

CONTRIBUCION AL ESTUDIO MOLECULAR DE LA EPIDEMIOLOGIA DE LA *PASTEURELLA MULTOCIDA* SEROTIPO A, AISLADA DE CERDOS CON NEUMONIA ENZOOTICA

Gilma Hernández A., MVZ, MS.; Alba L. Hernández, Bact., M.S.;
Sandra Valenzuela, Bact.; Fernando Ariza B., MV, M.S.;
José D. Mogollón G., M.V., Ph.D.*

RESUMEN

El propósito de la presente investigación fue comparar los perfiles de ADN plasmídico y proteínas de membrana externa (PME) de cepas de *P. multocida* tipo A, asociada con neumonía en cerdos con el fin de contribuir al estudio molecular de la epidemiología de la enfermedad. Se examinaron 50 cepas de *P. multocida* de tres granjas porcícolas mediante el uso de geles de agarosa (perfiles de plásmidos) y geles de poliacrilamida (PME). Se estableció que el 68% de las cepas no poseían plásmidos, el 16% presentaron un plásmido de alto peso molecular aproximado de 22 kb y el 16% restante presentaron dos plásmidos de 4 y 7 kb, aproximadamente. En geles SDS-PAGE, las cepas estudiadas mostraron dos tipos de perfil: en el 72% de ellas apareció una banda mayor de 38.2 kd, pero no se observó banda de 34.6 kd (tipo I), y el 28% presentaron una banda mayor de 38.2 kd, pero en menor concentración, y se denominaron tipo II. Se concluyó que la ausencia de plásmidos en *P. multocida* es una limitación para estudios epidemiológicos. En contraste, los perfiles de PME podrían ser utilizados como marcadores para estudios de cepas de *P. multocida* en poblaciones porcinas afectadas con neumonía.

Palabras Claves Adicionales: *P. multocida*, cerdos, plásmidos, proteínas de membrana externa.

* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA-CEISA; Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Apartado Aéreo 29743. Santafé de Bogotá, D.C.

ABSTRACT

CONTRIBUTION TO THE MOLECULAR EPIDEMIOLOGY STUDY OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* SEROTYPE A, ISOLATED FROM SWINES WITH ENZOOTIC PNEUMONIA

The purpose of this research was to compare the plasmid profiles, and the outer protein membranes profiles (OMP) of *P. multocida* strains isolated from pigs affected with pneumonia in order to understand the molecular epidemiology of this disease. Fifty *P. multocida* strains obtained from three different farms were examined by sodium dodecil sulfate gel electrophoresis and plasmid DNA-screening using agarose gels. It was found that 68% of these strains did not show plasmids, 16% had a high molecular weigh plasmid (22 kb approximately) and the other 16% had two plasmids of about 4 and 7 K Kb. Among 50 strains two types of OMP patterns could be distinguished: 72% strains showed a major protein of 38.2 Kd (Type I) and 28% had a major protein of 38.2 Kd (type II). It was concluded that the very low presence of plasmids in *P. multocida* is a limitation of this tool for epidemiological studies. In contrast, the OMP patterns may be useful as markers to differentiate *P. multocida* type A strains in swine populations with enzootic pneumonia.

Additional Index Words: *P. multocida*, plasmids, OMP patterns.

En explotaciones porcinas intensivas existe una amplia diseminación de problemas respiratorios, siendo la neumonía enzoótica uno de los más comunes (Ross, 1990). Este síndrome causa grandes pérdidas económicas que consisten principalmente en la disminución de la conversión alimenticia, retraso en el crecimiento, decomisos en matadero, tratamientos terapéuticos y medidas de control que se deben adoptar. (Piojan et al., 1987; Ross, 1990).

La Pasteurellosis en el cerdo se ha asociado con la *P. multocida* tipos A y D, los cuales producen dos síndromes bien definidos: la rinitis atrófica y la neumonía enzoótica. Numerosos estudios han demostrado que en el síndrome neumónico el principal agente secundario involucrado es la *P. multocida* tipo A (Luthenberg et al., 1984; Piojan et al., 1984). En Colombia Imbacuam y Barrera, en 1992, encontraron una prevalencia del 53.5% para *P. multocida* tipo A en casos de neumonía enzoótica, en animales sacrificados en una planta de procesamiento de cerdos del centro del país (Castro y Montenegro, 1992; Imbacuam y Barrera, 1992).

