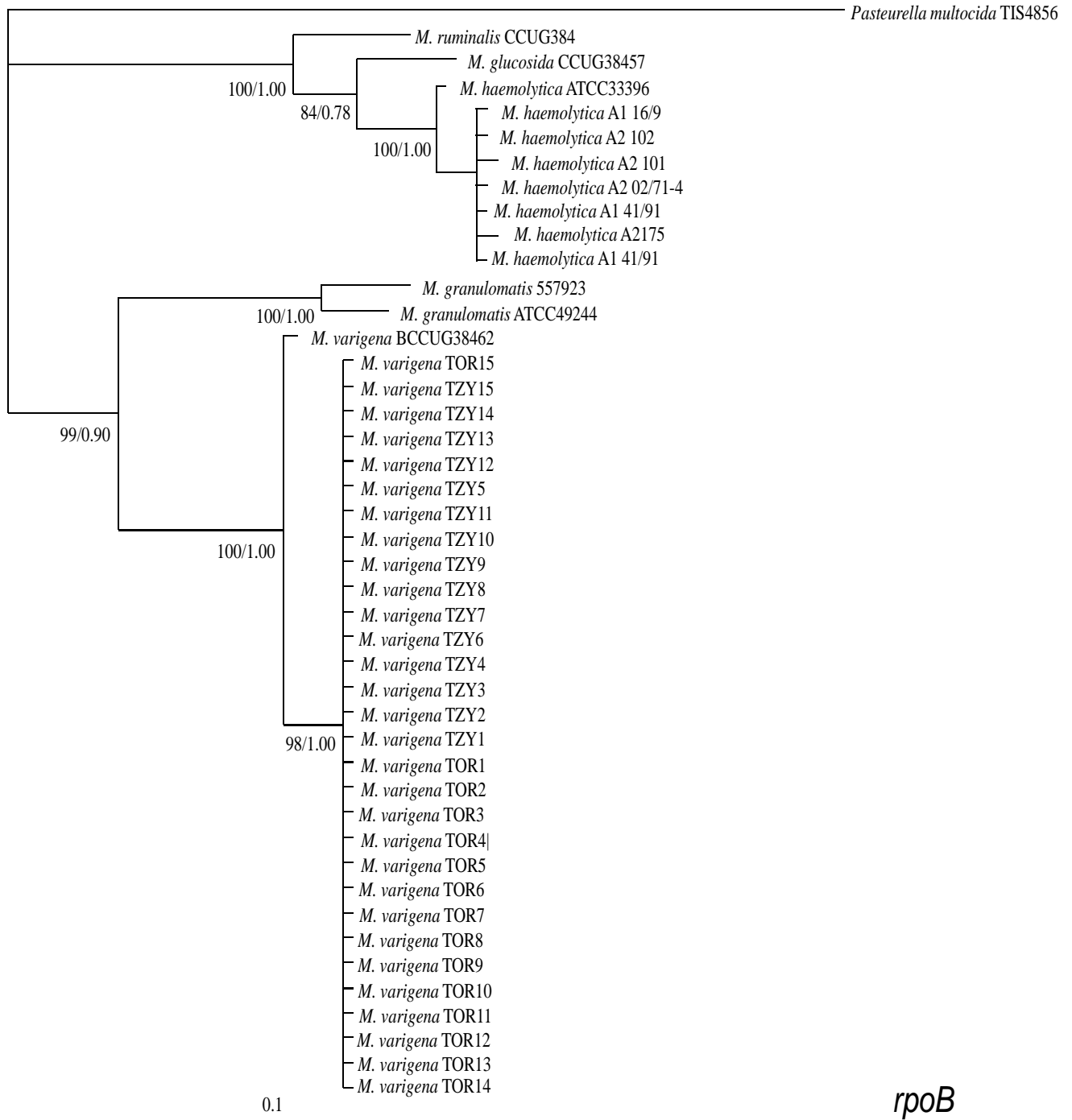


Fig. 5. Árbol filogenético de las secuencias de *M. varigena* usando el gen de *rpoB*. Los números en los nodos indican valores de *Bootstrap* y probabilidad posterior del análisis de UPGMA y Bayesiano.

