

26263

Reg 63386 ICA



Centro de Documentación
CEISA

**CONTRIBUCIÓN A LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
PASTEURELLA MULTOCIDA TIPO A MEDIANTE EL
ESTUDIO DE LA HUELLA GENÓMICA.**

**BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA**

25 ENE. 1999

ANGÉLICA LEÓN CHÁVEZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 1997**



Centro de Documentación
CEISA.

**CONTRIBUCIÓN A LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
PASTEURELLA MULTOCIDA TIPO A MEDIANTE EL
ESTUDIO DE LA HUELLA GENÓMICA.**

ANGELICA LEÓN CHAVEZ

**JOSÉ DARIO MOGOLLÓN GALVIS
DIRECTOR**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
SANTAFE DE BOGOTÁ, 1997**



Centro de Documentación
CEISA

**CONTRIBUCIÓN A LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
PASTEURELLA MULTOCIDA TIPO A MEDIANTE EL
ESTUDIO DE LA HUELLA GENÓMICA.**

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

ANGÉLICA LEÓN CHAVEZ

JURADO

JURADO

JURADO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
SANTAFE DE BOGOTÁ, 1997**

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas, son responsabilidad del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación, Agosto de 1989.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos al Centro de Investigación en Salud y Producción Animal CEISA en especial al doctor Luzardo Estrada y al doctor Fernando Ariza; por su valiosa ayuda tanto humana como técnica y económica para la realización de este proyecto.

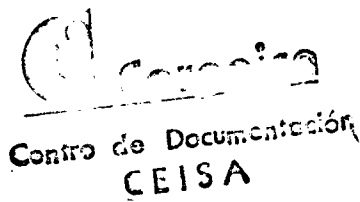
Igualmente deseo destacar el apoyo y la colaboración del director de ésta investigación el doctor José Darío Mogollón, por su constante preocupación, sus aportes técnicos y científicos y en general por su ardua tarea de asesoría y formación profesional.

De la misma manera, expresar mi reconocimiento a todas las personas que con su decidido apoyo contribuyeron en la culminación de éste trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. REVISIÓN DE LITERATURA	14
1.1. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS	15
1.2. SÍNTOMAS Y CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS	16
1.3. FACTORES DE VIRULENCIA	18
1.3.1. Fimbrias	21
1.3.2. Polisacáridos capsulares	21
1.3.3. Toxinas	22
1.3.4. Proteínas de membrana externa	22
1.3.5. Neuroaminidasa	23
1.3.6. Plásmidos	23
1.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PASTEURELLA MULTOCIDA	24
1.4.1. Huella genómica	26
1.4.1.1. Enzimas de restricción	29
1.4.1.2. Electroforesis en geles de agarosa	32
1.4.1.3. Buffer de corrido y coloración	35

1.4.2.	Perfil de plásmidos	37
1.4.3.	Ribotipificación	38
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1.	PROCEDENCIA DE LOS PORCINOS MUESTREADOS	41
2.2.	TOMA DE MUESTRAS	41
2.3.	ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO	42
2.4.	ANÁLISIS BIOQUÍMICO	42
2.5.	EXTRACCIÓN DE ADN GENOMICO	43
2.6.	CANTIDAD DE ADN Y LECTURA EN ESPECTROFOTÓMETRO	45
2.7.	DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	45
2.8.	ELECTROFORESIS	47
2.9.	TINCIÓN Y REVELADO	48
2.10.	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	48
3.	RESULTADOS	50
3.1.	ANÁLISIS DE LA HUELLA GENÓMICA DE LAS CEPAS DE <u>PASTEURELLA MULTOCIDA</u> DE CADA GRANJA	50
3.2.	DISTRIBUCIÓN DE PATRONES DE RESTRICCIÓN DE LAS CEPAS DE <u>PASTEURELLA MULTOCIDA</u> EN CADA GRANJA	52
4.	DISCUSIÓN	54
5.	CONCLUSIONES	58
6.	RECOMENDACIONES	60
	BIBLIOGRAFÍA	61
	ANEXOS	71



LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Ejemplos de algunos tipos de endonucleasas de restricción	30
Tabla 2. Composición de buffer para enzimas de restricción	32
Tabla 3. Rangos de separación para geles de agarosa	33
Tabla 4. Composición de los buffers comúnmente usados en electroforesis	36

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura química de la agarosa	33
Figura 2. Relación entre el tamaño del ADN y la movilidad electroforética	34
Figura 3. Diagrama del sistema utilizado en la fotografía de geles teñidos con bromuro de etidio	37
Figura 4. Esquema del patrón de restricción del ADN del Fago Lambda digerido con la enzima Hind III	47
Figura 5. Porcentaje de patrones de restricción encontrados en la digestión con la enzima Hae III	53
Figura 6. Porcentaje de patrones de restricción encontrados en la digestión con la enzima Sma I	53

INTRODUCCIÓN

En Colombia la población porcina, según estimativos, se ha mantenido relativamente constante; los indicativos de consumo de carne de cerdo *per capita*, reflejan la moderada contribución actual de la porcicultura en la alimentación del pueblo colombiano.

En el país existen alrededor de 490.000 explotaciones porcinas de las cuales el 60% son de carácter extensivo o familiar (menos de cinco cerdos en promedio). Las explotaciones intensivas o de tipo comercial representan aproximadamente el 40% restante ².

El sistema de producción intensiva o comercial, ha comenzado a desarrollarse en los últimos años y se caracteriza por mantener a los animales en confinamiento, en instalaciones adecuadas, por el suministro de raciones de buena calidad y por contar con animales genéticamente mejorados.

El riesgo de introducir enfermedades animales en áreas del mundo donde no han existido previamente se ve incrementado por el crecimiento de la población humana, por el aumento de la necesidad de consumo de proteína animal y por el intercambio de animales y sus productos entre sus países.

Al igual que la mayoría de las enfermedades la morbilidad y la mortalidad es la causa más obvia de pérdidas económicas por efecto de gastos médicos costos de tratamiento, prevención y control; el estimado de las pérdidas animales que se atribuyen a las enfermedades respiratorias en los Estados Unidos supera los 500 millones de dólares ⁴⁶.

Dentro de las enfermedades respiratorias, de los porcinos la neumonía enzoótica, es uno de los síndromes que mayores repercusiones económicas ocasiona en ésta especie, debido a que reduce tanto la tasa de crecimiento como la eficiencia de la conversión alimenticia⁴².

De otro lado, numerosas investigaciones han demostrado que el principal agente secundario involucrado en el complejo respiratorio porcino es la Pasteurella multocida, sin embargo se sabe que esta bacteria no puede colonizar el pulmón a menos que exista antes un evento inmunosupresor primario, el cual generalmente es una infección por Mycoplasma o por virus, pudiendo estar asociada a factores de estrés ¹⁹.

En nuestro medio se desconoce la magnitud de la problemática ocasionada por la P. multocida¹⁸. Se ha demostrado que las cepas importantes son las de tipo D toxigénica que produce rinitis atrófica y las cepas tipo A que afectan principalmente al pulmón. En Estados Unidos el serotipo A es uno de los más comúnmente aislados de pulmones de cerdos y es posible que cepas toxigénicas estén también relacionados con el desarrollo de neumonía y también en la rinitis³³.

Uno de los primeros interrogantes que se plantea cuando se aborda el estudio de la epidemiología de un brote epidémico de etiología bacteriana, es establecer si nos encontramos frente a una situación producida por la misma cepa, o si por el contrario se trata de cepas similares de la misma especie pero no idénticas. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas que valoran tanto las características genotípicas como las fenotípicas de estos microorganismos, como son: los perfiles de plásmidos, el análisis de las proteínas totales o proteínas de membrana PCR, ribotipificación y la huella genómica del ADN cromosomal⁴¹.

El estudio de las proteínas de una especie bacteriana a través de sus perfiles de migración electroforética en geles de poliacrilamida, analizados a partir de extractos proteicos y los perfiles plasmídicos ha sido aplicado en múltiples especies bacterianas, como método de identificación y establecimiento de la relación clonal entre cepas de gérmenes aislados en diferentes periodos de

tiempo. La sensibilidad de los métodos usados y los resultados obtenidos han permitido utilizarlos como marcadores epidemiológicos.

Por otra parte, el análisis con endonucleasas de restricción del genoma bacteriano (REA), y la ribotipificación también han sido usadas con mucho éxito como un instrumento epidemiológico para la diferenciación de cepas en gran variedad de infecciones bacterianas, incluyendo algunas causadas por P. multocida ^{28,29}.

El propósito de la presente investigación es contribuir al conocimiento de la epidemiología de la P. multocida serotipo A en granjas porcinas de producción intensiva, mediante la aplicación del estudio de la huella genómica.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

La neumonía enzoótica porcina (NEP) es una enfermedad pulmonar crónica, de distribución mundial que afecta a cerdos de diferentes edades, aunque se reconoce que los cerdos jóvenes son los más susceptibles.

La Pasteurella multocida se considera como agente etiológico secundario de la neumonía y comúnmente es aislada de pulmones de cerdos neumónicos. Típicamente entre el 30 y 60% de los cerdos de sacrificio presentan lesiones neumónicas las cuales varían en grado de severidad. Estas neumonías generalmente tienen como agente primario el Mycoplasma hyopneumoniae o infecciones virales en las que la P. multocida juega un papel determinante aumentando la severidad de la lesión⁸.

Este complejo neumónico porcino causa mortalidad, pérdida de la condición general y disminución en el ritmo de crecimiento. Cuando interviene la P. multocida se produce una bronconeumonía purulenta, algunas veces con pericarditis y pleuritis. Otra posibilidad puede ser la participación del

Actinobacillus pleuroneumoniae que produce una severa Neumonía fibrino-necrótica-hemorrágica con lesiones que afectan principalmente la parte dorsal del lóbulo diafragmático. Aunque no es muy común, otros agentes involucrados son: Bordetella bronchiseptica, Haemophilus parasuis, Corynebacterium sp., Klebsiella sp., Pseudomona sp., y algunos virus ^{49,50}.

1.1. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

La Pasteurella multocida está ubicada dentro del grupo HAP (Haemophilus, Actinobacillus y Pasteurella). Los estudios taxonómicos y la secuenciación del ADN han puesto de manifiesto el íntimo parentesco existente entre los tres géneros. Es un cocobacilo Gram negativo que se puede encontrar sólo en cadenas, inmóvil, aerobio o anaerobio facultativo, con poder fermentativo y positivos a la oxidasa y catalasa. Una propiedad citada con frecuencia es la tinción bipolar con determinados colorantes (Azul de metileno y Giemsa), no forman esporas y su tamaño varía de 0.3 a 1.0 μm de diámetro por 1 a 2 μm de longitud ¹⁴.

Taxonómicamente se ha clasificado como: orden Eubacteriales, familia Pasteurellaceae, géneros Actinobacillus, Haemophilus, Pasteurella especies aerógenas, haemolítica, gallinarum, pneumotrópica, urae y multocida.

Aunque las características serológicas de la P. multocida están basadas en las propiedades antigénicas de los componentes de la cápsula y pared celular, se conoce poco de los antígenos responsables de su serotipo o patogenicidad específica²⁵. Uno de los sistemas de tipificación más usado lo realizó Carter y colaboradores, quienes identificaron cuatro serotipos (A, B, C, D, E). Las cepas A y D se pueden distinguir por su reacción con hialuronidasa y acriflavina respectivamente.

En los cerdos se ha demostrado que las cepas de P. multocida son importantes en la Rinitis Atrófica, que es producida por las cepas toxigénicas tipo D mientras que las cepas tipo A generalmente afectan el pulmón^{11,45}.

La P. multocida forma parte de la microflora del tracto respiratorio, y los factores predisponentes y la inmunosupresión favorecen la colonización del pulmón.

1.2. SÍNTOMAS Y CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Los signos clínicos varían de acuerdo a la presentación; en la forma aguda, los animales muestran disnea, respiración abdominal, tos, descarga nasal ligera y fiebre entre 40 y 41°C y se puede observar cianosis en las extremidades. Los signos duran de cinco a diez días al cabo de los cuales los

animales se pueden recuperar o morir. En la forma crónica el grado de neumonía es menos severo y se puede presentar tos persistente¹⁸.

Las lesiones pulmonares también pueden variar de acuerdo a la forma aguda o crónica de la enfermedad, usualmente están localizadas en las porciones craneoventrales del pulmón, afectando principalmente los lóbulos apical y cardiaco, así como la parte anterior del lóbulo diafragmático. Las lesiones aparecen hacia los cinco primeros días después de producirse la infección y se desarrolla en un plazo de cuatro semanas³.

Macroscópicamente se observa una neumonía exudativa, con una consolidación de color rosa grisáceo, con zonas rojizas atelectásicas localizadas en los lóbulos anteriores y en los casos severos en los lóbulos diafragmáticos. las lesiones histopatológicas se caracterizan por una neumonía, con hiperplasia linfoide, peribronquiolar y perivascular con incremento de células mononucleares que forman nódulos característicos que comprimen el lumen de los bronquios⁵⁰.

En un experimento, las traqueas de cerdos sacrificados a las cuatro semanas de edad, mostraron lesiones de traqueitis que consistían en hiperplasia epitelial, e infiltración de la lámina propia por un pequeño número de células linfoides y plasmáticas. El lumen de la tráquea contenía material con pocas células epiteliales, macrófagos, y neutrófilos; el de los bronquios contenía un

exudado de material mucoide consistente en neutrófilos y algunos macrófagos²⁵.

Es necesario tener en cuenta que las lesiones ocasionadas por la infección con P. multocida no son patognomónicas, y por lo tanto no se puede usar un solo parámetro para establecer un criterio definitivo; el diagnóstico presuntivo se debe confirmar con la historia clínica, histopatología y aislamiento del microorganismo.

El aislamiento se hace por cultivo directo de la muestra sobre agar sangre; si están muy contaminadas se puede diluir en caldo BHI (infusión cerebro-corazón) para sembrarlo posteriormente en un medio selectivo. Después de aislar los gérmenes se someten a pruebas bioquímicas para su identificación.

1.3. FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores predisponentes como temperatura, humedad, ventilación, población, genética y estrés, juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, la cual se presenta cuando el número de microorganismos es alto al tiempo que baja la resistencia por el estrés de ciertas condiciones medioambientales o de prácticas de manejo.

Los requerimientos de patogenicidad de este grupo de bacterias incluyen:

1. Colonización de la superficie de la mucosa.
2. Invasión del tejido del huésped
3. Supervivencia y multiplicación del microorganismo
4. Daño del tejido del huésped

Para este propósito las bacterias poseen estructuras de adhesión; polisacáridos capsulares, estructuras de superficie como OMP y LPSs (proteínas de membrana externa y Lipopolisacáridos) y productos celulares que incluyen toxinas ⁷.

La presencia de las cepas de tipo A y D en pulmones neumónicos, es visible de tal forma que en la flora nasal del cerdo rinítico es de 80% D y 20% A y en la flora pulmonar del cerdo neumónico es 55% A y 15% D²⁸; esto se debe a que el macrófago alveolar es capaz de fagocitar rápidamente a cepas de tipo D, pero no cepas de tipo A; esto se explicaría por la presencia en la segunda de una espesa cápsula de ácido hialurónico que las protege de la fagocitosis. Por otro lado, los macrófagos aparentemente no son susceptibles a las toxinas de las cepas D⁶⁰.

Se especula que la producción de toxina no es exclusiva de P. multocida del tipo capsular D y que las de tipo A que son toxigénicas podrían estar involucradas en la aparición de neumonía^{27,51}.

En el caso de la mucosa nasal el organismo, principalmente tipo D toxigénico es incapaz de establecerse si no ha sido previamente afectado por la Bordetella bronchiséptica lo cual favorece el crecimiento de la P. multocida tipo D³¹.

A nivel pulmonar sólo actúa cuando los mecanismos defensivos locales han sido dañados por otros agentes, siendo mucho más importante como agente que agrava los procesos pulmonares producidos por otros particularmente Mycoplasma hyopneumoniae el cual es responsable de la enfermedad primaria⁴.

Para que ocurra la colonización de la mucosa respiratoria porcina, el microorganismo se debe adherir al epitelio y la citoadherencia es un factor virulento importante de muchos patógenos bacteriales. En un estudio realizado, se encontró que los tres organismos más frecuentemente aislados de pulmones neumónicos fueron Mycoplasma hyopneumoniae 83%. Pasteurella multocida 43% y Mycoplasma hyorhinis 37% ^{4,25}.

Otros factores de virulencia están dados por las características fenotípicas de la bacteria como son: la cápsula, constituida por ácido hialurónico que le sirve para neutralizar la defensa del hospedero: toxina dermonecrótica, presente en la pared celular y que produce severas alteraciones de los cornetes nasales¹²: neuraminidasa, enzima que se asocia con los mecanismos

de adhesión de la P. multocida tipo A y que desempeña un papel importante en la colonización e infección de la nasofaringe.

1.3.1. Fimbrias

La adherencia bacterial a la superficie de la célula euacariótica se hace a través de material capsular o proteínas de superficie llamada adhesinas. Las fimbrias de las bacterias Gram negativas sirven como adhesinas específicas que se unen a receptores también específicos que están presentes en las células eucarióticas.

Los aislamientos de P. multocida tipo A de conejos poseen fimbrias que median la adhesión a las células faríngeas. Se conoce además que las cepas tipo A aisladas de porcinos se adhieren más rápido al epitelio traqueal que las cepas tipo D²⁶.

1.3.2. Polisacáridos capsulares

La presencia de polisacáridos capsulares, algunos asociados con ácido hialurónico, son un factor común entre el grupo HAP y se le reconoce como un importante atributo de virulencia ya que previene la fagocitosis y la actividad sérica bactericida ^{24,40}.

Los siguientes patógenos capsulares del grupo son importantes: Haemophilus influenzae, Actinobacillus plauroneumoniae, Pasteurella haemolítica y P. multocida.