Se han reportado diferentes grados de virulencia entre las cepas de *Pasteurella multocida*. Piojan y Fuentes (1987) demostraron que existen cepas del serotipo A virulentas, capaces de producir pleuritis y neumonías severas. También encontraron otro tipo de serotipo A que produce neumonía sin pleuritis y algunas cepas que pueden producir pleuritis sin neumonía. Hasta el presente se desconocen en detalle los factores de virulencia responsables de esas variaciones.

De otro lado, a nivel molecular las diferencias entre los serotipos y la naturaleza de los componentes de la pared celular todavía están por definirse. La electroforesis en geles de poliacrilamida (page) ha sido utilizada con éxito en la clasificación de varias especies bacterianas (Jackman, 1985; Carter, 1984) en estudios epidemiológicos o en la identificación de antígenos protectivos (Luthenberg et al., 1984). Además, los perfiles de plásmidos han demostrado ser muy valiosos para estudios epidemiológicos de enfermedades causadas por bacterias Gram positivas o Gram negativas (Hawkey, 1987; McDonald y Pugh, 1986).

El propósito del presente estudio fue examinar los perfiles de plásmidos y las proteínas de membrana externa (PME) de cepas de *P. multocida* aisladas de granjas porcinas con problemas neumónicos para establecer relaciones epidemiológicas entre las cepas existentes en cada población evaluada.

MATERIALES Y METODOS

Colección de Muestras

La colección de muestras para el presente estudio se realizó en un centro de beneficio de porcinos de la ciudad de Santafé de Bogotá. Se colectaron 116 muestras pulmonares de áreas que presentaban lesiones macroscópicas compatibles con neumonía enzoótica, pertenecientes a cerdos que venían de tres granjas comerciales diferentes (A,B,C) localizadas en zonas de Cundinamarca.

Aislamiento Bacterial

Una vez trasladadas las muestras al laboratorio, se realizó el cultivo inicial sembrando directamente sobre cajas de petri que contenían agar BHI con 5% de sangre y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación se observó la apariencia de las colonias; las que se consideraron sospechosas fueron cultivadas nuevamente en agar sangre e incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se realizaron frotis bacterianos que fueron coloreados con Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria de acuerdo

con los métodos convencionales (Bernar et al., 1989; Piojan et al., 1984; Piojan y Fuentes, 1987).

Tipificación de la Cepa

Para la tipificación de la cepa se realizó la prueba de hialuronidasa, utilizando discos de papel filtro estériles impregnados con hialuronidasa testicular bovina a una concentración de 700 U/ml. (Brodgen y Packer, 1979; Carter, 1984).

Aislamiento e Identificación de Plásmidos

Inicialmente se realizó una prueba de sensibilidad bacterial utilizando el método de difusión en agar con sensidiscos de lincomicina, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina, estreptomina, cloranfenicol y ampicilina*¹.

Para la extracción del ADN plasmídico se siguió el método de lisis alcalina (Kado y Liu, 1981; Sambrook et al., 1989) estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Salud y Producción Animal, CEISA, el cual fue luego separado en geles de agarosa al 0.7% en buffer trisborato pH, 8.3 (TBE) 0.5% con la adición de 1 µL de bromuro de etidio por cada 100 ml de gel. El corrido electroforético se realizó en cámara horizontal (DNA Sub-cell electrophoresis system cat. No. 170-4300 *² durante 18 horas a 30 voltios constantes. Como marcador se utilizó el fago lambda digerido con EcoRI y Hind III *³ y una vez finalizado el corrido, los geles fueron observados con luz ultravioleta y fotografiados con película polaroid 667 para determinar posteriormente el tamaño de los plásmidos (Ausebel et al., 1987).

Obtención e Identificación de Proteínas de Membrana Externa (PME).

Para la obtención e identificación de PME se siguió la metodología descrita por Rossmanith et al. 1991. Brevemente la técnica realizada consistió en lo siguiente:

Las cepas de *P. multocida* tipo A debidamente identificadas se sembraron en 500 ml de caldo BHI y luego fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Después fueron centrifugadas a 5.000 g durante 30 min a 4°C y se realizaron dos lavados con solución salina fisiológica estéril al 0.85%, realizando centrifugaciones de 5.000 g durante 10 min.