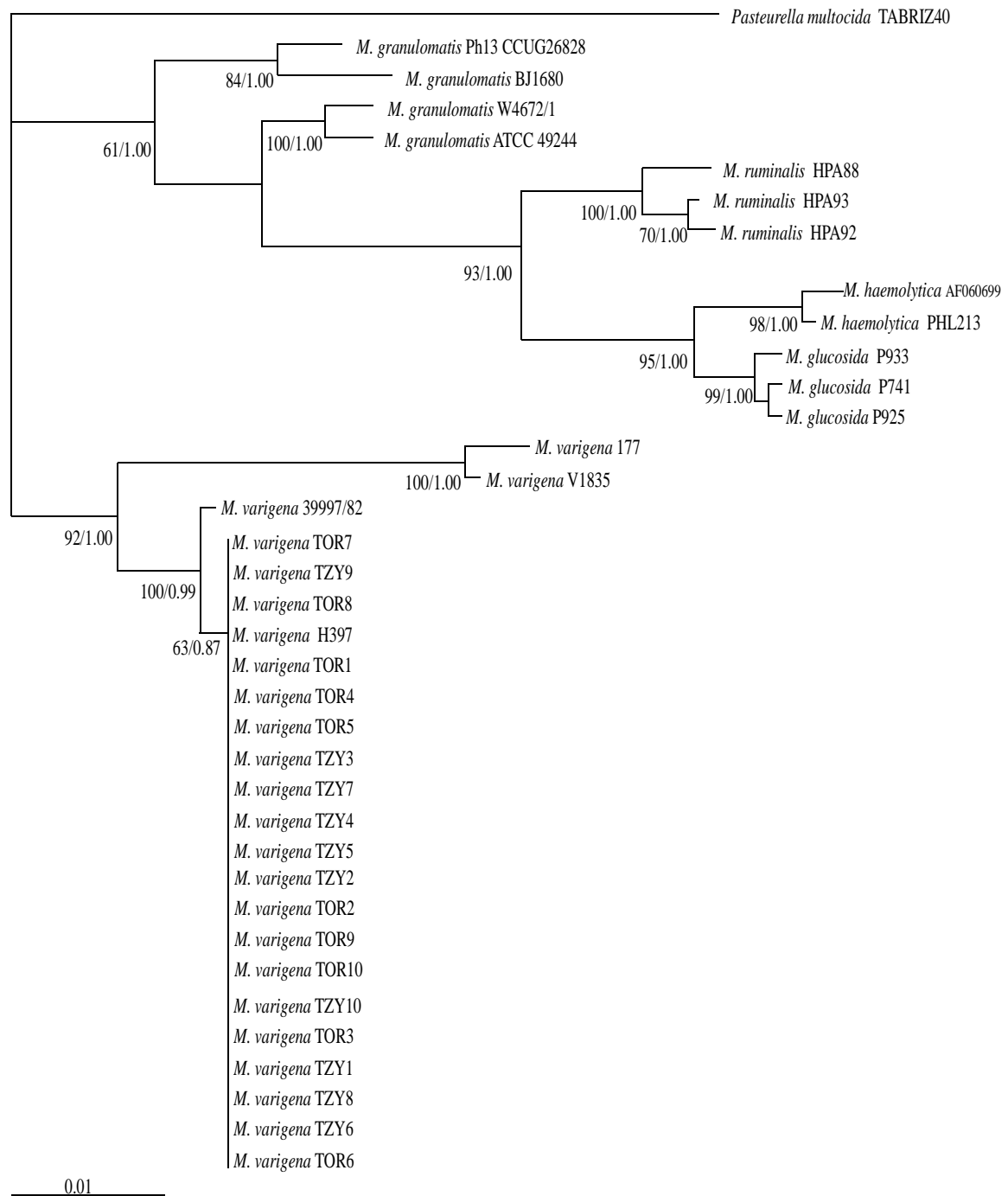


Fig. 6. Árbol filogenético de las secuencias de *M. varigena* usando los genes 16S ARNr y *rpoB*. Los números en los nodos indican valores de *Bootstrap* y probabilidad posterior del análisis de UPGMA y Bayesiano.

