

**EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA**  
**DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA***  
**CAUSANTES DE BROTES DE CÓLERA AVIAR MEDIANTE ERIC-PCR**

HUBERMAN Yosef<sup>1</sup>, ZOLEZZI Gisela<sup>2</sup>, CHINEN Isabel<sup>2</sup>, LOMÓNACO Jorgelina<sup>1</sup>, MALENA Rosana<sup>1</sup>, NIEVAS Paula<sup>1</sup> y TERZOLO Horacio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INTA, EEA Balcarce, Producción Animal, Bacteriología. RN 226 km 73,3, (07620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina. E-mail: [huberman.yosef@inta.gob.ar](mailto:huberman.yosef@inta.gob.ar)

<sup>2</sup>Servicio de Fisiopatogenia, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

### **INTRODUCCIÓN**

*Pasteurella multocida* es un bacilo o cocobacilo Gram negativo que es el agente causal del cólera aviar, la septicemia hemorrágica bovina, la rinoneumonitis cunícola y la rinitis atrófica porcina, entre varias otras enfermedades más incluyendo infecciones humanas. El cólera aviar es una enfermedad cosmopolita que afecta a todo tipo de aves aunque, debido a su importancia en producción animal, se reporta más frecuentemente en pollos y pavos reproductores. Los brotes de cólera aviar pueden presentarse como una enfermedad fatal aguda o como una infección crónica, aún en aves vacunadas. La técnica de ERIC-PCR permite evaluar la relación genética entre cepas de *P. multocida*. El objetivo de este trabajo es evaluar mediante la técnica de ERIC-PCR la diversidad genética y la relación clonal entre cepas de *P. multocida* que habían sido aisladas de brotes de cólera aviar en granjas de pollos reproductores.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se estudiaron 23 cepas de *Pasteurella multocida* provenientes de 4 brotes de cólera aviar que ocurrieron en 2 empresas avícolas de *Gallus gallus* reproductores pesados de la provincia de Entre Ríos, Argentina.

Empresa N°1: Se estudiaron 4 cepas (correlativamente identificadas del número 1972 al 1975) aisladas de un brote ocurrido en 2008 y otras 5 cepas de otro brote en 2009 (identificadas con los números 2092 y correlativos del 2110 al 2113).

Empresa N°2: Se estudiaron 8 cepas (correlativamente identificadas del número 2084 al 2091) aisladas de un brote ocurrido en 2009 y otras 6 cepas de otro brote en 2012 (correlativamente identificadas del número 2422 al 2427).

Todos los aislamientos fueron identificados como *Pasteurella multocida* (4) y se les realizó la prueba de ERIC-PCR (1) para la caracterización filogenética. Los perfiles moleculares que se obtuvieron fueron fotografiados y analizados con el software Bionumerics 3.5.

### **RESULTADOS**

Empresa N°1: En el primer brote las cepas 1974 y 1975 presentaron un 95% de similitud entre sí y fueron consideradas como integrantes de un mismo clon. Por otro lado, las cepas 1972 y 1973 presentaron un 75% de similitud entre sí y menos de un 70% con el mencionado clon de las cepas 1974 y 1975. En el segundo brote las cepas 2010 y 2011 presentaron un mismo patrón de bandas. Las cepas 2112 y 2113 presentaron un 95% de similitud entre sí, por lo cual fueron consideradas como integrantes de un mismo clon que además presentó una similitud de 80% con la cepa 2092 aunque menos de 70% de similitud con las cepas 2010 y 2011. Al comparar los patrones de bandas entre ambos brotes, se encontró que las cepas 1974 y 1975 están correlacionadas con las cepas 2011 y 2012 (75% de similitud). Además, las cepas 1973 y 2092 presentaron un 95% de similitud entre sí y fueron similares (80%) a las del clon de las cepas 2112 y 2113.

Empresa N°2: En el primer brote las cepas 2087, 2088 y 2089 presentaron entre sí un mismo patrón de bandas. Del mismo modo, las cepas 2090 y 2091 también presentaron entre sí un mismo patrón de bandas. Estas 5 cepas presentaron entre sí un 95% de similitud. La cepa 2084 presentó una similitud del 90% con estas 5 cepas. Además, las cepas 2085 y 2086 presentaron entre sí el mismo patrón de bandas, aunque con menor grado de similitud (80%) con las otras 6 cepas. En el segundo brote las cepas 2422 y 2423 presentaron entre sí el mismo patrón de bandas, como así también las cepas 2425 y 2426. La cepa 2424 presentó otro patrón de bandas que fue correlacionado (92% de

similitud) con el patrón de bandas de las cepas 2425 y 2426, mientras que la cepa 2427 estaba correlacionada (88% de similitud) con el patrón de las cepas 2422 y 2423.

