

Caracterización molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas del ganado bovino

Yenner Sánchez-Enamorado,^{1*} Osney Leiva-Peláez,¹ María Belsis Cordero-Ramírez,¹ Magdalena Oliva-López,¹ Karen León-Arcia²

¹ Grupo Empresarial LABIOFAM,

² Centro de Neurociencias de Cuba

email: yunaisi.tamayo@labiofam.co.cu

La Pasteurelosis es una enfermedad producida por la bacteria *Pasteurella multocida* miembro del género *Pasteurella*, que afecta a una gran variedad de animales domésticos y salvajes. La bacteria se caracteriza por ser Gram negativa, inmóvil, cocobacilar y anaerobia facultativa. La aplicación de métodos genotípicos resulta de gran utilidad y permiten superar limitaciones de los procedimientos fenotípicos tradicionales. El objetivo de este trabajo fue determinar la relación genética entre las cepas B1, B2 y B3 de *P. multocida* propuestas como candidatos vacunales. Las cepas procedieron del cepario de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas, que pertenece a los Laboratorios LABIOFAM. Las cepas en estudio fueron analizadas con las técnicas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis en campo pulsado. Se pudo confirmar que las tres cepas pertenecían a la especie *P. multocida*, subespecie multocida tipo capsular A. De igual manera se detectó que las cepas B1 y B3 son indistinguibles genéticamente entre sí y que la B2 poseía un 91% de similitud con respecto a las dos primeras. Los resultados obtenidos mediante la identificación y clasificación de estas cepas, permitirán el desarrollo de vacunas contra *P. multocida*.

Palabras claves: *Pasteurella multocida*, PCR, electroforesis en campo pulsado.

Introducción

La Pasteurelosis es una enfermedad producida por la bacteria *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) miembro del género *Pasteurella*, y es parte de la microbiota normal del sistema respiratorio superior de muchas especies animales (1). Se considera una enfermedad zoonótica, su principal reservorio son los animales domésticos y silvestres. Los animales domésticos padecen diferentes presentaciones de pasteurelosis: cólera aviar, neumonía porcina, otras infecciones que afectan a conejos, cabras y ovejas; en el ganado bovino ocasiona dos enfermedades de gran impacto, la septicemia hemorrágica bovina y la pasteurelosis neumónica (2).

La especie *P. multocida* es una bacteria Gram negativa, inmóvil, cocobacilar, anaerobia facultativa, caracterizada por producir catalasa, citocromo oxidasa e indol; utilizar glucosa, manosa y sacarosa, no crecer en agar MacConkey, no produce hemólisis ni ureasa y se ha diferenciado según el tipo de antígenos presentes en la cápsula de la bacteria o en su lipopolisacárido. Así entonces, se han identificado en la actualidad cinco serogrupos basados en la cápsula A, B, D, E y F,

y 16 serotipos somáticos basados en la estructura del lipopolisacárido. Se divide en tres subespecies (subsp) según su capacidad de utilizar dulcitol y sorbitol: *P. multocida* subsp *multocida*, *P. multocida* subsp *septica* y *P. multocida* subsp *gallicida*. Las dos primeras se aíslan de mamíferos y aves, la tercera de aves (3, 4).

La necesidad de identificar a los patógenos dio lugar a un potente desarrollo de técnicas por biología molecular, las que resultan de gran utilidad y permiten superar limitaciones de los procedimientos fenotípicos tradicionales (4, 5).

La Pasteurelosis se reporta en casi todos los países del mundo, esporádica o epizooticamente y si bien no se le concede gran importancia económica en las regiones templadas, sí causa notables estragos en los trópicos. Produce grandes pérdidas económicas en casi todo el mundo, no solo por muerte, sino también por disminución en ganancias de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia y costos elevados de tratamiento en animales enfermos. En Cuba se ve afectado principalmente el ganado bovino, reportándose además en cerdos, aves y conejos. Esta enfermedad presentaba

* Dra Medicina Veterinaria y Zootecnista.

una gran incidencia antes del año 1959, a partir de ese año comenzó un plan sistemático de profilaxis (6, 7). En nuestro país se han realizado investigaciones con relación a la caracterización fenotípica y molecular de cepas de *P. multocida* en diversas especies animales, pero ninguna, como apoyo en los programas de prevención y control de la Pasteurelosis.