Discusión

En los trabajos realizados por Jaramillo y colaboradores en los años de 2007 y 2008,^{8,9,10} reportan aislamientos de *M. haemolytica* y *P. multocida* del tracto respiratorio alto de bovinos del valle central y región norte de México y de dos rastro de México, en estos trabajos se utilizaron diferentes métodos para identificar y clasificar a cepas de *Mannheimia* spp. En primer lugar se utilizaron técnicas fenotípicas como la identificación bioquímica clásica y el sistema automatizado API 20E, sin embargo en una gran cantidad de estos aislados no se logró realizar una identificación binominal de género y especie, quedando solo en identificación de género (*Mannheimia* spp).^{8,9,10} En este sentido se les realizó la técnica de hemoaglutinación indirecta y no se encontró reacción positiva a ningún serotipo, por lo que se determinó que eran cepas no tipificables.

En este sentido se ha reportado la utilidad de la pruebas bioquímicas clásicas, como del sistema API 20E en la identificación de diferentes microorganismos, incluyendo *Mannheimia* y *Pasteurella*, sin embargo aún cuando se ha propuesto como una herramienta útil de fácil realización, está puede presentar problemas relacionados con la confusión de resultados derivados de las condiciones de cultivo que pueden influenciar la expresión de algunas características fenotípicas, dando como resultado falsos positivos y falsos negativos.^{8-10,55}

Asimismo se ha reportado que la serotipificación no es una herramienta del todo confiable para la clasificación de *M. haemolytica*, dejando algunas cepas consideradas como no

tipificables^{9,56} esta situación se reportó en un caso clínico donde se menciona que las pruebas fenotípicas de rutina no fueron suficiente para la identificación de la especie del género de *Mannheimia* en un caso de meningitis bovina, por lo que complementan las técnicas fenotípicas con pruebas de genotipificación.⁵⁷

La comparación de las secuencias de genes conservados, con mayor frecuencia los que codifican 16S ARNr, se utilizan para la identificación genotípica de bacterias. Todos los taxa de *Pasteurellaceae* se han caracterizado por la secuenciación del gen 16S ARNr y la secuencia de este gen ha sido el punto de partida para la clasificación e identificación de la mayoría de los taxones, incluyendo los métodos de detección de PCR desarrollados.⁵⁸

La utilización de métodos moleculares permitió la identificación de los aislamientos que estaban clasificadas como no tipificables bajo los criterios de pruebas bioquímicas y fenotípicas, la secuenciación del gen 16S ADNr permitió identificar la especie de *Mannheimia* determinándola como *Mannheimia varigena*, así como realizar relaciones filogenéticas⁵⁹ que incluyen a géneros como *Mannheimia*, *Pasteurella*^{60,61} y otros géneros diferentes a esta familia como por ejemplo *Mycobacterium*.⁴⁴ El gen 16S es incapaz de detectar variaciones génicas finas entre aislados de la misma especie⁶¹ por lo que fue reforzado con el gen de la subunidad beta *rpoB* para estos fines.

El gen *rpoB* ha sido utilizado para definir relaciones filogenéticas en varios grupos de bacterias, dentro de la familia *Pasteurellaceae* en el caso de la separación de *Histophilus somni*⁶² así como en otros géneros fuera de la

familia como *Brucella*⁶³ y su poder discriminatorio es mayor que las secuencias de 16S ADNr.⁶⁴ En estudios previos comparativos el gen *rpoB* a nivel de género muestra similitudes de 85-88% en las secuencias de nucleótidos.⁶⁵ La resolución del gen *rpoB* dentro de la familia *Pasteurellaceae* es generalmente mayor que las secuencias obtenidas con 16S ADNr. Por lo que el gen *rpoB* no solo complementa a 16S ADNr, sino que es una gran herramienta de gran alcance para la revisión de la taxonomía de la familia *Pasteurellaceae*.^{47,64}