*1 Difco (Visa).

*2 Biorad (USA).

*3 Promega (USA).

Una vez resuspendidos, los sedimentos en 20 ml de solución salina fueron almacenados a -20°C durante la noche. Posteriormente se descongelaron y sonicaron tres tiempos de 1 min. a 100 watos. Luego se centrifugó a 2.000 g durante 20 min. a 4°C y se trasladó el sobrenadante a tubos de ultracentrífuga para centrifugar a 30.000 g durante 1 hora.

El sedimento fue resuspendido en 1 ml. de sarcosyl al 2% y se incubó durante 30 min. a 22°C . Se adicionó solución salina hasta llenar los tubos y posteriormente se ultracentrifugó a 30.000 g durante 1 hora. Se descartó el sobrenadante; el sedimento se resuspendió en 200 microlitros de agua destilada y se almacenó a -20°C hasta la electroforesis. Para la determinación de la cantidad de proteína se utilizó el método de Bradford (1976):

La electroforesis SDS-PAGE se realizó en gel de policarilamida, según la técnica descrita por Laemli (1970), utilizando un gel de concentración del 5% (T 5%; C 2.7%) y un gel de resolución del 12% (T 12%; C 2.7%), en cámara LKB 2001-001 vertical electrophoresis *4. Las condiciones de corrida fueron: 70 voltios hasta que la muestra entró en el gel de separación y luego se incrementó a voltaje constante de 120 voltios, temperatura de enfriamiento 9°C y tiempo de corrida de 6 a 7 horas.

Después del corrido los geles fueron colocados en una solución colorante azul de coomassie (Stock de azul de coomassie R250, 0.1%; metanol, 50%; ácido acético, 10% y agua destilada) y luego decolorados en soluciones I y II de metanol ácido acético y agua en concentración del 5 y 7%, respectivamente (Ausebel et al., 1987; Rossmanith et al., 1991).

Inmunotransferencia

Las proteínas bacteriales separadas electroforéticamente fueron transferidas a papel de nitrocelulosa usando buffer de transferencia (tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y sometidas a 30 voltios durante 18 horas y 60 voltios durante 2 horas con enfriamiento (en cámara trans-blot, Biorad USA).

Terminada la transferencia, la tira de los marcadores de peso molecular fue coloreada con rojo ponceau al 0.5% en ácido tricloroacético al 0.5% en metanol durante 5 min. para verificar la transferencia, y la nitrocelulosa con las muestras de antígeno fue colocada en solución bloqueadora, leche descremada (Carbury's Marvel) al 5% en TTBS (Buffer tris-HCl 0.02 M; pH 7.5; 0.5 M NaCl. y 0.05% de Tween 20) a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas.

*4 Box 305-16126 Berna Sweden.

*5 Sigma Chemical Co. USA.

Después de descartada la solución bloqueadora la nitrocelulosa se cortó en tiras, las cuales fueron enfrentadas a sueros de campo (procedentes de las mismas granjas estudiadas) en dilución 1:5 en TBS. Se incubó por 18 horas a temperatura ambiente, se descartó el primer anticuerpo y se lavó tres veces con TTBS durante 10 min. cada vez. Se adicionó el anticuerpo secundario, anti Ig. G de cerdo *⁵ en dilución 1:100 en TBS, se lavó y adicionó el complejo ABC. Finalmente se volvió a lavar y se adicionó la solución substrato cromógeno; tan pronto apareció el color se detuvo la reacción con agua destilada (Ausebel, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento e Identificación Bacterial

De un total de 116 muestras de pulmones examinados, se realizaron 50 (68%) aislamientos caracterizados como *P. multocida* serotipo A, de acuerdo con las pruebas de morfología, bioquímicas y de hialuronidasa.

Plásmidos

Aunque la resistencia en la prueba del antibiograma fue del 100% para la lincomicina, la concentración de 30 µg por ml de cultivo recomendada para la extracción del ADN plasmídico en otras bacterias, produjo inhibición total del crecimiento de la *P. multocida*. Por esta razón fue necesario hacer una prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC), en la cual se pudo establecer que la concentración óptima de antibiótico para el crecimiento bacterial y expresión plasmídica era de 125 µg por ml de cultivo.

