

Bases Microbiológicas de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en Uruguay

Mag. Vanessa Sosa Torres

TESIS DE DOCTORADO

PEDECIBA

Área Biología

Sub-área Microbiología

Tutor: Dr. Pablo Zunino
Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones
Biológicas Clemente Estable

Diciembre 2013
Montevideo-Uruguay

Todo parece imposible hasta que se hace

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este largo proceso fueron muchas las personas que intervinieron con su granito de arena aportando conocimiento, enseñanza, información, ayuda, apoyo, consejos, experiencia y amistad. A todos ustedes les agradezco de corazón.

- En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Pablo Zunino, mi tutor de Tesis, por la oportunidad y apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo. Confió en mí y gracias a su apoyo llegué a donde estoy hoy día.
- Muchas gracias a todo el Departamento de Microbiología del IIBCE (La Colonia) que puso su granito de arena directa o indirectamente en este trabajo.
 - o A Valeria, Cecilia y Ana Claudia, con quienes compartí diferentes momentos de esta tesis.
 - o A Anita, a quien le debo muchísimo, compartí con ella mis últimas etapas de este proyecto y sin ella este último tirón hubiese sido mucho más complicado.
 - o A Karina que me ayudó no sólo tiñéndome geles cuando Gaelito me impedía hacerlo, sino también en la discusión de resultados.
 - o A Martín, mi amigo que siempre estuvo ahí, para llorar, reír y compartir vivencias no sólo en lo académico.
 - o A Matilde, que también le solicité ayuda al final del tramo y con quien comparto hoy en día mi vida profesional fuera de la academia.
 - o A Germán por siempre darme para adelante.
 - o A Claudia, Paola, Bruno, con quienes comencé esta gran aventura.
 - o A Karen, Virginia, Loreley, Belén, Sofía y Daniela, que colaboraron con que la rutina sea más amena.
 - o Y a todo el resto de la colonia que apenas conocí...
- Gracias a todo el personal del Laboratorio Santa Elena con quienes compartí discusiones de trabajo y estuvieron siempre abiertos para el intercambio de conocimiento y experiencia.
- Gracias al apoyo económico que hizo posible la realización de esta tesis:
 - o Laboratorios Santa Elena

- Agencia Nacional de Investigación e Innovación
- Programa de Desarrollo Tecnológico
- Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
- Ya fuera del ámbito académico quiero agradecer a mis actuales compañeros de trabajo, mi segunda casa en este momento. Gracias a todos por hacerme el aguante, no solo a mí, sino también a mi amigo Arnold en esta etapa final de la Tesis.
Gracias a Jorge por elevar mi autoestima y permitirme crecer como profesional.
- Gracias a mis amigas y amigos del alma por vuestro constante apoyo durante todos estos años de Doctorado, día a día recibí vuestro aliento...
- Y finalmente, pero no menos importante, gracias a mi FAMILIA.
 - Gracias a mis padres quienes siempre me apoyaron en TODO sin cuestionamientos. Gracias por el esfuerzo que hicieron para que hoy pueda estar donde estoy.
 - Gracias Virg por estar siempre a mi lado y apoyarme a pesar de la distancia.
 - Gracias al resto de mi familia, tanto biológica como adoptada (suena mucho mejor que política). Gracias Elba, Paula, Betito por vuestro cariño, comprensión y apoyo en estas etapas finales de escritura de la Tesis.
- Gracias Ale por estar a mi lado, en TODOS los sentidos. Gracias porque he madurado y aprendido contigo. Gracias por compartir las cosas buenas y por luchar en los momentos difíciles. Gracias por tu paciencia, tu cariño, por tu comprensión, por confiar en mí, por transmitirme tu fuerza, porque tu ánimo y ayuda han sido fundamentales, especialmente en estos últimos momentos. Gracias por hacerme reír (aunque la mayoría de veces sea yo la víctima...) y por reírte de ti mismo.
- Gracias Airu por tu alegría y apoyo incondicional
- Gracias Itaíra y Gael mis hijos divinos por ser como son y por entender que mamá "tiene que estudiar"

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	3
La ganadería a nivel mundial y nacional	4
Enfermedades que afectan a la ganadería	5
Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina	6
Historia de la QIB	7
Sintomatología asociada a la QIB	9
Transmisión de la QIB	10
Agentes predisponentes de la QIB	11
Agentes etiológicos de la QIB	14
Factores de virulencia de <i>Moraxella</i> spp. asociados a QIB	17
Estrategias de tratamiento y prevención de la QIB	28
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	37
Objetivo general	38
Objetivos específicos	38
MATERIALES y MÉTODOS	39
Colección de aislamientos	40
Medios y condiciones de cultivo	43
Identificación fenotípica de los aislamientos	43
Identificación molecular de los aislamientos	50

CAPÍTULO I

Identificación fenotípica y genotípica de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos a partir de brotes de QIB en Uruguay **59**

1. Antecedentes	60
2. Objetivo	64
3. Resultados	64
4. Discusión	74

CAPÍTULO II

Caracterización y variabilidad fenotípica de aislamientos de *Moraxella* spp. recuperados de brotes de QIB **79**

1. Antecedentes	80
2. Objetivos	85
3. Resultados	85
4. Discusión	96

CAPÍTULO III

Caracterización genotípica de aislamientos de *Moraxella* spp. recuperados de brotes de QIB **104**

1. Antecedentes	105
2. Objetivos	110
3. Resultados	111
4. Discusión	139

CAPÍTULO IV

Análisis de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB **144**

1. Antecedentes	145
2. Objetivos	147

3. Resultados	147
4. Discusión	152
CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	159
BIBLIOGRAFÍA	164

RESUMEN

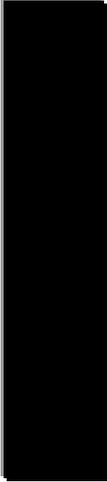
La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una severa enfermedad ocular que afecta al ganado y que tiene un importante impacto económico y sanitario. La identificación de los agentes etiológicos asociados a la enfermedad así como el análisis de la diversidad fenotípica y genotípica de cepas clínicas de *Moraxella* es el principal desafío para el diseño de un exitoso programa inmunoprolifático.

La identificación de los aislamientos llevada a cabo en este trabajo indicó la presencia de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* asociadas a casos de QIB, constituyendo esta la primera descripción de *M. bovoculi* en nuestro país. Otros aislamientos bacterianos asociados a la QIB e identificados por técnicas de análisis fenotípicos y genotípicos pertenecieron a diferentes géneros bacterianos.

Cuando la diversidad fenotípica fue analizada se encontró que los aislamientos mostraron una amplia diversidad en lo que respecta a factores de virulencia que estarían involucrados en el establecimiento o desarrollo de la QIB. A su vez, la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. fue caracterizada genotípicamente por técnicas de ADN-*fingerprinting* observándose que todos los aislamientos fueron tipificables por las técnicas evaluadas. A nivel genotípico también se halló una gran heterogeneidad dado por el amplio perfil de patrones de banda obtenidos. Incluso se observó que en un brote coexistió más de una especie del género *Moraxella*. Con respecto a la distribución de factores de virulencia se observó que el gen *mbxA*, que codifica la subunidad estructural de las hemolisinas MbxA, fue amplificado tanto en aislamientos de *M. bovis* como de *M. bovoculi* y se observaron diferencias genéticas a nivel de este gen en ambas especies como se corroboró cuando se realizaron estudios filogenéticos. Con los cebadores utilizados no fue posible amplificar los genes *omp79*, *plb*, *tolC* y *fur* en la mayoría de los aislamientos de *M. bovoculi*. Esto no significa que estos genes no estén presentes en esta especie bacteriana, pero sí que si están presentes la secuencia nucleotídica de los mismos es probable que sea diferente a la secuencia nucleotídica de los genes de *M. bovis*.

Con ninguna de las técnicas de caracterización evaluada se pudo agrupar los aislamientos en base al departamento ni al año de obtenido el mismo, a características fenotípicas o genotípicas.

Los resultados obtenidos indican la existencia de aislamientos de *M. bovoculi* en nuestro país y que los mismos se diferencian de *M. bovis* a nivel fenotípico y genotípico. Estas diferencias deberían ser tenidas en cuenta al momento de diseñar estrategias de tratamiento y prevención de la QIB.



INTRODUCCIÓN

La ganadería a nivel mundial y nacional

A nivel mundial, la producción ganadera ocupa el 30% de la superficie terrestre (Steinfeld *et al.*, 2006). Este es el subsector más importante de la economía agrícola en la mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo.

En Uruguay, la ganadería constituye una de las actividades económicas más importantes, ocupando unas 15.500.000 hectáreas (aproximadamente un 90% de la superficie total del país). Actualmente el sector ganadero comprende alrededor de 10.500.000 vacunos destinados a la producción de carne y unos 680.000 vacunos destinados a la producción lechera (DIGESA, 2012). Durante el año 2012 se faenaron 2.078.783 vacunos en establecimientos habilitados, correspondiendo un 46% a vacas y un 52% a novillos (INAC, 2013). A su vez, durante ese año, las exportaciones de carnes, menudencias, productos cárnicos y subproductos, sumaron 1.772 millones de dólares (INAC, 2013). Los ingresos obtenidos por carne vacuna representaron un 81% del total embarcado en el sector cárnico. Estas características ubican a la ganadería como una actividad clave para el desarrollo nacional, tanto por su aporte a la economía, como por el aprovechamiento del territorio.

Las principales razas bovinas de carne en Uruguay son de origen británico como *Hereford*, *Polled Hereford*, *Aberdeen Angus* y *Shorton*, mientras que las principales razas bovinas de leche están representadas principalmente por *Holando-Holstein* y en menor medida *Jersey* (DIGESA, 2012).

Enfermedades que afectan a la ganadería

Las enfermedades del ganado constituyen uno de los principales obstáculos para su explotación eficiente. El estado sanitario ganadero depende principalmente de las condiciones del animal, de las condiciones del medio en que se encuentra y de la presencia de agentes que pueden producir enfermedades. La sanidad de los rodeos de cría es uno de los pilares más importantes en la productividad de un país, dado el serio impacto económico que puede causar. Las pérdidas económicas ocasionadas por diversas enfermedades ganaderas son cuantiosas a nivel nacional, estimándose las mismas en millones de dólares al año. Mientras que las enfermedades infecciosas constituían en la década de los 80 pérdidas de alrededor de un 11% en la ganadería de Estados Unidos, en países que contaban con servicios veterinarios insuficientes, las pérdidas se reportaban del 30 al 50% de la potencial producción ganadera (Pettersen & Ramos, 1982). Esto ocasiona un marcado contraste en la productividad entre los países desarrollados y los que se encuentran en etapa de desarrollo.

Los nuevos sistemas de producción que tienden a la intensificación requieren una especial atención en el manejo del riesgo sanitario particularmente asociado a las enfermedades de carácter infectocontagiosas. Sin lugar a duda la profilaxis de las enfermedades tiene un impacto directo a nivel sanitario y económico. Afortunadamente, para muchas de estas enfermedades se cuenta con vacunas que con un buen programa inmunoproláctico, complementado con normas sanitarias y de manejo, rinden resultados satisfactorios.

Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) constituye la enfermedad ocular más frecuentemente detectada en bovinos, estimándose por ejemplo en Iowa, Estados Unidos, una prevalencia del 23% (O'Conner *et al.*, 2012; Punch, 1985). Es una enfermedad que puede afectar uno o ambos ojos, es altamente contagiosa, de etiología multifactorial y que si bien afecta animales jóvenes puede manifestarse en todas las categorías de bovinos (Killinger, 1977).

Aunque la QIB es una enfermedad raramente fatal, las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad son ampliamente conocidas en todo el mundo y se generan por diversas causas. Entre éstas encontramos estrés provocado por el permanente malestar que ocurre en los animales durante la fase aguda de la enfermedad, dado que los bovinos enfermos buscan aliviar su disconfort haciendo contacto con otros bovinos u objetos del ambiente (Hughes, 1981). El resultado de esta hiper-actividad y la reducción del tiempo de alimentación, llevan a una disminución de la producción de leche y del crecimiento, que en el caso de los terneros puede llegar a ser del 20% de su peso (Angelos, 2010; Funk *et al.*, 2009). A su vez, el tratamiento asociado a la enfermedad requiere manipulación de los animales y los costos pueden ser atribuidos directamente a honorarios veterinarios, drogas, análisis de laboratorio y mayor demanda de mano de obra (Hughes, 1981; Postma *et al.*, 2008).

Historia de la QIB

Las primeras descripciones del principal agente bacteriano responsable de la QIB fueron realizadas por Akkerman en 1886, Schimmel en 1888 y por Billings en 1889, quienes detectaron la presencia de finos y cortos bacilos con extremos redondeados en la córnea de bovinos afectados (Hughes, 1981). El patógeno Gram negativo aislado, identificado como bacilo *Morax-Axenfeld* (Morax, 1896; Axenfeld, 1897) fue incapaz de producir la enfermedad en vacas normales y conejos. Aunque Mitter, en 1915 tampoco logró reproducir la enfermedad en vacas asintomáticas, sugirió que el contacto de estos microorganismos con superficies erosionadas era probablemente necesario para reproducir la enfermedad (Mitter, 1915).

En Escocia, Poels (1911) aisló *Bacillus pyogenes* de ojos de bovinos infectados y fue capaz de reproducir la enfermedad inyectando cultivo bacteriano en la córnea de animales normales. Otros dos microorganismos, un coco Gram negativo y uno Gram positivo también fueron aislados y los mismos fueron considerados invasores secundarios. En el año 1919 se aisló un corto diplobacilo Gram negativo de cultivos de ojos afectados con QIB (Allen, 1919). Éste bacilo fue asociado con el *Morax-Axenfeld* y se sugirió que la QIB se encontraba distribuida mundialmente y que ésta podía ser causada por el mismo microorganismo en diferentes países. Jones y Little (1923) también aislaron un diplobacilo Gram negativo y reprodujeron la inflamación característica mediante la inoculación de un cultivo puro en los ojos de bovinos. A su vez, estudiaron las características bioquímicas de estos microorganismos y observaron

que los mismos producían hemólisis en placas de agar suplementadas con sangre equina, licuaban la gelatina luego de 10 días de incubación a 22°C, no fermentaban carbohidratos, presentaban células de 1-2 μm en longitud y 0,5 μm de ancho, eran capsulados, no móviles y no producían esporas (Jones & Little, 1923).

Jones y Little (1924) demostraron que los microorganismos responsables de la QIB eran rápidamente destruidos en el intestino de las moscas y que no vivían más de tres horas en la superficie de las mismas. Estos datos sugirieron que la enfermedad era probablemente distribuida por transmisión mecánica. En 1937, Hauduroy y colaboradores clasificaron la bacteria descrita por Jones y Little como perteneciente al género *Haemophilus*. Posteriormente, Lwoff en 1939 la reclasificó dentro del género *Moraxella*, el cual incluía diplococos Gram negativos aislados de la mucosa nasofaríngea, conjuntiva y tracto urogenital.

La QIB fue transmitida por transferencia directa de exudado ocular o nasal de bovinos infectados a bovinos sanos (Reid & Anigstein, 1945). Posteriormente, fue posible producir la infección experimental en terneros usando un cultivo puro de *Moraxella bovis* (Barner, 1952). A partir de este estudio se propuso desarrollar un agente inmunizador dado que los animales que se recuperaron de la QIB no fueron susceptibles a una reinfección con el mismo patógeno luego de un año de la infección experimental. A su vez, Barner encontró que la enfermedad llamada "ojo rosado" (del inglés *pink eye*) y que era causada por *M. bovis* en ganado bovino, era naturalmente infecciosa y por este motivo la queratoconjuntivitis fue llamada "Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina".

Sintomatología asociada a la QIB

El período de incubación de la QIB frecuentemente es de 2-3 días, aunque se registran intervalos de hasta 3 semanas después de la inoculación experimental. Entre los signos más tempranos cabe destacar la hiperemia de los vasos corneales y el edema conjuntival, casi siempre acompañado de abundante lagrimeo acuoso, blefarospasmo, fotofobia y en algunos casos fiebre, anorexia y disminución en la producción de leche (Angelos, 2010; Carmo *et al.*, 2011). Transcurridos 1-2 días aparece una pequeña opacidad en el centro de la córnea que puede llegar a ulcerarse. Esta opacidad se va haciendo cada vez más extensa y en el momento de inflamación máxima, alrededor de 6 días después de los primeros signos, puede cubrir toda la córnea (Angelos, 2010). A medida que mejora la inflamación aguda, las secreciones oculares se tornan purulentas y la opacidad se comienza a contraer para curarse por completo al cabo de un curso total de 3 a 5 semanas (Blood & Radostits, 1992).