Aunque la sola cápsula no es suficiente para hacer a un microorganismo virulento, estudios realizados en Haemophilus influenzae tipo B, han resultado en aislamiento de genes responsables del tipo capsular y muestran que una mutación en uno de esos genes produce pérdida de la virulencia. La capsulación y la virulencia se puede restablecer por transformación con ADN clonado.

Los lipopolisacáridos (LPSs) confieren resistencia al complemento, la actividad bactericida del suero y estimulan la liberación de mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria, o daño tisular.

1.3.3. Toxinas

Otro factor importante de virulencia son las toxinas, particularmente las leucotoxinas. La Pasteurella haemolítica produce una citotoxina que lisa leucocitos incluyendo monocitos de sangre periférica, polimorfonucleares y macrófagos alveolares. Igualmente el Actinobacillus pleuropneumoniae produce una hemolisina citotoxina que interviene en la patogénesis de la enfermedad¹⁵. En el caso de la P. multocida tipo A, aislada de casos de neumonía no se ha demostrado en forma muy clara la producción de toxina.

1.3.4. Proteínas de membrana externa

Recientemente se ha puesto particular atención sobre las proteínas de membrana externa, las cuales se han asociado a diferentes funciones de las bacterias; las proteínas de membrana externa (OMP) de bacterias Gram negativas tienen un papel importante en los procesos infecciosos³³.

Una de las funciones de estas proteínas es el transporte de sustancias a través de la membrana externa, así junto con la fosfolipasa A son esenciales para la invasión de la célula hospedera por ciertos patógenos.

1.3.5. Neuroaminidasa

La actividad de esta enzima está asociada con los mecanismos de adhesión de la P. multocida tipo A, y desempeña un papel importante en la colonización e infección de la nasofarínge, posándose sobre el epitelio ciliado de las células. Esta enzima rompe el enlace químico del ácido neuroamínico (o ácido siálico, presente en las superficies de las mucosas) con otros carbohidratos.

1.3.6. Plásmidos

Aislamiento de miembros de la familia Pasteurellaceae, mostraron resistencia a drogas usadas en la terapia de infecciones comunes en animales¹⁰.

Algunas cepas de P. multocida poseen plásmidos que se relacionan con resistencia a los antibióticos. Así por ejemplo en una cepa de P. multocida aislada de bovinos se encontró que producía beta-lactamasa y estudios posteriores demostraron que poseía un plásmido que codificaba para esta enzima⁵⁹.

1.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PASTEURELLA MULTOCIDA

El organismo está presente prácticamente en todos los sistemas de producción intensiva de cerdos y se puede fácilmente aislar de la mucosa nasal de individuos sanos, por lo cual su nicho ecológico es la nasofaringe. Se destruye fácilmente a temperaturas mayores de 50°C por diez minutos, por la acción del fenol al 0.5% durante 15 minutos, por soluciones de bicloruro de mercurio al 1:5000 y por el cresol al 3.5% en unos minutos.

La transmisión es por vía nasal u oral a través de gotitas de aerosol de animales infectados, por contacto con objetos contaminados o por secreciones respiratorias, afectando animales en etapa de crecimiento y finalización.

Se ha establecido que las condiciones de manejo y los factores ambientales influyen considerablemente en la gravedad del padecimiento, así por ejemplo la temperatura y la humedad facilitan la penetración a los pulmones tanto de patógenos primarios como secundarios al alterar el mecanismo protector de las vías respiratorias, la sedimentación de partículas infectadas que van por aire y el nivel de concentración de los patógenos presentes en una piara⁵.

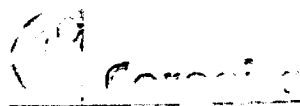
Este organismo ocasiona una alta morbilidad y una baja mortalidad, pero produce una drástica reducción en los parámetros de crecimiento y productividad.

Debido a que la P. multocida se encuentra como patógeno secundario, para su control se debe diseñar un programa que incluya:

1. Ventilación adecuada de las instalaciones, para prevenir la acumulación de gases como el amoníaco.
2. Controlar las condiciones predisponentes como exceso de animales por m², la unión de cerdos de diferente procedencia, temperaturas extremas y alta humedad.
3. Adoptar en la medida de lo posible un esquema de movimiento de los animales "todo dentro/todo fuera".

Otro de los métodos para minimizar los efectos de la infección es el tratamiento durante las fases tempranas de la enfermedad con antibióticos como: Penicilinas, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Gentamicina, Kanamicina, etc.

La identificación de los microorganismos usualmente está basada en aspectos como aislamiento, perfiles bioquímicos, serotipificación y antibiograma. Pero la tipificación precisa de las bacterias patogénicas es un propósito importante en la epidemiología de las enfermedades infecciosas se requiere constantemente la identificación de marcadores específicos para reconocer cepas asociadas con brotes de enfermedad y por lo tanto diferenciar las cepas endémicas de las epidémicas²⁰. Es por esto que la epidemiología de las enfermedades infecciosas se puede estudiar a nivel molecular mediante análisis de proteínas, perfil de plásmidos, ribotipificación, PCR o huella genómica.



1.4.1. Huella genómica

Es un método molecular que permite detectar directamente diferencias entre el ADN de los microorganismos. El método consiste en el corte del ADN con una enzima de restricción la cual produce fragmentos de diferentes longitudes, dependiendo del número y posición de secuencias reconocidas por la enzima. Los fragmentos generados por la digestión con la enzima de restricción se separan luego por métodos electroforéticos, produciendo un patrón de bandas característico ^{52,54}.

Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción consisten en la mayoría de los casos de cuatro a seis nucleótidos dispuestos en un orden específico y en cadenas simétricas, la frecuencia de restricción de la enzima depende del número de sitios de restricción reconocidos por ésta y del tamaño del genoma ²².

Debido a que el genoma de las especies bacterianas varía considerablemente en su composición, se debe esperar que la distribución de los fragmentos generados por la enzima varíen ampliamente³⁰.

Los patrones de restricción del ADN se han utilizado para detectar diferencias entre las cepas de varias bacterias, incluyendo un gran número de géneros y especies y otros microorganismos de importancia tanto en medicina humana como veterinaria.

La diferencia entre las cepas por medio de la huella genómica se puede establecer por la evaluación visual de los patrones de restricción o por medio de métodos computarizados para hacerla mucho más objetiva en cuanto a comparación.

Este análisis ha surgido como una alternativa taxonómica superior a otros métodos convencionales que involucran características fenotípicas, ya que con éste método se busca caracterizar la bacteria de acuerdo al patrón de restricción de su genoma. Además la técnica revela un grupo específico de marcadores que reflejan la organización genética del microorganismo, la cual es insensible a las variaciones fenotípicas y condiciones de crecimiento. Lo que hace que sea un buen método para establecer relación clonal entre organismos aislados en diferentes épocas de tiempo o en diferentes regiones geográficas ³⁹.

La caracterización de un brote de enfermedad de tipo infeccioso generalmente involucra situaciones en los que hay transmisión de este proceso de persona a persona o de animal a animal o una infección simultánea a partir de una misma fuente.

Un rasgo importante en la evaluación epidemiológica, es la determinación de la clonalidad del agente infeccioso sospechoso independientemente del método de transmisión. El seguimiento de un agente patógeno se puede hacer

en hospitales, comunidades o en poblaciones animales dando a conocer la epidemiología de la infección⁵⁷.

Numerosos estudios epidemiológicos se han descrito en la literatura para confirmar la utilidad de la huella genómica en aspectos tales como:

- Identificación de cepas bacterianas epidémicas.
- Caracterización de cepas bacterianas endémicas.
- Caracterización de cepas bacterianas aisladas de diferentes regiones geográficas.

Kristiansen y colaboradores²⁹, demostraron la posibilidad de utilizar esta metodología para el estudio de cepas de Neisseria meningitidis serotipo B15, realizando digestiones del genoma con enzimas como la Hind III y EcoRI separando luego los fragmentos en geles de poliacrilamida. Se encontraron entre 50 y 60 fragmentos en el perfil electroforético y se concluyó que se podía obtener suficiente información genética acerca de cepas epidemiológicamente relacionadas.

En un estudio, Holten y colaboradores¹³, comparando cepas de Neisseria meningitidis serotipo B15 encontraron que las cepas aisladas de portadores sanos (aislamientos faríngeos), mostraban una huella genómica muy heterogénea en tanto que las cepas asociadas con meningitis (aisladas de

líquido cerebro espinal o sangre), eran muy similares indicando que había un solo clon invasivo septicémico.

Mogollón y colaboradores³⁸, también examinaron cepas de Streptococcus suis tipo 2 aislados de casos humanos con meningitis y encontraron que ellas eran similares pero no idénticas a la cepa de referencia del tipo 2. Este hallazgo permitió concluir que la huella genómica facilitó la discriminación entre cepas que eran serológicamente idénticas. Además, se demostró que una cepa causante de meningitis en cerdos aislada en Minnesota (USA), fue idéntica a dos cepas humanas aisladas en Hong Kong. Esta observación corroboró el potencial de infección que representan los cerdos para los humanos, y sugirió que ciertos clones pueden estar ampliamente dispersos en la naturaleza.

1.4.1.1. Enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas aisladas principalmente de procariotes que reconocen segmentos específicos dentro de una doble cadena de ADN (Tabla 1). Estas enzimas se pueden clasificar en tres grupos: Tipo I, Tipo II y Tipo III según la composición de las bases de la subunidad, el cofactor requerido y el tipo de ADN clivado.

Las de tipo I son las más complejas. Este grupo contiene tres tipos diferentes de subunidades y requieren Mg_2 , ATP y 5-adenosylmetionina para clivar el ADN. Sus sitios de reconocimiento son complejos y el clivaje del ADN da origen a fragmentos específicos de 400 a 7000 pares de bases.

Tabla 1. Ejemplos de algunos tipos de endonucleasas de restricción

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	ORIGEN	SITIO DE RECONOCIMIENTO
BamH I	<u>Bacillus amyloliquefaciens</u> H	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'
EcoR I	<u>Escherichia coli</u> RY13	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'
Hind III	<u>Haemophilus influenza</u> Rd	5'-A AGCTT-3' 3'-TTCGA A-5'
Hpa II	<u>Haemophilus parainfluenza</u>	5'-C CGG-3' 3'-GGC C-5'
Kpn I	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	5'-GGTAC C-3' 3'-C CATGG-5'
Hae III	<u>Hemophilus aegyptius</u>	5'-GG CC-3' 3'-CC GG-5'
Sma I	<u>Serratia marcescens</u>	5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5'

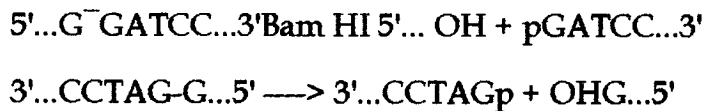
Tomado de Maniatis y Col. (1982).

Las de tipo III: Son un poco menos complejas contienen únicamente dos tipos de subunidades y al igual que las de tipo I requieren Mg_2 más ATP para clivar ADN, la S-adenosylmetionina estimula la actividad enzimática pero no es un requerimiento absoluto. El clivaje del ADN aparece en fragmentos de 25 a 27 pares de bases.

Las enzimas de tipo II son mucho más simples. Las endonucleasas contienen únicamente un tipo de subunidad y solamente requiere Mg_2 para clivar el ADN.

El clivaje de ADN ocurre en sitios específicos dentro o adyacente al sitio de reconocimiento de la enzima. Se han aislado e identificado un gran número de enzimas de restricción tipo II muchas de la cuales son usadas en el proceso

de clonaje molecular y la generación de un huella genómica. En general las enzimas tipo II reconocen secuencias específicas de ADN para dar origen a fragmentos descritos de ADN con residuos fosfatos en la terminación 5' e hidroxilo en la terminación 3' ³⁵.



Cada enzima de restricción requiere de unas condiciones óptimas para llevar a cabo su actividad dependiendo de las recomendaciones de cada casa comercial ^{22,35}.

Hay que tener en cuenta la temperatura, el tiempo de incubación y la composición del Buffer, de la cual la temperatura es la variable más importante. Las enzimas de restricción han sido divididas en varios grupos de acuerdo a los requerimientos iónicos de cada una de ellas para su actividad. Las que trabajan mejor con elevado contenido iónico, las que requieren un contenido iónico promedio, finalmente las que tienen preferencia por buffer de bajo contenido iónico y otro tipo de buffer (Tabla 2).

Generalmente se requiere 1µl de enzima para digerir 1 mg de ADN en una hora; además hay que tener en cuenta que la reacción puede detenerse por cambios de temperatura o con un buffer que contenga EDTA.

Tabla 2. Composición de buffer para enzimas de restricción

		<i>Colour coding on buffer label</i>	
<i>Low salt buffer</i>	x10 L	100mM Tris-HCl, pH7.5 100mM MgCl ₂ 10mM Dithiothreitol	Pink
<i>Medium salt buffer</i>	x10 M	100mM Tris-HCl, pH7.5 100mM MgCl ₂ 10mM Dithiothreitol 500mM NaCl	Purple
<i>High salt buffer</i>	x10 H	500mM Tris-HCl, pH7.5 100mM MgCl ₂ 10mM Dithiothreitol 1000mM NaCl	Green
<i>Potassium buffer (KCl)</i>	x10 K	200mM Tris-HCl, pH8.5 100mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol 1000mM KCl	Yellow
<i>Tris acetate buffer BSA-free</i>	x10 T	330mM Tris-HCl, pH7.9 100mM Mg-acetate 5 mM Dithiothreitol 660mM K-acetate	Orange
	0.1% BSA		Red
	0.1% Triton X-10		Blue

Tomado de Hoenecke, N and Stock, C. 1994.

1.4.1.2. Electroforesis en geles de agarosa

La agarosa es un polímero lineal extraído de algas marinas cuya estructura básica se muestra en la Figura 1. La agarosa comercial no es completamente pura, esta viene contaminada con otros polisacáridos, sales y proteínas. Su impureza varía de lote a lote y también según la empresa fabricante. Estas diferencias pueden afectar la migración del ADN y la capacidad de recuperar el ADN del gel para servir de sustrato en una reacción enzimática.

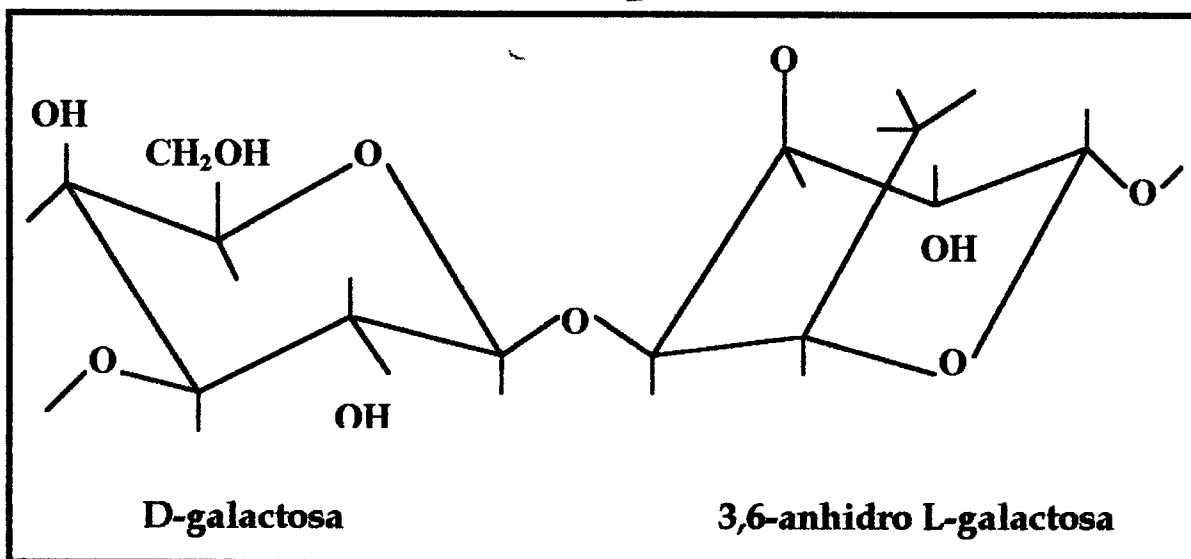


Figura 1. Estructura química de la agarosa

Es por eso que algunos fabricantes preparan grados especiales de agarosa que son clasificados según la presencia de inhibidores y nucleasas y por tener un mínimo de fluorescencia después de la coloración con bromuro de etidio.