Al extraer el ADN plasmídico de las cepas de *P. multocida* serotipo A, provenientes de cerdos pertenecientes a las granjas bajo estudio, se pudo establecer que: 34 (68%) de las cepas no tenían plásmidos. Como control en todos los casos las extracciones se hicieron junto con dos cepas de referencia (C49 y C50 Universidad de Minnesota, USA), las cuales presentaron cinco plásmidos de 22 kb, 15 kb, 5.5 kb, 4 kb y 3.8 kb.

Se encontró que ocho de las cepas presentaron un plásmido de alto peso molecular aproximado de 22 kb, el cual coincide con el mostrado por las cepas de referencia. De las demás cepas, en 8 (16%) se observaron dos plásmidos de aproximadamente 7 y 4 kb, respectivamente (Figura 1).

Al analizar las granjas por separado, encontramos que en la granja A ninguna de las 20 cepas analizadas tenían plásmidos, en la granja B hubo gran variación,

pues la mitad de las cepas no revelaron plásmidos, y las otras 10 presentaron plásmidos o bien de 22, ó 4 y 7 kb, respectivamente, mientras que en la granja C, 4 de las cepas no mostraron plásmidos y 6 presentaron un plásmido de alto peso molecular (22 kb) (Tabla 1).

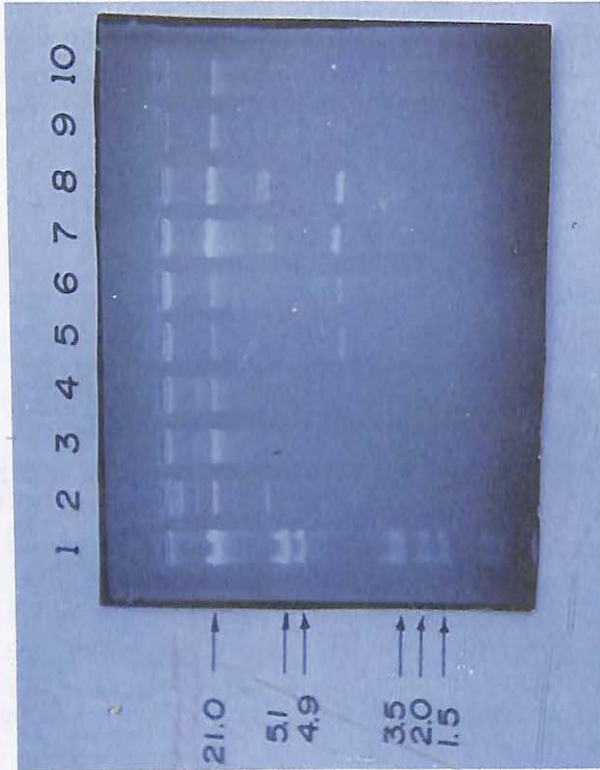


FIGURA 1. Perfil electroforético del ADN plasmídico de cepas de *P. multocida* serotipo A. Carril 1: Marcador de peso molecular, fago lambda digerido con Eco RI y Hind III; carril 2: cepa de referencia con 5 plásmidos entre 3.8 y 22 kb.; carriles 3 y 4: cepas con plásmido de alto peso molecular de 22 kb.; carriles 5,6,7 y 8: cepas con dos plásmidos de 4 y 7 kb.; carriles 9 y 10: cepas sin plásmidos.

Los resultados de este estudio son similares a los descritos por Rossmannith et al. (1991), quienes encontraron que en 20 cepas de *P. multocida* estudiadas sólo 10 presentaron plásmidos. Sin embargo, la ausencia de plásmidos o bien su pérdida es factible de darse, debido a la combinación que se puede presentar entre clones de diferentes tipos con y sin plásmidos; o por reordenamiento en el material genético de la bacteria (Hawkey, 1987).

TABLA 1
ADN plasmídico de cepas de *P. multocida* serotipo A, aisladas de cerdos provenientes de las granjas estudiadas.