La secuencia entera del gen *rpoB* tiene el poder necesario para describir una nueva especie de bacteria. Con una fracción (300-750 pb) de la secuencia del gen *rpoB* es suficiente para una precisa identificación de aislamientos clínicos. La identificación basada en la secuencia de *rpoB* parcial es posible cuando se encuentra un alto valor de similitudes a una secuencia de una cepa de referencia bien conocidos.⁵⁹ Esto confirma que la variabilidad interespecie en enterobacterias es aproximadamente tres veces mayor que 16S ADNr.⁶⁶

Los taxonomistas definen una especie como: cepas que tengan un 70% o más de similitud de ADN por re-asociación. Especies con este nivel de relación característica tienen 97 por ciento o más secuencias identificadas con el gen 16S ARNr. Cepas con menos de 97.5% de similitud en la secuencia del gen 16S ADNr son improbables para relacionarlos con otro nivel de especies.⁴¹ Los valores obtenidos en este trabajo con el gen 16S ADNr se encuentran por arriba de este valor (100%), a su vez este dato se reforzó con el gen *rpoB* que confirmó que las cepas pertenecen a *M. varigena* con una valor de similitud de 99%, este gen es una herramienta alternativa para la identificación genotípica bacteriana.⁶⁶

Se realizó un estudio filogenético con el gen 16S ADNr donde se pudo observar la identificación de *M. varigena* dentro del género, la única diferencia resaltable fue que en el árbol realizado con las secuencias del gen *rpoB* el quinto clado mostró una separación entre las muestras obtenidas de Tizayuca y Gómez Palacios. Esto nos llevó a la realización de un estudio de genética poblacional entre estas dos poblaciones, se detectaron los índices de $F_{st}=0.635$ y $N_m=0.29$ lo cual indica una alta diferenciación genética y un bajo valor de migración. Debido a que el gen 16S no mostró separación de grupos en los aislados no se pudo realizar el análisis población debido a la alta similitud de las secuencias. Esta situación se podría explicar debido a que la población de bovinos en los establos de Tizayuca es continuamente incrementada con animales de otras regiones, incluyendo animales de la cuenca lechera de Torreón.

Debido a los cambios constantes en la clasificación taxonómica de muchas especies de la familia *Pasteurellaceae*, es necesario un nuevo, racional y preciso procedimiento para la identificación de rutina en laboratorios veterinarios, para las especies más relevantes y frecuentes.² La amplificación y secuencia de genes de material clínico puede mejorar nuestra comprensión de la patogénesis microbiana y predecir mejor las respuestas a la terapia y los resultados.³⁴ Ejemplos de esto es un reporte de la secuencia completa de un plásmido de resistencia de *M. varigena*, el análisis de este plásmido revela una nueva disposición de tres genes de resistencia,⁶⁷ también un estudio realizado en Dinamarca donde se menciona que varias especies de *Mannheimia* diferentes a *M. haemolytica* podrían estar involucradas en el complejo respiratorio bovino,⁵⁹ así como un reporte de la

existencia de varias especies de *Mannheimia* en aparato respiratorio alto en ovejas.¹⁷ Hay autores que no están totalmente de acuerdo en incluir el uso de la secuencia del gene 16S ADNr, por la elevación de los costos y el acceso no restringido a las bases de datos publicas.⁶⁸

En los últimos años otra alternativa dentro de los métodos moleculares es el uso de PCR tiempo-real porque reduce la manipulación posterior a la amplificación y esto hace un análisis más rápido y reduce el riesgo de contaminación.⁶⁹

Conclusiones

La secuencia de la subunidad 16S ADNr permitió identificar 30 cepas de *M. varigena* procedentes de dos regiones geográficas de México.

El análisis de la secuencia parcial del gen *rpoB* confirmó la especie y mostró diferencias no significativas entre las cepas obtenidas de Tizayuca y Torreón.