## **DISCUSIÓN**

Las diferentes técnicas moleculares que han sido utilizadas para la caracterización filogenética de cepas de *P. multocida* han confirmado que existe una gran diversidad genética entre los aislamientos, ya sea mediante: el estudio de los perfiles de las proteínas de membrana externa (OMPs) y el análisis de los tipos capsulares (3); el uso de enzimas de restricción – REA (5); la hibridación del ADN (8); o la secuenciación del 16SrDNA (2,6). En la Argentina, aplicando las técnicas de ERIC-PCR y PFGE se demostró que todas las cepas de *P. multocida* que habían sido aisladas de aves silvestres capturadas en la Antártida presentaron similitud genética entre sí (7). Además, estos autores también demostraron que las cepas aisladas de las aves silvestres y las cepas aisladas de aves de corral fueron diferentes. Para comparar el grado de similitud entre cepas mediante ERIC-PCR se debe tener en cuenta la gran variabilidad de los patrones genéticos, ya que cuando se efectúan repeticiones de esta técnica con una misma cepa pueden obtenerse pequeñas diferencias, como por ejemplo, la presencia o ausencia de una determinada banda (1). Por lo tanto, en el presente estudio se consideró que dos o más cepas se reconocen como idénticas si es que las mismas poseen un 90% de similitud entre sí. En la Empresa N°1 se determinó que los dos brotes (2008 y 2009) fueron causados por cepas similares, o sea puede deducirse que muy posiblemente ambos brotes fueron causados por las mismas cepas que circulaban dentro de la granja. Por el contrario, las cepas aisladas de los dos brotes (2009 y 2012) de la Empresa N°2 se diferenciaron claramente ya que presentaron menos de un 70% de similitud; por lo tanto, estos dos brotes se originaron a partir de una nueva cepa que ingresó al establecimiento.

## **CONCLUSIONES**

La aplicación de esta técnica tiene implicaciones prácticas para la prevención del cólera aviar ya que permite discriminar entre cepas provenientes de un mismo o distintos brotes y de esta manera realizar el seguimiento epidemiológico en brotes recidivantes, conocer sobre la aparición de nuevas cepas en la granja o la re-emergencia de cepas que ya habían sido aisladas de brotes anteriores. Este conocimiento permite la aplicación de medidas profilácticas adecuadas en granjas de aves reproductoras.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Amonsin, A., J. F. X. Wellehan, L. L. Li, J. Laber y V. Kapur. DNA fingerprinting of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3025–3031. 2002.
2. Capitini, C. M., I. A. Herrero, R. Patel, M. B. Ishitani y T. G. Boyce. Wound Infection with *Neisseria weaveri* and a Novel Subspecies of *Pasteurella multocida* in a Child who Sustained a Tiger Bite. *Clin. Infect. Dis.* 34: E74-76. 2002.
3. Davies, R. L., R. MacCorquodale y B. Caffrey. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. *Vet. Microbiol.* 91: 169–182. 2003.
4. Huberman, Y. D. y H. R. Terzolo. *Pasteurella multocida* y cólera aviar. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)* 96: 4–15. 2015.
5. Hunt, M. L., B. Adler y K. M. Townsend. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 72: 3–25. 2000.
6. Kuhnert, P., P. Boerlin, S. Emler, M. Krawinkler y J. Frey. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 599–604. 2000.
7. Leotta, G. A., G. B. Vigo, I. Chinen, M. Prieto, R. Callejo y M. Rivas. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 38: 125–129. 2006.
8. Olsen, I., F. E. Dewhirst, B. J. Paster y H. J. Busse. Family I. *Pasteurellaceae* Pohl 1981b, 382 VP (Effective publication: Pohl 1979, 81). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two The Proteobacteria Part B - The Gammaproteobacteria*, second. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley y G. M. Garrity, eds. Springer, East Lansing, MI, USA. pp. 851–866. 2005.