Granja	No. cepas	No. plásmidos	Peso plásm. kb
A	20	Ninguno	-
B	10	Ninguno	-
	8	2	4 y 7
	2	1	22
C	4	Ninguno	-
	6	1	22

Resultados de otros estudios como los realizados por Cote et al. (1991) contrastan con los obtenidos en este trabajo. Al comparar cepas tipo A y D, encontraron que el 50% de las cepas tipo D mostraban plásmidos de diverso tamaño, pero los de tipo A no presentaron plásmidos. Es posible que bajo condiciones de campo se produzca la movilización de plásmidos conjugativos entre diversas especies de gérmenes Gram negativos o entre cepas de *P. multocida* que tengan los mismos plásmidos (Bernar et al., 1989).

Igualmente se encontró un plásmido de alto peso molecular (22 kb) en el 16% de las cepas, el cual también está presente en las cepas de referencia. Estos plásmidos extremadamente grandes incluyen pequeñas formas crípticas que producen efectos no detectables fenotípicamente; así, para su mejor caracterización se podría hacer digestión con endonucleasas de restricción, puesto que son éstos los que podrían estar relacionados con resistencia a los antibióticos (Bernar et al., 1989).

Finalmente, se podría pensar que la presencia de plásmidos en las cepas de *P. multocida* es muy baja, lo que limitaría su uso en estudios epidemiológicos si se compara con otras bacterias Gram negativas (Cote et al., 1991; McDonald y Pugh, 1986; Rossmann et al., 1991).

Proteínas de Membrana Externa de *P. multocida* Tipo A

Debido a que las proteínas de membrana (PME) de *P. multocida* son de bajo peso molecular, para su corrido electroforético se utilizaron geles del 12%, puesto que en geles del 10% las proteínas menores comigran con el frente de

corrida. Se encontró también que el cultivo en 500 ml. de caldo BHI lo produjo una cantidad media de proteína de 30 µg.

En las 50 cepas analizadas por electroforesis se pudo observar que se obtuvieron dos tipos de perfil electroforético cuya principal diferencia se registró a nivel de las proteínas de mayor concentración de 38.3 y 34.6 kd. El 72% de las cepas presentaron una banda mayor de 38.2 kd y no exhibieron banda de 34.6 kd, por lo cual se denominaron tipo I. El 28% de las mismas presentaron una banda mayor de 34.6 kd y también una de 38.2 kd, pero en menor concentración; estas cepas se denominaron tipo II.

Otras bandas de proteínas observadas como mayores, aunque en menor concentración, fueron las de 16.1 kd, que posiblemente corresponden a una región intensa de LPS, las de 29.8; 41.1; 47.7; 65.8; 70 y 85.4 kd (Figura 2), que se considera podrían ser inmunogénicas.

Al analizar el perfil electroforético de las cepas teniendo en cuenta su procedencia, se estableció que en la granja A todas las cepas presentaron un perfil tipo I, que resultó igual al revelado por las cepas de referencia. En la granja B, 14 presentaron el patrón I y 6, el patrón tipo II, y la granja C igualmente exhibió los dos perfiles: 8 presentaron el patrón II, y 2 el patrón tipo I (Tabla 2).



FIGURA 2. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa (PME) de cepas de *Pasteurella multocida* serotipo A; carril 1, cepas de referencia C50; carril 2, cepa tipo II con proteína mayores de 24.5 y 34.6 kd.; carril 3, cepa tipo I con proteínas mayores de 24.5 y 38.2 kd.; carril 4, marcador de peso molecular.

TABLA 2

Cepas de *P. multocida* serotipo A con diferencia en la movilidad electroforética de una de sus bandas de proteínas de membrana externa.

Granja	Aislamiento	PM.Kd 38.2	PM Kd 34.6 y 38.2
A	20	20	
B	20	14	6
C	10	2	8

Un estudio realizado por Rossmann *et al.* (1991) demostró que en bovinos la *P. multocida* presenta dos bandas prominentes de 35 y 22 kd. Las cepas aviares también presentan dos bandas prominentes de 39 y 22 kd, mientras que otras especies de *Pasteurella sp.* sólo poseen una banda prominente de 34 kd. En el presente estudio se determinó que la *P. multocida* serotipo A, aislada de pulmón de cerdo, igualmente presenta dos bandas prominentes: una de 24.5 kd y otra que varía según el tipo de cepa y corresponde a 38.2 ó 34.6 que podrían ser las de 35 y 22 kd en bovinos, ó 39 y 22 kd en cepas aviares. En conclusión, en las tres granjas estudiadas existen sólo dos clones bacterianos según los perfiles de PME encontrados. Estas características electroforéticas podrían ser usadas como marcadores epidemiológicos, pues permiten establecer cierta diferencia entre cepas existentes en una población.