La caracterización fenotípica y genética de la bacteria *P. multocida* es fundamental para el tratamiento y control de las enfermedades que produce (4), además estos métodos permiten evaluar a las cepas aisladas de casos clínicos, como futuros candidatos vacunales para la obtención de bacterinas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación genética entre las cepas B1, B2 y B3 de *P. multocida* propuestas como candidatos vacunales.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepas de *P. multocida* utilizadas en la presente investigación fueron aisladas de bovinos a los que se le tomaron muestras de hígado, pulmón, corazón y piel (tejido subcutáneo).

Las muestras se incubaron a 37°C en placas de agar sangre en el Laboratorio Provincial de Veterinaria de Granma, que pertenece a los Laboratorios Biológicos Farmacéutico (LABIOFAM).

Las cepas obtenidas fueron enviadas al cepario de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas, que pertenece a LABIOFAM, y se nombraron como cepa B1, B2 y B3 de *P. multocida*.

Todas las cepas fueron identificadas por las características macroscópicas de las colonias, las características microscópicas por el método de Gram y las pruebas bioquímicas incluidas en la galería multisustrato API 20E (Biomérieux) y otras realizadas de manera tradicional (catalasa, oxidasa, producción de indol, hemólisis, urea, motilidad, dulcitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, glucosa, maltosa y manitol).

En este estudio se incluyeron, tres cepas de referencia como controles positivos, todas pertenecientes a la especie *P. multocida* subespecie *multocida*: 10322 NCTC tipo capsular A, 10323 NCTC tipo capsular B y 10325 NCTC tipo capsular D. Como control negativo se utilizó *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922.

Ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), específico para *Pasteurella multocida* a las cepas B1, B2 y B3

Los cebadores empleados para realizar la RCP específica de especie *P. multocida* son los propuestos por Townsend y cols (8), correspondientes al fragmento KMT1, único en *P. multocida* y son enumerados en la Tabla 1. La RCP se realizó según el procedimiento descrito por Townsend y cols (8), con las mismas condiciones referida por estos autores.

Tabla 1. Cebadores de RCP específica de especie.

Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	Tamaño del fragmento amplificado
KMT1T7	5' ATCCGCTATTTACCCAGTGG 3'	460pb
KMT1SP6	5' GCTGTAAACGAACTCGCCAC 3'	460pb

Condiciones de la RCP

El RCP se realizó directamente a partir de colonias aisladas del microorganismo, crecidas previamente en placas de agar sangre las que fueron incubadas a 37°C durante 16 h. La muestra se tomó tocando ligeramente una colonia con la punta de una pipeta y luego se resuspendió directamente en la mezcla de amplificación del RCP. La mezcla de RCP que contenía un volumen total de 25 µL, 1 x tampón para RCP, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 2 mM de MgCl₂, 3,2 pmoles de cada cebador y 0,5 µg de ADN Taq-polimerasa. Los parámetros de ciclación en el termociclador BOYN Industrial fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min 30 ciclos de 95°C durante 1 min, de 55°C durante 1 min, de 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 7 min. El producto de la reacción se mantuvo a 4°C hasta que se realizó la electroforesis.

Un volumen de 5 µL de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% en 1 x tampón de desarrollo Tris-acetato (TAE) a 4 V/cm por 1 h. Luego el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizaron por luz ultravioleta en un transiluminador. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb-1Kb (Biotools, Madrid, España).

Ensayo de RCP para la determinación del tipo capsular a las cepas B1, B2 y B3

Similar procedimiento se realizó para la determinación de los tipos capsulares (A, B y D) por medio de una RCP múltiple, según los descrito por Townsend y

Tabla 2. RCP con cebadores de tipo capsulares de *P. multocida*.