Este es el primer reporte de aislamientos, identificación y análisis filogenético de *Mannheimia varigena* en México y Latinoamérica.

Referencias

- 1.- ZECCHINON L, FETT T, DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36:133-156.
- 2.- DOUSSE F, THOMANN A, BRODARD I, KOREZAK BM, SCHLATTER Y, KUHNERT P, MISEREZ R, FREY J. Routine phenotypic identification of bacterial species of the family Pasteurellaceae isolated from animals. J Vet Diagn Invest 2008; 20:716-724.
- 3.- CHRISTENSEN H, FOSTER G, CHISTENSEN JP, PEENYCOTT T, OLSEN JE, BISGAARD M. Phylogenetic analysis by 16S rDNA gene sequence comparison of avian taxa of Bisgaard and characterization and description of two new taxa of Pasteurellaceae. J Appl Microbiol 2003;95:354-363.
- 4.- REDFIELD RJ, FINDLAY WA, BOSSÉ J, KROLL JS, CAMERON DS, NASH HE. Evolution of competence and DNA uptake specificity in the *Pasteurellaceae*. BMC Evol Biol 2006;6(82):1-15.
- 5.- RICE JA, CARRASCO-MEDINA L, HODGINS DC, SHEWEN PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2008; 8(2): 117-128.
- 6.- RICE JA, CARRASCO-MEDINA L, HODGINS DC, SHEWEN PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2008; 8(2):117-128.
- 7.- ADAMU JY. *Mannhemia haemolytica*: Phylogeny and Genetic Analysis of its major virulence factors. Isr J Vet Med 2007; 62:1.
- 8.- JARAMILLO-ARANGO CJ, HERNÁNDEZ-CASTRO R, CAMPUZANO-OCAMPO V, SUÁREZ-GÜEMES F, DELGADO-GONZÁLEZ R, TRIGO-TAVERA F.

Characterisation of *Mannheimia* sp. and *P. multocida* Strain Isolated from Bovine Pneumonic Lungs in Two Slaughterhouses in Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 6(12): 1398-1404.

9.- JARAMILLO-ARANGO CJ, HERNÁNDEZ-CASTRO R, SUÁREZ-GÜEMES F, MARTÍNEZ-MAYA JJ, AGUILAR-ROMERO F, JARAMILLO-MEZA L, TRIGO FJ. Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exúdate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Res Vet Sci 2008; 84:7-13.

10.-JARAMILLO CJ, HERNANDEZ-CASTRO R, SUAREZ-GÜEMEZ F, MARTÍNEZ-MAYA J, AGUILAR-ROMERO F, JARAMILLO-MEZA L, TRIGO FJ. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* Isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in nort-central of Mexico. Journal of animal and veterinary Advances 2007;6(3):404-409.

11.- ANGEN Ø, QUIRIE M, DONACHIE W, BISGAARD M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping. Vet Microbiol 1999; 65:283-290.

12.- TEFERA G, SMOLA J. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Mannheimia*: chances in taxonomy. Vet Med 2001; 46(4): 119-124.

13.- POULSEN LL, REINERT TM, SAND RL, BISGAARD M, CHRISTENSEN H, OLSEN JE, STUEN S, BOJESEN AM. Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. In apparently healthy sheep in Norway. Acta Vet Scan 2006; 48(1):1-7.

14.- DAVIES RL, PASTER BJ, DEWHIRST FE. Phylogenetic Relationships and Diversity within the *Pasteurella Haemolytica* Complex Based on 16S rRNA sequence comparison and

outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46(3): 736-744.

15.- ILHAN Z, KELEŞ I. Biotyping and serotyping of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* isolated from lung samples of slaughtered sheep in the Van region. *Turk J Vet Anim Sci* 2007; 31(2): 137-141.

16.- BLACKALL PJ, BISGAARD M, STEPHENS CP. Phenotypic characterization of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust Vet J* 2002; 80:87-89.

17.- POULSEN LL, REINERT TM, SAND RL, BISGAARD M, CHRISTENSEN H, OLSEN JE, STUEN S, BOJESEN AM. Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Vet Scand* 2006;47(70):1-7.

18.- ANGEN O, MUTTERS R, CAUNGANT DA, OLSEN JE, BISGAARD M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *Haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. Nov., *Mannheimia glucosidal* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49:67-86.

19.- ANGEN Ø, AHRENS P., BISGAARD M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol* 2002; 84:103-114.

20.- KEHRENBERG C, SCHULZE-TANZIL G, MARTEL J-L, CHASLUS-DANCLA E, SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella*

and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 2001; 32: 323-339.

21.- JEYASEELAN S, SREEVATSAN S, MAHESWARAN SK. Role of *Mannheimia haemolytica* leucotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev* 2002; 3(2):69-82.

22.- HIGHLANDER SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia*. *Front Biosci* 2001; 6:1128-1150.

23.- GIOIA J, QIN X, JIANG H, CLINKENBEARD K, LO R, LIU Y, FOX GE, YERRAPRAGADA S, MCLEOD MP, MCNEILL TZ, HEMPHILL L, SODERGREN E, WANG Q, MUZNY DM, HOMSI FJ, WEINSTOCK GM, HIGHLANDER SK. The Genoma Sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into Virulence, Natural Competence, and *Pasteurellaceae* Phylogeny. *J Bacteriol* 2006; 188:20, 7257-7266.

24.- HIGHLANDER SK, FEDOROVA ND, DUSEK DM, PANCIERA R, ALVAREZ LE, RINEHART C. Inactivation of *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* Leukotoxin Causes Partial Attenuation of Virulence in a Calf Challenge Model. *Infect Immun* 2000; 68(7): 3916-3922.

25.- KIRKAN S, KAYA O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* Strains Isolated from Pneumonic Lungs of Sheep in the Aydin Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2005: 491-494.

26.- SRIKUMARAN S, KELLING CL, AMBAGALA A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Anim Health Res Rev* 2008;8(2);215-229.

- 27.- KIRKAN S, KAYA O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* Strain Isolated from Pneumonic of Sheep in the Aydin Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2005; 491-494.
- 28.- CHRISTENSEN C, KUHNERT P, BUSSE H-J, FREDERIKSEN W, BISGAARD M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. Int J Syst Evol Microbio 2007; 57:166-178.
- 29.-KUHNERT P, KORCZAK M. Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). Microbiology 2006; 152: 2537-2548.
- 30.- DAHLLÖF I, BAILLIE H, KJELLEBERG S. rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. Appl Environ Microbiol 2000; 3376-3380.
- 31.- RODICIO MA, MENDOZA MA. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(4):238-245.
- 32.- DÍAZ G, WACHER C. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Rev Latinoam Microbiol 2003; 45:30-40.
- 33.- LOUIE M, LOUIE L, SIMOR AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious disease. CMAJ 2000; 163(3): 301-309.
- 34.- PETTI CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. Med Microbiol 2007; 44:1108-1114.

- 35.- JANDE JM, ABBOTT SL. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? J Clin Microbiol 2002; 40(6):1887-1891.
- 36.- MIGNARD S, FLANDROIS JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. J Microbiol Methods 2006;67:574-581.
- 37.- VOLKER G, BARRIE CM. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51, 3-16.
- 38.- GÜRTLER V, MAYALL BC. Genomic approaches to typing, taxonomy of bacterial isolated. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:3-16.
- 39.- OLIVE M, BEAN P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 1661-1669.
- 40.- CAI H, ARCHAMBAULT M, PRESCOTT JF. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. J Vet Diagn Invest 2003; 15:465-469.
- 41.- BALDUS PJ. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory. Mol Diagn 2001; 6(4): 313-321.
- 42.- MORSE,R.et al. Analysis of the beta'subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni*(formely *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic(fast-evolving) bacterium. Int J Syst Bacteriol 1996; 46:1004-1009.
- 43.- ROWLAND GC et al. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta

subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. Biochem Soc Trans. 21;40S

44.- ADÉKAMBI T, DRANCOURT M, RAOULT D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol 2008; 17(1): 37-45.

45.- ADEKAMBI T, DRANCOURT M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54:2095-2105.

46.- CHRISTENSEN H, KUHNERT P, OLSEN JE, BISGAARD M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. Int J Syst Evol Microbio 2004; 54:1601-1609.

47.- KORCZAK B, CHRISTENSEN H, EMLER S, FREY J, KUHNERT P. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54:1393-1399.

48.- STALEY JT. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. Phil Trans R Soc B 2006; 361: 1899-1909.

49.- POSADA D, CRANDALL KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 1998;14(9):817-8

50.- HOLDER M, LEWIS PO. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Nat Rev Genet. 2003;4(4):275-84.

51.- HUELSENBECK JP, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 2001;17(8):754-5.

- 52.- HUELSENBECK JP, RONQUIST F, NIELSEN R, BOLLBACK JP. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. 2001; 294(5550):2310-4.
- 53.- PAGE DM. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Com Applic Biol Scien*. 1996 12;357-358.
- 54.- KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform*. 2004; 5:150-163.
- 55.- VERA YA, RODRIGUEZ EF, GUTIERREZ CB. Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. *Res Vet Sci* 2008; 85(3):453-456
- 56.- ALEXANDER TW, COOK SR, YANKE LJ, BOOKER CW, MORLEY PS, READ RR, GOW SP, MCALLISTER TA. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia ruminalis*. *Vet Microbiol* 2008;130:165-175.
- 57.- CATRY B, OPSOMER G, DECOSTERE A, FEYEN B, DE KRUIF A, HAESEBROUCK F. Fatal meningitis in a calf caused by *Mannheimia varigena*. *Res Vet Sci* 2004;77:187-188.
- 58.- CHRISTENSEN H, BISGAARD M. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. *Berl Munch Tierartl Wochenschr* 2010 ; 123 (1-2) :20-30

59.- CATLY B, BAELE M, OPSOMER G, DECOSTERE A, HAESEBROUCK F. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. Vet Microbiol 2004;98:251-256.

60.- CHRISTENSEN H, ANGEN Ø, OLSEN JE, BISSGARD M. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. Microbiology 2004;150:1757-1767.

61.- DAVIES RL. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strain of avian, bovine, ovine and porcine origin from Englands and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. Microbiology 2004; 150:4199-4210.

62.- ANGEN Ø, AHRENS P, KUHNERT P, CHRISTENSEN H, MUTTERS R. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. Nov. for the three species incertae sedis '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. Int J Syst Evol Microbiol 2003;53:1449-1456.

63.- SAYAN M, YUMUK Z, BILENOGLU O, ERDENLIG S, WILLKE A. Genotyping of *Brucella melitensis* by *rpoB* gene analysis and re-evaluation of conventional serotyping method. Jpn J Infect Dis 2009;62:160-163.

64.-KORCZAK B, CHRISTENSEN H, EMLER S, FREY J, KUHNERT P. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. Int J Syst Evol Microbiol 2004,54; 1393-1399.

65.- GREGERSEN RH, NEUBAUER C, CHRISTENSEN H, BOSEJEN AM, HESS M, BISGAARD M. Comparative studies on (*Pasteurella*) *testudinis* and (*P.*) *testudinis*-like bacterial and proposal of

Chelonobacter oris gen. nov., sp. Nov. as a new member of the family *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:1583-1588.

66.- MOLLET C, DRANCOURT M, RAOULT D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 1997; 26:1005-1011.

67.- KEHRENBURG C, SCHWARZ S. Nucleotide sequence and organization of plasmid Pmvscs1 from *Mannheimia varigena*: identification of a multiresistance gene cluster. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:383-386.

68.- BOUDEWIJNS M. 16S r RNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage?. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3469-3470.

69.- GUENTHER S, SCHIERACK P, GROBBEL M, LÜBKE-BECKER A, WIELER LH, EWERS C. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. *J Microbiol Methods* 2008;75:75-80.