Es claro que se debe tener precaución al comparar los perfiles de PME de *P. multocida*, puesto que existen varios factores de crecimiento que pueden afectar su expresión, además de las diferencias en movilidad electroforética que se pueden presentar entre diferentes investigadores (Choi *et al.*, 1989).

Los resultados son lo bastante llamativos para sugerir la continuación de los estudios sobre la significancia de las PME de *P. multocida* tipo A aislada de procesos neumónicos, como podría ser la expresión de nuevas proteínas bajo condiciones del huésped (restricción de hierro) en el tejido pulmonar.

INMUNOBLOTTING

Los sueros policlonales de campo detectaron cuatro proteínas mayores correspondientes a 24.5, 38.2, 65.8 y 86.4 kd con los cuales el antisuero reaccionó fuertemente en los dos tipos de cepas encontradas, y reaccionó

débilmente con algunas de las otras proteínas mayores analizadas por electroforesis. También se observó una banda difusa a nivel de 16.1 kd que corresponde posiblemente a la producción de anticuerpos contra la banda de LPS (Figura 3).

De acuerdo con la reacción idéntica de los dos tipos de cepas encontradas frente a los sueros policlonales tomados al azar, y donde posiblemente se encuentran anticuerpos contra los dos biotipos, se podría sugerir que los dos tipos de cepas presentan las mismas proteínas antigénicas (Fenotipo).

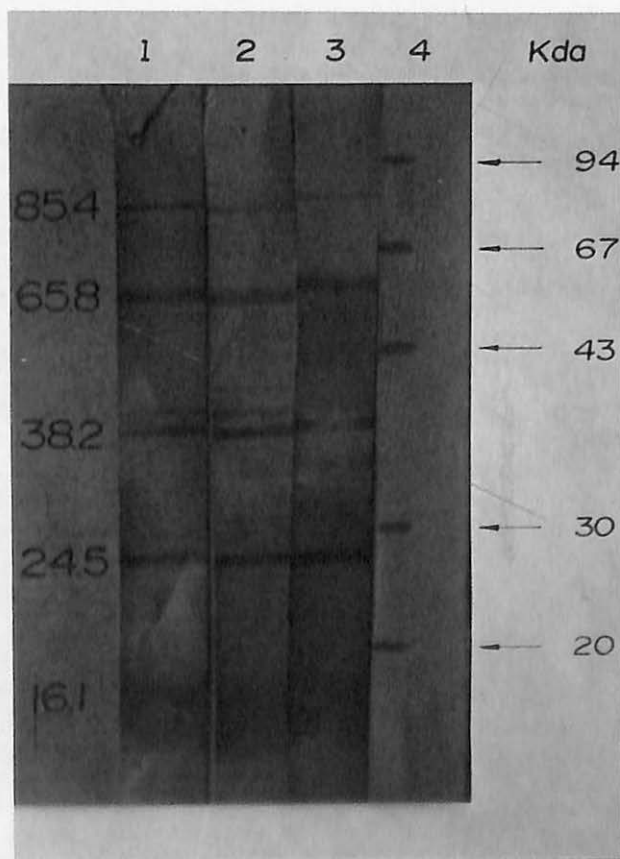


FIGURA 3. Inmunoblotting de proteínas de membrana externa de *P. multocida* serotipo A; carriles 1, 2, y 3, proteínas antigénicas mayores encontradas en las cepas provenientes de las 3 granjas y que fueron iguales para los dos tipos (I y II); carril 4, marcador de peso molecular.

También es probable que los sueros de campo obtenidos sólo correspondieran a los de cepas tipo I donde sólo aparece la proteína de 38.3 kd; y por esta razón la de 34.6 kd no se detectó en el blotting. La proteína de 38.3 kd presente en los dos tipos de cepas fue la que resultó ser antigénica. Esto podría sugerir que existen OMP más inmunogénicas que otras que deberían estudiarse con mayor detenimiento su potencial antigénico para diseño de inmunogenes (Luthenberg *et al.*, 1984).