Tipo capsular	Nombre del cebador	Secuencia de los cebadores	Tamaño de los fragmentos amplificados
A	CAPA-FWD	5' TGCCAAAATCGCAGTCAG 3'	1044 pb
	CAPA-REV	5' TTGCCATCATTGTCAGTG 3'	1044 pb
	CAPB-FWD	5' CATTATCCAAGCTCCACC 3'	760 pb
B	CAPB-REV	5' GCCCGAGAGTTTCAATCC 3'	760 pb
	CAPD-FWD	5' TTACAAAAGAAAGACTAGAGACCC 3'	657 pb
D	CAPD-REV	5' CATCTACCCACTCAACCATATCAG 3'	657 pb

cols (9). La secuencia y el tamaño de los fragmentos con los cebadores de tipo capsular se observan en la Tabla 2. Se utilizó un marcador de peso molecular de 3000 pb (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder 100 a 3000 pb (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Técnica de Electroforesis de Campos Pulsados (ECP)

Preparación de las muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) inmovilizado en agarosa

Se creció cada cepa B1, B2 y B3 en caldo tripton-soya a 37°C en agitación hasta obtener la fase exponencial, se lavaron con NaCl a 0,15 M. Luego, 109 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL de células se mezclaron con 1 mL de agarosa al 1,5%. Los bloques se formaron al añadir la mezcla en los moldes del Sistema GUEFAST06® (Neuronic SA, La Habana, Cuba), para luego realizar la ECP y se transfirieron a 1 mL de tampón NDSUPlus (0,01M Tris, 0,1M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% w:v Sarcosyl, 1% v:v Nonidet P-40, 4M urea, pH 9,5) por 2 h. Luego se lavaron 2 veces a 45°C con agua destilada y 3 veces con tampón TE (10 mM, Tris and 0,5 mM EDTA pH=8,0) a 45°C por 15 min cada uno. Se guardaron hasta su uso en TE a 4°C.

Digestión del ADN con enzimas de restricción

Cada bloque se lavó con tampón TE-0,5 por 15 min y se equilibró con 0,2 mL del tampón de restricción según lo recomendado por el fabricante de la enzima. Luego se incubaron con 5 U de una endonucleasa de restricción (ApaI) (New England Biolabs, MA, USA) a 25°C por 2 h. Esta enzima de restricción se seleccionó al tener en cuenta el resultado de estudios previos, donde se demostró que es la más adecuada para la caracterización de *P. multocida* al producir bandas claras y bien separadas y ser los patrones fácilmente traducibles (10).

Separación de los fragmentos de restricción en ECP y comparación de las cepas

Los fragmentos de restricción se separaron mediante ECP usando el Sistema GUEFAST, en geles de agarosa 1,5%. La corrida electroforética se realizó en la mini cámara de configuración TAFE aplicando 140v. El tampón de corrida TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico y 1 mM EDTA, pH=8,3) se mantuvo a 20°C. Se aplicaron tiempos de pulsos entre 3 y 25 s durante 10 h. La tinción de los geles se realizó añadiendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio durante 30 min y se fotografiaron al iluminarlos con luz ultravioleta. Las imágenes se cargaron en el software GUEFASTScan para detectar las bandas, comparar los patrones y determinar el grado de similitud o asociación ecológica entre las especies, según el coeficiente de DICE (11), el cual expresa la probabilidad de que una banda en un patrón este también en otro, cuantificado como la relación entre el número de bandas coincidentes en dos patrones y el total de bandas. Se utilizó un marcador de peso molecular de concatámeros de fago Lambda (λ)

Resultados y Discusión

Ensayo de RCP específico para *Pasteurella multocida* a las cepas B1, B2 y B3

Como se muestra en la Figura 1, las tres cepas estudiadas y sometidas al RCP específico de especie (8) presentaron una banda de una talla de 460 pb, coincidiendo con la región del fragmento KMT1, por lo que se confirmó que las cepas B1, B2 y B3 pertenecen 100% a la especie *P. multocida* de forma clara.

Campuzano y cols y Hunt y cols (1, 12) recomiendan el uso de la RCP como la mejor opción en la identificación de aislamientos de *P. multocida*, en términos de

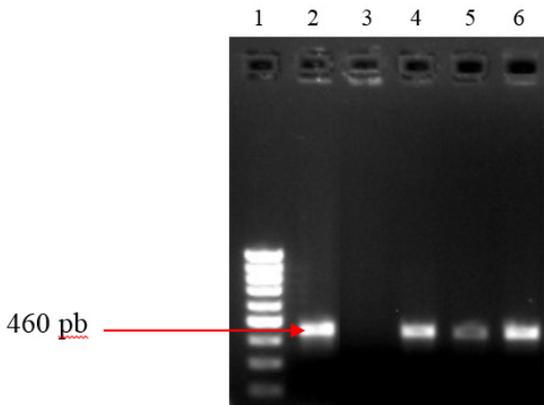


Fig. 1. Producto de la amplificación de la RCP, para identificar especies de *P. multocida*. Línea 1, marcador de peso molecular (100pb-1Kb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); línea 3, *E. coli*; Líneas 4-6, cepas B1, B2 y B3, de *P. multocida* respectivamente.

sensibilidad y especificidad, lo cual se demostró con los resultados presentados en este estudio. Varios autores emplean diferentes técnicas moleculares como la ribotipificación y la RCP, ya que permiten detectar con claridad las variaciones genéticas entre las cepas (1, 2, 5, 12). La RCP ha sido ampliamente usada como herramienta para detectar con claridad las variaciones genéticas entre las cepas, para el diagnóstico de rutina de la Pasteurelisis en las diferentes especies en estudios de epidemiología molecular, sin tener que recurrir a las pruebas fenotípicas, las cuales pueden llevar varios días antes de obtener un resultado (1).

Ensayo de RCP para la determinación del tipo capsular a las cepas B1, B2 y B3

Se observa en la Figura 2, que las cepas B1, B2 y B3 sometidas al RCP para determinar los tipos capsulares (9), presentaron una banda de una talla de 1044 pb coincidiendo con la región del fragmento amplificado para el tipo capsular A, confirmándose que las tres cepas corresponden 100% al tipo capsular A. Este resultado coincide con Christensen y cols (4), quienes declaran que este tipo capsular A, es el más frecuente en todo tipo de hospedadores. Algunos estudios registran elevados porcentajes de identificación para el tipo capsular A, que van de 92,3 a 99%, al utilizar la RCP para la identificación molecular de los tipos capsulares de *P. multocida* en aislamientos de origen bovino (1).

La cápsula de *P. multocida* está compuesta por carbohidratos. A pesar de que se desconoce con

exactitud la composición de la cápsula de cada uno de los diferentes tipos, si son conocidas sus características diferenciales. La cápsula de tipo A está formada en gran parte por ácido hialurónico, responsable del aspecto mucoso de las colonias (6).

La cápsula de tipo D contiene heparina y la de tipo F contiene condroitín sulfato (12). El tipo capsular B contiene arabinosa, manosa y galactosa, entre otros monosacáridos, pero se desconoce su estructura (9).

Es bien conocido que la cápsula tiene un papel importante en la resistencia de los microorganismos a la fagocitosis (13), se conoce que las cepas con tipo capsular A, inhiben la actividad fagocítica de los neutrófilos y de los leucocitos polimorfonucleares en bovinos; probablemente sea el ácido hialurónico el responsable de ello. Además, la cápsula de *P. multocida* favorece la supervivencia del microorganismo en el medio ambiente y su transmisión al hospedador y confiere resistencia a la desecación (14). La adherencia en la célula hospedera varía según el tipo capsular y del tipo de células; existe controversia entre los investigadores sobre la adherencia para el tipo capsular A, puede disminuir si se elimina la cápsula (15), mientras que otros destacan que se incrementa (6).

Mediante la caracterización de los aislamientos es posible determinar las relaciones genéticas entre ellos, así como el grado de diversidad genética que presenta este microorganismo. Por otra parte, ciertos

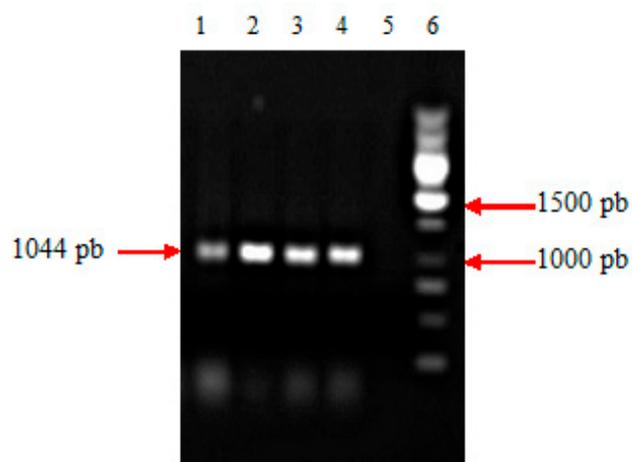


Fig. 2. Producto de la amplificación de la RCP, para identificar el tipo capsular A. Línea 1, control positivo (NCTC 10322); líneas 2-4, cepas B1, B2 y B3 de *P. multocida* respectivamente; línea 5, *E. coli*; línea 6, marcador de peso molecular (3000 pb).

estudios parecen confirmar que determinadas cepas de *P. multocida*, independientemente del tipo capsular, bajo determinadas circunstancias, son capaces de diseminarse desde el pulmón a otros órganos o tejidos del hospedador. La mayoría de los investigadores señalan que *P. multocida* actúa como patógeno secundario (aislada en muchas ocasiones combinada con agentes víricos o bacterianos), aunque pueden existir cepas que actuarían como patógenos primarios, incluso otros autores han indicado que a partir de procesos neumónicos puedan desencadenarse procesos septicémicos (1, 4, 5).

Resultados de la Técnica de ECP

Todas las cepas analizadas en este estudio se caracterizaron mediante la ECP; técnica que permitió determinar la relación genética entre las cepas B1, B2 y B3, basada en la comparación de patrones de bandas que se generaron, luego de la digestión enzimática de todo el genoma bacteriano, al someterlo a una electroforesis multidireccional, utilizando la *ApaI* (Fig. 3).

Mediante la ECP se observó que los patrones de bandas del ADN de la cepa B2 mostraron una banda con una posición diferente al de las cepas B1 y B3. Además, las

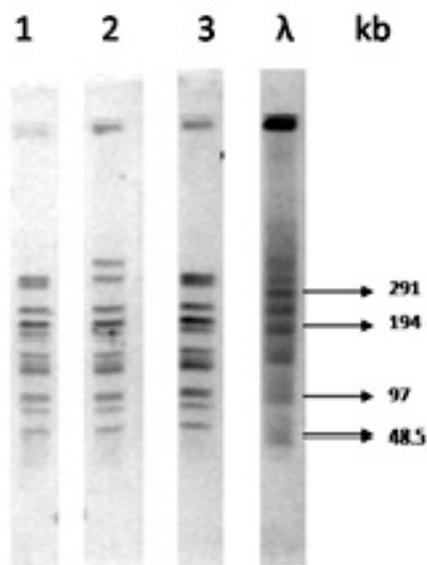


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) que visualizan mediante tinción con bromuro de etidio los productos de la ECP, para identificar patrones de bandas del ADN de las cepas B1, B2 y B3 de *P. multocida* obtenidos en las cámaras de ECP de configuración TAFE. Líneas 1, 2 y 3, cepas B1, B2 y B3, de *P. multocida* respectivamente; línea 4: patrón de peso molecular concatámeros de fago Lambda (λ).

cepas B1 y B3 tuvieron un 100% de similitud y ambas con la B2 un 91%.

Según los criterios descritos por Tenover y cols (16) y Van Belkum y cols (17), las tres cepas se pueden clasificar en el mismo tipo A, puesto que tienen solo una banda diferente en sus patrones; además que las cepas B1 y B3 son indistinguibles entre ellas y se clasifican en un subtipo diferente al de la cepa B2 dentro del mismo tipo, correspondiente a la especie *P. multocida*.

Los aislamientos de *P. multocida* presentan linajes genéticos divergentes. Esta divergencia evolutiva refleja la acumulación de mutaciones no letales al azar, como sustitución de un par de bases, delección de un gen individual o adquisición de ADN de otras especies microbianas. Con el desarrollo de técnicas moleculares fue posible detectar con precisión alteraciones genéticas mínimas (2, 16).

Los primeros trabajos sobre subtipificación de *P. multocida* se realizaron mediante la caracterización de uno o varios marcadores fenotípicos; sin embargo, las técnicas de subtipificación fenotípica presentan algunas limitaciones, como por ejemplo tienen baja reproducibilidad y limitado poder discriminatorio (2).

Según Hunter y Gaston (18), el poder discriminatorio que debe presentar una técnica de subtipificación molecular debe ser al menos del 90% ($D=0,90$). Para cumplir con el 5% de probabilidad aceptable (error tipo I). El valor ideal de D debe ser $>0,95$, aunque las técnicas de subtipificación que presentan un poder discriminatorio $<0,95$ se utilizan en combinación con otras técnicas para llegar al valor de $D=0,95$.

Pedersen y cols (10) plantean que esta técnica presenta una elevada sensibilidad para determinar el tipo de cepa y un elevado poder discriminatorio aplicada a la caracterización de este patógeno, y ha demostrado una buena reproducibilidad, siendo estos parámetros superiores a los obtenidos con otras técnicas de tipificación molecular, ya mencionadas anteriormente (19). Esta técnica además se utiliza para la caracterización de aislamientos de *P. multocida* en diferentes especies de animales y en el hombre (10, 19).

Townsend y cols (8) demostraron la utilidad de la ECP en estudios de epidemiología molecular, al diferenciar cepas indistinguibles por serotipificación, perfil proteico y ribotipificación.

Asimismo, se obtuvieron mejores resultados al subtipificar cepas de *P. multocida* por ECP con el uso

de la ApaI que al hacerlo por ribotipificación mediante el análisis de restricción enzimática y REP-PCR (del inglés, Repetitive Extragenic Palindromic PCR); al mismo tiempo la ECP ha sido utilizada con éxito para evaluar la heterogeneidad de los agentes patógenos involucrados en brotes recurrentes, para monitorear las cepas zoonóticas con el objetivo de lograr un control de la transmisión a los humanos y para caracterizar la susceptibilidad a agentes microbianos de los aislamientos (19). Además, se demostró que la ECP utilizando la ApaI es una técnica que presenta buena reproducibilidad en diferentes laboratorios (2, 10).

Leotta y cols (2), aplicando la metodología que se realizó en este estudio, la ECP con ApaI, pudieron caracterizar además brotes de pasteurelosis al establecer el origen de los mismos, identificar las vías de transmisión, controlar la diseminación de las cepas resistentes a antibióticos y vigilar los programas de vacunación.

Existen numerosos estudios sobre la utilidad de la caracterización de *P. multocida*, que suministran una valiosa información que puede ser empleada para ampliar el conocimiento sobre este agente y generar estrategias que permitan controlar las distintas enfermedades producidas por las diferentes variedades de esta bacteria.

Por otro lado, siempre es importante tener en cuenta los métodos fenotípicos y moleculares utilizados para dicha caracterización, así como el número de aislamientos analizados y el del tipo de muestreo utilizado, pudiendo ser útiles para determinar la transmisión de *P. multocida* entre diferentes especies animales, inclusive el hombre (4).

El conocimiento de las características y la identificación de cepas de *P. multocida* es un paso importante para la prevención y el tratamiento de la pasteurelosis en medicina humana y veterinaria, siendo necesario analizar un mayor número de cepas en el marco de estudios epidemiológicos (3).

Consideramos que los resultados obtenidos en esta investigación con las cepas de *P. multocida* propuestas como candidato vacunal contra la pasteurelosis bovina, en conjunto con otros resultados ya obtenidos, permitirán hacer una selección adecuada de la cepa con la cual se dará comienzo a los estudios correspondientes para la obtención de una bacterina que cumpla con las referencias internacionales, como apoyo en los programas de prevención y control de dicha enfermedad.

Referencias

1. Campuzano VM, González AD, Hernández R, Suárez F, Trigo FJ, Jaramillo CJ. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de exudado nasal de bovinos, en dos cuencas lecheras de México. *Vet Méx* 2011;42(1):1-10.
2. Leotta GA, Chinen I, Vigo GB, Gugliada J, Rivas M. Evaluation of two techniques of molecular subtyping to study *Pasteurella multocida*. *Rev Argent Microbiol* 2006;38(4):190-6.
3. Leotta GA, Vigo GB, Chinen I, Prieto M, Callejo R, Rivas M. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2006;38(3):125-9.
4. García-Benzaquén N. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria; 2010.
5. Espinosa I, Alfonso P, Martínez S. Identificación del gen *toxA* en aislamientos cubanos de *Pasteurella multocida* procedentes de cerdos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Rev Salud Anim* 2009;31(3):188-92.
6. Serra A. La Pasteurelosis del ganado. En: III Jornada Nacional de Ciencias Veterinarias. Tomo II. La Habana: Consejo Científico Veterinario; 1975.p.27.
7. Morales AJF, Jaramillo ML, Ayala AD, Trigo TFJ. Evaluación de fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* en macrófagos alveolares en bovinos. *Rev Lat Amer Microbiol* 1994;36(1):57-66.
8. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):1096-1100.
9. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 2001;39(3):924-9.
10. Pedersen K, Dietz HH, Jorgensen JC, Christensen TK, Bregnballe T, Andersen TH. *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. *J Wild Dis* 2003;39(4):808-16.
11. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 1945; 26(3):297-302.
12. Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2000;72(1):3-25.
13. Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* 2000;68(6):3463-8.
14. Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghodduzi M, et al. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 2001;69(4):2487-92.
15. Pruijboom IM, Rimler RB, Ackermann MR, Brogden KA. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Dis* 1996;40(4):887-93.

16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
17. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID); Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(3):1-46.
18. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26(11):2465-6.
19. Gunawardana GA, Townsend KM, Frost AJ. Molecular characterization of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. *Vet Microbiol* 2000;72(1):97-109.

Molecular characterization of *Pasteurella multocida* strains from cattle

Abstract

Pasteurellosis is a disease caused by *Pasteurella multocida* bacterium, which affects a variety of domestic and wild animals. *P. multocida* is a Gram negative, non-motile, and facultative anaerobic cocobacillus, from genus *Pasteurella*. Genotyping methods are useful to improve the limitations of the traditional phenotyping methods. The aim of this paper was to determine the genetic relationship between *P. multocida* strains B1, B2 and B3, proposed as vaccine candidates. The strains came from the culture collection of the Viral and Bacterial Vaccine Producing Enterprise, LABIOFAM (acronym in Spanish), and were analyzed with polymerase chain reaction and pulsed field electrophoresis. It was confirmed that the three strains belonged to *P. multocida* species, capsular type A *multocida* subspecies. It was also proved that B1 and B3 strains are genetically indistinguishable, and that B2 had a 91% of similarity with B1 and B3. Results obtained by the identification and classification of these strains will permit the development of vaccines against *P. multocida*.

Keywords: *Pasteurella multocida*, PCR, pulsed field gel electrophoresis

Recibido: Noviembre de 2014

Aceptado: Febrero de 2015