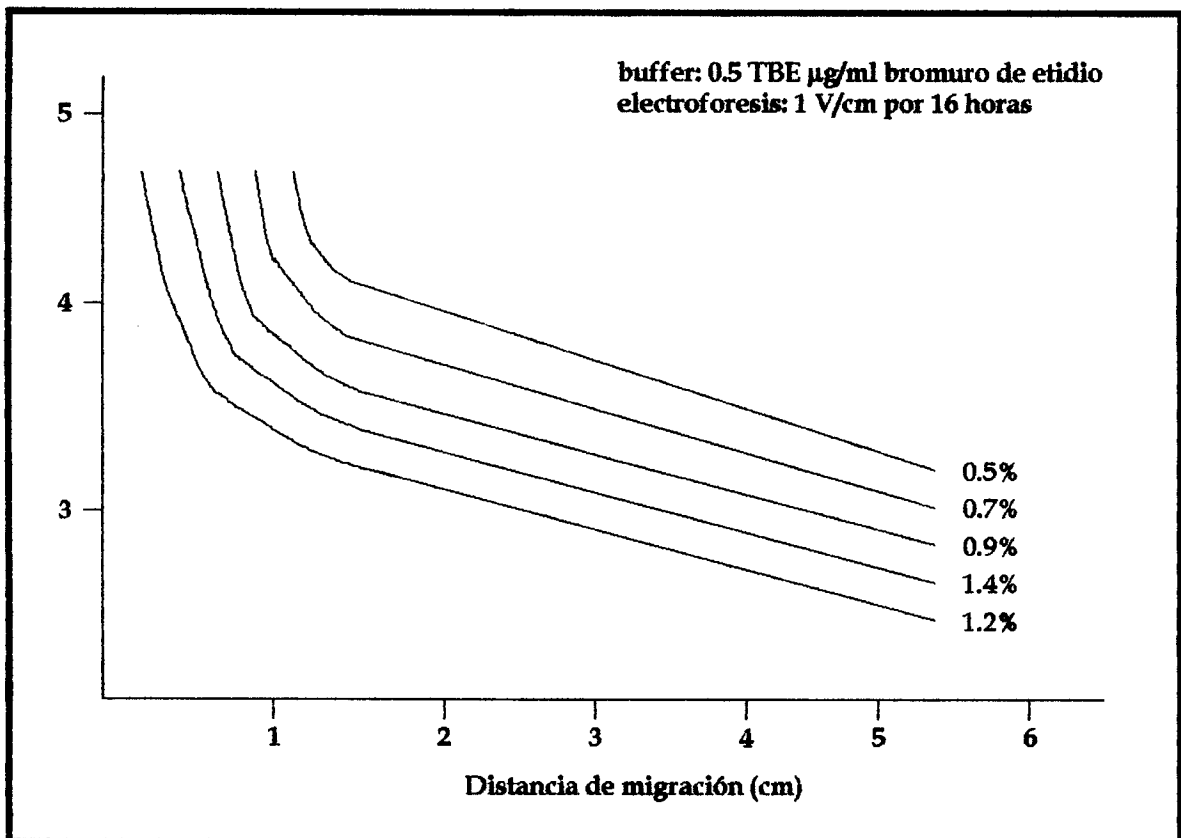
Los geles de agarosa son preparados con diferentes porcentajes de gelificación dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN que se van a separar. La Tabla 3 muestra el rango óptimo de separación para diferentes porcentajes de agarosa.

Tabla 3. Rangos de separación para geles de agarosa

AGAROSA (%)	RANGO ÓPTIMO DE SEPARACIÓN DE ADN (KB)
0.3	60 - 5.0
0.6	20 - 1.0
0.7	10 - 0.8
0.9	7 - 0.5
1.2	6 - 0.4
1.5	4 - 0.2
2.0	3 - 0.1

La tasa de migración de los ácidos nucleicos a través de geles de agarosa adicionalmente depende de varios factores:

- **Tamaño molecular del ADN:** La rata de migración a través de los geles es inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases (Hellin y col. 1974) (Figura 2). La migración de moléculas grandes es más lenta debido a la mayor fricción y porque su corrido a través de los poros del gel es menos eficiente que el de moléculas más pequeñas³⁵.



Tomado de Maniatis y Colaboradores 1982.

Figura 2. Relación entre el tamaño del ADN y la movilidad electroforética en geles de agarosa a diferentes porcentajes.

Conformación del ADN: Existen tres diferentes clasificaciones del ADN según su conformación así: (Tipo I) circular superhelicoidal; (Tipo II) relajada (Nicked); (Tipo III) lineal. Cada uno de estos tipos presentan diferentes tasas de migración a través de los geles de agarosa. La movilidad de éstas tres formas depende primariamente de la concentración del gel de agarosa, la cantidad de corriente aplicada y la concentración iónica del buffer de corrido. Bajo estas condiciones es ADN tipo III migra más lento que el ADN tipo I.

- **Voltaje aplicado:** La rata de migración de fragmentos lineales de ADN es proporcional al voltaje aplicado de este modo, el rango efectivo de separación en geles de agarosa decrece a medida que el voltaje incrementa; generalmente se utiliza 1V/cm de longitud del gel ³⁵.

1.4.1.3. Buffer de corrido y coloración

La movilidad del ADN está afectada por la composición y la fuerza iónica del buffer de corrido; en ausencia de iones la conductividad eléctrica disminuye y el ADN migra más lentamente. Por el contrario un buffer con buena concentración iónica aumenta la conductividad eléctrica eficientemente y disminuye la generación de calor (importante para evitar desnaturalización del ADN). Existen diferentes clases de buffer dependiendo de la muestra y el tiempo de corrido (Tabla 4).

Por razones históricas, el TAE ha sido el buffer más comúnmente usado. Sin embargo su capacidad amortiguadora es muy baja y tiende a agotarse en

corridos electroforéticos largos; el TPE y TBE tienen un costo más elevado que el TAE, pero presentan una alta capacidad amortiguadora y son usados para largos corridos.

De otro lado, la coloración de los geles de agarosa se realiza con un colorante fluorescente llamado bromuro de etidio. Esta sustancia contiene un grupo planar que se intercala entre las bases agrupadas de ADN. La posición fija de este grupo entre bases muy cercanas produce exposición de ADN; La radiación U.V. es absorbida por el ADN y transmitida por el colorante, la energía se reemite a 590 nm en la región rojo amarillo del espectro visible.

Tabla 4. Composición de los buffers comúnmente usados en electroforesis

BUFFER	SOLUCIÓN DE TRABAJO	CONCENTRACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK (POR LITRO)
Tris-acetato (TAE)	1x:0.04 M Tris acetato 0.001 M EDTA	50x:242g Tris base 57.1ml ácido acético glacial 100ml 0.5M EDTA (pH 8.0)
Tris-fosfato (TPE)	1x:0.09 M Tris fosfato 0.002 M EDTA	10x:108g Tris base 15.5ml 85% ácido fosfórico (1679g/ml) 40ml 0.5M EDTA (pH 8.0)
Tris-borato (TBE)	0.5x:0.045 M Tris borato 0.001 M EDTA	5x: 54g Tris base 27.5g ácido bórico 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0)
Tris-alkalino	1x:50mN NaOH 1mM EDTA	1x: 5ml 10N NaOH 2ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

Tomado de Maniatis y Col 1982.

El bromuro de etidio puede ser usado para detectar ácidos nucleicos de cadena doble y sencilla (ARN Y ADN). Sin embargo, la afinidad del colorante

por los ácidos nucleicos de cadena simple es relativamente baja y la producción de fluorescencia es comparativamente pobre (Figura 3).

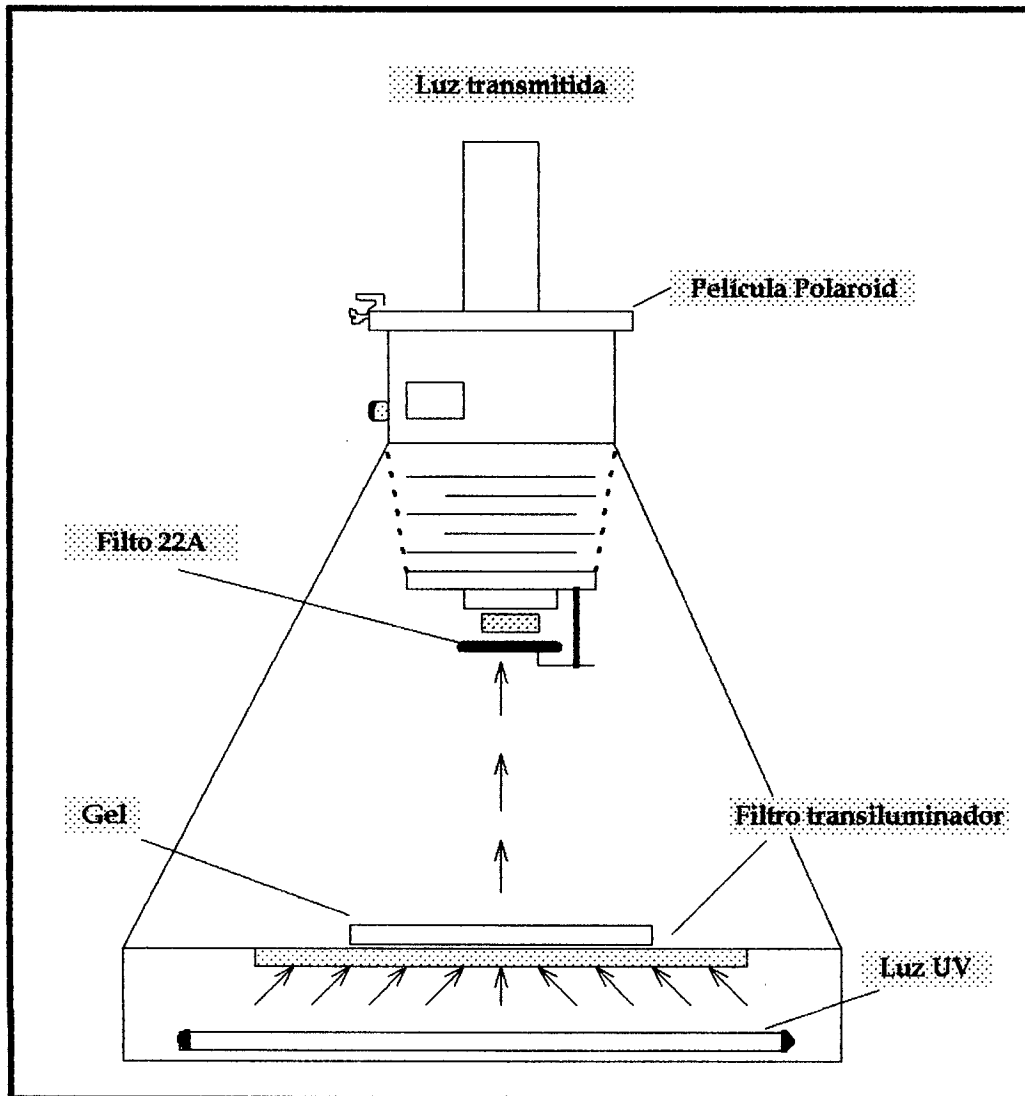


Figura 3. Diagrama del sistema utilizado para la fotografía de geles teñidos con bromuro de etidio.

1.4.2. Perfil de plásmidos

Las bacterias contienen pequeños elementos extracromosomales llamados plásmidos, los cuales son moléculas de ADN circular de doble cadena que se

duplican libremente y no son esenciales para la célula bajo condiciones normales de crecimiento. Su presencia le confiere nuevas propiedades al huésped. Los tamaños de los plásmidos son variables, algunos tienen pesos moleculares no mayores de 10^9 daltons y son portadores de uno a tres genes mientras que otros tienen pesos que representan del 10 al 20% del cromosoma⁵³.

El análisis plasmídico es un método de tipificación que se encuentra dentro de las posibilidades de muchos laboratorios de microbiología. Permite conocer de forma rápida la similitud existente entre las diferentes cepas bacterianas aisladas en un brote epidémico. El empleo de endonucleasas de restricción mejora el poder discriminatorio del método sobre todo cuando sólo existe un plásmido y además es de elevado peso molecular o el perfil plasmídico es muy similar¹⁶.

1.4.3. Ribotipificación

La ribotipificación es un método de genotipificación el cual usa una sonda derivada directamente de un ARN ribosomal mediante un ADN complementario obtenido de las fracciones 16S + 23S ARNr. El ARN puede ser obtenido tanto de cepas homólogas como heterólogas¹.

Es una técnica más sensible y más específica de tipificación molecular en la que usando un ARN ribosomal obtenemos patrones de bandas (ribotipos)

específicos donde haya una secuencia complementaria del ADN que contiene el gen⁵⁸.

La ribotipificación se constituye en una técnica adecuada mediante la cual podemos distinguir cepas de diferentes grupos o poblaciones.

Las sondas genómicas basadas en el uso del ARN ribosomal (ARNr) suministran un amplio sistema aplicable para investigar la epidemiología molecular de diversas bacterias ya que otro tipo de sonda tiene una aplicación más limitada por ser mucho más específica o únicamente para cepas dentro de una especie particular.

El fundamento para un uso racional de las sondas de ARNr hibridizadas a huellas genómicas de ADN está basado en la evolución histórica de la bacteria debido a que algunas secuencias del ribosoma son altamente conservadas.

Para obtener la sonda es necesario primero obtener por medio de transcriptasa reversa un ADN complementario a partir del ARNr.

Cuando se realiza este proceso de ribotipificación y se siguen las instrucciones de detección y revelado de acuerdo al kit utilizado, los resultados son visualizados directamente en la membrana de nylon utilizada.

Se comparan en forma visual los ribotipos de las cepas analizadas en un determinado brote epidémico, y se establece el número de patrones existentes para cada grupo de bacterias y se obtiene de ésta forma un buen estudio epidemiológico²¹.

2. METODOLOGÍA

2.1. PROCEDENCIA DE LOS PORCINOS MUESTREADOS

En el presente estudio se utilizaron porcinos procedentes de cuatro granjas del departamento de Cundinamarca situadas en los Municipios de Guasca (Granja 1), San Francisco (Granja 2), Facatativa (Granja 3) y La Victoria (Granja 4), y sacrificados en el frigorífico de Guadalupe centro de beneficio de porcinos en Santafé de Bogotá.

2.2. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas en el mismo lugar de sacrificio (Frigorífico Guadalupe). En total se colectaron 100 muestras de tejido pulmonar de aquellas áreas que presentaban lesiones macroscópicas características de neumonía, y se trasladaron bajo condiciones adecuadas de refrigeración al

centro de investigaciones en salud y producción animal CorpoICA-Ceisa, donde se llevó a cabo el estudio.

2.3. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

Las muestras pulmonares se sembraron en agar sangre y agar Mac Conkey, y se incubaron a 37°C por 24-48 horas. Las colonias que presentaron la morfología característica de Pasteurella y que no crecieron en agar Mac Conkey, se sometieron a coloración de Gram⁶. Las colonias identificadas al microscopio como cocobacilos Gram-negativos se subcultivaron en agar sangre y se incubaron a 37°C de 24-48 horas y así en cultivo puro se sometieron a pruebas bioquímicas según los perfiles descritos por Carter ⁶.

2.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Las colonias sospechosas de ser P. multocida se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: Catalasa; Oxidasa; SIM; Urea; Nitratos; y Fermentación de Azúcares como glucosa, lactosa, manitol, sorbitol y maltosa. Se confirmaron como cepas de P. multocida aquellas que mostraron reacción positiva a la catalasa, la oxidasa, el indol, la glucosa, el manitol y el sorbitol y reacción negativa a la úrea, la lactosa y la maltosa.

Posteriormente se practicaron pruebas selectivas como la de hialuronidasa para la identificación del serotipo A. La prueba de hialuronidasa se realizó de la siguiente manera:

Las cepas cultivadas en 3 ml de caldo BHI a 37°C por 24 horas se sembraron masivamente en agar BHI; luego se impregnaron discos de papel del filtro estéril con Hialuronidasa Testicular Ovina a una concentración de 700 unidades/ml. y se leyó después de incubar a 37°C por 24 horas. La presencia de un halo de inhibición alrededor del disco se consideró como un resultado positivo para el serotipo A ^{34,47}.

2.5. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Las cepas de Pasteurella multocida aisladas de los pulmones afectados se cultivaron en 30 ml de medio BHI a 37°C toda la noche. Luego se realizó la coloración de Gram (confirmar morfología) y se cultivó en agar sangre para control de esterilidad (ausencia de crecimiento de otros microorganismos).

La suspensión de bacterias se centrifugó a 10.000 r.p.m. a 4°C por 20 minutos; el sedimento obtenido se lavó dos veces con PBS y finalmente se resuspendió

en 5 ml de una solución recién preparada que contenía^{17a}: Sucrosa^b 25 %, Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 10 mM, PH^c 8.0

Posteriormente se ajustó el pH de la solución en 8.0 y se adicionaron 10 mg./ml. de lisozima. La suspensión se mezcló suavemente durante 30-60 min. a temperatura ambiente y se agregaron 25 ml. de proteinasa K (20 mg/ml). Luego de mantenerse a temperatura ambiente por 10 min se adicionaron 2 ml de una solución recién preparada que contenía^d : Sucrosa^e 25 %, Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 50 mM, Sarcosil^f 10 %, pH 8.0

La suspensión se incubó a 50 °C por tres horas en baño maría; transcurrido este tiempo se adicionaron 3.5 ml de una solución de acetato de amonio (7.5 M) y 100 µl de Fenil metil sulfonil fluoride (PMSF) recién preparado en 1 ml. de etanol absoluto (2 mg/ml).

Luego de mezclar, se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C por 20 minutos, el contenido de la vénula se transfirió un tubo de 50 ml al cual se le adicionaron suavemente 2,5 a 3,0 volúmenes de etanol absoluto y se colocó en hielo por 10 minutos.

a Esta solución se preparó a partir de soluciones stock: Tris HCl 0.1 M; EDTA 0.5 M; NaCl 1

b La sucrosa se pesó y adicionó en el momento de preparar la solución

c El pH se ajustó en el momento de preparar la solución con NaOH ó HCl 5N

d Esta solución se preparó a partir de soluciones stock: Tris HCl 0.1 M; EDTA 0.5 M; NaCl 1 M.

e La sucrosa y el sarcosil se pesaron y adicionaron en el momento de preparar la solución

f El pH se ajustó en el momento de preparar la solución con NaOH ó HCl 5N



Finalmente la vónula se agitó manualmente hasta precipitar el ADN, que luego se colectó en un tubo eppendorf que contenía 400 a 500 ml de etanol al 10 %; este se centrifugó a 20.000 rpm. por tres minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se descartó y el pellet de ADN se resuspendió en 50µl. de Buffer TE (Tris-EDTA PH: 8.0), disolviéndolo luego a 65°C por dos horas.

2.6. CANTIDAD DE ADN Y LECTURA EN ESPECTOFOTÓMETRO

Para determinar la concentración de ADN se realizaron lecturas de adsorbancia por espectrofotometría a 260 y 280 nm. Las bases purinas y pirimidinas absorben con mayor fuerza a 260 nm, y las proteínas contaminantes absorben mejor a una longitud de onda de 280 nm.; por lo tanto la proporción de adsorbancia entre 260:280 es una forma de determinar la pureza de la preparación de ADN, la cual es óptima entre 1.6 y 2.0.

2.7. DIGESTIÓN DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se colocaron diferentes cantidades de ADN en tubos eppendorf, según la pureza leída en el espectrofotómetro (3, 5 ó 7 µl.); se agregaron 3 µl de las enzimas de restricción Hae III o Sma I (Promega Biological Research Products,

USA) y 3 μ l del buffer correspondiente, completando esta mezcla con agua destilada, desmineralizada y estéril a un volumen final de 30 μ l.

El marcador de peso molecular se preparó con 1 μ l. de ADN, 1 μ l. de enzima (Hae III o Sma I) y 1 μ l. de buffer y 2 μ l. de agua destilada, desmineralizada y estéril para un volumen final de 5 μ l.

Las digestiones con Hae III se incubaron a 37°C por dos horas; y las realizadas con Sma I a 25°C por dos horas. Luego se detuvo la reacción adicionando la quinta parte del volumen final de la digestión con buffer de llenado (azul de bromofenol) a las muestras y al marcador.

Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III (GIBCO BRL - Cat N° 10382-026), cuyos fragmentos sirven como estándar de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida. Los fragmentos pueden ser visualizados por la coloración con bromuro de etidio (Figura 4).

Los fragmentos de 564 y 125 pares de bases, pueden ser difíciles de detectar por su pequeño tamaño. Debido a la presencia de terminaciones cohesivas en los fragmentos 23130 y 4361 pares de bases, la banda de 4361 pares de bases puede no ser observada a menos que el ADN sea calentado 65°C por 10 minutos.

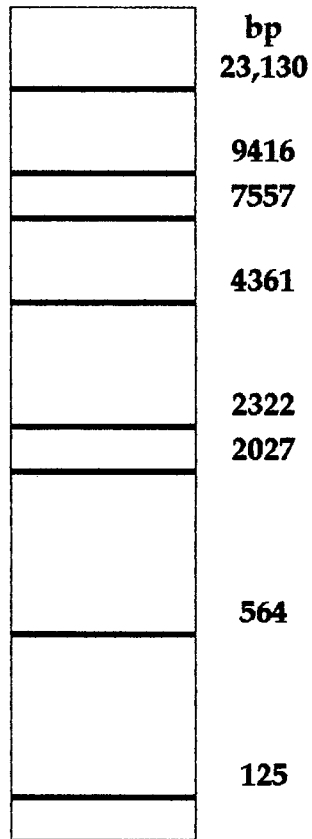


Figura 4. Esquema del patrón de restricción del ADN del fago Lambda digerido con la enzima Hind III.

2.8. ELECTROFORESIS

El ADN digerido fue sometido a electroforesis en una unidad horizontal de una sola dimensión en un gel de agarosa 0.55% (0.55 gr. de agarosa en 100 ml. de buffer TBE * 0.5 x), dejándolo con una corriente continua 30 Voltios por 17 horas.

g 89 mM. de Tris base, 89 mM de ácido bórico, 2.4 mM de EDTA sodio a pH 8.3

2.9. TINCIÓN Y REVELADO

Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 mg/ml), utilizando el mismo buffer de corrido (900 ml); luego se adicionaron 50 μ l de bromuro de etidio, mezclando suavemente durante una hora y finalmente se lavó con agua destilada por 15 minutos.

Las bandas de ADN se visualizaron en un trans-iluminador de luz UV y se tomaron fotografías con cámara polaroid utilizando una película polaroid 665.

2.10. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los patrones de restricción se analizaron en forma visual teniendo en cuenta los fragmentos de alto peso molecular para establecer diferencias entre cepas de P. multocida^{17,44}.

En el caso de la huella generada con Sma I se examinaron en detalle los negativos de las fotografías tomadas a los respectivos geles para ubicar en forma precisa todos los fragmentos y elaborar así un perfil por medio del computador y facilitar el análisis.

De otro lado, se determinaron los porcentajes de los patrones obtenidos (X) con las enzimas utilizadas (Hae III y Sma I) en cada una de las granjas analizadas, así:

$$\% \text{ Patrón X} = \frac{\text{Número de muestras digeridas con Hae III, que presentaron el patrón X}}{\text{Número total de muestras digeridas con Hae III}} \times 100$$

$$\% \text{ Patrón X} = \frac{\text{Número de muestras digeridas con Sma I, que presentaron el patrón X}}{\text{Número total de muestras digeridas con Sma I}} \times 100$$

3. RESULTADOS

La digestión de las muestras con enzimas proporcionó diferentes patrones de restricción que se designaron de la siguiente manera: Los patrones obtenidos al digerir las muestras de ADN con la enzima Hae III se denominaron A, B; y los obtenidos con la enzima Sma I se denotaron como C, D y E.

3.1. ANÁLISIS DE LA HUELLA GENÓMICA DE LAS CEPAS DE PASTEURELLA MULTOCIDA DE CADA GRANJA

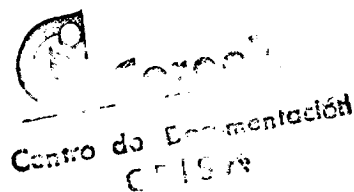
Granja 1 (Puyito): Las cepas de P. multocida digeridas con Hae III presentaron dos patrones de restricción, A y B tal como se aprecia en los carriles 2 y 3 del gel (Anexo 1); estas diferencias son significativas en los fragmentos de mayor peso molecular, aproximadamente entre 23.130 y 9.416 pares de bases de acuerdo al marcador de peso.

Por otra parte, las cepas de la misma granja digeridas con la enzima Sma I mostraron tres patrones diferentes, C, D y E, fácilmente distinguibles en los carriles 3, 5 y 6 (Anexo 1); estos patrones exhiben mayores diferencias entre 9416 y 2322 pares de bases comparado con el fago lambda.

Granja 2 (Carulla): Las cepas procedentes de esta granja segunda presentaron un solo patrón de restricción (B) al ser digeridas con Hae III, representado en todos los carriles (Anexo 1). De otro lado las cepas de P. multocida tenían un solo patrón (D) cuando se estudiaron con la enzima Sma I.

Granja 3 (La Floresta): En la tercera granja estudiada (La Floresta), con la digestión con Hae III se observaron dos patrones de restricción A y B. La digestión con Sma I presentó como resultado tres patrones C, D y E (Anexo 1).

Granja 4 (La Pas): Finalmente la cuarta granja (La Pas) incluida en el estudio presentó dos patrones, A y B, cuando se realizaron digestiones con Hae III(Anexo 1). La digestión con Sma I mostró tres patrones de restricción, C, D y E en los carriles 1, 2 y 9 respectivamente (Anexo 1).



3.2. DISTRIBUCIÓN DE PATRONES DE RESTRICCIÓN DE LAS CEPAS DE PASTEURELLA MULTOCIDA EN CADA GRANJA.

Granja 1 (Puyito): En la digestión con Hae III, predominó el patrón B presente en un 66,7% de las muestras, en tanto que el patrón A aparece en un 33,3% (Figura 5). Con Sma I, aparecen en igual cantidad los patrones C y D con un 22,2% de las muestras cada uno, en tanto que el patrón E alcanzó el 55,6% del total de la muestras (Figura 6).

Granja 2 (Carulla): El 100% de las muestras de esta granja mostraron un solo patrón de restricción (B), en la digestión con la enzima Hae III (Figura 5). De forma similar la digestión con Sma I, produjo un 100% del patrón D (Figura 6).

Granja 3 (La Floresta): En la digestión con Hae III se presentó un 66,7% para el patrón A y un 33,3% para el patrón B (Figura 5). En el corte con Sma I, el patrón C apareció en un 55,6 % de las muestras, el patrón D en un 11,1% y el patrón E en un 33,3% (Figura 6).

Granja 4 (La Pas): Del total de las muestras de esta granja digeridas con Hae III, el 55,6% presentaron el patrón A y el 44,4% correspondieron al patrón B (Figura 5). La digestión con Sma I, produjo un 22,2% para el patrón C, un 11,1% para el patrón D y un 66,7% para el patrón E (Figura 6).

Figura 9. Porcentajes de patrones de restricción encontrados en la digestión con la enzima Hae III en las cuatro granjas

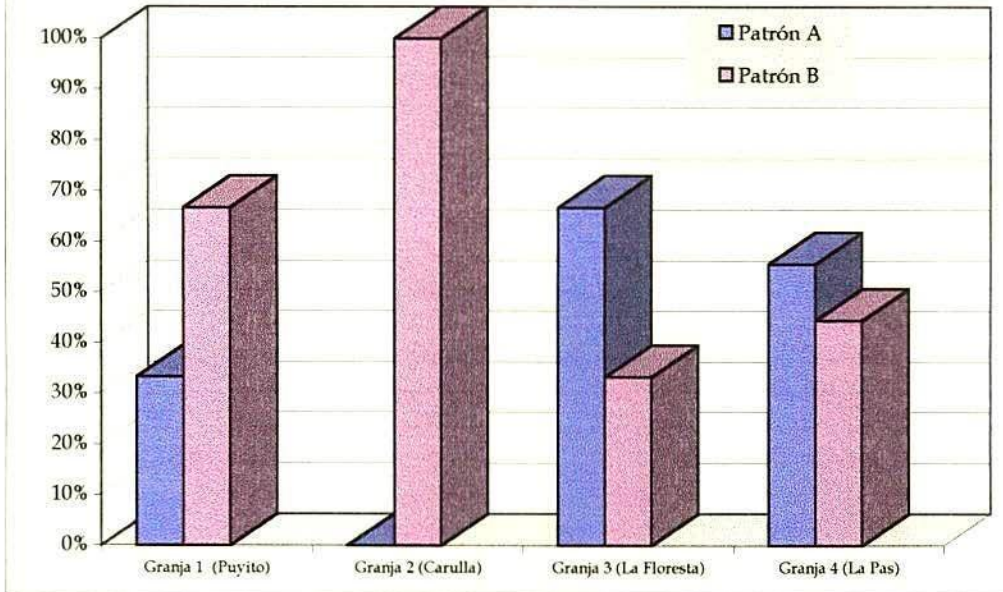
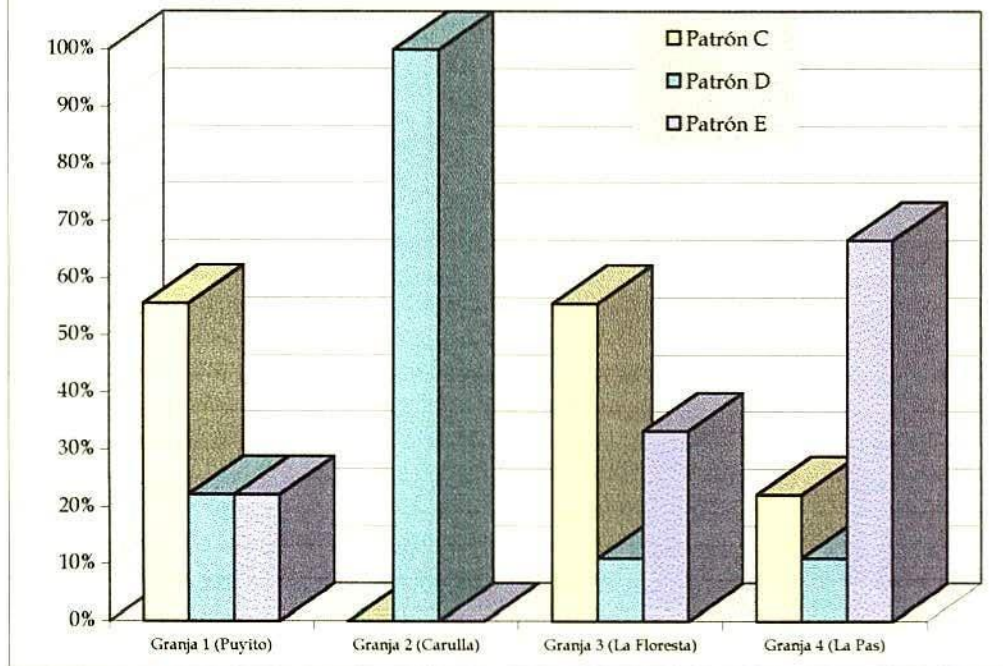


Figura 10. Porcentajes de patrones de restricción encontrados en la digestión con la enzima Sma I en las cuatro granjas



4. DISCUSIÓN

La neumonía de los cerdos representa uno de los problemas más serios de ésta especie animal⁴⁶; y se considera como el resultado de una compleja interacción entre varios agentes infecciosos, procedimientos de manejo y medio ambiente, entre los cuales vale la pena mencionar la temperatura, ventilación, polvo, alta concentración de amoníaco y la prevalencia e incidencia de diversos agentes patógenos ^{8,56}.

El análisis fenotípico de las muestras pulmonares que incluyó morfología, pruebas bioquímicas y serológicas, permitió el aislamiento de cepas de un solo tipo bacteriano en las cuatro granjas estudiadas: P. multocida serotipo A. Pero al realizar el análisis con endonucleasas de restricción del genoma bacteriano se pudo detectar directamente divergencias entre estas cepas fenotípicamente idénticas y demostró ser una técnica mucho más sensible que cualquier otro método de caracterización serológica, usándose actualmente para estudios de seguimiento epidemiológico de cepas bacterianas.

Los resultados obtenidos sugieren que la metodología utilizada para la generación de una huella genómica presentó un amplio espectro de análisis molecular, tanto para aislamientos clínicos, en los cuales fueron encontrados diferentes patrones de restricción que pueden ser utilizados como marcadores epidemiológicos específicos como también para diferenciar cepas responsables de brotes de enfermedad, que podrían en un momento determinado servir como cepas de referencia para así establecer la relación molecular entre una y otra.

Se encontraron marcadas diferencias genómicas significativas al analizar las cepas de P. multocida aisladas de una misma granja. Así, las digestiones del ADN cromosomal con Hae III y Sma I en tres de las cuatro granjas incluidas en el estudio mostraron dos y tres patrones de restricción respectivamente; lo cual sugiere una mayor diversidad genética. En contraste en la granja 2 se observó un solo patrón al digerir las cepas con estas enzimas.

Este hallazgo permite concluir que existe heterogeneidad entre las cepas de P. multocida tipo A aisladas de problemas neumónicos. Además se evidenció que la enzima Sma I, provee una mayor información genética produciendo mayores patrones que al utilizar la enzima Hae III, haciendo que Sma I sea considerada una mejor herramienta epidemiológica para futuros estudios de este tipo.

En un estudio reciente realizado por Gardner y colaboradores (1994) ¹⁷ se examinaron cepas de P. multocida asociadas con casos de rinitis atrófica progresiva y se encontró también una variabilidad genómica interesante entre cepas de tipo D y tipo A no toxigénicas, aisladas de diferentes granjas; y cepas aisladas dentro de una misma granja. Estos hallazgos son similares a los encontrados en la presente investigación y permiten afirmar que los perfiles de restricción generados por estas enzimas son una herramienta confiable para la discriminación entre cepas de P. multocida tipo A, aisladas de casos del complejo neumónico porcino.

De otro lado el hecho de haber aislado estas cepas de pulmón (casos de campo asociados a neumonía), sugiere que se trata de cepas virulentas pues fueron obtenidas de lesiones de consolidación neumónica evidentes, lo que implicaría su capacidad de colonización.

Calsamiglia y colaboradores (1996)⁹ en un estudio preliminar demostraron experimentalmente que es posible detectar diferencias genómicas entre cepas virulentas y cepas de baja virulencia de P. multocida tipo A. Estos investigadores encontraron que cuatro cepas virulentas presentaron el mismo patrón de restricción con Hpa II mientras que la cepa de baja virulencia mostró un patrón diferente.

En cuanto a la relación epidemiológica entre las cepas estudiadas el presente trabajo reveló que en cada una de las granjas tiende a predominar un solo

patrón de restricción es decir uno o máximo dos clones. Esta relación genética entre las cepas de un mismo genotipo podría sugerir una transmisión horizontal de la infección entre los animales de las poblaciones examinadas.

Es bien sabido que la transmisión de la enfermedad ocurre por contacto directo entre animales sanos y enfermos. La presencia de varios clones en una misma granja puede deberse a la mezcla de lechones de levante que se compran de diversas granjas y son llevados para su finalización a una nueva.

Rúbies y colaboradores (1996)⁴⁸, concluyeron que las cepas de P. multocida que se pueden encontrar en granjas comerciales podrían ser el resultado de la mezcla de cepas que han estado presentes en los ancestros (padres, abuelos, bisabuelos). Esta combinación resultaría en que cada granja tiene una cepa diferente lo cual se definiría como propia para esa población.


Dichos hallazgos fueron efectuados mediante estudios filogenéticos, al comparar molecularmente cepas de P. multocida aisladas de una granja núcleo, generando patrones de restricción cortados con Hind III analizados mediante un programa de computador.

Se concluye, que el estudio detallado de la huella genómica de cepas de P. multocida tipo A de casos de neumonía contribuye a dilucidar el patrón de transmisión de la infección a nivel de campo en especial si se utiliza la enzima Sma I para generar estos patrones.

5. CONCLUSIONES

- ◆ Los métodos de caracterización molecular, aportan una enorme información para el estudio de la historia natural de la enfermedades y facilita conocer la cadena de transmisión, conllevando al desarrollo de métodos efectivos de prevención y control.
- ◆ La huella genómica, es una técnica molecular que nos permite generar marcadores específicos para diferenciar cepas responsables de brotes de enfermedad.
- ◆ Las cepas de P. multocida tipo A, asociadas con neumonía y aislada da una misma granja, presentan similares patrones de restricción (huella genómica), lo cual significa que estas cepas tienen relación clonal.

- ◆ Los resultados de este estudio, sugieren una transmisión horizontal de la infección entre los animales de las poblaciones examinadas.

 **Corpoica**
Centro de Documentación
CEISA

6. RECOMENDACIONES

- ◆ Se sugiere par próximos estudios comparar cepas de Pasteurella multocida aisladas de granjas con ciclo completo (donde no ocurre mezcla de animales de otras granjas), con aquellas explotaciones donde se agrupan animales provenientes de varias granjas.

- ◆ Sería conveniente examinar las cepas existentes en los padres (a nivel de amígdala) y compararlas con las presentes en los hijos para estudio de la transmisión vertical de la Pasteurella multocida.

- ◆ Es recomendable que al aplicar técnicas de caracterización molecular, la Huella Genómica esté acompañada de otras técnicas como P.C.R. o Ribotipificación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 ADAMSON, M. R. et. al. Molecular epidemiology of Pasteurella multocida using ribotyping. *Pasteurellosis in production animals*. 1992; 69-76.
- 2 ALARCÓN, E., BROCHERD, M., BURITICA, P., GOMEZ, J., OROZCO, R., PARRA, D., Y VILLAMIL, J.C. 1980 Sector Agropecuario Colombiano. *Diagnóstico Tecnológico ICA, Bogotá*. Vol.2:798-821.
- 3 BAKM, O., KIM, Y. O. A herd outbreak of Pasteurella pneumoniae the pigs. *Pathological and epidemiological field studies in: International Pigs Veterinary Society Proceeding*. México. D.F. 1982. 84.
- 4 BLANCHARD, Beatrice. Electrón microscopic observation of the respiratory trac of SPF Piglets inoculated with Mycoplasma hyopneumoniae. *Vet. Microbiology*. 1992. 30: 329-41.

- 5 BUTTENSCHON, J. BOSSE, D. ROSENDAL, S. Dissemination of Pasteurella multocida type A from pulmonary lesions in pigs. In: International Conference on the Haemophilus, Actinobacillus, Pasteurella. Grupo Organisms Proceedings University of Guelph. Canadá. 1989. June. 21-24.
- 6 CARTER, G. R. Serotyping of Pasteurella multocida in Microbiology. 1984:16:247-258
- 7 CHOI, K.H.; MAMESWARAN, S.K.; FELICE, L.J. Characterization of outer membrane protein enriched extract from Pasteurella multocida isolated from turkeys. Am. J. Vet. Resp. 1989. 50 (5).
- 8 CIPRIAN, A.; CRUZ. TA. Mycoplasma hyopneumoniae: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Arch. Med. Res. 1994. summer: 25 (2): 235-9.
- 9 CALSAMIGLIA, M.; CARVALHO, L.; PIJOAN, C. DNA Fingerprinting of Inoculated and Recovered Strains of Pasteurella multocida. Proceedings of the 14th IPVS Congress. Bologna, Italy. 1996. 7 - 10 July.
- 10 COLLINS, F. Mechanism of adquired resistance a Pasteurella multocida infection. A. Review cornell veterinary. 1987. 67: 103-08.

- 11 DIEMEN, Van.; DE JONG, M. F. and others. Intranasal administration of Pasteurella multocida toxin in a Challenge - Exposure model used to induce subclinical signs of atrophic rhinitis in pigs-. Am. J. Vet. Res. 1994. Jan: 55 (1): 49-54.
- 12 DIGIACOMO, R. F.; DEEB, B. J. Toxin Production by Pasteurella multocida isolated from rabbits with Atrophic Rhinitis. Am. J. Vet. Res. 1993. Aug: 54 (8): 1280-6.
- 13 EISENSTEIN, B. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. J. Infect. Dis. 1990. 54: 73-7.
- 14 FARRINGTON, D. O. Pneumonic Pasterellosis In: Diseases of swine. Ed by A.D. Leman, 6th Edition. 1986. 436-444.
- 15 FELIX, R.; FLEISCH, H. Effect of Pasteurella multocida toxin on bone resorption in vitro. Infect-Immun. 1992. Dec: 60 (12): 4984-8.
- 16 FRANCESC, Marco y JIMENEZ, María T. Métodos de Tipificación: análisis de plásmidos. Ent intec y microbiol. clin. Volumen 11, Num 2 Febrero 1993.

- 17 GARDNER, Ian.; KASTEN, Rick.; and others. Molecular finger Printing of Pasteurella multocida associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 1994. 6:442-47.
- 18 GILMOUR, N. J. L. Pasteurellosis: The disease. Pasteurellosis in production animals. Aciar Proceedings. N°43. Australia. 1992. 79-82.
- 19 GOIS, M. G.; KUKSA, F.; SISAK. Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs in: International Pigs. Veterinary Society Proceeding Copenhagen. 1980. 6: 214.
- 20 GOLDMAN, D. New microbiological techniques for hospital epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1987. 6: 344-7.
- 21 HAWKEY, P. M. Molecular Methids fir the Investigation of Bacterial Croos-Infection. J. hop intec. 1987; 9:211 - 218.
- 22 HOENECKE, N and STOCK, C. Restriction enzymes promega. Notes Magazine. 1994. 47: 10 - 12.
- 23 HOLTEN, E.; LINDGVIST, B.; LUND, V.; BJORVATN, B. Diferentiation strains of Neisseria meningitidis by DNA Restriction Endonuclease Fingerprinting. J. Infec. Dis. 1984. 150:672-77

- 24 INZANA, J. Thomas. Capsules and virulence in the HAP. Group of bacteria. Can. J. Vet. Res. 1990. 54: 522-527.
- 25 JACQUES, M.; KOBISCH, M. Virulence of capsulated and no capsulated isolates of Pasteurella multocida and their adherence to porcina respiratory tract cell and mucus. Infect-Imm. 1993. Nov 61 (11): 4785-95.
- 26 JOHNSONS, R. B. and others. The antibody response of rabbits and cattle to Pasteurella multocida assessment of cross reactivity between serotypes. Aciar Proceedings. Australia. Nº 43. 1992. 159-164.
- 27 KAMP, E.; KIMMAN. Induction of nasal turbinate atrophy in Gern-free pigs, using Pasteurella multocida as well as bacterium free crude and purified dermonecrotic toxin of Pasteurella multocida. Am.J.Vet. Res. 1988. 49: 1844-49.
- 28 KIM, J.; NAGARAJA, V. DNA Fingerprinting for differentiation of field isolates from reference vaccine strains of Pasteurella multocida in turkeys. Am. J. Vet. Res. 1990. 51 (2): 207-9.
- 29 KRISTIENSEN, B. G. Differentiation of B 15 strains of Neisseria meningitidis by DNA restriction endonuclease priting finger . J, infect. dis. 1984. 150: 672-77.

- 30 LARIVIERE, S. Characterization of Pasteurella multocida form nasal cavities of Piglets from farms with or without atrophic rhinitis. J-Clin-Microbiol. 1992. Jun: 30 (6): 1398-401.
- 31 LARIVIERE, S.; LEBLANC, L. Comparison of isolation methods for the recovery of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida form the nasal cavities of piglets. J-Clin-Microbiol. 1993. Feb: 31 (2): 364-7.
- 32 LEBRUN, A.; CAYA, M. Effects of sub-mics of antibiotics on cell surface characteristics and virulence of Pasteurella multocida. Antimicrob-agents-chemother. 1992. oct: 36 (10): 2093-8.
- 33 LUGTENBERG, B.; BOXTELL, R. Atrophic Rhinitis in swine: correlation of Pasteurella multocida pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns. Inf. and Imm. 1984. 46 (1): 48,54.
- 34 MANNHEIM, W. Pasteurellaceae family. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 4th Edn. Edited by Krieg, N. Holt. J. Williams and Wilkins. Baltimore, London. 1984:1:552-558.
- 35 MANIATIS, T.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning cold spring Harbor Laboratory. 1982. Pág: 98-106.

- 36 MARCO, F. y colaboradores. Métodos de Tipificación y Análisis de Plásmidos, Ventajas e Inconvenientes. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1993. 11:97-107.
- 37 MAYER, J. W. Use of Plasmid Profiles in Epidemiologic Surveillance Transmission of Antibiotic Resistance. Clin Microbiol Rev. 1988; 1:228-243
- 38 MOGOLLON, JD.; PIOJAN, C.; MURTAUGH, M.; COLLINS, J.E.; CLEARY, P.; KAPLAN, E. Characterization of Prototype and Clinically Defined strain of Streptococcus suis by Genomic Fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 1990. 28:2462-66.
- 39 MOGOLLON, J. D. y ARIZA, F. Caracterización del Streptococcus suis tipo 2, por huella genómica en dos áreas porcícolas de Colombia (En proceso).
- 40 NICOLET, J. Overview of the virulence attributes of the HAP group of bacteria, can. J-Vet-Res 1990. 54: s12-s15.
- 41 OWEN, R.J. Chromosomal DNA Fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial Pathogens-. J. Med. Microbiol. 1989. Vol 30: 89-99.

- 42 PIJOAN, C. Strategy and cost of eradicating Pneumonía Swine herd health programming conference. 1988. Sep. St.Paul University of Minesota. 240-41.
- 43 PIOJAN, C.; FUENTES, M. Severe pleuritis associated with certain strain of Pasteurella multocida in swine. J. Am. Vet. Med. Assc. 1987. 191: 823-26.
- 44 PIOJAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C. Isolation of toxigenic strain of Pasteurella multocida from lungs of neumonic swine. J. Am. Vet. Med. A. 1984. 185 (5): 552-53.
- 45 PIOJAN, C.; TRIGO, F. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to Pasteurella multocida isolates from Atrophic Rhinitis. Can. J. Vet. Res. 1990. 54: 516-21.
- 46 QUILAND, J. Qué costo tienen las enfermedades respiratorias?. II Congreso Nacional de la Sociedad de médicos veterinarios especializados en cerdos (memorias). Maracay - Venezuela. 1989. 4: (15).
- 47 ROSNER, H. and others. Hyaluronic acid and a B-D xilan. extracellular polysaccharides of Pasteurella multocida. Aciar Proceedings. N° 43. Australia. 1992. 329-33.

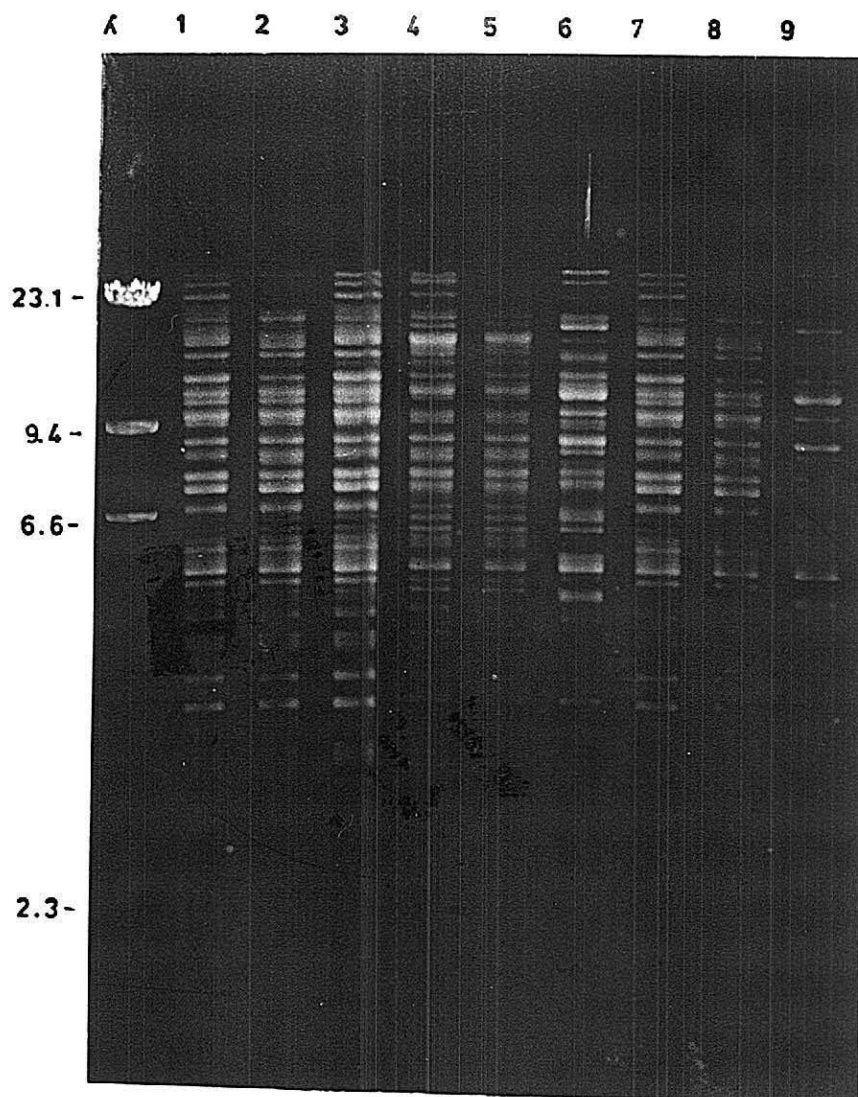
- 48 RUBIES, X.; CASAL, J.; PIJOAN, C. Transmission of Pasteurella multocida Clones in a Swine Pyramid Structure. Proceedings of the 14th IPVS Congress. Bologna, Italy. 1996. 7 - 10 July.(1995).
- 49 SALMON, S. A.; WATTS, J. L. Evaluation of the rapid NH system for identification of Haemophilus somnus, Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, and Actinobacillus pleuropneumoniae, isolated from cattle and pigs with respiratory disease. J. Clin. Microbiol. 1993. May. 31 (5): 1362-3.
- 50 SHIFFERLI, C. Neumonía micoplásmica porcina: patología y aislamiento de micoplasmas del tracto respiratorio del cerdo. Ach. Med. Vet. 1990. XXII No.1.
- 51 SHIGERY, I.; TAKUO, S. Relationship between serotypes dermonecrotic toxin production of Pasteurella multocida isolates pneumonic lesions of porcine lung. J. Pn. J. Vet. 1988. 50 (6): 1200-6.
- 52 SOUTHERN, M. Analysis of restriction - fragment patterns from complex Deoxyribonucleic acid species -. Biochem. Soc. Symp. 1979. 44: 37-41.
- 53 STANISICH, V. A. Identification and analysis of plasmids at the genetic level. En Grinsted J. Bennett PM, eds, plasmid technology. 2a Ed. Londres, Academic press, 1988, 11 -47.

- 54 STEVENS, D. SCHERER, S. Application of DNA. Typing to epidemiology and taxonomy of candida species. J. clin. 1987. 25: 675-79
- 55 STRASSER, M. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. inm. and inmpat. 1992. 31: 141-53.
- 56 STRAW, B. C.; BACKSTROM, J. Evaluation of swine at slaughter part II finding at slaughter and their significance. Com. Con. Ed. Prac. Vet. 1986. 8: 106-12.
- 57 WACHSMUTH, K. Molecular Epidemiology of bacterial infecctions: examples of methodology and of investigations of outbreaks. Rev. Infec. Dis. 1986. 8: 682-92.
- 58 WATSON, J. D. Recombinant DNA. Scientific American books. New York. 1983.
- 59 WILSON, P. Haemophylus, Actinobacillus, Pasteurella: Mechanisms of resistence and antibiotic therapy. Can. J. Vet. Res. 1990. 54: 73-7.
- 60 WOOLCOCK, J. B. Immune Mechanisms in Pasteurella multocida infected mice. Infect. Inmun. 1986. 13: 949-58.

ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de los patrones de restricción obtenidos mediante la técnica de huella genómica.

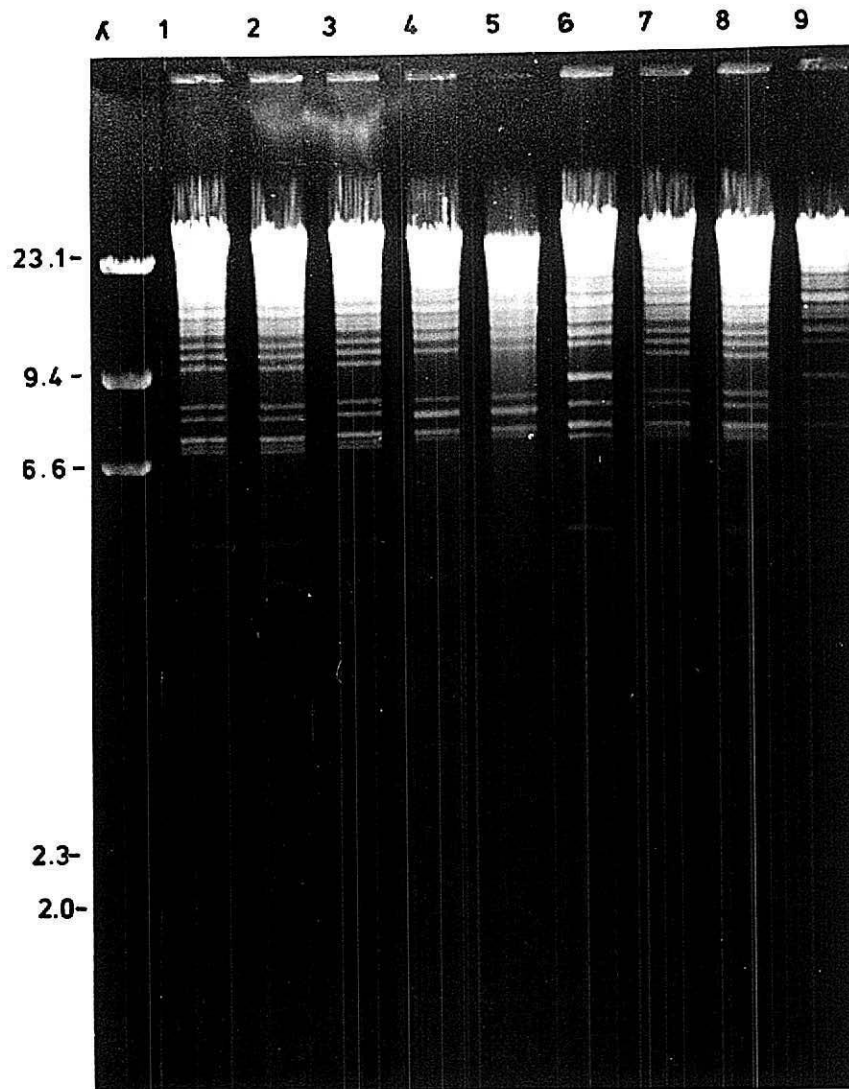
Foto 1. Patrones de restricción de ADN total de Pasteurella multocida tipo A, obtenidos en la digestión con la enzima Hae III. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 1 (Puyito). Lambda: marcador de peso molecular.



GRANJA PUYITO
(Hae III)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Foto 2. Huella genómica obtenida de cepas de Pasteurella multocida tipo A, después de la digestión con la enzima Sma I. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 1 (Puyito). Lambda: marcador de peso molecular. Se adjunta esquema en computador para mejor apreciación de los patrones de restricción.



GRANJA PUYITO
(Sma I)

Kbp R 1 2 3 4 5 6 7 8 9

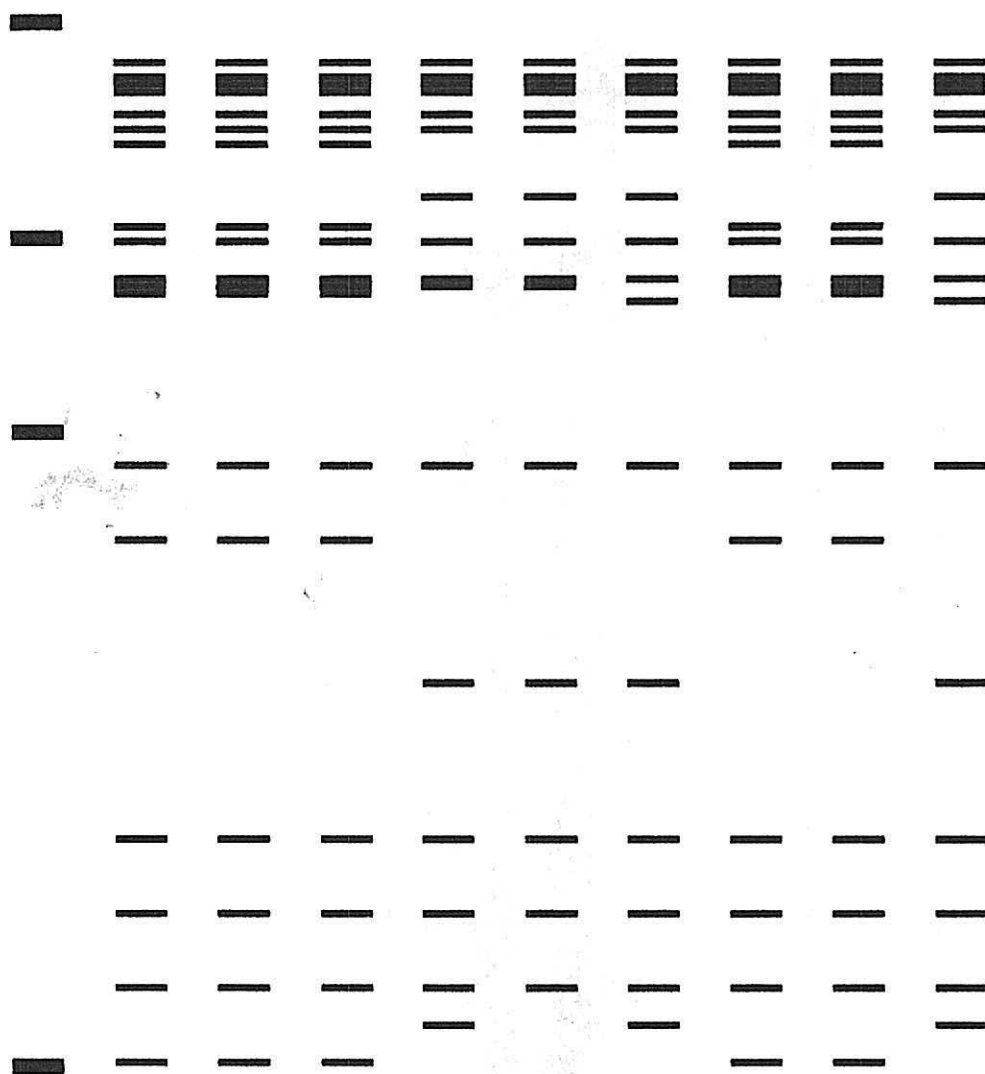
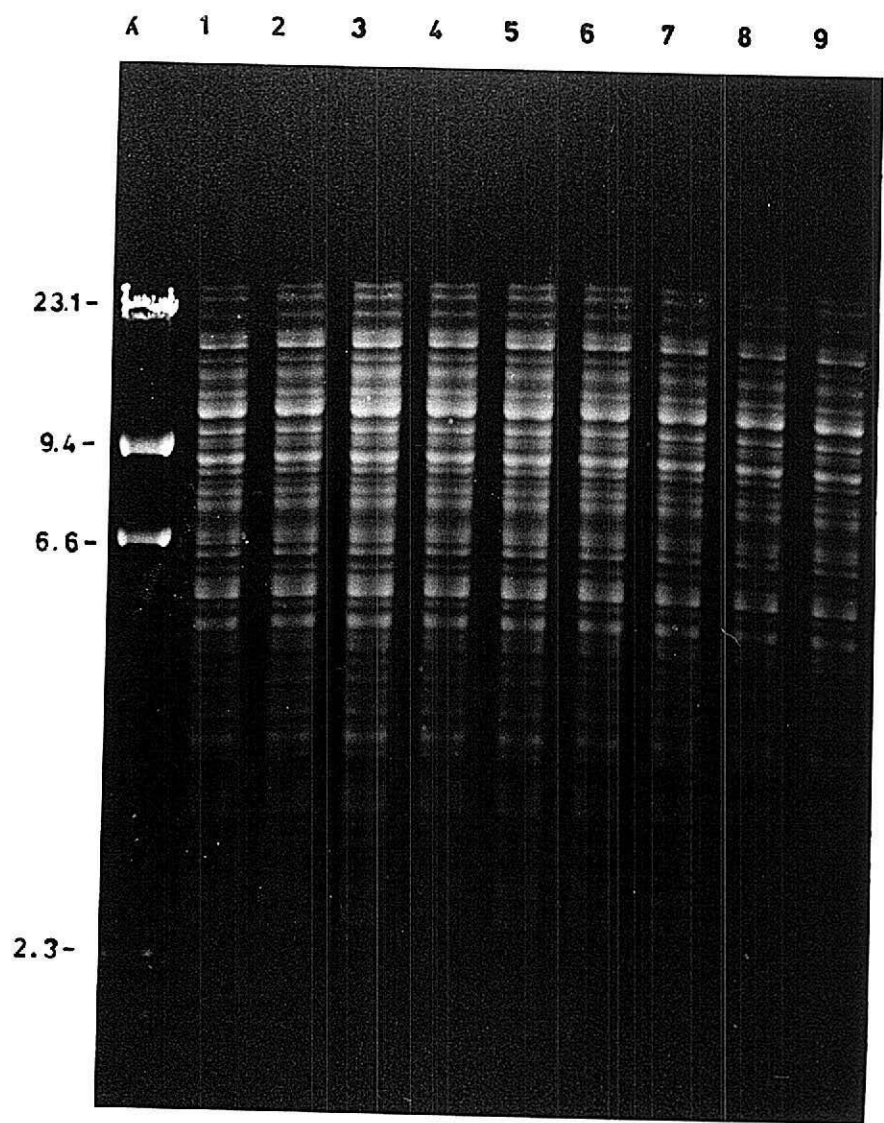
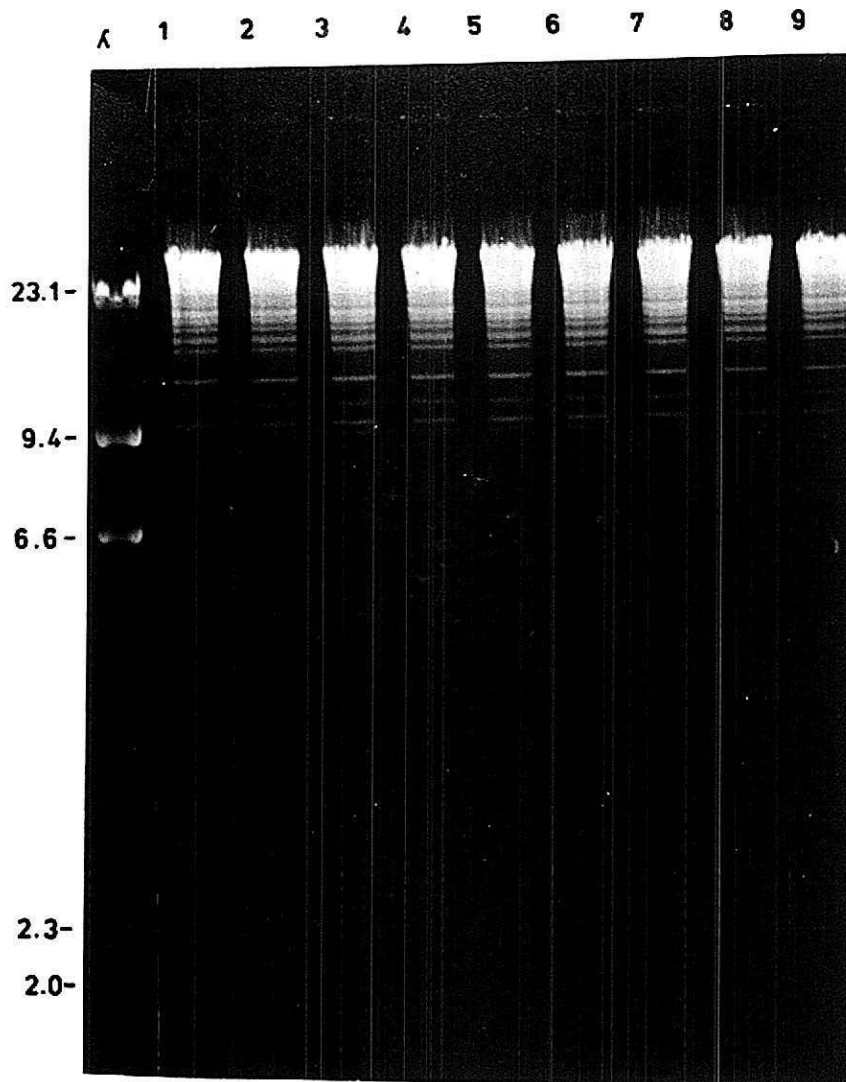


Foto 3. Patrones de restricción de ADN total de Pasteurella multocida tipo A, obtenidos en la digestión con la enzima Hae III. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 2 (Carulla). Lambda: marcador de peso molecular.



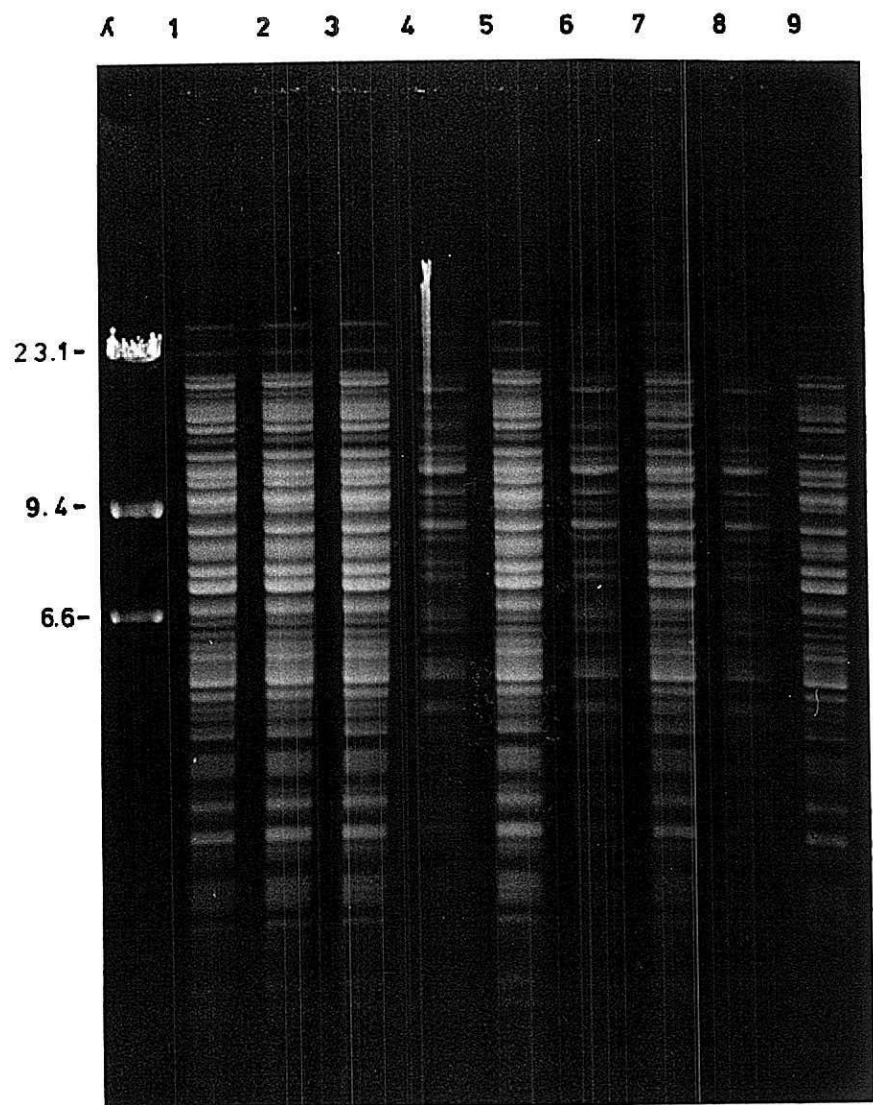
GRANJA CARULLA
(Hae III)

Foto 4. Huella genómica obtenida de cepas de Pasteurella multocida tipo A, después de la digestión con la enzima Sma I. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 2 (Carulla). Lambda: marcador de peso molecular. Se adjunta esquema en computador para mejor apreciación de los patrones de restricción.



GRANJA CARULLA
(Sma I)

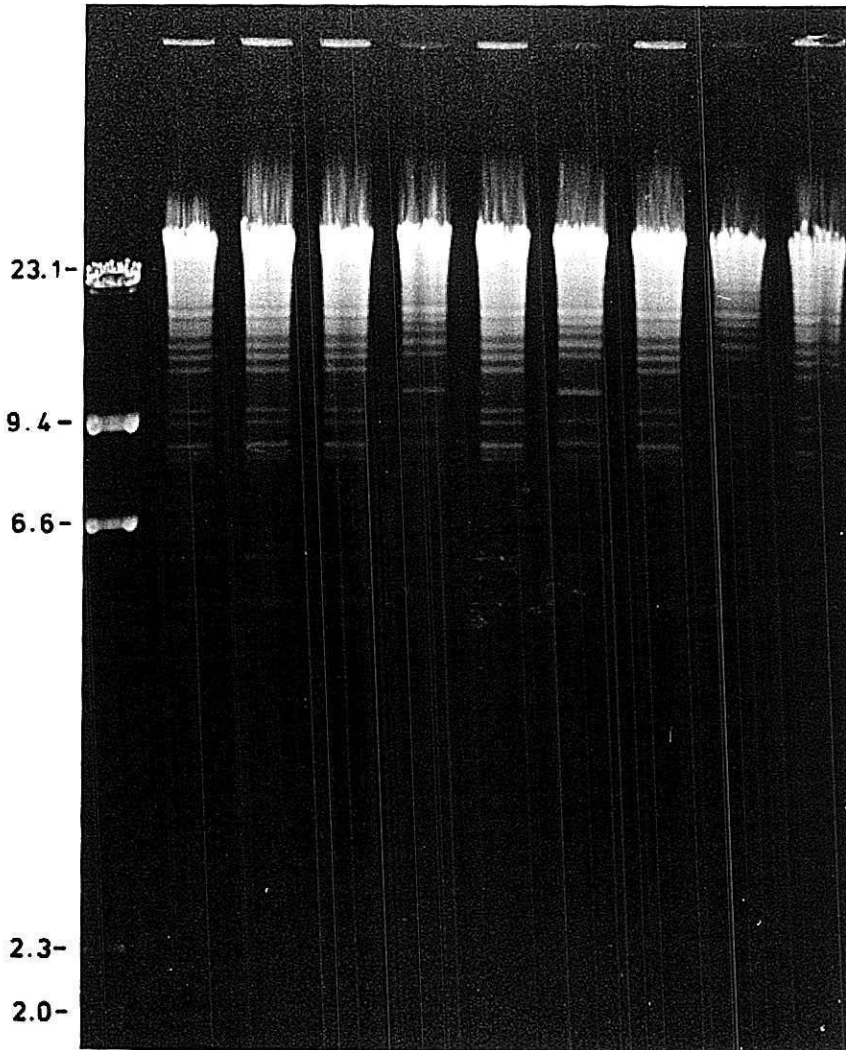
Foto 5. Patrones de restricción de ADN total de Pasteurella multocida tipo A, obtenidos en la digestión con la enzima Hae III. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 3 (La Floresta). Lambda: marcador de peso molecular.



GRANJA LA FLORESTA
(Hae III)

Foto 6. Huella genómica obtenida de cepas de Pasteurella multocida tipo A, después de la digestión con la enzima Sma I. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 3 (La Floresta). Lambda: marcador de peso molecular. Se adjunta esquema en computador para mejor apreciación de los patrones de restricción.

λ 1 2 3 4 5 6 7 8 9



GRANJA LA FLORESTA
(Sma I)

Kbp R 1 2 3 4 5 6 7 8 9

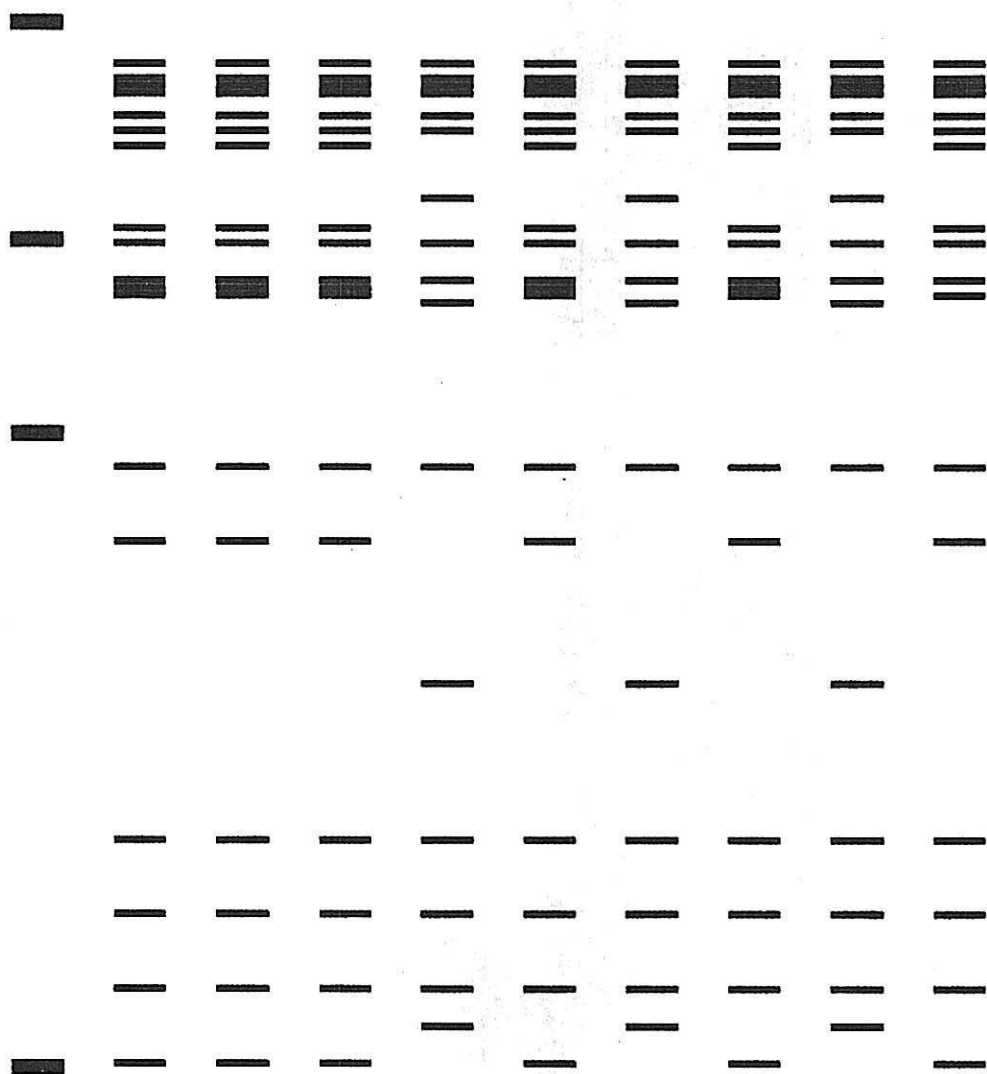
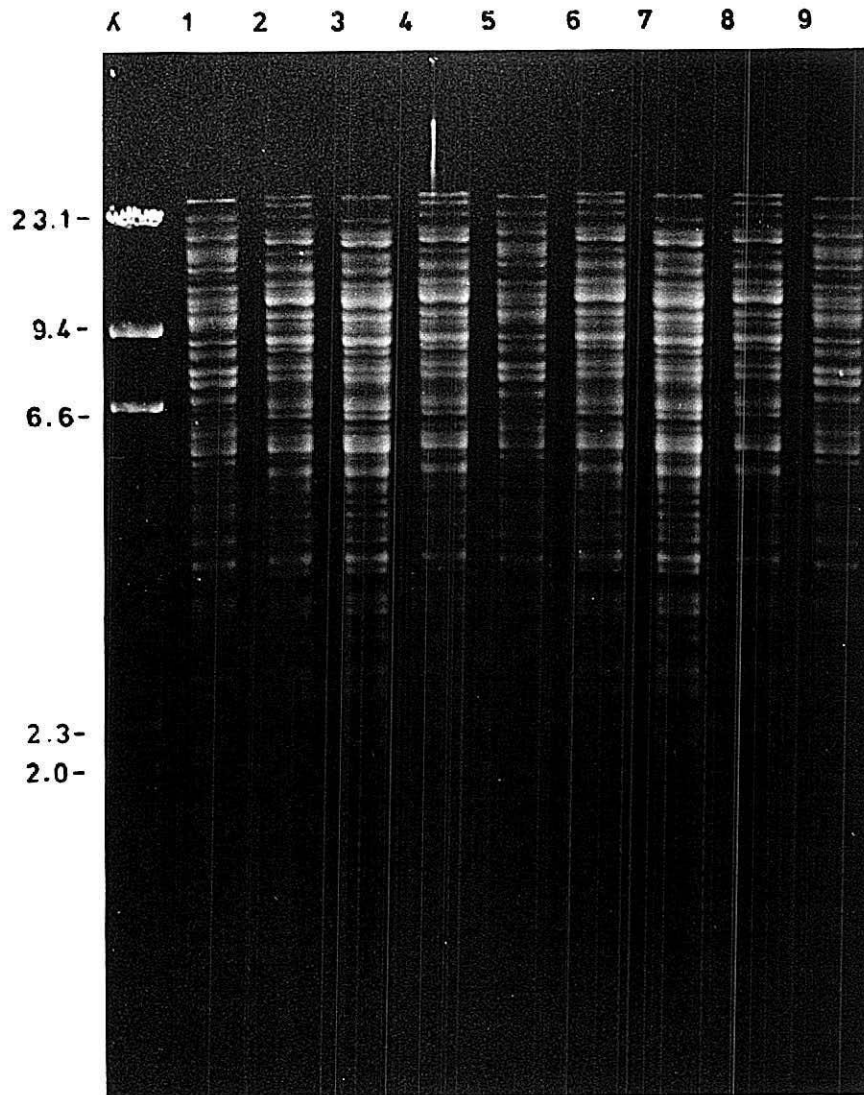


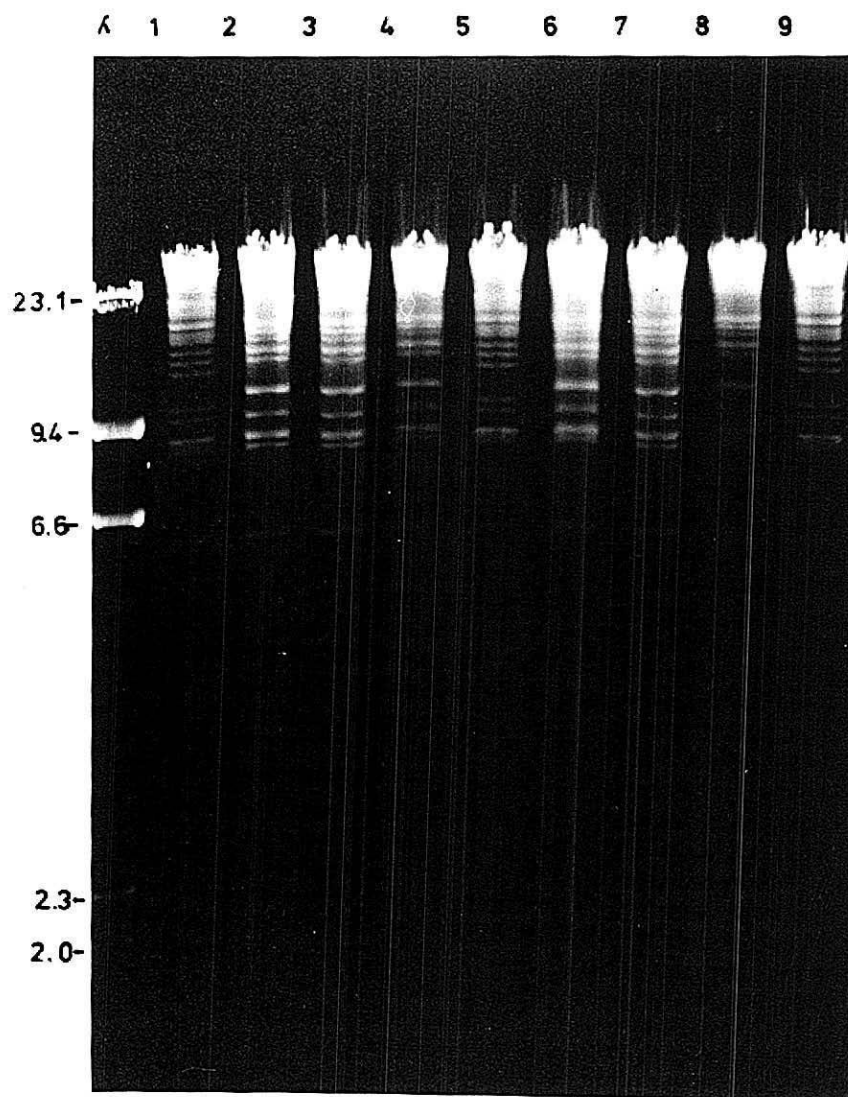
Foto 7. Patrones de restricción de ADN total de Pasteurella multocida tipo A, obtenidos en la digestión con la enzima Hae III. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 4 (La Pas). Lambda: marcador de peso molecular.



GRANJA LA PAS
(Hae III)

Foto 8. Huella genómica obtenida de cepas de Pasteurella multocida tipo A, después de la digestión con la enzima Sma I. Carril 1-9: Muestras pertenecientes a la Granja 4 (La Pas). Lambda: marcador de peso molecular. Se adjunta esquema en computador para mejor apreciación de los patrones de restricción.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA



GRANJA LA PAS
(Sma I)

Kbp

R

1

2

3

4

5

6

7

8

9

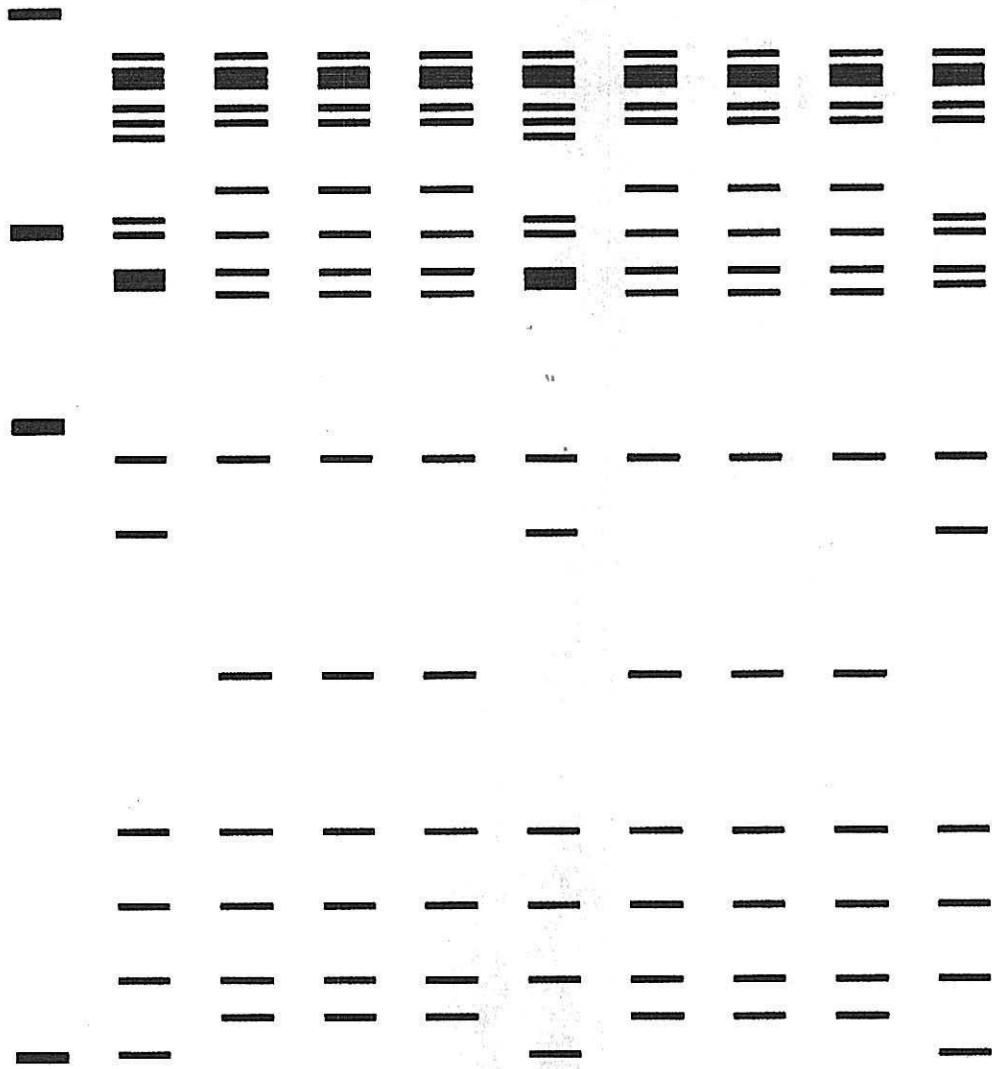
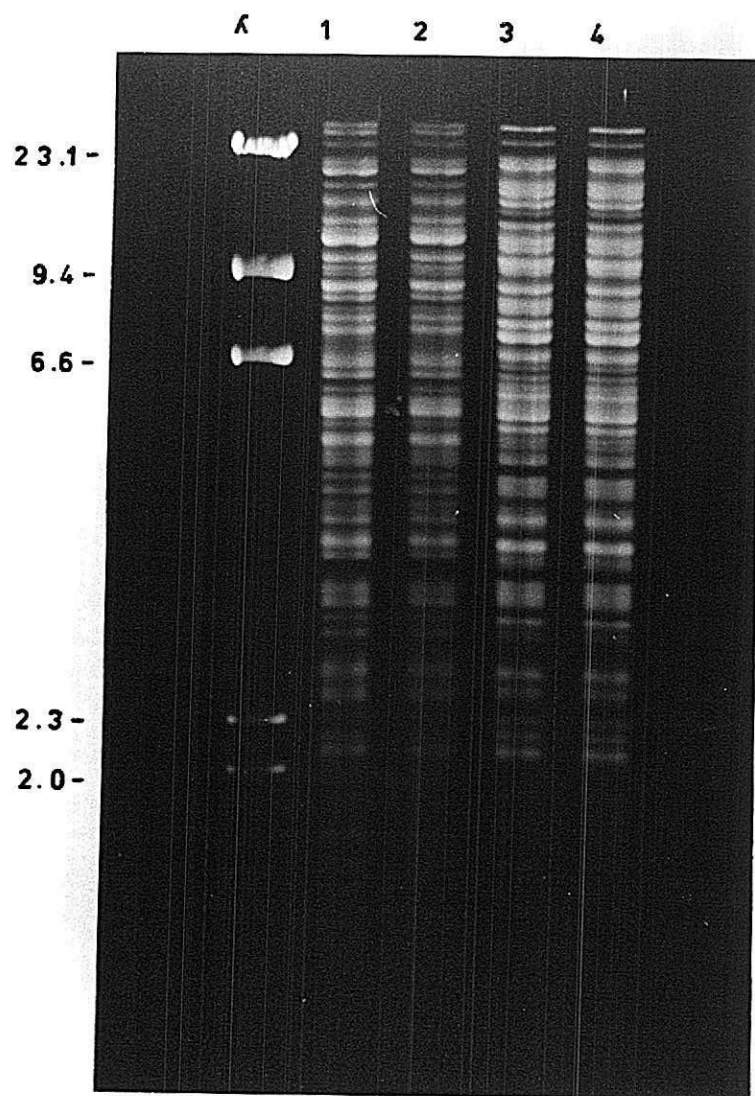


Foto 9. Patrones encontrados en las cuatro granjas, al digerir ADN de Pasteurella multocida tipo A, con Hae III: Carril 1-4 Lambda: marcador de peso molecular.

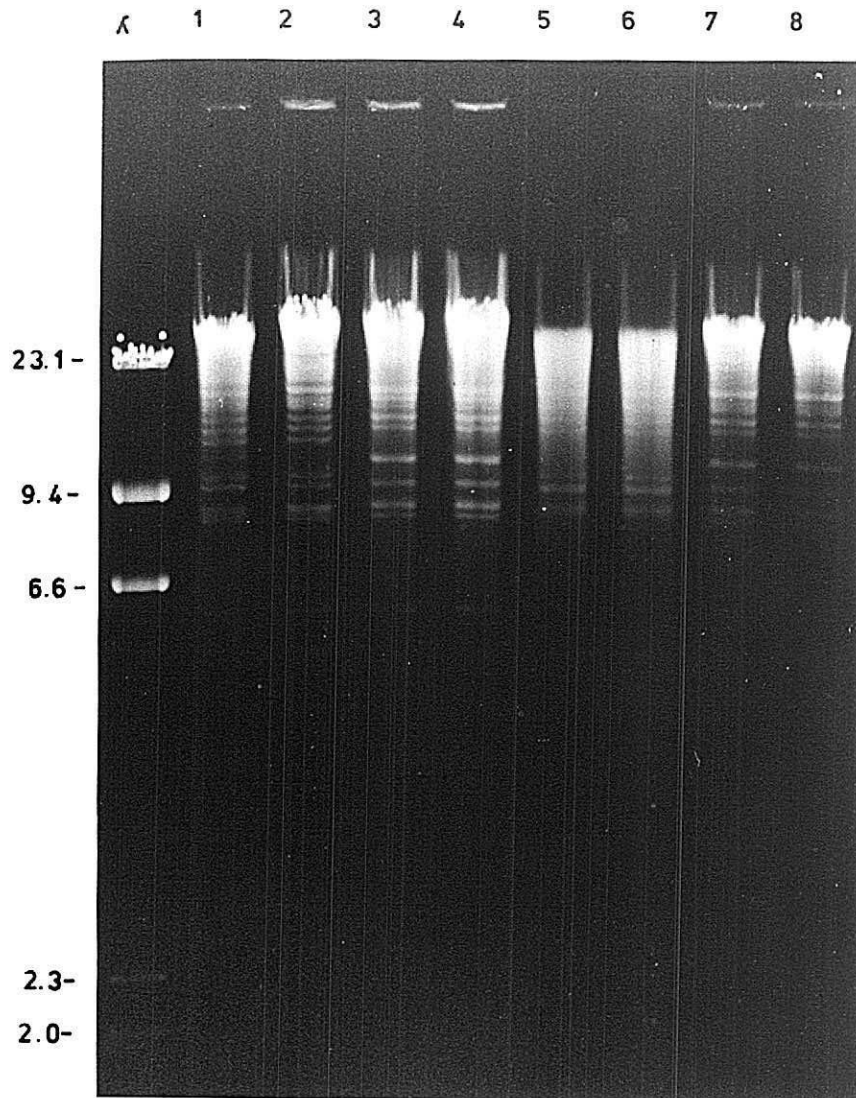


PATRONES ENCONTRADOS EN LAS CUATRO GRANJAS
(Hae III)

Foto 10. Patrones encontrados en las cuatro granjas, al digerir ADN de Pasteurella multocida tipo A, con Sma I: Carril 1-9. Lambda: marcador de peso molecular.



Centro de Documentación
CEISA



PATRONES ENCONTRADOS EN LAS CUATRO GRANJAS
(Sma I)

1977-07-27 - 10:00 AM

USO DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN PARA ESTUDIAR EPIDEMIOLOGÍA DE PASTEURELLA MULTOCIDA TIPO A EN DIFERENTES GRANJAS PORCINAS DE PRODUCCIÓN INTENSIVA

ANGELICA LEÓN, BACT; FERNANDO ARIZA, MV. M.Sc.; JOSÉ D. MOGOLLÓN, MV. MSc. M.S. PhD.

Dentro de las enfermedades respiratorias, de los porcinos la neumonía enzoótica, es uno de los síndromes que mayores repercusiones económicas ocasiona en ésta especie, debido a que reduce tanto la tasa de crecimiento como la eficiencia de la conversión alimenticia².

De otro lado, numerosas investigaciones han demostrado que el principal agente secundario involucrado en el complejo respiratorio porcino es la Pasteurella multocida, sin embargo se sabe que esta bacteria no puede colonizar el pulmón a menos que exista antes un evento inmunosupresor primario, el cual generalmente es una infección por *Mycoplasma* o por virus, pudiendo estar asociada a factores de estrés³.

Uno de los primeros interrogantes que se plantea cuando se aborda el estudio de la epidemiología de un brote epidémico de etiología bacteriana, es establecer si nos encontramos frente a una situación producida por la misma cepa, o si por el contrario se trata de cepas similares de la misma especie pero no idénticas. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas que valoran tanto las características genotípicas como las fenotípicas de estos microorganismos, como son: los perfiles de plásmidos, el análisis de las proteínas totales o proteínas de membrana PCR, ribotipificación y la huella genómica del ADN cromosomal⁴.

El propósito de la presente investigación es contribuir al conocimiento de la epidemiología de la P. multocida serotipo A en granjas porcinas de producción intensiva, mediante la aplicación del estudio de la huella genómica.

En el presente estudio se utilizaron porcinos procedentes de cuatro granjas del departamento de Cundinamarca (Colombia) situadas en los Municipios de Guasca (Granja 1), San Francisco (Granja 2), Facatativa (Granja 3) y La Victoria (Granja 4), y sacrificados en el frigorífico de Guadalupe centro de beneficio de porcinos en Santafé de Bogotá.

Las muestras fueron tomadas en el mismo lugar de sacrificio (Frigorífico Guadalupe). En total se colectaron 100 muestras de tejido pulmonar de aquellas áreas que presentaban lesiones macroscópicas características de neumonía, y se trasladaron bajo condiciones adecuadas de refrigeración al centro de investigaciones en salud y producción animal CorpolCA-Ceisa, donde se llevó a cabo el estudio.

Las muestras pulmonares se sembraron en agar sangre y agar Mac Conkey, y se incubaron a 37°C por 24-48 horas. Las colonias que presentaron la morfología característica de Pasteurella y que no crecieron en agar Mac Conkey, se sometieron a coloración de Gram⁵. Las colonias identificadas al microscopio como coccobacilos Gram-negativos se subcultivaron en agar sangre y se incubaron a 37°C de 24-48 horas y así en cultivo puro se sometieron a pruebas bioquímicas según los perfiles descritos por Carter¹.

Las colonias sospechosas de ser P. multocida se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: Catalasa; Oxidasa; SIM; Urea; Nitratos; y Fermentación de Azúcares como glucosa, lactosa, manitol, sorbitol y maltosa. Se confirmaron como cepas de P. multocida aquellas que mostraron reacción positiva a la catalasa, la oxidasa, el indol, la glucosa, el manitol y el sorbitol y reacción negativa a la úrea, la lactosa y la maltosa.

Posteriormente se practicaron pruebas selectivas como la de hialuronidasa para la identificación del serotipo A. La prueba de hialuronidasa se realizó de la siguiente manera:

Las cepas cultivadas en 3 ml de caldo BHI a 37°C por 24 horas se sembraron masivamente en agar BHI; luego se impregnaron discos de papel del filtro estéril con Hialuronidasa Testicular Ovina a una concentración de 700 unidades/ml. y se leyó después de incubar a 37°C por 24 horas. La presencia de un

halo de inhibición alrededor del disco se consideró como un resultado positivo para el serotipo A^{6,10}.

Las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de los pulmones afectados se cultivaron en 30 ml de medio BHI a 37°C toda la noche. Luego se realizó la coloración de Gram (confirmar morfología) y se cultivó en agar sangre para control de esterilidad (ausencia de crecimiento de otros microorganismos).

La suspensión de bacterias se centrifugó a 10.000 r.p.m. a 4°C por 20 minutos; el sedimento obtenido se lavó dos veces con PBS y finalmente se resuspendió en 5 ml de una solución recién preparada que contenía: Sucrosa 25 %, Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 10 mM, pH 8.0

Posteriormente se ajustó el pH de la solución en 8.0 y se adicionaron 10 mg./ml. de lisozima. La suspensión se mezcló suavemente durante 30-60 min. a temperatura ambiente y se agregaron 25 ml. de proteinasa K (20 mg/ml). Luego de mantenerse a temperatura ambiente por 10 min se adicionaron 2 ml de una solución recién preparada que contenía: Sucrosa 25 %, Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 50 mM, Sarcosil 10 %, pH 8.0

La suspensión se incubó a 50 °C por tres horas en baño maría; transcurrido este tiempo se adicionaron 3.5 ml de una solución de acetato de amonio (7.5 M) y 100 µl de Fenil metil sulfonil fluoride (PMSF) recién preparado en 1 ml de etanol absoluto (2 mg/ml).

Luego de mezclar, se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C por 20 minutos, el contenido de la vénula se transfirió un tubo de 50 ml al cual se le adicionaron suavemente 2,5 a 3,0 volúmenes de etanol absoluto y se colocó en hielo por 10 minutos.

Finalmente la vénula se agitó manualmente hasta precipitar el ADN, que luego se colectó en un tubo eppendorf que contenía 400 a 500 µl de etanol al 10 %; este se centrifugó a 20.000 rpm. por tres minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se descartó y el pellet de ADN se resuspendió en 50µl. de Buffer TE (Tris-EDTA PH: 8.0), disolviéndolo luego a 65°C por dos horas.

Se colocaron 3 µl de ADN en tubos eppendorf y se agregaron 3 µl de las enzimas de restricción Hae III o Sma I (Promega Biological Research Products, USA) y 3 µl del buffer correspondiente, completando esta mezcla con agua destilada, desmineralizada y estéril a un volumen final de 30 µl.

El marcador de peso molecular se preparó con 1 µl. de ADN, 1 µl. de enzima (Hae III o Sma I) y 1 µl. de buffer y 2 µl. de agua destilada, desmineralizada y estéril para un volumen final de 5 µl.

Las digestiones con Hae III se incubaron a 37°C por dos horas; y las realizadas con Sma I a 25°C por dos horas. Luego se detuvo la reacción adicionando la quinta parte del volumen final de la digestión con buffer de llenado (azul de bromofenol) a las muestras y al marcador.

Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III (GIBCO BRL - Cat N° 10382-026), cuyos fragmentos sirven como estándar de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa y poli-acrilamida. Los fragmentos pueden ser visualizados por la coloración con bromuro de etidio.

El ADN digerido fue sometido a electroforesis en una unidad horizontal de una sola dimensión en un gel de agarosa 0.55% (0.55 gr. de agarosa en 100 ml. de buffer TBE 0.5 x), dejándolo con una corriente continua 30 Voltios por 17 horas.

Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 mg/ml), utilizando el mismo buffer de corrido (900 ml); luego se adicionaron 50 µl de bromuro de etidio, mezclando suavemente durante una hora y finalmente se lavó con agua destilada por 15 minutos.

Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se tomaron fotografías con cámara polaroid utilizando una película polaroid 665.

La digestión de las muestras con enzimas proporcionó diferentes patrones de restricción que se designaron de la siguiente manera: Los patrones obtenidos al digerir las muestras de ADN con la enzima Hae III se denominaron A, B; y los obtenidos con la enzima Sma I se denotaron como C, D y E.

Granja 1: En la digestión con Hae III, predominó el patrón B presente en un 66,7% de las muestras, en tanto que el patrón A aparece en un 33,3%. Con Sma I, aparecen en igual cantidad los patrones C y D con un 22,2% de las muestras cada uno, en tanto que el patrón E alcanzó el 55,6% del total de las muestras.

Granja 2: El 100% de las muestras de esta granja mostraron un solo patrón de restricción (B), en la

digestión con la enzima Hae III. De forma similar la digestión con Sma I, produjo un 100% del patrón D.

Granja 3: En la digestión con Hae III se presentó un 66,7% para el patrón A y un 33,3% para el patrón B. En el corte con Sma I, el patrón C apareció en un 55,6 % de las muestras, el patrón D en un 11,1% y el patrón E en un 33,3%.

Granja 4: Del total de las muestras de esta granja digeridas con Hae III, el 55,6% presentaron el patrón A y el 44,4% correspondieron al patrón B. La digestión con Sma I, produjo un 22,2% para el patrón C, un 11,1% para el patrón D y un 66,7% para el patrón E.

La neumonía de los cerdos representa uno de los problemas más serios de ésta especie animal⁹; y se considera como el resultado de una compleja interacción entre varios agentes infecciosos, procedimientos de manejo y medio ambiente, entre los cuales vale la pena mencionar la temperatura, ventilación, polvo, alta concentración de amoníaco y la prevalencia e incidencia de diversos agentes patógenos^{2,10}.

El análisis fenotípico de las muestras pulmonares que incluyó morfología, pruebas bioquímicas y serológicas, permitió el aislamiento de cepas de un solo tipo bacteriano en las cuatro granjas estudiadas: P. multocida serotipo A. Pero al realizar el análisis con endonucleasas de restricción del genoma bacteriano se pudo detectar directamente divergencias entre estas cepas fenotípicamente idénticas y demostró ser una técnica mucho más sensible que cualquier otro método de caracterización serológica, usándose actualmente para estudios de seguimiento epidemiológico de cepas bacterianas.

Los resultados obtenidos sugieren que la metodología utilizada para la generación de una huella genómica presentó un amplio espectro de análisis molecular, tanto para aislamientos clínicos, en los cuales fueron encontrados diferentes patrones de restricción que pueden ser utilizados como marcadores epidemiológicos específicos como también para diferenciar cepas responsables de brotes de enfermedad, que podrían en un momento determinado servir como cepas de referencia para así establecer la relación molecular entre una y otra.

Se encontraron marcadas diferencias genómicas significativas al analizar las cepas de P. multocida aisladas de una misma granja. Así, las digestiones del ADN cromosomal con Hae III y Sma I en tres de las

cuatro granjas incluidas en el estudio mostraron dos y tres patrones de restricción respectivamente; lo cual sugiere una mayor diversidad genética. En contraste en la granja 2 se observó un solo patrón al digerir las cepas con estas enzimas.

Este hallazgo permite concluir que existe heterogeneidad entre las cepas de P. multocida tipo A aisladas de problemas neumónicos. Además se evidenció que la enzima Sma I, provee una mayor información genética produciendo mayores patrones que al utilizar la enzima Hae III, haciendo que Sma I sea considerada una mejor herramienta epidemiológica para futuros estudios de este tipo.

En un estudio reciente realizado por Gardner y colaboradores (1994)⁴ se examinaron cepas de P. multocida asociadas con casos de rinitis atrófica progresiva y se encontró también una variabilidad genómica interesante entre cepas de tipo D y tipo A no toxigénicas, aisladas de diferentes granjas; y cepas aisladas dentro de una misma granja. Estos hallazgos son similares a los encontrados en la presente investigación y permiten afirmar que los perfiles de restricción generados por estas enzimas son una herramienta confiable para la discriminación entre cepas de P. multocida tipo A, aisladas de casos del complejo neumónico porcino.

De otro lado el hecho de haber aislado estas cepas de pulmón (casos de campo asociados a neumonía), sugiere que se trata de cepas virulentas pues fueron obtenidas de lesiones de consolidación neumónica evidentes, lo que implicaría su capacidad de colonización.

Calsamiglia y colaboradores (1996)³ en un estudio preliminar demostraron experimentalmente que es posible detectar diferencias genómicas entre cepas virulentas y cepas de baja virulencia de P. multocida tipo A. Estos investigadores encontraron que cuatro cepas virulentas presentaron el mismo patrón de restricción con Hpa II mientras que la cepa de baja virulencia mostró un patrón diferente.

En cuanto a la relación epidemiológica entre las cepas estudiadas el presente trabajo reveló que en cada una de las granjas tiende a predominar un solo patrón de restricción es decir uno o máximo dos clones. Esta relación genética entre las cepas de un mismo genotipo podría sugerir una transmisión horizontal de la infección entre los animales de las poblaciones examinadas.

Es bien sabido que la transmisión de la enfermedad ocurre por contacto directo entre animales sanos y enfermos. La presencia de varios clones en una misma granja puede deberse a la mezcla de lechones de levante que se compran de diversas granjas y son llevados para su finalización a una nueva.

Rúbies y colaboradores (1996)¹⁰, concluyeron que las cepas de P. multocida que se pueden encontrar en granjas comerciales podrían ser el resultado de la mezcla de cepas que han estado presentes en los ancestros (padres, abuelos, bisabuelos). Esta combinación resultaría en que cada granja tiene una cepa diferente lo cual se definiría como propia para esa población.

Dichos hallazgos fueron efectuados mediante estudios filogenéticos, al comparar molecularmente cepas de P. multocida aisladas de una granja núcleo, generando patrones de restricción cortados con Hind III analizados mediante un programa de computador.

Se concluye, que el estudio detallado de la huella genómica de cepas de P. multocida tipo A de casos de neumonía contribuye a dilucidar el patrón de transmisión de la infección a nivel de campo en especial si se utiliza la enzima Sma I para generar estos patrones.

- 1 CARTER, G. R. Serotyping of Pasteurella multocida in Microbiology. 1984:16:247-258
- 2 CIPRIAN, A.; CRUZ. TA. Mycoplasma hyopneumoniae: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Arch. Med. Res. 1994. summer: 25 (2): 235-9.
- 3 CALSAMIGLIA, M.; CARVALHO, L.; PIJOAN, C. DNA Fingerprinting of Inoculated and Recovered Strains of Pasteurella multocida. Proceedings of the 14th IPVS Congress. Bologna, Italy. 1996. 7 - 10 July.
- 4 GARDNER, Ian.; KASTEN, Rick.; and others. Molecular finger Printing of Pasteurella multocida associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 1994. 6:442-47.
- 5 GOIS, M. G.; KUKSA, F.; SISAK. Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs in: International Pigs. Veterinary Society Proceeding Copenhagen. 1980. 6: 214.
- 6 MANNHEIM, W. Pasteurellaceae family. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 4th Edn. Edited by Krieg, N. Holt. J. Williams and Wilkins. Baltimore, London. 1984:1:552-558.
- 7 OWEN, R.J. Chromosomal DNA Fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial Pathogens-. J. Med. Microbiol. 1989. Vol 30: 89-99.
- 8 QUILAND, J. Qué costo tienen las enfermedades respiratorias?. II Congreso Nacional de la Sociedad de médicos veterinarios especializados en cerdos (memorias). Maracay - Venezuela. 1989. 4: (15).
- 9 ROSNER, H. and others. Hyaluronic acid and a B-D xilan. extracellular polysaccharides of Pasteurella multocida. Aciar Proceedings. N° 43. Australia. 1992. 329-33.
- 10 RUBIES, X.; CASAL, J.; PIJOAN, C. Transmission of Pasteurella multocida Clones in a Swine Pyramid Structure. Proceedings of the 14th IPVS Congress. Bologna, Italy. 1996. 7 - 10 July.(1995).
- 11 STRAW, B. C.; BACKSTROM, J. Evaluation of swine at slaughter part II finding at slaughter and their significance. Com. Con. Ed. Prac. Vet. 1986. 8: 106-12.
- 12 PIJOAN, C. Strategy and cost of eradicating Pneumonia Swine herd health programming conference. 1988. Sep. St.Paul University of Minesota. 240-41.