En conclusión, estos resultados pueden ilustrar el valor de las técnicas electroforéticas para estudios epidemiológicos bacterianos (detección de marcadores) e identificación de proteínas que pueden tener cierta importancia antigénica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Ausebel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Smith, J.A.; Seidman, J.G.; Struhl, K.** 1987. Currents protocols in molecular biology U.S.A. Geene Publishing Associates and Wilhey, Inter-science, New York.
2. **Bernar, D. D.; Dulbeco, R.; Eisen, H.N.; Harold, S.; Ginsberg, J.B.** 1989. Microbiology, 4^a edic.; Lippincott company, pp. 136-146.
3. **Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of kprotein utilizing the principle of protein dy binding. *Analyt. Biochem.* 72:248:254.
4. **Brodgen, K.A. ; Packer, R.A.** 1979. Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping sistems. *Am. J. Vet. Res.* 40:1332-1335.
5. **Carter, G.R.** 1984. Serotyping of *P. multocida*. *Vet. Microbiol.* 16:247-258.
6. **Castro, B.G.; Montenegro, L.V.** 1992. Caracterización patológica de la neumonía enzoótica en porcinos sacrificados en Santafé de Bogotá. Universidad de La Salle, Facultad de Medicina Veterinaria. Tesis de grado. 120 p
7. **Cote, S.; Harol, J.; Higgins, R.; Jaques, M.** 1991. Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R plasmids in *P. multocida* from swine. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1653-1657.
8. **Choi, K.H.; Mahesware, S.K.; Felice, L.J.** 1989. Characterization of outer membrane protein enriched extract from *P. multocida* isolate turkey. *Am. J. Vet. Res.* 50:676-683.

9. **Hawkey, P.M.** 1987. Molecular methods for the investigation of bacterial cross-infection, *J. Hosp. Infect.* 1: 211-218.
10. **Imbacuam, L.E.; Barrera, P.A.** 1992. La *P. multocida* como agente asociado a la neumonía enzoótica porcina en cerdos sacrificados en Santafé de Bogotá, Corporación de Ciencias Agropecuarias, Fac. de Medicina Veterinaria, Tesis de grado. 89 p.
11. **Jackman, P.J. H.** 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole cell protein pattern. *In*: Chemical methods in bacterial systematics. M. Good Fellow and D.E. Minnikin Eds. Academic Press, London. pp. 115-129.
12. **Kado, C.L.; Liu, S.T.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bact.* 145: 1315-1373.
13. **Laemli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Naure*, 227:680-685.
14. **McDonald, T. J.; Pugh, G.W.** 1986. Plasmid profiles of *Moraxella bovis* isolates. *Am. J. Vet. Res.* 47:964-966.
15. **Luthenberg, B.; Ria, V.B.; Marten, D.J.** 1984. Atrophic rhinitis in swine: correlation of *P. multocida*, pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns, *Infect. and Immun.* 46: 48-53.
16. **Piojan, C.; Lastra, A.; Ramírez, C.; Leman, A.D.** 1984. Isolation of toxigenic strains of *P. multocida* A. *J. Am. Med. Assc.* 185: 552-553.
17. **Piojan, C.; Fuentes, M.** 1987. Severe pleuritis associated with certain strain of *P. multocida* in swine. *J. Am. Med. Assc.* 191: 834-826.
18. **Rossmannith, S.E.; Wilt, G.R.; Wu, D.** 1991. Characterization and comparison of antimicrobial susceptibilities and outer membrane protein and plasmid DNA profiles of *Pasteurella haemolytica* and certain other members of the genus *Pasteurella*, *Am. J. Vet. Res.*, 52:2016-2022.
19. **Ross, R.** 1990. *Mycoplasma Hyopneumoniae*: Diagnosis, treatment and prevention. Minnesota swine conference for veterinarians. University of Minnesota. Sept 16-18. pp. 294-298.
20. **Sambrook, J.; Fritsch, F.; Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning-a laboratory manual, second. Edic. U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 3: 615-620: