

**EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA**  
**VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA***  
**AISLADAS EN ARGENTINA**

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 el agente causal de diferentes enfermedades como el cólera aviar, la septicemia hemorrágica bovina, la rinoneumonitis cunícola y la rinitis atrófica porcina, entre otras, incluyendo infecciones en humanos. La utilización de técnicas bacteriológicas y serológicas no siempre son suficientes para la clasificación de cepas, dado que no aportan suficiente información para estudios epidemiológicos (14). El desarrollo de técnicas de caracterización basadas en el ADN bacteriano posibilita la diferenciación y clasificación de cepas fenotípicamente idénticas (11). Últimamente se están utilizando técnicas de caracterización molecular junto con la clasificación tradicional (13). En la Argentina se estudiaron comparativamente cepas de *P. multocida* procedentes de aves silvestres, capturadas en la Antártida, con algunas cepas que habían sido aisladas de aves de corral logrando relacionarlas y agruparlas genéticamente mediante ERIC-PCR (9). El objetivo de este trabajo es evaluar, mediante la técnica de ERIC-PCR, la diversidad genética y la relación clonal entre diferentes cepas de *P. multocida*.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron 101 cepas de *Pasteurella multocida* (INTA Balcarce), obtenidos desde 1974 en adelante. Se estudiaron 88 cepas de provenientes casos de cólera aviar que fueron aisladas de reproductores pesados (84 cepas), pavos (2 cepas), ponedoras y faisanes (1 cepa de cada uno). Además, se estudiaron 6 cepas de bovinos, 3 de ovinos, 2 de porcinos y 2 de conejos. Además, se incluyeron las 16 cepas de referencia internacional (3). Se realizó la prueba de ERIC-PCR (1) y los perfiles moleculares fueron analizados con el software Bionumerics 3.5. Se definieron 3 niveles de similitud: Nivel 1 o "Patrón" se asignó cuando las cepas presentaron el mismo perfil de bandas (100% de similitud); Nivel 2 o "Clon" se asignó cuando las cepas presentaron un 90% de similitud (1); y Nivel 3 o "Clúster", cuando las cepas presentaron un 85% de similitud (9).

### **RESULTADOS**

Se detectaron 75 patrones de bandas integrados por 1 a 3 cepas. Otros 3 patrones de bandas incluyeron 4, 5 o 6 cepas. Aplicando el criterio de un 90% similitud (Nivel 2) en todas las cepas, los 78 patrones se pudieron agrupar en 41 clones y, aplicando el criterio de un 85% de similitud (Nivel 3), estos 41 clones se agruparon en 25 clústeres. Los dos clústeres en los que se ubicaron más cepas incluyeron 23 y 24 cepas. Los otros 23 clústeres restantes estaban compuestos por 1 a 12 cepas. Comparando los datos completos de cada cepa, no se encontró ninguna asociación entre los clústeres que correspondiera con alguno de los datos disponibles para estas cepas.

### **DISCUSIÓN**

La caracterización molecular del ADN (DNA Fingerprinting) incluye una variedad de metodologías con especificidad y poder discriminatorio variables, tal como análisis de restricción con endonucleasas (REA), amplificación de fragmentos polimórficos de longitud variable con una enzima de restricción (AFLP) (12), amplificación del ADN de los ribosomas (2) o combinaciones entre todas las anteriores (7); hibridación del ADN (10) y secuenciación del 16SrDNA (4,8). Otra reconocida técnica es la electroforesis en campo pulsado (PFGE) que se considera como el "gold" estándar de elección para realizar trabajos de epidemiología molecular (5). 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 (9) y también que las cepas aisladas de estas aves silvestres fueron distintas de las cepas aisladas en las aves de corral. En el presente estudio se evaluaron 3 niveles de similitud: "Patrón" (Nivel 1), "Clon" (Nivel 2) y "Clúster" (Nivel 3), agrupando las cepas en 78 patrones, 41 clones o en 25 clústeres. Sin embargo, no se obtuvo ninguna asociación entre estos agrupamientos cuando se incorporaron en el análisis los datos disponibles para estas cepas. Por ejemplo, en el clúster 1 se agruparon 2 clones y 11 patrones, comprendiendo un total de 23 cepas que se

aislaron entre los años 1974 y 2012, procedieron de 3 provincias diferentes y se obtuvieron de distintas especies animales: reproductores pesados (11 cepas), pavos (2 cepas), bovinos (4 cepas), ovinos (1 cepa) y porcinos (1 cepa); además en este clúster se agruparon 4 cepas de referencia de serotipos 3, 5 y 16, todas originalmente aisladas de pavos, y una cepa de referencia del serotipo 14 que fue aislada de bovinos. Específicamente la técnica de ERIC PCR ha permitido discriminar entre cepas provenientes de un mismo o distintos brotes en una misma especie animal<sup>1</sup>. Estos resultados coinciden con los estudios efectuados en otros países (7) demostrando una gran variabilidad genética entre las cepas de *P. multocida*.

### CONCLUSIONES

En este estudio se ha demostrado la existencia de una gran diversidad genética entre las cepas, lo cual no ha proporcionado ningún orden lógico que permitiera correlacionar las diferencias genéticas de estas cepas con los datos disponibles, en lo referido al origen de las cepas (especie animal, zona de aislamiento, año de aislamiento o enfermedad que causan), ni obtener resultados útiles aplicables a estudios epidemiológicos o profilácticos.

### 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: 3025–31. 2002.
2. Blackall, P. J., J. L. Pahoff, D. Marks, N. Fegan y C. J. Morrow. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. *Aust. Vet. J.* 72: 135–138. 1995.
3. Brogden, K. A, K. R. Rhoades y K. L. Heddleston. A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Dis.* 22: 185–190. 1978.
4. 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.
5. Goering, R. V. Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection - Analysis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 14: 595–600. 1993.
6. Harper, M., M. John, C. Turni, M. Edmunds, F. St. Michael, B. Adler, P. J. Blackall, A. D. Cox y J. D. Boyce. Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J. Clin. Microbiol.* 53: 477–485. 2015.
7. Hunt, M. L., B. Adler y K. M. Townsend. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 72: 3–25. 2000.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Owen, R. J. Chromosomal DNA fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.* 30: 89–99. 1989.
12. Shivachandra, S. B., A. A. Kumar, R. Gautam, S. Joseph, M. K. Saxena, P. Chaudhuri y S. K. Srivastava. Characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* by restriction endonuclease and amplified fragment length polymorphism. *Res. Vet. Sci.* 81: 8–18. 2006.
13. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing y B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233–2239. 1995.
14. Wilson, M. A., R. B. Rimler y L. J. Hoffman. Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1518–1824. 1992.

---

<sup>1</sup> Acá debe ir la cita del otro trabajo. Se agregará si me confirman su aceptación.