Se ha descrito que en el transcurso de un mes se puede constatar sintomatología en prácticamente la totalidad del ganado (Baptista, 1979). Se calcula que sólo en un bajo porcentaje de los casos quedan opacidades residuales (Blood & Radostits, 1992). Únicamente en los casos en los cuales la enfermedad es grave, la córnea adopta forma cónica, con intensa vascularización y la ulceración del vértice de la zona inflamada produce trayectos profundos en el órgano, repletos de pus y rodeados de una zona de eritematosa. En estos casos es cuando puede llegar a suceder ruptura de la córnea y eventualmente ceguera (Carmo *et al.*, 2011).

Transmisión de la QIB

Los bovinos representan el único reservorio natural conocido de *M. bovis* y se ha sugerido que podrían mantener la bacteria durante el invierno y ser fuente de infección para animales más jóvenes durante el verano (Pugh & Hughes, 1966). Existen diversos serotipos de *M. bovis* y se ha observado que el mismo serotipo puede prevalecer de año en año en un predio, probablemente en los animales portadores (Moore & Rutter, 1987).

La enfermedad es más frecuente en verano y otoño y alcanza carácter epizootico cuando hay abundancia de pasturas, moscas y polvo, por lo que se cree que alguno de estos podría ser el agente transmisor al estar contaminado por secreciones oculares de animales enfermos. La mosca *Musca autumnales*, conocida como mosca de la cara por su preferencia por la zona que rodea a los ojos, podría ser un vector importante de la infección pues se ha determinado que es portadora de *M. bovis* durante períodos de al menos 3 días (Alexander, 2011; Glass & Gerhardt, 1983). En condiciones experimentales, se ha determinado que la transmisión de QIB no suele ocurrir en ausencia de moscas y sí en su presencia (Kolpecky *et al.*, 1986).

Agentes predisponentes de la QIB

Existen distintos factores epidemiológicos que se suman a los agentes etiológicos y juegan un papel importante en la ocurrencia y/o severidad clínica de la QIB. Entre los más importantes se encuentran el estrés, condiciones ambientales predisponentes (viento, polvo y aumento de intensidad de radiación solar que irritan los ojos), físicos (pastos encañados, alimentos en batea con polvillo, traumas físicos entre animales) y biológicos (alérgenos en el aire, moscas vectores del agente, virus y bacterias asociadas a los agentes etiológicos de la enfermedad, raza y edad del bovino, cepa causante de la enfermedad y estado inmune de los bovinos) (Baptista, 1979; Brown *et al.*, 1998). No obstante, es importante tener claro que sin el agente etiológico responsable de la enfermedad no se producen la queratitis y conjuntivitis típicas de la afección, aunque se trate de una enfermedad considerada como un síndrome multifactorial.

La radiación ultravioleta (UV), particularmente la parte del espectro que causa quemaduras solares (<320 nm) varía de acuerdo a la latitud, altitud y época del año (Hughes, 1981). Estos rayos UV, abundantes en el verano y el polvo ambiental provocan irritación de los ojos. Bajo condiciones de campo a largo plazo, Hughes y Pugh (1970) y Lepper y Barton (1987) demostraron que el aumento de la radiación solar incrementaba la tasa de infección y la aparición de signos clínicos de QIB. A su vez, la irradiación experimental de los ojos de vacas con radiación UV, antes de la inoculación con *M. bovis*, facilitó la infección y causó graves signos clínicos (Hughes *et al.*, 1965; Hughes *et al.*, 1968a; Kopecky *et al.*, 1980; Pederson *et al.*, 1972).

Pese a que los casos de QIB ocurren predominantemente durante los meses de temperatura más alta del año, también se reportan brotes en invierno cuando el ganado se encuentra confinado en establos cerrados o en lotes de engorde intensivo (Hughes & Pugh, 1970; Snowden *et al.*, 2005; Thrift & Overfield, 1974).

Los traumas físicos se originan por la agresión, golpes y choques entre animales durante la manipulación que pueden dañar los ojos. Los cuerpos extraños tales como la paja, el pienso, forraje y granos de arena pueden ocasionar el desgaste de la córnea. A su vez la córnea se puede dañar por el pastoreo cerca de los márgenes del campo, las espinas, los alambres de púas y los tallos secos de hierba. En conjunto, estos agentes traumatizantes podrían potencialmente facilitar el ingreso a la córnea de agentes patógenos (Alexander, 2011).

Por otro lado, las moscas de la cara no sólo actúan como vectores, como se vio previamente, sino que también son irritantes oculares que permiten el establecimiento de la infección. El movimiento de la mosca mientras está posada en el ojo causa daño ocular y un aumento de las secreciones (Van Geem & Broce, 1985). Existen también otros agentes causales que pueden aparecer en forma combinada con *M. bovis* y de esa manera provocar lesiones más graves. Entre éstos agentes encontramos el Herpes virus Bovino, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma* spp. y *Chlamydia* spp. colaborando sinérgicamente con la patogenicidad característica de la QIB (Langford & Dorward, 1969; Mohanty & Lillie 1970; Sykes *et al.*, 1962). La mayoría de los autores considera a los agentes nombrados anteriormente como microorganismos asociados a casos de QIB, siendo los únicos agentes etiológicos que producen QIB bacterias pertenecientes al género *Moraxella* spp..

A pesar de que todas las razas de bovinos pueden ser afectadas por la QIB, comúnmente se observa que existe una prevalencia mucho más alta de la enfermedad en las razas europeas (Dodt, 1977; Makinde *et al.*, 1985; Snowden *et al.*, 2005; Webber & Selby, 1981). A su vez, no sólo la prevalencia de la enfermedad es mayor sino que la severidad y la afección uni o bilateral en los ojos es mucho más marcada en el ganado tipo europeo que en el ganado cebuino y sus cruza. Experimentalmente también se ha observado que la raza *Hereford* y sus cruza son más susceptibles a la enfermedad (Snowden *et al.*, 2005; Ward & Nielson, 1979), seguidas por las razas *Aberdeen Angus* y *Charolais*. La falta de pigmentación de los párpados es un factor fundamental en esta variación de la susceptibilidad observada (Pugh *et al.*, 1986; Ward & Nielson, 1979).

Snowden y colaboradores (2005) determinaron que la incidencia de QIB también estaría relacionada a la edad de los animales, observándose un aumento significativo en el número de casos a partir de los 45 días de edad y comenzando a declinar a partir de los 130 días. A pesar que los terneros son generalmente más susceptibles a la QIB que los animales de más edad (Hughes & Pugh, 1970; Slatter *et al.*, 1982; Webber & Selby, 1981;), los adultos pueden ser afectados gravemente cuando el rodeo no ha sido expuesto previamente al agente etiológico (Baptista, 1979; Hughes & Pugh, 1970).

Agentes etiológicos de la QIB

Como se comentó anteriormente, tradicionalmente se ha considerado a la bacteria Gram negativa *M. bovis*, perteneciente a la familia *Moraxellaceae*, como el agente etiológico de la QIB (Alexander, 2011; Baptista, 1979; Barner, 1952; Bryan *et al.*, 1973; Hughes *et al.*, 1965; Jackson, 1953; Jones & Little, 1924; Pederson *et al.*, 1972; Pugh *et al.*, 1968). Sin embargo, estudios recientes han establecido la existencia de otras especies pertenecientes al género *Moraxella*, *Moraxella ovis* (anteriormente denominada *Branhamella ovis*) y *Moraxella bovoculi*, asociadas a casos de QIB (Angelos *et al.*, 2007a; Cerny *et al.*, 2006; Elad *et al.*, 1988; Nagy *et al.*, 1989). Sin embargo, aún no se ha establecido exactamente el papel de estas dos últimas especies en la patogenia de la enfermedad.

Moraxella bovis

M. bovis es un patógeno oportunista, que se encontró no sólo en animales con sintomatología clínica de QIB sino que incluso se lo encontró en la conjuntiva y en las secreciones nasales de bovinos sin ningún signo o antecedente de infección (Pugh & McDonald, 1986). O'Connor y colaboradores (2012) en un estudio cohorte realizado con 478 ojos no encontraron una asociación entre una previa exposición a *M. bovis* y la subsecuente incidencia de QIB. Sin embargo, estos autores determinaron que *M.*

bovis es más frecuentemente recuperada de ojos con lesiones por QIB que de ojos no afectados y por este motivo se lo considera su agente causal.

Moraxella bovoculi

M. bovoculi fue propuesta hace pocos años como una nueva especie del género *Moraxella*, muy cercana filogenéticamente a *M. bovis* y *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007a). *M. bovoculi* es un coco Gram negativo que fue aislado de córneas ulceradas de bovino en el verano del año 2002 durante un brote de QIB ocurrido en el norte de California, Estados Unidos (Angelos *et al.*, 2007a). Durante este brote se tomaron muestras de 138 ojos de bovinos de entre 3 y 9 meses de edad con sintomatología clínica de QIB. Los exámenes microbiológicos permitieron aislar 29 cepas de *M. bovis* y 18 cepas β -hemolíticas con forma de cocos Gram negativos. Las secuencias del ADNr 16S de estas 18 cepas presentaron un 99,9% de homología entre ellas y el análisis filogenético permitió colocarlas dentro del grupo de similaridad a *M. bovis* y *M. ovis* (Pettersson *et al.*, 1998). Sin embargo, los porcentajes de homología obtenidos entre las tres especies de *Moraxella* con morfología de cocos fueron inferiores al 96%. Las características fenotípicas y genotípicas permitieron a Angelos y colaboradores (2007) definir estas nuevas cepas e incluirlas en una nueva especie a la que denominaron *M. bovoculi*.

M. bovoculi se describió como un nuevo miembro del género *Moraxella* en base a la secuencia nucleotídica de seis genes *housekeeping* (aquellos que codifican para proteínas esenciales para el funcionamiento general de las células), de los genes que codifican para las subunidades de ARNr 16S y 23S así como de la región intergénica ubicada entre ambos (ITS). A su vez, los análisis bioquímicos mostraron diferencias

entre los aislamientos de *M. bovoculi*, *M. bovis* y *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007a; Angelos & Ball, 2007a). Se encontró que *M. bovoculi* podía ser diferenciada bioquímicamente de *M. bovis* en base a la actividad fenilalanina desaminasa positiva y a la incapacidad de expresar gelatinasa (Angelos *et al.*, 2007a). No obstante, luego de la primera identificación de *M. bovoculi* fenilalanina desaminasa positivos se identificaron aislamientos de *M. bovoculi*, pero que resultaron fenilalanina desaminasa negativos (Angelos & Ball, 2007a).

Según Angelos (2010) *M. bovoculi* es causante de QIB, aunque aún no haya demasiados estudios sobre la patogenicidad de esta nueva especie.

Moraxella ovis

M. ovis ha sido aislada de casos de QIB, principalmente de animales jóvenes, aunque aún no está completamente dilucidado su papel en la patogénesis de la enfermedad (Elad *et al.*, 1988; Nagy *et al.*, 1989). Cerny y colaboradores (2006) examinaron la presencia de factores de virulencia descritos en *M. bovis* en aislamientos clínicos de *M. ovis* con el objetivo de dilucidar la importancia de esta última en la etiología y desarrollo de la QIB. Estos autores evaluaron el efecto de cultivos de *M. ovis* sobre diferentes tipos de células de origen bovino y encontraron que los aislamientos exhibieron actividad hemolítica sobre eritrocitos y actividad citotóxica sobre células mononucleares sanguíneas y células del epitelio de la córnea, lo que sugiere que *M. ovis* juega un papel en la patogénesis de la QIB.

Cada vez son más los investigadores que sugieren que los aislamientos clasificados como *M. ovis* corresponderían a la especie que hoy en día se denomina *M. bovoculi* (Angelos, 2010; O'Connor *et al.*, 2012).

Factores de virulencia de *Moraxella* spp. asociados a QIB

Las lesiones ocasionadas por la QIB generalmente se localizan en el ojo sin llegar el microorganismo a la corriente sanguínea de los animales afectados. La infección experimental de *M. bovis* en bovinos ha resultado en úlceras de córnea, erosiones conjuntivales y la acumulación de fibrina, neutrófilos y bacterias en el estroma corneal (Rogers *et al.*, 1987a, 1987b). En base a los experimentos para reproducir la enfermedad en terneros gnotobióticos (Pugh *et al.*, 1978) y a los estudios de cultivos sobre tejido corneal (Chandler *et al.*, 1985), se ha sugerido que probablemente exista una gran variación de virulencia entre cepas de *M. bovis* (Pugh & Hughes, 1970a).

Entre los factores de virulencia que se asocian a la patogenicidad de *Moraxella* spp., se encuentran la expresión de fimbrias, hemaglutininas, hemolisinas, fosfolipasas, sistemas de adquisición de hierro y enzimas proteolíticas e hidrolíticas (Postma *et al.*, 2008).

Fimbrias, Hemaglutininas y Biofilms

Fimbrias

Las fimbrias son proteínas de superficie cuya función es la adhesión de la bacteria a receptores específicos presentes en las células blanco (Chandler *et al.*, 1979; Gil Turnes, 1983). Las fimbrias de *M. bovis* son del tipo IV, resisten 65 °C durante una hora y se inactivan luego de 30 min a 100 °C. En *M. bovis* las fimbrias se encuentran distribuidas alrededor de la célula y las mismas miden de 1 a 4 µm de largo y aproximadamente 6 nm de diámetro (Keizer *et al.*, 2001).

La expresión de las fimbrias de *M. bovis* se pierde luego de varios pasajes por cultivo, resultando en un fenotipo liso. Las cepas fimbriadas se adhieren a superficies celulares bovinas mejor que las cepas no-fimbriadas (Annuar & Wilcox, 1985). A su vez, se ha propuesto que sólo las cepas fimbriadas de *M. bovis* son capaces de establecer infección ocular y causar signos clínicos de QIB en bovinos inoculados experimentalmente (Chandler *et al.*, 1979; Jayappa & Lehr, 1986; Lepper & Power, 1988; Pugh & Hughes, 1971).

Dos tipos funcionalmente diferentes de fimbrias, llamadas I y Q han sido identificadas (Marrs *et al.*, 1985). La fimbria Q (previamente llamada β) estimula la unión inicial de la bacteria a la córnea bovina, mientras que la fimbria I (previamente llamada α) se asocia a la persistencia local y mantenimiento de la infección (Ruehl *et al.*, 1993). Una cepa de *M. bovis* es capaz de producir ambos tipos de fimbrias (Marrs *et al.*, 1985) y transiciones bidireccionales entre la expresión de ellas ocurren como resultado del "switch" en una región cromosomal de 2.1 kb (variación de fase, Figura 1) (Marrs *et al.*, 1988).

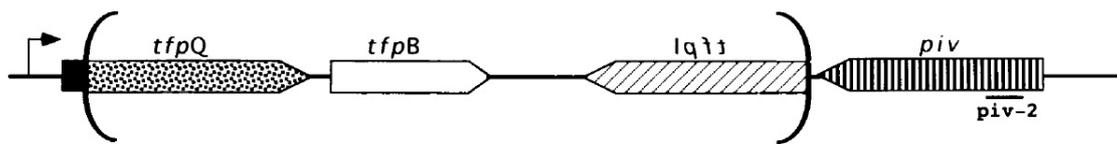


Figura 1. Representación esquemática de la región de inversión del ADN que codifica las fimbrias de tipo IV de *M. bovis*. Entre paréntesis se indica el segmento de ADN invertible. La flecha indica el comienzo y sentido de la transcripción. Figura adaptada de Heinrich & Glasgow (1997).

Los segmentos génicos que codifican para el extremo carboxi terminal de las proteínas fimbriales Q e I están orientados en direcciones opuestas del segmento invertible. La orientación de este segmento determina la proteína que será producida. Un gen, *piv*, localizado inmediatamente adyacente al segmento invertible, codifica una invertasa de ADN sitio-específica que determina el gen fimbrial a transcribir (Heinrich & Glasgow, 1997; Lenich & Glasgow, 1994; Marrs *et al.*, 1990). Un marco de lectura (ORF del inglés *Open Reading Frame*) *tfpB* fue encontrado en el segmento invertible, pero su función no ha sido claramente dilucidada hasta el momento.

Diversos estudios han demostrado que cepas de *M. bovis* que expresan fimbrias de tipo Q son más eficientes en establecer la infección y por lo tanto son más patogénicas que cepas que expresan fimbrias de tipo I (Ruehl *et al.*, 1988; 1993). El cambio entre fimbrias I y fimbrias Q de *M. bovis* es probable que sea importante en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Angelos, 2010).

Por medio de análisis inmunológicos basados en la técnica de ELISA fueron descritos seis serogrupos de fimbrias de *M. bovis* (Lepper & Hermans, 1986). Posteriormente, un estudio con mayor número de cepas usando aglutinación, ELISA e inmunoelectroforesis describió, en base a diferencias en determinantes antigénicos,

siete serogrupos fimbriales (Moore & Lepper, 1991). La presencia de al menos siete serogrupos fimbriales así como la posibilidad de variación de fase determinada por la recombinación sitio específica de un segmento de ADN cromosomal determina una elevada variabilidad antigénica.

Finalmente, es importante resaltar que las fimbrias de *M. bovis* no sólo son esenciales para la colonización del hospedero sino que también son importantes inmunógenos (Lehr *et al.*, 1985; Moore & Rutter, 1987).

Hemaglutininas

Las cepas de *M. bovis* son capaces de aglutinar eritrocitos ovinos a temperatura ambiente y de cerdo a 4°C (Gil Turnes, 1983). Se ha descrito que las hemaglutininas de *M. bovis* podrían tener un papel importante en la adhesión, ya que se ha observado que cepas no fimbriadas se adhieren a varios tipos de células, a pesar de hacerlo menos eficientemente que las cepas fimbriadas (Annuar & Wilcox, 1985). La hemaglutinación de *M. bovis* se estudió con suspensiones bacterianas autoaglutinantes. Suspensiones bacterianas tratadas con MgCl₂ fueron no autoaglutinantes y no hemaglutinantes (Gil Turnes, 1983).

En el 2006 Kakuda y colaboradores identificaron en *M. bovis* dos ORFs denominados *flpA* y *flpB*, en un plásmido de 44 kb, pMBO-1. Estos ORFs posiblemente codifiquen proteínas homólogas con las hemaglutininas filamentosas de *Bordetella pertussis* (FHA) que le permiten a este patógeno adherirse a las superficies mucosas. En el plásmido pMBO-1 también fue descrito un ORF que posiblemente codifique para una proteína involucrada en la secreción de las hemaglutininas y un ORF que codificaría

una proteína accesoria de Flp (Fap). Esta última tiene similitud con la proteína accesoria FhaC necesaria para la interacción con FHA de *B. pertussis* permitiéndole atravesar el espacio periplásmico de la superficie celular (Kakuda *et al.*, 2006).

Biofilms

La gran mayoría de la vida bacteriana en la naturaleza en vez de encontrarse en estado planctónico, se encuentra formando comunidades llamadas *biofilms* (Costerton, 1995; Kolter & Greenberg, 2006). Los *biofilms* están constituidos por una o varias especies bacterianas que se adhieren entre sí y a superficies o interfaces expuestas, bióticas o abióticas y que se encuentran incluidas en una matriz polimérica hidratada de producción propia (Davey & O'Toole, 2000; Donlan, 2002). La importancia de los *biofilms* se destaca por su papel en muchas enfermedades crónicas, la resistencia a los antibióticos, la contaminación biológica y el tratamiento de las aguas residuales (Fux *et al.*, 2005).

El crecimiento de los *biofilms* suele ser representado como una serie de discretas fases de un ciclo de vida (Stoodley *et al.*, 2002) que comienza cuando las células entran en contacto con una superficie, ya sea al azar o por quimiotaxis hacia atrayentes químicos (Freter, 1981; Pratt & Kolter, 1998). La adhesión inicial a esta superficie es a menudo reversible, de tal manera que las células pueden separarse si las condiciones cambian. Tras la unión, las bacterias se multiplican para formar grupos densos de células que caracterizan a los *biofilms*. Dentro de esta estructura, junto con las células se encuentran atrapados: el agua, iones solubles de bajo y alto peso molecular, polisacáridos y ADN. En muchos *biofilms* esta matriz retiene agua y al estar hidratados

adoptan un estado semisólido, en el cual el principal componente de la matriz es agua, llegando a ocupar hasta un 97% del mismo (Zhang *et al.*, 1998).

A pesar de que la capacidad de *M. bovis* de formar *biofilm* ha sido escasamente estudiada, una gran variedad de infecciones oculares se han asociado a los *biofilm* (Elder *et al.*, 1995; Murugan *et al.*, 2010). Se ha descrito que las fimbrias de tipo IV son los factores más importantes en la unión de *M. bovis* a la superficie de las células corneales epiteliales *in vitro* y en el establecimiento de la infección en los ojos de los bovinos (Lepper & Power, 1988), pudiendo jugar éstas un papel importante en el desarrollo de *biofilms* por este patógeno.

Hemolisinas

La mayoría de las cepas de *M. bovis* sintetizan hemolisinas que tienen propiedades hemolíticas dependientes de calcio, corneotóxicas y leucotóxicas y, por lo tanto, tienen una importante función en la patogénesis de este microorganismo (Billson *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 1995). Estas toxinas tienen la propiedad de degradarse muy fácilmente una vez que son liberadas por la bacteria, pero a pesar de ello son capaces de producir daño en la córnea.

Se encontró una correlación entre la capacidad de *M. bovis* de producir β -hemolisinas sobre agar sangre y la capacidad de este patógeno de producir enfermedad clínica en animales susceptibles experimentalmente desafiados (Nayar & Saunders, 1975; Pugh & Hughes, 1968; 1971) y en brotes epidémicos (Hughes *et al.*, 1970; Lepper & Barton, 1987).

Cepas no hemolíticas de *M. bovis* son aisladas frecuentemente de bovinos y su papel en la patogenia es controversial. Inicialmente se sugirió que estas cepas eran capaces de desarrollar QIB (Pugh & Hughes, 1970a). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que no estarían asociadas a la enfermedad (Brown *et al.*, 1998).

La β -hemolisina de *M. bovis* (MbxA) pertenece a la familia RTX de exo-proteínas bacterianas y se caracteriza por producir poros en la membrana citoplasmática de diversas células, provocando eflujo de potasio, desequilibrio osmótico y lisis (Angelos *et al.*, 2001; Billson *et al.*, 2000). Esta exotoxina está codificada en un operón compuesto por 5 genes denominados 5'-*mbxC-mbxA-mxB-mxD-toIC*-3'. El gen *mbxA* codifica una proteína de aproximadamente 98,8 kDa, MbxA (Angelos *et al.*, 2001). En MbxA existe una secuencia de aminoácidos característica de las toxinas RTX, incluyendo repetidos ricos en glicina en el extremo carboxi-terminal (Angelos *et al.*, 2001). La toxina MbxA es activada por el producto del gen *mbxC* y transportada por proteínas de membrana codificadas por los genes *mbxB* y *mbxD* (Angelos *et al.*, 2001).

Angelos y colaboradores (2003) observaron por PCR y *Southern blot* la ausencia de hibridación entre sondas específicas para el gen *mbx* y ADN genómico aislado de cepas no hemolíticas de *M. bovis*. Cuando se analizó el ADN que rodeaba los extremos 5' y 3' de *mbxCABDtoIC* en cepas hemolíticas se encontraron diversas regiones repetidas de aproximadamente 700 pb rodeando al operón (Hess & Angelos, 2006). Sin embargo, cuando se analizaron cepas no-hemolíticas de *M. bovis* las mismas tenían sólo uno o directamente no tenían estas secuencias repetidas. La organización genética, el menor contenido G+C de *mbxCABDtoIC*, las secuencias repetidas en las

cepas hemolíticas de *M. bovis* y su ausencia en cepas no hemolíticas de *M. bovis*, sugieren que el operón *mbx* de *M. bovis* está localizado en un elemento genético móvil, específicamente en una isla de patogenicidad (PAIs del inglés *Pathogenicity Associated Islands*). Éste es el primer elemento perteneciente a una PAI demostrado en *M. bovis* y ha sido denominado PAI I_{Tifton 1}. Hess y Angelos (2006) sugirieron que las cepas no-hemolíticas de *M. bovis* pueden convertirse en hemolíticas y potencialmente patogénicas por adquisición directa del operón *mbx*.

Operones RTX completos han sido identificados en *M. bovoculi* y *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007b). En *M. bovoculi* el operón fue denominado *mbv* y comprende los genes *mbvCABDtoIC*, mientras que en *M. ovis* el operón fue denominado *mov* y comprende los genes *movCABDtoIC*. Se ha descrito que el suero policlonal obtenido en conejo contra MbvA neutralizó la actividad hemolítica de *M. bovoculi* y *M. ovis*, pero no así la actividad hemolítica de *M. bovis*. El suero policlonal obtenido en conejo contra MbxA neutraliza sólo parcialmente la actividad hemolítica de *M. bovoculi* y *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007b). MbvA y MovA tienen aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos deducida, mientras que en la secuencia aminoacídica deducida de *M. bovis* MbxA tiene aproximadamente un 83% de identidad con MbvA y MovA (Angelos *et al.*, 2007b).

Las hemolisinas de *Moraxella* spp. son de naturaleza proteica, lo que les confiere la capacidad para actuar como antígenos en vacunas, A su vez, Angelos y Ball (2007a) demostraron la homogeneidad genética a nivel de citotoxinas de *M. bovis* de cepas de *M. bovis* obtenidas de diversos orígenes geográficos. Por estos motivos se ha sugerido

que una vacuna basada en citotoxinas puede prevenir la QIB ocasionada por múltiples cepas de *M. bovis*.

Se ha descrito que el ganado recuperado de casos de QIB desarrolla respuesta en anticuerpos anti-hemolisinas que puede neutralizar las hemolisinas de varias cepas de *M. bovis* (Billson *et al.*, 1994; Hoiem-Dalen *et al.*, 1990; Ostle & Rosenbusch, 1985). A su vez, el ganado que ha sido vacunado con hemolisinas de *M. bovis* resultó protegido contra desafíos heterólogos (Billson *et al.*, 1994).

Fosfolipasa B y enzimas hidrolíticas y proteolíticas

En *M. bovis* se ha descrito la presencia de un gen llamado *plb* que codifica una fosfolipasa B (Farn *et al.*, 2001). Plb, una proteína compacta, globular, soluble, con una estructura típica de autotransportadores convencional. La actividad enzimática de la fosfolipasa B de 66 kDa sobre fosfolípidos de membrana puede resultar en la lisis celular. Esta proteína es una lipasa serina triacilglicerol y contiene un motivo aminoacídico compuesto de Gly-Asp-Ser-Leu alrededor de su sitio activo y por esta razón pertenece a la familia GDSL de proteínas lipolíticas (Farn *et al.*, 2001). Aunque aún no está claro el papel de la proteína Plb en la patogénesis de *M. bovis*, se ha sugerido que podría ser un antígeno candidato para su inclusión en vacunas contra QIB (Angelos *et al.*, 2010). Esto se debe a que Plb fue detectada por *Western blot* en cepas representativas de todos los serogrupos descritos de *M. bovis* (Farn *et al.*, 2001). Los genes que codifican Plb pudieron ser expresados en forma recombinante en *Escherichia coli* con alto grado de pureza y rendimiento (Shiell *et al.*, 2007). Plb fue secretada bajo dos formas que tuvieron secuencias aminoacídicas idénticas pero que

difirieron en tamaño y punto isoeléctrico, indicando que la fosfolipasa B nativa puede existir en dos posibles estados que posiblemente difieran en su estado de oxidación de los residuos de cisteína (Shiell *et al.*, 2007).

Enzimas hidrolíticas (esterasa C4, esterasa-lipasa C8, lipasa C14, fosfoamidasa, hialuronidasa y fosfatasa) y enzimas proteolíticas (aminopeptidasas y gelatinasa) también han sido identificadas en el sobrenadante de cultivos de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Se ha sugerido que las mismas participarían en la producción de úlceras corneales junto a fibrinolisinias y las enzimas con actividad hemolítica, anteriormente descritas (Angelos *et al.*, 2007; Frank & Gerber, 1981).

Sistemas de adquisición de hierro

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de prácticamente toda forma de vida ya que se necesita en la producción proteica y para la síntesis de ADN y ARN (Fenwick *et al.*, 1996). Las bacterias presentan diversos mecanismos para obtener hierro, dentro de estos se encuentra la secreción de sideróforos que forman complejos con la fuente de hierro y se unen a la superficie bacteriana mediante receptores específicos. La capacidad que tienen las bacterias patógenas de captar el hierro en el organismo hospedador contribuye a la patogenicidad del mismo ya que facilita su persistencia y crecimiento. Estudios *in vitro* sugieren que *M. bovis* posee un eficiente sistema de adquisición de hierro constituido por sideróforos y proteínas de membrana externa (PME) que reconocen lactoferrina y transferrina bovina, dos proteínas capaces de quelar el hierro presente en secreciones mucosas y en el suero sanguíneo, respectivamente (Brown *et al.*, 1998; Fenwick *et al.*, 1996). Yu y Schryvers (1994)

identificaron dos proteínas de unión a la transferrina, Tbp1 y Tbp2, en la membrana celular de *M. bovis*. Estas proteínas resultaron específicas para transferrina bovina pero no para la ovina o caprina. En trabajos posteriores realizados por los mismos investigadores se identificaron en *M. bovis* las proteínas de unión a transferrina TbpA y TbpB así como proteínas de unión a la lactoferrina LbpA y LbpB (Yu & Schryvers, 2002). La capacidad de *M. bovis* de multiplicarse en medios con bajo contenido de hierro sugiere un papel de este atributo en la virulencia. Mutantes isogénicas deficientes en las proteínas LbpA y/o LbpB demostraron una reducción en la unión a lactoferrina y fueron incapaces de utilizar la lactoferrina bovina para crecer. Se ha postulado que la proteína LbpB podría ser un candidato para su incorporación en vacunas contra QIB (Angelos *et al.*, 2010).

Fenwick y colaboradores (1996), por su parte, también estudiaron el efecto de la limitación de hierro sobre la expresión de proteínas de *M. bovis* y descubrieron dos PME así como posibles sideróforos que se inducirían en estas condiciones. Una de estas PME, de aproximadamente 78 kDa ha sido propuesta como receptor de sideróforos. El mecanismo de regulación de la expresión de proteínas en *M. bovis* en respuesta a la disminución de la concentración de hierro ambiental fue estudiado por Kakuda y colaboradores (2003a). Este grupo de investigadores encontró que *M. bovis* poseía el gen *fur* (*ferric uptake regulator*), el cual fue clonado y caracterizado, encontrando que la expresión de Fur disminuye cuando existe hierro disponible y que Fur se une a un fragmento de ADN *upstream* del gen *fur*. Estos autores también describieron una proteína de 79 kDa reprimible por hierro denominada IrpA y negativamente regulada por Fur. Cepas de *M. bovis* deficientes en IrpA vieron reducida su capacidad de crecer en condiciones donde la fuente de hierro en el medio es transferrina bovina o

lactoferrina bovina (Kakuda *et al.*, 2003b). A su vez, IrpA fue propuesta como candidata de vacunas dado que se encontró conservada en una colección de aislamientos de *M. bovis* (Kakuda *et al.*, 2003b).

Estrategias de tratamiento y prevención de la QIB

Tratamiento

El tratamiento de los casos clínicos de QIB debe comenzar inmediatamente que la enfermedad ha sido diagnosticada evitando de esta forma que ocurran lesiones irreparables en la córnea del animal. Diversas medidas terapéuticas locales y sistémicas han sido usadas largamente para el tratamiento de la QIB. Tradicionalmente los antibióticos se han empleado para tratar los animales con QIB y disminuir la posibilidad de contagio del resto de los animales. La córnea bovina posee la capacidad de una buena cicatrización de úlceras profundas. Este hecho combinado con la amplia gama de antibióticos que se usan para combatir los casos de QIB lleva a que gran parte de los tratamientos sean eficaces (Angelos, 2010).

En general, para la administración de los antibióticos y antiinflamatorios vía local se utilizan aerosoles así como pomadas o ungüentos (Blood & Radostits, 1992). Su empleo resulta efectivo si la dosificación puede repetirse de acuerdo a las indicaciones terapéuticas, prolongándose el tratamiento al menos por varios días. El efecto de

barrido y diluyente de las lágrimas conspira contra la permanencia de los productos en dosis terapéutica sobre la conjuntiva y córnea, lo que hace necesario repetir las aplicaciones. Sin embargo, es casi imposible hacer uso de estas formas medicamentosas en rodeos numerosos con índices de incidencia elevados por la dificultad que implica movilizar los animales repetidamente (Blood & Radostits, 1992). En estos casos la utilización de drogas de larga acción por vía parenteral sistémica o local es la opción más indicada, ya que mantiene una concentración elevada en lágrimas por 48 a 72 hs. Entre las drogas con efectividad contra *M. bovis* se pueden mencionar oxitetraciclina, gentamicina, cefalosporinas, trimetoprim, nitrofuranos amoxicilina y tilmicosin (George *et al.*, 1984). Sin embargo, hay que tener presente que *M. bovis* recuperada de diferentes rodeos (George *et al.*, 1984) o de diferentes animales del mismo rodeo varía en su respuesta a drogas antimicrobianas (Gil Turnes & Albuquerque, 1984). Por estos motivos la terapia antibiótica no asegura ni la curación clínica ni la eliminación del agente en los animales portadores (Nagy *et al.*, 1989; Punch, 1985).

La detección temprana de animales con signos de QIB, el aislamiento y la identificación del agente patogénico si es posible y el control de los insectos vectores son de gran importancia para el manejo de los rodeos con casos clínicos de QIB.

Prevención

Entre las medidas profilácticas más comúnmente empleadas para proteger a los animales de la QIB se encuentra la vacunación ya sea con células totales inactivadas (bacterinas) o proteínas bacterianas purificadas o recombinantes (Hughes & Pugh,

1971; Lepper *et al.*, 1993; Pugh & McDonald, 1982; Smith *et al.*, 1990; Webber & Selby, 1981). Sin embargo, con frecuencia la protección inducida por estas vacunas no es total (Burns & O'Connor, 2008).

Vacunas basadas en células bacterianas

Los primeros estudios sobre inmunidad frente a la QIB fueron realizados por Hughes y colaboradores (1968b), quienes inmunizaron vacunos con diferentes cepas de *M. bovis* y los re-expusieron a cepas homólogas y heterólogas. Luego de una primera exposición el 100% de los animales resultó infectado y un 66% desarrolló queratitis, mientras que luego de la segunda y tercera exposición el 55% resultó infectado y sólo un 3,4% desarrolló queratitis. Este 3,4% correspondió a animales que fueron re-expuestos a cepas heterólogas de *M. bovis*. La reducción en la tasa de infección se asoció al desarrollo de inmunidad. A su vez, se observó que animales vacunados intramuscularmente con cepas vivas de *M. bovis* desarrollaron menor tasa de QIB luego del desafío experimental en comparación al grupo control (Hughes & Pugh, 1971). También se ha descrito que las vacunas formuladas con cepas de *M. bovis* inactivadas por formol son efectivas en la prevención de la QIB inducida experimentalmente (Hughes & Pugh, 1972). En condiciones de campo, sin embargo, bacterinas autógenas inactivadas por formol no resultaron protectoras (Hughes *et al.*, 1976). Pugh y Hughes (1975) también evaluaron el efecto de la inmunización de bovinos con células totales, células lisadas y fracciones fimbriales de tres cepas de *M. bovis* y posterior desafío de los animales con cultivos virulentos de *M. bovis*. El suero de los animales no susceptibles tuvo mayor título en anticuerpos contra las fimbrias

homólogas que el suero de animales susceptibles. A su vez, los animales vacunados con lisado celular no fueron resistentes a la QIB y en el suero de esos animales no se detectaron anticuerpos contra fimbrias.

La protección con una bacterina monovalente tiene por lo general una respuesta antigénica muy buena, pero sólo si el serogrupo homólogo de la fimbria que conforma la cepa infectante está contenido en la vacuna (Pugh *et al.*, 1977). Se sugiere que la limitada reactividad cruzada a nivel antigénico entre fimbrias heterólogas y el surgimiento de nuevos tipos de fimbrias puede llevar a la producción de brotes de QIB (Vandergaast & Rosenbusch, 1989).

Por otro lado, Prieto y colaboradores (2003; 2008) han procurado desarrollar métodos para mejorar la expresión de fimbrias de cultivos de *M. bovis* para la producción de vacunas en biorreactores. Ellos encontraron que la adición de carboximetilcelulosa en el medio de cultivo mejoraba la fimbriación sin alterar las propiedades antigénicas de las fimbrias (Prieto *et al.*, 2008).

En lo que respecta a *M. bovoculi* y debido a su reciente descripción son pocos los estudios donde se evaluó la inmunización contra este patógeno. Funk y colaboradores (2009) encontraron que una vacuna autógena (formada por aislamientos de *M. bovoculi* obtenidos de ese mismo animal ese mismo año) no fue efectiva en prevenir la QIB natural. A su vez, un estudio reciente realizado por Gould y colaboradores (2013) evaluó la relación entre *M. bovoculi* y QIB usando un modelo animal en terneros. Estos autores establecieron tres grupos al azar, a uno de estos solo se le realizó escarificación corneal, a otro se le realizó escarificación corneal e inoculación de *M. bovoculi* y al tercero se le realizó escarificación corneal e inoculación de *M. bovis*. El 90% de los

animales inoculados con *M. bovis* desarrollaron úlceras debidas a QIB, mientras que los animales inoculados con *M. bovoculi* no desarrollaron la enfermedad usando este modelo, sugiriendo que este último podría no ser el organismo causal de la QIB. La incapacidad de reproducir la infección por *M. bovoculi* puede estar ocasionada por la dificultad que presenta la reproducción experimental de la enfermedad. Como se mencionó previamente, es imposible llegar a conclusiones exhaustivas dado el bajo número de estudios in vivo realizados con *M. bovoculi*.

La capacidad protectora de cepas de *M. ovis* también fue evaluada, encontrándose que una vacuna formada por cepas de *M. ovis* autógenas no fue capaz de proteger a los animales inmunizados contra la QIB (Funk *et al.*, 2009).

Vacunas basadas en subunidades proteicas

Otra de las opciones de inmunización es el uso de vacunas constituidas por subunidades proteicas. En un ensayo de inmunización donde se evaluó la respuesta a fimbrias de cepas homólogas y heterólogas, se demostró que la virulencia de *M. bovis* podría ser reducida en presencia de anticuerpos contra fimbrias homólogas. No obstante, en un mismo rodeo se han observado diferentes tipos fimbriales infectando los ojos de los bovinos; por esta razón, los anticuerpos protectores tendrían que estar dirigidos contra todos los tipos fimbriales que posee *M. bovis*. Esto tiene que ser tenido en cuenta al momento de formular una vacuna contra QIB basada en subunidades fimbriales.

Fimbrias purificadas también fueron evaluadas por Zbrun y colaboradores (2012), quienes las usaron junto a diferentes adyuvantes para determinar cuál de ellos

brindaba mejor respuesta en anticuerpos IgA locales luego de la administración intranasal de vacunas experimentales. La respuesta fue comparada con la respuesta IgA producida luego de la inoculación con adyuvante placebo y con una infección natural de QIB. Se observó un aumento significativo en la respuesta IgA anti-fimbrias cuando los animales se inmunizaron intranasalmente con fimbrias-QuilA y con fimbrias-Marcol Span, sin embargo, esta respuesta no se asoció con protección contra la QIB ocasionada por *M. bovis* (Zbrun *et al.*, 2012).

Vacunas recombinantes basadas en las fimbrias de tipo IV de *M. bovis* también han sido propuestas y en este sentido fimbrias de *M. bovis* producidas de forma recombinante en *Pseudomonas aeruginosa* han protegido exitosamente a bovinos de un desafío homólogo (Elleman *et al.*, 1990; Lepper *et al.*, 1993).

Por otro lado, otra subunidad bacteriana que ha sido evaluada como posible candidata de vacunas para prevenir la QIB son las hemolisinas de *Moraxella* spp.. Ganado bovino inmunizado con una hemolisina parcialmente purificada de *M. bovis* fue protegido de la QIB luego de un desafío experimental con una cepa heteróloga de *M. bovis* (Billson *et al.*, 1994). George y colaboradores (2005) evaluaron la eficacia de la inmunización con hemolisina de *M. bovis* parcialmente purificada usando como adyuvante Qui1A. Estos autores observaron que la vacunación fue efectiva en reducir los brotes de QIB.

Las limitaciones en la producción a gran escala de la hemolisina parcialmente purificada de *M. bovis* llevaron a investigar la generación de vacunas recombinantes. Angelos y colaboradores (2004, 2007c) evaluaron si el extremo carboxi-terminal de MbxA o el extremo carboxi terminal de MbxA unido a las fimbrias, expresados en

forma recombinante, protegía contra QIB. En estas pruebas, se observó una tendencia a la reducción de la ocurrencia de QIB en los animales vacunados comparados con los animales control. Sin embargo, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas. Posteriormente, Angelos y colaboradores (2010) inmunizaron de forma subcutánea bovinos con una vacuna recombinante formada por subunidades del extremo carboxi-terminal de la citotoxina de *M. bovoculi* (MbvA) junto a adyuvante ISCOM y evaluaron su capacidad de prevenir naturalmente la QIB. En los animales vacunados con MbvA se observó un aumento significativo de anticuerpos en suero, respecto a los animales que recibieron sólo adyuvante (control), aunque no se observaron diferencias significativas en la proporción de animales que desarrollaron úlceras de córnea.

H IPÓTESIS

M. bovis y *M. bovoculi* son los principales agentes etiológicos de QIB y se sabe que existen diferentes cepas de estos patógenos circulando simultáneamente a nivel mundial. Estas dos especies presentan diferencias genéticas y fenotípicas aunque algunos de los factores de virulencia están conservados y podrían usarse para el desarrollo de vacunas contra la QIB. El avance en el conocimiento de las características de estos patógenos involucrados en la QIB en nuestro país permitirá contribuir al desarrollo de estrategias efectivas para el control de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo del presente trabajo consistió en realizar un estudio microbiológico de la QIB a nivel nacional con el fin de identificar y caracterizar las cepas asociadas a brotes clínicos que se encuentran en circulación.

Objetivos específicos

- Identificar fenotípica y genotípicamente aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos de brotes de QIB en Uruguay y estudiar la relación filogenética entre los mismos.
- Caracterizar fenotípicamente una colección de aislamientos nativos de *Moraxella* spp. por medio de sensibilidad a antibióticos, capacidad de formar *biofilms* sobre superficies abióticas, hemaglutinación, autoaglutinación y análisis del patrón de proteínas de membrana externa.
- Caracterizar genotípicamente una colección de aislamientos nativos de *Moraxella* spp. mediante el análisis de la variación global del genoma empleando RAPD-PCR, REP-PCR y PFGE, así como la variación de genes codificantes de factores de virulencia.
- Analizar la microbiota bacteriana ocular asociada a los brotes de QIB.

MATERIALES Y **MÉTODOS**

Colección de aislamientos

Se analizó una colección de aislamientos bacterianos perteneciente al Departamento de Microbiología del IIBCE compuesta de 67 aislamientos clínicos de QIB colectados en diferentes departamentos de Uruguay (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Flores, Florida, Maldonado, Mercedes, Paysandú, Rocha, San José, Salto, Tacuarembó, Treinta y Tres) y tomadas en distintos años (de 1983 a 2009). Cada aislamiento pertenece a un bovino. Se incluyeron 8 aislamientos obtenidos de un brote de QIB en el estado de Kansas, Estados Unidos, gentilmente cedidas por el Dr. Brad Fenwick (Kansas State University) (Tabla 1). A su vez, la colección de aislamientos estuvo formada por tres cepas de referencia (ATCC), Epp63 de *M. bovis*, BAA1259 de *M. bovoculi* y 33078 de *M. ovís*.

Los aislamientos generados durante la realización de esta tesis se obtuvieron por medio de la introducción de un hisopo estéril en el saco conjuntival de bovinos con sintomatología de QIB; estas manipulaciones fueron realizadas por personal especializado en cada uno de los establecimientos que remitieron muestras al Laboratorio. En el lugar de muestreo el hisopo se descargó sobre una placa de agar suplementada con sangre ovina al 5% (AS) y la placa inoculada se remitió de forma refrigerada al Laboratorio donde se procesaron. Una vez en el Laboratorio, las placas inoculadas fueron incubadas durante 24 hs a 37°C. Posteriormente se seleccionaron las presuntas colonias de *Moraxella* spp. como aquellas de color gris-blanquecino, de

hasta 3 mm de diámetro y que exhibieron un halo de β -hemólisis a su alrededor. Por otro lado, se seleccionaron colonias cuyas características macroscópicas no parecían ser de *Moraxella* spp. pero que crecieron al menos tres colonias iguales por placa.

Tabla 1. Colección de aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos de QIB.

Nombre	Origen geográfico	Año
Epp63	Cepa referencia (<i>M. bovis</i> , ATCC), Marrs <i>et al.</i> , 1985	
BAA1259	Cepa referencia (<i>M. bovoculi</i> , ATCC), Angelos <i>et al.</i> , 2007a	
33078	Cepa referencia (<i>M. ovis</i> , ATCC), Bryn <i>et al.</i> , 1977	
Fs327	Kansas, EEUU	
Fs328	Kansas, EEUU	
Fs330	Kansas, EEUU	
Fs337	Kansas, EEUU	
Fs343	Kansas, EEUU	
Sp346	Kansas, EEUU	
Fs347	Kansas, EEUU	
Fs467	Kansas, EEUU	
2419	Uruguay, Florida	1983
2358 [Ⓔ]	Uruguay, Salto	1983
2959 [Ⓔ]	Uruguay, Salto	1983
2439-2	Uruguay, San José	1983
3346-1 [Ⓟ]	Uruguay, Soriano	1983
3346-II [Ⓟ]	Uruguay, Soriano	1983
Art	Uruguay, Artigas	2004
SES	Uruguay, Salto	2004
SER ^⓪	Uruguay, Rocha	2005
2693 ^⓪	Uruguay, Rocha	2005
PRO	Uruguay, Canelones	2007
TT3	Uruguay, Treinta y Tres	2007
1965	Uruguay, San José	2008
BM3A [*]	Uruguay, Cerro Largo	2005
BM3B [*]	Uruguay, Cerro Largo	2005
BM5A [*]	Uruguay, Cerro Largo	2005
BM5B [*]	Uruguay, Cerro Largo	2005
BM6 [*]	Uruguay, Cerro Largo	2005
EV083 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006
EV094 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006
EV121 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006
EV228 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006
EV250 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006
EV345 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006
EV366 ^⓪	Uruguay, Maldonado	2006

EV378 ^δ	Uruguay, Maldonado	2006
EV450A ^δ	Uruguay, Maldonado	2006
EV450B ^δ	Uruguay, Maldonado	2006
EV458 ^δ	Uruguay, Maldonado	2006
EV541 ^δ	Uruguay, Maldonado	2006
LC2747 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC190 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC010 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC3718 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC2842 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC2694 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC2852 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC2680 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC008 ^β	Uruguay, Flores	2006
LC009 ^β	Uruguay, Flores	2006
NIN1 ^σ	Uruguay, Tacuarembó	2007
NIN9 ^σ	Uruguay, Tacuarembó	2007
SJ01 ^χ	Uruguay, San José	2007
SJ02 ^χ	Uruguay, San José	2007
SJ03A ^χ	Uruguay, San José	2007
SJ03B ^χ	Uruguay, San José	2007
SJ04 ^χ	Uruguay, San José	2007
SJ07 ^χ	Uruguay, San José	2007
SJ08 ^χ	Uruguay, San José	2007
CANIA ^φ	Uruguay, Canelones	2008
CANIB ^φ	Uruguay, Canelones	2008
CANII ^φ	Uruguay, Canelones	2008
CANIIIA ^φ	Uruguay, Canelones	2008
CANIIIB ^φ	Uruguay, Canelones	2008
CANVIA ^φ	Uruguay, Canelones	2008
CANVIB ^φ	Uruguay, Canelones	2008
1 A1 ^λ	Uruguay, Treinta y Tres	2008
3 A8 ^λ	Uruguay, Treinta y Tres	2008
5120 ^κ	Uruguay, Paysandú	2009
5148 ^κ	Uruguay, Paysandú	2009
771A ^π	Uruguay, Florida	2009
771B ^π	Uruguay, Florida	2009
FVL ^θ	Uruguay, San José	2009
64 ^θ	Uruguay, San José	2009
M1 [⊙]	Uruguay, Rocha	2009
M2 [⊙]	Uruguay, Rocha	2009
M3 [⊙]	Uruguay, Rocha	2009

Los aislamientos obtenidos de un mismo brote de QIB están identificados con igual símbolo. En lila se indican las cepas ATCC para *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis*. En gris se marcan los aislamientos evaluados en el Capítulo IV de esta Tesis. En negrita se marcan los aislamientos obtenidos de brotes de Kansas, EEUU.

Medios y condiciones de cultivo

Los aislamientos puros fueron rutinariamente recuperados en agar base sangre suplementado con sangre ovina al 5% (AS) o infusión cerebro corazón (*Brain Heart Infusion*, BHI) suplementado con sangre ovina e incubados durante 24 hs a 37°C. El suplemento de los medios con sangre permite un mejor crecimiento de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Los aislamientos se conservaron a -20°C en caldo BHI suplementado con glicerol al 12% con el fin de tenerlos disponibles para el trabajo diario de laboratorio, y a -80°C en las mismas condiciones para asegurar su preservación a largo plazo.

Identificación fenotípica de los aislamientos

Identificación morfológica

La identificación morfológica de los aislamientos se realizó de manera macroscópica mediante la observación de las colonias (tamaño, color y forma) a partir de un cultivo puro en AS de 24 hs de incubación a 37°C y mediante el examen microscópico de los frotis con tinción de Gram.

Identificación bioquímica

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas convencionales: movilidad bacteriana, producción de oxidasa y catalasa (enzimas vinculadas con la respiración), producción de ácido o ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa (TSI), desaminación del triptófano y la fenilalanina para formar indol y ácido fenilpirúvico, respectivamente, producción de ureasa, detección de aislamientos fermentadores de lactosa y producción de exoenzimas como gelatinasas, desoxirribonucleasas y hemolisinas.

También se evaluó la actividad β -hemolítica por la aparición de un halo transparente en el medio de cultivo alrededor de las colonias aisladas.

Susceptibilidad antibiótica

La resistencia de *Moraxella* spp. a los diferentes antibióticos se determinó mediante difusión en placa de agar.

A partir de los cultivos frescos se prepararon suspensiones 0,5 McFarland en solución fosfato salino (PBS) y las mismas se inocularon por medio de hisopos de algodón estériles sobre la superficie de placas de agar Mueller-Hinton (MH) suplementado con sangre ovina al 6%. Una vez inoculadas, se colocó sobre la superficie del agar discos de papel de filtro conteniendo oxitetraciclina (T, 30 μ g), sulfisoxazole (G, 300 μ g), nitrofurantoína (FD300, 300 μ g), cloranfenicol (C30, 30 μ g), cloxacilina (CX1, 1 μ g), neomicina (N30, 30 μ g), polimixina B (PB300, 300 μ g), tetraciclina (TE30, 30 μ g), trimetoprim sulfametoxazol (SXT25, 25 μ g), eritromicina (E15, 15 μ g), norfloxacin

(NOR10, 10 µg), cefalotina (CR30, 30 µg) y rifampicina (RA5, 5 µg). Las placas fueron incubadas a 37°C y a las 24 hs se determinó el halo de inhibición alrededor de los discos conteniendo la droga. El ensayo fue hecho por duplicado. Dado que no hay estandarización sobre criterios disponibles para correlacionar zonas de inhibición alrededor de los discos con susceptibilidad o resistencia contra drogas antimicrobianas, los aislamientos de *Moraxella* spp. fueron arbitrariamente considerados resistentes *in vitro* cuando el crecimiento no fue inhibido. Esta técnica fue utilizada con la finalidad de biotipificar la colección de aislamientos.

Las diferencias en el número de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* resistentes a distintos antibióticos fueron evaluadas usando el test de Chi-cuadrado.

Formación del biofilms

La cuantificación indirecta del *biofilms* formado por *Moraxella* spp. sobre superficies abióticas se evaluó empleando el método de tinción con cristal violeta (CV) (O'Toole & Kolter, 1998). Los diferentes aislamientos de *Moraxella* spp. fueron incubados estáticamente en placas de poliestireno de 96 pocillos conteniendo BHI. Para visualizar el *biofilm* formado se removió el medio, se realizaron lavados con agua destilada y las células adheridas se tiñeron con CV al 1% (p/v) por 20 min. Para la cuantificación indirecta del *biofilm* el CV asociado a las células se solubilizó con etanol 95% y se determinó la densidad óptica a 540 nm (DO_{540}). Los ensayos se realizaron por triplicado. La cuantificación del *biofilms* formado por *M. bovis* y *M. bovoculi* fue analizada estadísticamente usando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Hemaglutinación

Con el objetivo de evaluar la capacidad hemaglutinante de los diferentes aislamientos de *Moraxella* spp. se empleó la técnica descrita por Adegbola y colaboradores (1983). A partir de cultivos bacterianos frescos incubados a 37°C en condiciones estáticas en caldo BHI, se preparó una suspensión en PBS (10^9 ufc/ml). La actividad hemaglutinante se determinó al mezclar en una placa de hemaglutinación volúmenes iguales de la suspensión bacteriana y de una suspensión de eritrocitos frescos de ovinos al 3% en PBS. Se consideró un resultado positivo la formación de grumos visibles de eritrocitos luego de la incubación a 37°C con agitación durante aproximadamente 5 min. Como control negativo se empleó PBS en lugar de la suspensión bacteriana. Se consideró que un aislamiento era no hemaglutinante luego de realizar tres ensayos y que todos resultaran negativos.

Autoaglutinación

Para determinar la capacidad de autoagregación de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. se empleó la técnica descrita por Bibiloni y colaboradores (2001). A partir de cultivos frescos se realizaron suspensiones bacterianas en PBS a una $DO_{600}=1$, se agitaron vigorosamente y se midió su DO_{600} a distintos intervalos de tiempo hasta observar saturación. El coeficiente de autoagregación (%C) se calculó empleando la siguiente fórmula: $[1-(DO_t/DO_i)]*100$, donde DO_t es la DO a un tiempo dado y DO_i la DO inicial. Este coeficiente es un índice que determina la capacidad que tienen los aislamientos de adherirse entre sí. Cuanto mayor es la capacidad de adherirse, los aislamientos tendrán una relación DO_t/DO_i tendiendo a 0 y por lo tanto

el coeficiente de autoagregación tenderá al 100%. En cambio en los aislamientos que no se adhieran la relación DO_t/DO_i tenderá a 1 y el coeficiente de autoagregación tenderá al 0%.

Los ensayos se hicieron por triplicado. Los coeficientes de autoaglutinación de *M. bovis* y *M. bovoculi* fueron analizados estadísticamente usando el test de Mann-Whitney. La correlación entre la autoaglutinación y la formación de *biofilms* fue analizada usando el *test* no paramétrico de Spearman.

Identificación de proteínas de membrana externa por espectrometría de masas

Extracción de Proteínas de Membrana Externa (PME)

La extracción de PME se llevó a cabo empleando el procedimiento descrito por Piccini y colaboradores (1998). Se centrifugó un cultivo bacteriano de la cepa Epp63 (cepa de referencia para *M. bovis*) (de 48 hs a 37°C, con agitación) a 10.000 g durante 5 min. El sedimento conteniendo las células se lavó con solución tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y se resuspendió en la misma solución. Esta suspensión bacteriana fue sometida a ultrasonido (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer Instrument Co) en hielo en forma intermitente hasta que se observó lisis celular. Posteriormente, la suspensión se centrifugó durante 10 min a 10.000 g y el sobrenadante obtenido conteniendo las PME se centrifugó a 13.000 g (45 min, 4°C). El sedimento logrado se resuspendió en 0,5 ml de solución tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; MgCl₂ 10 mM; Tritón 2%) y se incubó por 60 min a 37°C para solubilizar los lípidos de membrana. Por último, la muestra se centrifugó durante 45 min a 13.000 rpm y 4°C. El sedimento obtenido (rico en PME) se resuspendió en volúmenes iguales de solución tampón (Tris-HCl 100

mM; SDS 2%; pH 8.0) y solución de muestra de doble concentración. La extracción de PME fue corroborada en un SDS-PAGE.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS)

Esta técnica fue realizada de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook y colaboradores (1989).

Para la preparación de los geles se usó una relación de acrilamida/bisacrilamida de 29:1 respectivamente. El gel concentrador se preparó a una concentración final de acrilamida del 5%, mientras que el gel separador se preparó a una concentración final de acrilamida del 10%. La corrida electroforética se realizó en una cuba electroforética Mini Protean II de Bio-Rad a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador y luego se continuó a 140 V. La solución buffer utilizada en la electroforesis fue Tris-Glicina (Tris 0.3%; Glicina 1.9%; SDS 1%).

Las bandas proteicas se visualizaron por tinción de los geles con Azul brillante de Coomassie (0,25 gr de Azul brillante de Coomassie en 90 ml de etanol absoluto al 50% en agua destilada y 10 ml de ácido acético glacial) y posterior decoloración de los mismos con solución decolorante (etanol 25%, AcOH 8%).

Cuantificación proteica

La cuantificación de PME se realizó empleando el ensayo de Bradford que se basa en la unión del colorante Coomassie Blue a las proteínas (Bradford, 1976). Esta unión provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Este método es sensible, rápido, barato y con pocas interferencias. Para la cuantificación de

las PME se construyó una curva de calibración empleando como estándar albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones. Tanto a las muestras de la curva de calibración así como a las muestras de PME se les añadió el reactivo de Bradford, los mismos se agitaron y se leyó la absorbancia a 595nm.

Gel en 2-D

La separación de las proteínas mediante electroforesis en geles 2-D se realizó en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo.

En una primera etapa, las PME se purificaron usando el *kit* comercial *2D-Clean Up Kit* (GE Healthcare). Posteriormente la muestra se resuspendió en buffer de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%, IPG Buffer 3-10 0,5%, azul de bromofenol 0,002%) y DTT (17 mM). Las proteínas contenidas en 20 µg del extracto de PME se separaron en primera dimensión por punto isoeléctrico en geles de poliacrilamida con gradiente de pH de 3-10 por rehidratación pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente en un equipo *Protean IEF cell*. El programa de IEF fue de 300 V constante durante 60 min, 1000 V en gradiente durante 30 min, seguido de 5000 V en gradiente durante 80 min y finalmente 5000 V constante hasta 2 kWh. Los parámetros alcanzados fueron de 5000 V, 21 µA en un tiempo de 2 h con 53 min y a 6476 Vhs

La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE al 12,5 % a 10 mA/gel durante 15 min y posteriormente a 20 mA/gel, hasta que el frente de corrida alcanza el borde del gel. Se empleó un marcador de peso molecular *Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis*.

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Luego de la separación mediante electroforesis en geles 2-D, las PME se identificaron en base a espectrometría de masas en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo.

Una vez obtenido el gel en 2 dimensiones, se identificaron las proteínas de interés y se extrajeron del gel donde fueron separadas. El siguiente paso consistió en la digestión de las proteínas mediante una proteasa específica (tripsina) que genera un conjunto de péptidos que se analizó por espectrometría de masas.

Búsqueda en bases de datos.

La identificación de las proteínas se realizó con los péptidos resultantes de la digestión. Los datos obtenidos se analizaron en la base de datos del NCBIInr, mediante el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, USA, <http://www.matrixscience.com/>).

Identificación molecular de los aislamientos

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se prepararon suspensiones bacterianas en agua milliQ a partir de cultivos puros en medio sólido de los diferentes aislamientos y se

realizó la extracción utilizando un kit comercial (EZ-DNA *Simple Genomic DNA Isolation Reagent*, Biological Industries) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de PCR fue usada para la amplificación del gen ADNr 16S, la amplificación del ITS (espaciador intergénico)/parte del gen ADNr 16S/parte del gen que codifica para el ADNr 23S, la amplificación de regiones del genoma bacteriano por técnicas de ADN-*fingerprinting* así como para amplificar genes de virulencia de *Moraxella* spp. en la colección de aislamientos. Los cebadores utilizados para la amplificación de los diferentes genes en estudio así como las condiciones en las cuales se llevaron a cabo las diferentes reacciones de PCR se presentan en la Tabla 2. El diseño de los cebadores se realizó empleando la herramienta bioinformática *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Todos los cebadores fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT, USA) (<http://www.idtdna.com>).

La amplificación mediante PCR se realizó en un termociclador T1 (Biometra). Como sustrato se utilizó ADN genómico obtenido de un cultivo bacteriano puro y controles negativos conteniendo agua en lugar de ADN molde fueron realizados en paralelo a cada corrida. En todos los casos, el producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% empleando solución tampón de corrida TBE (10,8 g/l de Tris; 5,5 g/l de ácido bórico; 0,4% de EDTA 0,5 M, pH 8). La corrida electroforética se realizó a 110 V durante 40 minutos para verificar la amplificación de los genes. En paralelo a la muestra a analizar se corrió un marcador de peso molecular 1 Kb

(Fermentas) con el objetivo de conocer el tamaño de los amplicones obtenidos. Una vez finalizada la corrida, el gel se incubó durante 15 min en bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se analizó en un transiluminador de luz UV.

En el caso de la amplificación de los genes ribosomales, la purificación y secuenciación de la banda correspondiente al fragmento amplificado fue realizada por MACROGEN Inc. (Corea del Sur).

Tabla 2. Secuencia de cebadores y condiciones de PCR

Gen amplificado	Cebador		Referencia	Tamaño amplicón	Mezcla de reacción	Condiciones de reacción
	Nombre	Secuencia (5'-3')				
ADNr 16S	27f	agagtttgatc(a/c)tggtcag	Kane <i>et al.</i> , 1993	1500 pb		95°C 3', 30 ciclos de 95°C 30'', 50°C 30'', 72°C 90'' y un ciclo final de 72°C 10'
	1492r	acgg(c/t)tacctgttacgactt				
ADNr 16S-ITS-23S	MorNeissDn5	gctgcatggctgctgcagct	Angelos <i>et al.</i> , 2007a	2500 pb		95°C 3', 30 ciclos de 95°C 1', 60°C 45'', 72°C 1' y un ciclo final de 72°C 10'
	MorRRL1R	gctttcctggaagcagggtatt				
<i>mbxA</i>	P-hem start	athgaytggathgcnccnttyggngay	Angelos & Ball (2007b)	3703 pb		95 °C 1', 30 ciclos de 95 °C 1', 56 °C 30'', 72 °C 2' y extensión final a 72°C durante 5'
	New B gene up	accttatccatcacacactgaaaaaac				
<i>fur</i>	Mbfur_fwd	gttttggtatttagatgg	Este trabajo	336 pb	2 µl de ADN, solución tampón 1X, 0,6 µM de cada cebador, MgCl ₂ 3 mM, dNTP's 2 nM, 0.1 U Taq polimerasa (INVITROGEN)	94 °C 3', 30 ciclos de 94 °C 1', 40 °C 1' y 72°C 1' y una extensión final a 72°C 5'.
	Mbfur_rev	agtccttatacacgctct				
<i>toIC</i>	MbToIC_fwd	ctgcacagcaacattctattg	Este trabajo	886 pb		
	MbToIC_rev	ttagcgattcacgcatc				
<i>omp79</i>	Mbomp79_fwd	gatttgctaaaacacactga	Este trabajo	1138 pb		
	Mbomp79_rev	tggttcttctgcttttg				
<i>plb</i>	Mbplb_fwd	cgcaaatcaccgaccattt	Este trabajo	1490 pb		
	Mbplb_rev	aaacatcaagcgaaccccaa				
ERIC-PCR	ERIC-1R	atgtaagctcctggggattcac	Versalovic <i>et al.</i> , 1994			94°C 5', 40 ciclos de 94°C 1', 40°C 2', 72°C 8' y un ciclo final a 65°C 16'
	ERIC-2	aagtagtgactgggggtgagcg				
BOX-PCR	BOXA1R	ctaccgcaagggcagcgtgac	Dombek <i>et al.</i> , 2000	Bandas de diferentes tamaños		
RAPD-PCR	JWP1	gactgaagtgaccaagcgg	Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 1996			94°C 3', 34 ciclos de 94°C 1', 36°C 1', 72°C 2' y un ciclo final a 72°C 7'.
	JWOPA7	gaaacgggtg				

fur: gen involucrado en la regulación de la captación de hierro, *mbxA*: gen que codifica una hemolisina, *toIC*: PME involucrada en la secreción de proteínas, *omp79*: corresponde a una proteína de membrana externa de 79 kDa involucrada en la captación de hierro, *plb*: corresponde a una lipasa/fosfolipasa.

Electroforesis en campo pulsado

Para la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) fue necesario adecuar algunas variables tomando como punto de partida el protocolo propuesto por el CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>).

La realización de esta técnica se llevó a cabo en el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.

Preparación del ADN bacteriano

A partir de un cultivo fresco de los diferentes aislamientos de *Moraxella* spp. se prepararon suspensiones bacterianas en buffer de suspensión celular (Tris 100 mM pH 8; EDTA 100 mM, pH 8). En este paso se emplearon tres concentraciones bacterianas diferentes con la finalidad de poner a punto la técnica.

La suspensión celular se calentó a 37°C, se mezcló con un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión (*Agarosa Seakem Gold*) al 1% junto a proteinasa K (20 mg/ml) y se distribuyó en moldes para la formación de bloques o moldes. Los insertos de agarosa se incubaron en buffer de lisis conteniendo Proteinasa K a 50-55°C durante toda la noche.

Lisis bacteriana

Los bloques de agarosa fueron lisados en buffer (50mM Tris-EDTA pH 8 y 1% de lauril-sarcosina) y 25 µl de Proteinasa K (20mg/ml) en un baño de agua a 55°C toda la noche con agitación suave. Los lavados de los bloques de DNA se realizaron cuatro veces con buffer TE 1X (Tris-HCl EDTA), durante 15 min; cada lavado fue realizado a 50°C con agitación.

Digestión con enzimas de restricción

Para generar los patrones de fragmentos de restricción se emplearon las enzimas *Xba*I y *Sma*I, de dos orígenes diferentes (NewEngland y PROMEGA) para evaluar con cuál de ellas se obtenían mejores resultados. La restricción se llevó a cabo a 25°C durante 18 hs.

Electroforesis por campo pulsado

El gel para la electroforesis por campo pulsado fue preparado con agarosa *Seakem Gold* al 1% en buffer TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA). Las condiciones de corrida fueron de un ángulo de 120°, a 14°C, un tiempo inicial de pulso de 5 seg y un tiempo final de pulso de 20 seg con un voltaje de 6V. Para la puesta a punto de la técnica se evaluó un tiempo total de corrida de 18 y 20 horas. La corrida electroforética se realizó en una unidad CHEF DR III (Bio Rad).

Luego de la corrida el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se destiñó durante 1 h en agua

destilada. Finalmente se observó el gel en un transiluminador con lámpara UV y se fotografió usando una cámara equipada con el filtro adecuado. Posteriormente se realizó el análisis visual de los perfiles electroforéticos.

Análisis de los resultados

El análisis estadístico se realizó empleando el programa estadístico PAST, versión 2.17c (Ryan *et al.*, 1995).

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, las mismas se editaron y alinearon en el programa *DNA Baser* y las secuencias obtenidas se compararon con las publicadas en la base de datos del NCBI por medio de la herramienta informática BLASTn para determinar la identidad de las mismas. El BLAST es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. Este programa es capaz de comparar la secuencia en estudio contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en la base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema.

Para el análisis filogenético de las secuencias se empleó el programa bioinformático MEGA (Kumar *et al.*, 2001), el cual construye árboles filogenéticos a partir de los alineamientos usando métodos basados en caracteres (consideran cada sitio como un carácter e intentan relacionarlos) y métodos basados en distancias (establecen relaciones entre las secuencias transformadas en distancia). Mediante estos análisis fue posible establecer la relación filogenética entre los distintos aislamientos de la colección.

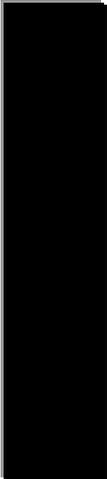
Con el objetivo de realizar el análisis de *cluster* se construyó una matriz de 0 (ausencia de banda) – 1 (presencia de banda) y la misma se analizó usando el algoritmo UPGMA. El algoritmo UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) es un método de agrupación jerárquica que asume una tasa constante de la evolución y construye un dendograma que refleja la estructura actual en una matriz de similitud. Como medida de similitud se empleó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (Rho)

Los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de Máxima Verosimilitud (del inglés *Maximum Likelihood*) y el modelo Kimura 2-parámetros. El modelo de Kimura 2-parámetros asume que las mutaciones (sustitución de nucleótidos) ocurren aleatoriamente e incluye dos parámetros, uno para transiciones y otro para tranversiones (Kimura, 1980).

Para el análisis de los resultados obtenidos de la diversidad fenotípica y genotípica se construyó una matriz con los resultados de formación de *biofilms* (se le asignó 1 cuando el aislamiento formaba *biofilms* y 0 cuando el aislamiento no formó *biofilms*), capacidad de autoagregación (dado que todos los aislamientos autoaglutinaron se les dio a todos un valor de 1), hemaglutinación (se le asignó un valor de 1 cuando el aislamiento era hemaglutinante y de 0 cuando el aislamiento no poseía esta capacidad), resistencia a los diferentes antibióticos (se le asignó un valor de 0 cuando el aislamiento fue sensible y de 1 cuando el aislamiento fue resistente) y presencia/ausencia de los diferentes genes de virulencia (se le asignó un valor de 1 cuando el aislamiento presentaba el gen y de 0 cuando no se amplificó el gen en el

aislamiento en estudio). Esta planilla fue analizada usando el programa PAST (Ryan *et al.*, 1995).

CAPÍTULO I



DENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA
DE AISLAMIENTOS DE *MORAXELLA* SPP.
OBTENIDOS A PARTIR DE BROTES DE QIB EN
URUGUAY

1. Antecedentes

Los métodos de identificación fenotípica se basan en la obtención de cultivos puros y la realización de distintas pruebas dependientes del crecimiento, ya sea de índole morfológicas, bioquímicas y/o fisiológicas. Estos métodos en general son laboriosos y consumen mucho tiempo, aunque hasta hace pocos años eran los únicos utilizados para un diagnóstico fiable.

La mayor parte de las cepas de *M. bovis* luego de 24 hs de incubación a 37°C en agar sangre forman colonias circulares de 1 a 3 mm de diámetro y con un halo de β -hemólisis a su alrededor de aproximadamente 0,5 a 1,0 mm. Estas colonias son firmes pero tienden a fragmentarse cuando se mueven a través de la superficie del medio. Suspensiones de colonias de *M. bovis* autoaglutinan en solución salina, excepto cuando están en presencia de $MgCl_2$ al 10% (Hughes, 1981). Luego de la incubación a 25°C las colonias incrementan su diámetro de 3 a 4 mm, tienen apariencia más plana y la zona de hemólisis ocupa 1-1,5 mm alrededor de ellas (Hughes, 1981). La remoción de las colonias de *M. bovis* de la superficie de agar sangre permite la visualización de una impresión negativa de la colonia removida, presentando una pequeña excavación en el agar.

Las colonias de *M. bovis* pueden tener una morfología lisa o rugosa. El margen de las colonias rugosas se erosiona y ocurren depresiones en diversos grados, pudiéndose involucrar una pequeña porción o todo el borde (Hughes, 1981). Para algunos autores

las colonias lisas de *M. bovis* pertenecen a las cepas patogénicas, mientras que las colonias rugosas son no patógenas.

Las colonias de *M. bovoculi* tienen de 0,7-1,3 mm de diámetro, son blancas, circulares y convexas. Todas las cepas crecen a 25 y 35°C en medio conteniendo sangre ovina al 5% y muchas de ellas crecen a 42°C (Angelos *et al.*, 2007a). La mayoría de las cepas son β -hemolíticas, mientras que se han descrito muy pocas que expresen α -hemolisinas (Angelos *et al.*, 2007a).

Con respecto a *M. ovis*, se ha descrito que las condiciones óptimas de temperatura para su crecimiento es a 37°C en condiciones aeróbicas. El crecimiento bacteriano se observa luego de 24 hs de incubación por la observación de turbidez en caldo o por la aparición de colonias en agar. Las colonias son circulares, con una elevación convexa, un margen entero, una superficie suave y un halo de β -hemólisis a su alrededor (Angelos *et al.*, 2007a).

En la Tabla I.1 se presenta un resumen de las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas esperadas para las diferentes especies de *Moraxella* spp. involucradas en brotes de QIB (Angelos *et al.*, 2007a; Angelos & Ball, 2007a).

Tabla I.1. Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis*

Características	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovoculi</i>	<i>M. ovis</i>
Morfología	C, B	C, DC	C
Tinción de Gram	-	-	-
Respiración	aerobia	aerobia	aerobia
Movilidad	-	-	-
Actividad catalasa	(+)	+	+
Actividad oxidasa	+	+	+
Crecimiento MacConkey	-	-	-
Producción de ácido a partir de glucosa	-	-	-
Crecimiento sobre medio mínimo conteniendo acetato y amonio	-	-	-
Hemólisis	+	(+)	(+)
Reducción del nitrato	(-)	(+)	-
Licuefacción de la gelatina	+	-	-
Actividad ADNasa	+	-	-
Proteólisis sobre medio Löffler	+	-	(+/-)
Indol	-	-	-
Actividad fenilalanina desaminasa	-	(+)	-
Hidrólisis del Tween 80	+	(+)	-
Actividad fosfatasa alcalina	-	(-)	+
Actividad esterasa C4 y C8	+	+	+
Actividad fosfatasa ácida	w	-	-

Abreviaciones: C coco, DC diplococo, B bacilo, - reacción negativa, + reacción positiva, w: reacción débil, (+) la mayoría de las cepas positivas, (-) la mayoría de las cepas negativas, (+/-) 50% de las cepas positivas (Angelos *et al.*, 2007a; Angelos & Ball, 2007a; Fraser & Gilmour, 1979).

Los inconvenientes que presentan los métodos tradicionales de identificación han estimulado el desarrollo de estrategias alternativas. La aplicación de herramientas moleculares ofrece un gran potencial para la identificación de los microorganismos. Diversos autores publicaron a finales de la década de los 80 las primeras aproximaciones hacia la evolución y ecología de los microorganismos utilizando técnicas moleculares (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). La propuesta más ampliamente utilizada para la identificación bacteriana se

basa en el análisis del gen ADNr 16S, gen que ha sido utilizado como un cronómetro evolutivo. El gen ADNr 16S codifica para la molécula ARNr 16S la cual es parte de la subunidad menor de los ribosomas junto con unas 20 proteínas. Una característica por la que ha sido posible definir relaciones filogenéticas entre organismos tan distantes con este gen es que tiene tasas de cambio muy distintas a lo largo de su secuencia (Woese, 1987).

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos de las diferentes bacterias en estudio y establecidas las comparaciones correspondientes, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S lo que indique su relación evolutiva. El análisis comparativo de secuencias es lo que permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los ADNr 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. En este sentido, Stackebrandt y Goebel (1994) demostraron que cepas con una similitud del 70% o más en experimento de reasociación ADN-ADN, presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes ARNr 16S. Así, cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus ADNr 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por lo tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel de ADNr 16S. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación (Stackebrandt *et al.*, 2002).

2. Objetivo

El objetivo de este capítulo fue identificar aislamientos de *Moraxella* spp. vinculados a la etiología de la QIB en Uruguay así como establecer relaciones filogenéticas entre ellos.

3. Resultados

Caracterización fenotípica de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp.

Caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica

La caracterización macroscópica de las colonias correspondientes al género *Moraxella* reveló que todos los aislamientos presentaron un aspecto similar cuando crecieron en AS. Todos los aislamientos formaron colonias circulares, grisáceas-blancuzcas, lisas o rugosas, de aproximadamente 0,8-3 mm y de consistencia friable.

Por otra parte, la caracterización microscópica de los diferentes aislamientos indicó que los mismos pertenecieron al grupo de bacterias Gram negativas, su morfología varió de cocos a cocobacilos y bacilos y usualmente se encontraron dispuestos de a pares o en cortas cadenas.

Por último, la caracterización bioquímica (Tabla I.2) indicó que ninguno de los aislamientos era móvil ni produjo ácido y/o gas, desaminó el triptófano o la fenilalanina, fermentó la lactosa y tampoco hidrolizó la urea.

Tabla I.2. Caracterización bioquímica de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos a partir de brotes de QIB

Aislamiento	Ureasa	Movilidad	Catalasa	Oxidasa	Hemólisis	Indol	DNAsa	FD	Gelatinasa	McC	Fermentación		
											Pico	Fondo	Gas
Epp63	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
BAA1259	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
33078	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
Fs 327	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Fs 328	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Fs 330	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Fs 343	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Sp 346	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Fs 347	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Fs 467	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
2419	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
2358	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
2439-2	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
Art	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
SES	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
PRO	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
TT3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
2693	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
1965	ND	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
64	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
3346-II	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
BM3A*	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
BM3B*	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
EV121 ^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV250 ^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV345 ^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV366 ^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV378 ^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-

EV450A^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV450B^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV458^δ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
LC2747^β	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
LC190^β	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
LC010^β	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
NIN1^σ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
NIN9^σ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
SJ01^χ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
SJ02^χ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
SJ03A^χ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
SJ03B^χ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
SJ07^χ	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
SJ08^χ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
CANIA^φ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
CANII^φ	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
CANIIIA^φ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
CANIIIB^φ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
1 A1^λ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
3 A8^λ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
5120^κ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
5148^κ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
771A^π	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
771B^π	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Alc	Alc	-
M1[⊙]	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
M2[⊙]	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
M3[⊙]	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-

Abreviaciones: FD: expresión de fenilalanina desaminasa; McC: crecimiento en agar MacConkey; Alc: alcalino; + reacción positiva; - reacción negativa.

Los aislamientos obtenidos de un mismo brote de QIB están identificados con igual símbolo.

Contrariamente, se observó que todos los aislamientos resultaron positivos para la producción de oxidasa. Todas estas características eran esperadas para *M. bovis*. En lo que se refiere a la catalasa se observó que la expresión de esta enzima fue variable al igual que la producción de gelatinasa en cuyo caso se observó que nueve de los aislamientos resultaron incapaces de expresar estas enzimas.

Identificación molecular de la colección de aislamientos de *Moraxella spp.*

La amplificación del gen ADNr 16S fue realizada en todos los aislamientos, exceptuando las cepas ATCC. Para la amplificación del gen ADNr 16S se usaron los cebadores universales 27f y 1492r. La reacción de PCR dio como resultado un amplicón de aproximadamente 1500 pb, de acuerdo al tamaño esperado para este gen (Figura I.1).

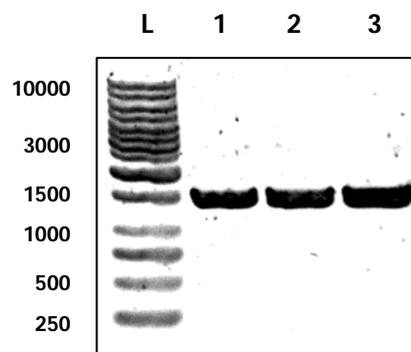


Figura I.1. Productos de la amplificación por PCR del gen ADNr 16S.

L: Marcador de tamaño molecular (Fermentas 1kb). Carril 1-3: amplicones correspondientes a diferentes aislamientos.

Una vez que los fragmentos de ADN correspondientes al ADNr 16S fueron amplificados y purificados, se los secuenció. La secuencia nucleotídica obtenida se la identificó usando el *software* BLAST y buscando en la base de datos del NCBI.

En la Tabla I.3 se presentan los resultados del análisis de similitud de secuencias obtenido para cada aislamiento con sus respectivos valores de "Puntuación", "% de secuencia cubierta" y "% de identidad". El valor de puntuación se calcula a partir de una fórmula que tiene en cuenta la alineación de residuos similares o idénticos, así

como cualquier hueco introducido para alinear las secuencias. El “% de secuencia cubierta” representa el porcentaje de la longitud de la secuencia remitida a la base de datos que ha encontrado homología y el valor de “% de identidad” se trata del porcentaje de identidad que posee la secuencia introducida y la secuencia publicada en la base de datos. La mayoría de las secuencias obtenidas en este estudio fueron publicadas en la base de datos del *GenBank* (columna 2 de la Tabla I.3, N° acceso *GenBank*).

La secuenciación del ADNr 16S determinó que los aislamientos presentaron una alta homología (97-100 %) con secuencias publicadas del ADNr 16S de *M. bovis* y de *M. bovoculi* (25 y 27 aislamientos, respectivamente). Estos resultados revelaron por primera vez la presencia en Uruguay de dos especies del género *Moraxella* spp., *M. bovis* y *M. bovoculi* asociadas a brotes de QIB.

Tabla I.3. Identificación molecular de los aislamientos de *Moraxella* spp. a través de la secuenciación del gen ADNr 16S

Aislamiento	N° acceso <i>GenBank</i>	Homología obtenida a partir del <i>GenBank</i>				
		N° acceso <i>GenBank</i>	Descripción (cepa)	Puntuación	% de secuencia cubierta	% de identidad
CANIIIA	JN001954	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	1705	98%	99%
CANIIIB	JN001941	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2519	100%	98%
EV250	JN001943	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2545	100%	99%
EV450B	JN001949	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2479	98%	98%
Fs327	JN001951	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2501	98%	98%
Fs328	JN001948	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2542	98%	99%
Fs330	JN001945	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2518	98%	99%
Sp346	JN001947	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2531	98%	99%
64	JN001939	AF005183.1	<i>M. bovis</i>	2503	100%	98%
BM3A	JN001940	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2569	98%	99%
EV121	JN001942	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2630	100%	100%

EV345	JN001944	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2604	100%	99%
EV366	JN001956	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	1725	98%	99%
EV450A	JN001950	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2516	97%	99%
LC190	JN001953	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2523	97%	99%
SJ01	JN001955	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2582	98%	99%
SJ02	JN001957	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2588	99%	99%
SJ03B	JN001946	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2549	98%	99%
SJ07	JN001952	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	1533	97%	99%
771A	JN001958	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	1703	99%	99%
5120	JN001937	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2586	100%	100%
5148	JN001938	NR028668.1	<i>M. bovis</i> (L-3)	2573	100%	99%
SJ08	-	-	<i>M. bovis</i>	2519	99%	98%
CANII	-	-	<i>M. bovis</i>	1518	98%	99%
EV378	-	-	<i>M. bovis</i>	1912	98%	99%
NIN9	JN005929	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2492	97%	98%
BM3B*	JN001980	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2534	97%	99%
CANIA	JN001966	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2558	98%	99%
Fs347	JN001968	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2560	98%	99%
Fs343	JN001981	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2538	97%	99%
LC010	JN001984	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2499	98%	99%
LC2747	JN001969	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2560	100%	99%
M1	JN001959	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2562	100%	99%
M2	JN001960	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2566	100%	99%
M3	JN001961	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2569	100%	99%
NIN1	JN001970	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2553	98%	99%
PRO	JN001971	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2527	98%	99%
3346-II*	JN001974	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2510	97%	99%
2419*	JN001972	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2536	97%	99%
Art	JN001982	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2551	98%	99%
2358*	JN001976	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2431	98%	98%
SES*	JN001975	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2473	97%	98%
SJ03A*	JN001977	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2514	98%	99%
TT3*	JN001978	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2499	97%	99%
1A1	JN001962	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2545	98%	99%
3A8	JN001964	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2556	98%	99%
771B*	JN001965	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2577	100%	100%
1965	JN001983	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2492	99%	98%
2439-2	JN001973	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2545	98%	99%
2693*	JN001963	GU181221.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	2566	100%	99%
EV458	JN001967	DQ153085.1	<i>M. bovoculi</i> (371)	2573	99%	100%
Fs467	-	-	<i>M. bovoculi</i>	2435	97%	98%

*: aislamientos negativos para la hidrólisis de gelatina.

Con el objetivo de corroborar estos resultados se amplificó en algunos de los aislamientos que presentaron homología con *M. bovoculi* parte del gen que codifica para la subunidad ADNr 16S, el espaciador intergénico (ITS) y parte del gen que codifica para el ADNr 23S (Figura I.2). Se seleccionaron 7 aislamientos al azar ya que se consideró que este era un número significativo.

De acuerdo a las secuencias publicadas y los cebadores empleados, MorNeissDn5 y MorRRL1R, el tamaño de los amplicones fue de aproximadamente 2500 pb, tal como era esperado.

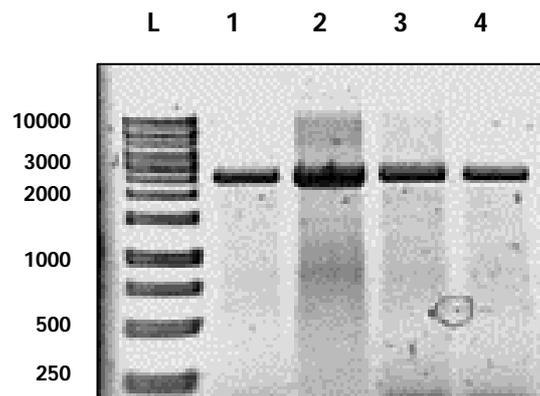


Figura I.2. Productos de la amplificación por PCR de parte del gen que codifica para la subunidad ADNr 16S, el espaciador intergénico (ITS) y parte del gen que codifica para la subunidad ADNr 23S. L: Marcador de tamaño molecular (Fermentas 1kb). Carriles 1-4: amplicones correspondientes a diferentes aislamientos.

Los resultados obtenidos del análisis de similitud de secuencias cuando se determinaron las homología de las secuencias que codifican para este locus (16S-ITS-23S) se muestran en la Tabla I.4.

Tabla I.4. Identificación molecular de algunos aislamientos de *M. bovoculi* resultado de la secuenciación de un segmento del gen ADNr 16S, el ITS y un segmento del gen ADNr 23S

Aislamiento	Nº acceso <i>GenBank</i>	Descripción	Puntuación	% de secuencia cubierta	% de identidad
2419	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1386	100 %	100 %
2358	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1369	99 %	99 %
3346-II	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1380	100 %	99 %
BM3B	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1373	100 %	99 %
SES	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1384	100 %	100 %
SJ03A	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1386	100 %	100 %
TT3	DQ153089.1	<i>M. bovoculi</i> (3709)	1386	100 %	100 %

Los resultados de la comparación nucleotídica de las secuencias obtenidas cuando se amplificó y secuenció un segmento del gen ADNr 16S, el ITS y parte del gen del ADNr 23S, confirmaron la homología de las secuencias de la colección de aislamientos con otras publicadas de *M. bovoculi*.

Relación filogenética de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp.

Con el objetivo de determinar la relación filogenética de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp., las secuencias nucleotídicas del ADNr 16S se comparó empleando la herramienta informática ClustalW. El árbol filogenético obtenido usando el programa bioinformático MEGA se presenta en la Figura I.3.

En la representación gráfica de la relación filogenética de la colección de aislamientos basada en la comparación de las secuencias nucleotídicas se observaron tres ramas principales: una formada exclusivamente por aislamientos que presentaron homología con *M. bovis*, otra integrada por los aislamientos con homología a *M. bovoculi* y en

forma separada se ubica la cepa de referencia de *M. ovis*. También se observa que los aislamientos que integran la rama donde se ubican los aislamientos con homología con *M. bovoculi* presentaron una alta homología de secuencia.

En base a estos resultados, los aislamientos se asignaron a las especies *M. bovis* o *M. bovoculi* según los datos de homología molecular.

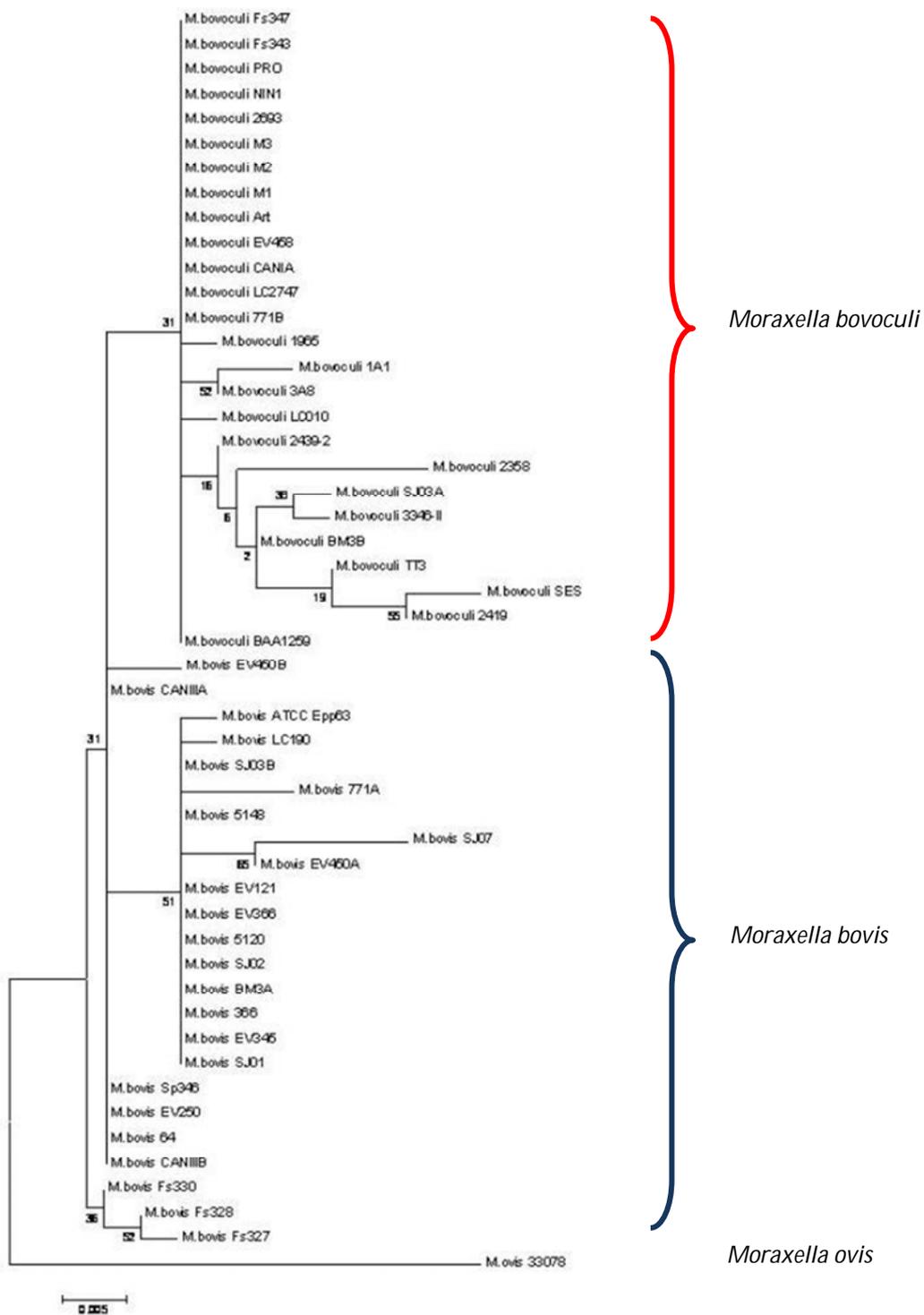


Figura I.3. Filogenia molecular del ADNr 16S analizado por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 1000 réplicas.

4. Discusión

La etiología de la QIB ha sido tradicionalmente asociada con la presencia de *M. bovis*. Sin embargo, recientemente, además de *M. bovis* también se ha descrito a las especies *M. ovis* y *M. bovoculi*, vinculadas con la etiología de la enfermedad. De acuerdo a estas consideraciones, el análisis actualizado de la etiología de la QIB en nuestro país se torna relevante con la finalidad de contribuir con el desarrollo de estrategias de prevención.

En el presente trabajo se identificó fenotípica y genotípicamente una colección de aislamientos de *Moraxella* spp. vinculados a brotes de QIB que fueron recuperados de brotes clínicos ocurridos en distintos años y provenientes de diversos orígenes geográficos de Uruguay.

Todos los aislamientos estudiados presentaron inicialmente las características macroscópicas y microscópicas descritas para *Moraxella* spp.. Además, se realizó una amplia variedad de pruebas bioquímicas con el fin de caracterizar los diferentes aislamientos. Cuando se evaluó en la colección de aislamientos la capacidad de expresar gelatinasas, enzimas descritas en cepas de *M. bovis* pero no en *M. bovoculi* o *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007a), se observó que 9 aislamientos (posteriormente identificados como *M. bovoculi*) no fueron capaces de expresar esta enzima. Además de esta propiedad, de acuerdo a lo descrito por Angelos y colaboradores (2007a), la actividad fenilalanina desaminasa distinguiría a *M. bovoculi* (reacción positiva) de *M.*

ovis o *M. bovis* (reacción negativa) (Angelos *et al.*, 2007a). Sin embargo, los mismos autores posteriormente identificaron cepas de *M. bovoculi* fenilalanina desaminasa negativas (Angelos & Ball, 2007a). En este trabajo, todos los aislamientos fueron fenilalanina desaminasa negativos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las características bioquímicas son variables y no permiten distinguir inequívocamente ambas especies de *Moraxella*. Esta consideración está con concordancia con Angelos y Ball (2007a) que recomiendan la secuenciación de los genes ribosomales para identificar la especie de *Moraxella* responsable de los brotes de QIB.

Con el fin de identificar molecularmente la colección de aislamientos se amplificó el gen ADNr 16S. Luego de secuenciar y comparar las secuencias de nucleótidos de los aislamientos con otras presentes en la base de datos del NCBI, se demostró que 25 aislamientos fueron *M. bovis* mientras que fueron *M. bovoculi*. Las diferencias en el número de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* no fueron significativas, al igual que lo observado recientemente por O' Coonor y colaboradores (2012). Se observó, a su vez, que los nueve aislamientos que no hidrolizaron la gelatina mostraron homología con *M. bovoculi*. A su vez, los aislamientos catalasa negativos correspondieron a aislamientos de *M. bovis*. Esto está de acuerdo a la descripción realizada por Angelos y colaboradores (2007a) para *M. bovis*, que la describen variable en la expresión de catalasa y para *M. bovoculi* que según estos mismos autores hasta el momento sólo se han descrito aislamientos catalasa positivos.

Ninguno de los aislamientos mostró homología con *M. ovis*, una especie descrita como potencial causa de QIB en otras regiones (Elad *et al.*, 1988; Libardoni *et al.*, 2012;

Yeruham *et al.*, 2001). Este resultado coincidió con el observado por O' Connor y colaboradores (2012) cuando identificaron los agentes responsables de la QIB de 77 animales con sintomatología clínica de la enfermedad en el Estado de Iowa (Estados Unidos).

De acuerdo a Angelos y colaboradores (2007a) la amplificación de regiones de los genes que codifican para la subunidad 23S, el espaciador intergénico (ITS) y la subunidad ribosomal 16S (16S-ITS-23S) puede complementar la información para la identificación de *M. bovoculi* y su diferenciación de *M. bovis*. Esta región se emplea usualmente para analizar diferencias filogenéticas entre microorganismos cercanamente emparentados, incluso pertenecientes a la misma especie (Ludwing & Schleifer, 1994). En consecuencia, en el presente trabajo se amplificaron estos genes para confirmar la identidad de los aislamientos de *M. bovoculi* gelatinasa negativos. En todos los casos se observó que los aislamientos presentaron una alta homología nucleotídica con secuencias presentes en bases de datos para esta especie bacteriana recientemente descrita.

Una vez determinadas las secuencias nucleotídicas del gen ADNr 16S bacteriano, las mismas se pueden comparar y evaluar el grado de similitud entre ellas para establecer su relación evolutiva (Cai *et al.*, 2003). Esta es una herramienta ampliamente utilizada en el análisis filogenético de diversas especies bacterianas (Lane *et al.*, 1985; Olsen & Woese, 1993; Stackebrandt, 1988; Woese, 1987). En este trabajo, los estudios filogenéticos realizados en base a la secuencia del ADNr 16S confirmaron los resultados de la identificación molecular y agruparon los aislamientos en dos ramas

claramente diferenciables desde el punto de vista filogenético incluso de la cepa de referencia de *M. ovís* incluida en el análisis.

En base a estos resultados se puede decir que este es el primer estudio etiológico realizado en nuestro país que detecta la presencia de dos especies del género *Moraxella* spp., *M. bovis* y *M. bovoculi*, vinculadas a brotes clínicos de QIB. Hasta el momento, *M. bovoculi* sólo había sido asociado a brotes de QIB en Estados Unidos (Angelos *et al.*, 2007a) y recientemente en Brasil (Libardoni *et al.*, 2012). En este estudio se constató la presencia de *M. bovoculi* en la colección de aislamientos, constituyendo este el primer trabajo que la asocia a brotes de QIB en Uruguay. Estos aislamientos pertenecieron a diferentes departamentos (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Flores, Florida, Maldonado, Rocha, Salto, San José, Soriano, Tacuarembó y Treinta y Tres) y fueron obtenidas en aislamientos obtenidos desde 1983. En consecuencia, a partir de este trabajo se sugiere que esta nueva especie de *Moraxella* haya estado circulando en nuestro país desde hace varios años. Angelos (2010) y Libardoni y colaboradores (2012) también sugirieron que *M. bovoculi* haya estado presente pero probablemente erróneamente identificado desde hace varios años atrás en Estados Unidos y Brasil, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que *M. bovoculi* podría ser una importante causa de QIB en el ganado uruguayo y confirmaron que la secuenciación de los genes ribosomales es necesaria para diferenciar *M. bovis* de *M. bovoculi*. A su vez, en este trabajo no fue posible correlacionar la identificación del aislamiento con el año y el departamento de donde fue obtenido el mismo.

Los resultados presentados en este Capítulo fueron publicados en *The Veterinary Journal* (V. Sosa, P. Zunino. "Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated to infectious bovine keratoconjunctivitis", 193: 595-597; 2012).

Con los resultados presentados en este Capítulo se elaboró el trabajo "Etiología de la Queratoconjuntivitis Infecciosa bovina en Uruguay" de los autores Vanessa Sosa, Cecilia Cortinas, Ana Claudia Pereiro y Pablo Zunino que obtuvo el Premio de la Academia Nacional de Veterinaria, 2009, financiado por la Sociedad Uruguaya de Buiatría, Academia Nacional de Veterinaria.

CAPÍTULO II

C

ARACTERIZACIÓN Y VARIABILIDAD
FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS DE
MORAXELLA SPP. RECUPERADOS
DE BROTES DE QIB

1. Antecedentes

Diversos trabajos coinciden en que *Moraxella* spp. presenta una significativa diversidad intra e interespecífica que lleva a que la protección conferida por el uso de vacunas contra QIB sea variable. En este sentido, Conceição y colaboradores (2003) demostraron la necesidad de contar con un sistema de vigilancia de la diversidad de cepas de *M. bovis* recuperadas de animales rutinariamente vacunados, con la finalidad de formular vacunas con los antígenos prevalentes en una región geográfica determinada. Este hecho ha llevado a varios autores a caracterizar las cepas de *Moraxella* spp. asociadas a la QIB. Varias características fenotípicas asociadas a la biología de *M. bovis* han sido estudiadas, incluyendo análisis de proteínas de membrana externa (PME), lipopolisacáridos (LPS) y fimbrias, así como también se han realizado análisis de susceptibilidad a antibióticos (Atwell *et al.*, 1984; Gil Turnes & Albuquerque, 1984; Prieto *et al.*, 1999). La mayoría de estos trabajos se han realizado solamente con aislamientos de *M. bovis* obtenidos de brotes de QIB. Hasta el momento y debido a su reciente identificación, son muy pocos los estudios sobre la diversidad fenotípica de *M. bovoculi*, en la región y en el mundo. Los únicos trabajos donde se evalúan cepas de *M. bovoculi* son aquellos donde se determina susceptibilidad/resistencia a diversos antibióticos (Angelos *et al.*, 2011).

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen

menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Gil Turnes & Araújo, 1982; Lepper & Hermans, 1986; Moore & Rutter, 1987).

Susceptibilidad a antibióticos

El antibiograma es una forma práctica y sencilla de expresar la resistencia de una cepa ante un panel escogido de antibióticos y permite diferenciar varias cepas de una especie, de una manera fácil y sencilla. La resistencia bacteriana no solo es el reflejo fenotípico de la adquisición de genes que expresan mecanismos de resistencia de las bacterias sino que también puede darse por mutaciones específicas del microorganismo.

La susceptibilidad *in vitro* de 84 aislamientos de *M. bovis* obtenidos de diferentes zonas de Estados Unidos fue evaluada contra diversos antibióticos usando el método de difusión en agar. Se encontró que todos los aislamientos fueron resistentes a la cloxacilina y un 68% lo fueron a la estreptomina (Webber *et al.*, 1982). Esta colección de aislamientos fue sensible al resto de los antibióticos evaluados que incluyó ampicilina, bacitracina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, neomicina, nitrofurazone, oxitetraciclina, penicilina, polimixina B, sulfa triple y tilosina. En lo que refiere a trabajos regionales, Conceição y colaboradores (2004) evaluaron por el método de Kirby-Bauer y por la determinación de la concentración inhibitoria mínima, la susceptibilidad a la estreptomina, neomicina, tetraciclina, kanamicina,

eritromicina y nitrofurantoína de treinta cepas de *M. bovis* recuperadas de brotes de QIB en Argentina, Brasil y Uruguay entre 1974 y 2001. Ellos encontraron que la mayoría de las cepas fueron susceptibles a los antibióticos usados rutinariamente en el tratamiento de la QIB y que la susceptibilidad a los antibióticos varió con el departamento y el momento de recuperar la cepa.

Hasta el momento sólo hay un estudio en el cual se evaluó la susceptibilidad a distintos antibióticos (ampicilina, ceftiofur, clortetraciclina, clindamicina, danofloxacina, enrofloxacina, florfenicol, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, penicilina, espectinomicina, sulfadimetoxina, tiamulin, tilmicosina, trimetropim-sulfametoxazole, tulatromicina y tilosina) de 57 cepas de *M. bovoculi* aisladas de brotes de QIB ocurridos entre el 2002 y el 2007 en California, Estados Unidos (Angelos *et al.*, 2011). En ese trabajo, se encontró una baja concentración inhibitoria mínima para todos los antibióticos evaluados y se sugirió que los antibióticos comúnmente usados contra *M. bovis* podrían ser también efectivos para tratar las infecciones causadas por *M. bovoculi*.

Diversidad antigénica

Gil Turnes y Araujo en 1982 caracterizaron serológicamente las fimbrias de *M. bovis* utilizando un test de doble inmunodifusión y a partir de este trabajo sugirieron agrupar las cepas de *M. bovis* en seis serogrupos diferentes (A, B, C, D, E, F) en base a la composición antigénica. Se encontraron diferencias entre los aislamientos de diferentes localizaciones geográficas y que algunas cepas eran antigénicamente más complejas que otras. Lepper y Hermans (1986) también propusieron agrupar los

aislamientos de *M. bovis* en seis serogrupos luego de evaluar por ELISA aislamientos de *M. bovis* obtenidos de brotes clínicos de QIB en Australia. En 1987, Moore y Rutter extrajeron proteínas fimbriales y establecieron la relación antigénica de las fimbrias de una colección de aislamientos de *M. bovis* aisladas de Reino Unido. A partir de 38 cepas, estos autores establecieron siete serogrupos fimbriales diferentes a través de seroaglutinación.

Moore y Lepper en 1991 procuraron llegar a un sistema de caracterización unificado dado que había discrepancia entre los diferentes agrupamientos antigénicos, parte de las cuales se debían a las variadas técnicas usadas para acordar la caracterización. A partir de este estudio se logró agrupar a los aislamientos de *M. bovis* en siete serogrupos diferentes. Pese a este sistema de agrupamiento en base a las características antigénicas, diversos investigadores han encontrado reactividad cruzada entre cepas pertenecientes a diferentes serogrupos fimbriales (Conceição *et al.*, 2003; Gil Turnes & Aleixo, 1991; McConnel *et al.*, 2008; Moore & Rutter, 1987; Vandergaast & Rosenbusch, 1989).

En los trabajos anteriormente expuestos y en otros también realizados sobre este tópico, se ha demostrado que las fimbrias difieren antigénicamente tanto entre aislamientos recuperados de diferentes lugares así como de diferentes animales de un mismo lugar geográfico (Gil Turnes & Albuquerque, 1984; Gil Turnes & Araújo, 1982; Lepper & Hermans, 1986; Moore & Rutter, 1987). Algunos estudios también encontraron que aislamientos recuperados del mismo animal en diferentes momentos o de diferentes animales en un mismo momento no siempre pertenecieron al mismo serogrupo (Gil Turnes & Albuquerque, 1984). Son pocos los estudios que encuentran

baja variabilidad antigénica asociada a las fimbrias de *M. bovis*. En este sentido, un trabajo realizado en Australia donde se determinó la variabilidad antigénica de *M. bovis* concluyó que los antígenos fimbriales de cepas aisladas de brotes de QIB en ese país han permanecido relativamente estables durante los últimos 20 años (McConnel *et al.*, 2008).

En lo que respecta a diversidad de otros antígenos de *M. bovis*, en 1999 Prieto y colaboradores analizaron una colección de 57 aislamientos clínicos de *M. bovis* obtenidos de brotes de QIB en Argentina y tres cepas de referencia e identificaron tres perfiles de LPS y tres perfiles de PME, reflejando una baja heterogeneidad de los antígenos de superficie evaluados. Este resultado es contradictorio al obtenido cuando se analizó el patrón de PME de diez aislamientos británicos de *M. bovis* (Horsnell & Teale, 1987). En este caso los patrones proteicos de los diferentes aislamientos fueron similares pero no idénticos y sólo se encontraron tres proteínas en común para todos los aislamientos. Estas diferencias entre ambos trabajos pueden deberse a diferencias locales o temporales de las cepas.

2. Objetivos

Caracterizar fenotípicamente una colección de aislamientos nativos de *Moraxella* spp. por medio de ensayos de sensibilidad a antibióticos, capacidad de formar *biofilms* sobre superficies abióticas, ensayos de hemaglutinación y autoagregación y análisis del perfil de PME de una cepa de *M. bovis*.

3. Resultados

Evaluación de la sensibilidad a antibióticos de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp.

La sensibilidad de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. a diferentes antibióticos se determinó siguiendo el método de difusión en placa de agar MH suplementado con sangre ovina al 5%, tal como se describe en materiales y métodos (Tabla II.1). Un aislamiento fue considerado resistente cuando no se observó inhibición alguno del crecimiento alrededor del disco conteniendo el antimicrobiano.

Tabla II.1. Patrón de sensibilidad de una colección de aislamientos de *Moraxella* spp. a diversos antibióticos

Aislamiento	ANTIBIÓTICO EVALUADO*												
	CX1	C30	N30	T30	PB300	SXT25	E15	TTE30	NOR10	FD300	CR30	RA5	G300
Epp63	1.1	3.4	2.5	R	1.9	2.2	3.2	3.0	3.8	1.0	4.4	3.5	2.8
BAA1259	1.2	3.0	2.0	3.0	1.5	2.5	2.5	2.8	3.0	3.0	2.8	2.8	2.5
Fs 327	1.1	3.0	2.5	3.5	1.8	2.5	2.0	3.0	4.0	3.4	4.0	3.5	R
Fs 328	1.0	3.1	2.0	3.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.6	3.0	3.6	3.0	2.8
Fs 330	1.2	3.2	2.5	2.9	1.7	2.3	2.0	2.6	4.0	2.6	3.6	3.0	2.4
Fs 343	1.8	3.0	1.8	3.0	1.7	2.3	1.5	1.3	3.0	2.9	3.0	3.0	2.8
Sp 346	1.6	2.5	2.4	2.8	1.4	R	3.0	3.0	4.0	2.4	3.0	2.7	1.8
Fs 347	1.2	2.5	2.0	2.7	1.7	2.4	1.4	2.5	2.7	1.0	3.0	2.7	2.4
Fs 467	1.8	R	2.3	2.5	1.4	1.8	R	2.5	2.5	2.5	3.4	3.5	2.5
2419	1.9	3.0	1.5	3.5	1.5	2.0	2.5	2.5	2.5	3.0	4.0	3.0	2.5
2358	1.2	2.8	1.8	3.0	1.6	2.4	2.0	2.8	2.6	1.2	3.0	2.6	2.7
2439-2	2.4	3.0	1.7	2.5	1.5	2.3	3.6	3.2	3.4	1.2	3.0	2.5	3.0
Art	1.8	3.5	2.5	2.5	1.5	2.5	3.0	3.0	3.0	2.8	2.8	3.4	3.0
SES	2.0	3.4	1.7	2.8	1.5	2.4	2.5	2.5	2.5	3.0	3.0	2.6	2.9
PRO	1.5	2.8	2.0	2.6	1.4	2.2	2.0	2.3	2.8	1.4	3.6	2.8	1.3
TT3	1.9	2.8	2.0	2.5	1.5	2.0	1.8	2.4	2.5	2.6	3.0	3.2	2.8
2693	2.0	2.8	1.8	2.5	1.5	2.3	2.5	3.0	2.9	2.0	3.0	2.4	2.0
1965	2.5	3.0	2.0	2.9	1.5	2.8	2.5	2.9	2.8	3.0	3.0	2.7	R
64	1.3	3.6	R	3.2	1.0	R	1.5	2.0	3.4	3.8	3.5	3.0	3.2
3346-II	2.0	3.0	1.6	3.0	1.5	2.5	2.4	2.9	2.8	1.0	3.0	2.3	1.4
BM3A	1.2	3.0	1.5	3.0	1.7	2.4	1.8	2.5	3.0	2.7	3.8	4.0	1.2
BM3B	2.1	3.1	2.0	2.8	1.5	1.9	2.7	2.9	2.9	3.8	3.3	3.0	3.9
EV121	2.6	2.7	2.8	3.0	R	2.8	3.0	R	4.0	2.5	3.5	4.0	4.0
EV250	2.0	3.0	2.2	3.1	1.8	3.0	2.8	3.0	3.2	3.5	4.0	2.8	1.5
EV345	1.0	3.8	2.7	3.2	1.5	3.2	3.4	3.0	3.2	3.6	3.5	3.2	3.5
EV366	1.7	2.8	1.8	3.3	1.0	1.9	3.0	1.3	2.5	1.1	3.3	2.9	2.5
EV450A	R	3.5	2.5	3.4	1.4	2.5	3.0	3.0	R	3.7	4.0	3.9	2.3
EV450B	2.0	3.5	2.4	3.4	1.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.2	4.0	3.0	2.9
EV458	2.0	3.2	2.0	3.0	1.7	2.8	2.5	2.8	3.0	1.2	2.8	3.8	3.3
LC2747	2.0	3.0	2.0	2.5	1.4	2.0	2.4	2.5	2.9	3.6	3.6	2.9	4.0
LC190	1.9	3.2	2.5	3.0	0.9	3.0	3.2	R	3.2	2.0	2.9	2.6	3.6
LC010	2.0	3.0	1.8	3.0	1.5	2.0	2.5	2.7	2.3	1.3	3.1	3.5	3.9
NIN1	2.0	3.0	2.0	2.4	1.5	2.5	2.5	1.5	2.5	R	3.0	2.5	2.6
NIN9	2.0	3.0	1.8	3.0	1.5	2.4	2.0	1.5	3.0	1.6	3.0	3.0	3.7
SJ01	2.0	3.5	2.0	3.0	1.2	2.0	2.5	3.0	3.0	1.2	3.6	3.4	2.4
SJ02	R	2.0	1.9	2.4	1.4	2.0	2.0	1.2	2.6	2.4	2.8	3.1	2.3
SJ03A	1.4	3.0	2.0	2.7	1.5	2.5	2.5	2.2	2.5	3.5	2.8	3.5	2.5
SJ03B	1.6	2.0	2.0	2.8	1.8	2.5	2.5	1.9	3.0	1.6	3.0	3.0	2.8

SJ07	1.5	3.5	2.5	3.1	1.5	2.0	3.0	2.5	3.0	2.6	3.6	2.6	3.0
SJ08	1.1	4.0	3.0	2.5	2.2	3.2	4.0	3.3	5.3	1.4	2.8	3.6	3.0
CANIA	2.4	3.2	2.2	3.0	1.5	2.4	3.0	3.0	2.6	3.4	3.4	3.0	2.9
CANII	R	3.2	2.4	3.0	1.8	2.8	3.0	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	3.2
CANIIIA	2.0	3.0	2.0	2.7	1.5	2.5	2.5	2.8	2.6	2.8	3.2	2.6	2.7
CANIIIB	R	3.0	1.8	3.5	2.0	1.2	2.5	2.5	2.8	2.5	3.0	1.2	3.0
1 A1	1.9	3.0	2.0	3.0	3.6	2.0	2.0	3.0	2.6	2.4	1.4	3.7	3.3
3 A8	1.2	4.0	2.0	2.8	2.0	3.0	4.0	3.0	4.0	1.3	4.0	2.9	2.9
5120	2.6	2.4	3.0	3.0	1.2	3.2	1.4	2.5	2.8	R	4.0	3.0	3.0
5148	2.0	3.2	2.0	2.6	2.2	1.6	1.9	2.7	4.0	2.9	1.6	2.9	3.3
771A	1.6	3.6	1.0	2.7	1.4	3.0	2.5	3.0	3.0	3.2	3.0	2.5	3.2
771B	1.4	2.6	1.4	3.0	R	2.7	1.2	2.0	2.8	2.2	2.8	4.0	2.8
M1	R	2.4	2.8	3.3	1.2	1.6	4.0	3.0	2.9	1.8	3.0	3.6	4.0
M2	1.3	2.9	2.4	3.5	1.8	1.8	1.2	1.5	3.1	2.9	1.9	3.0	2.6
M3	1.8	3.3	2.5	2.9	1.4	3.0	2.8	2.6	3.3	2.8	2.3	2.6	3.0

* Se informa el tamaño del halo de inhibición observado (en mm) luego de incubar los aislamientos con los diferentes antibióticos.

R resistente (un aislamiento se consideró resistente cuando no se inhibió crecimiento alrededor del disco conteniendo la droga); CX1: cloxacilina 1 µg; C30: cloranfenicol 30 µg; N30: neomicina 30 µg; T30: oxitetraciclina 30 µg; PB300: polimixina B 300 µg; SXT25: trimetoprim sulfametoxazol 25 µg; E15: eritromicina 15 µg; TE30: tetraciclina 30 µg; NOR10: norfloxacin 10 µg; FD300: nitrofurantoína 300 µg; CR30: cefalotina 30 µg; RA5: rifampicina 5 µg; G300: sulfisoxazole 300 µg.

En general, el crecimiento de los aislamientos de *Moraxella* spp. fue inhibido alrededor de la mayoría de los antibióticos evaluados, presentando aislamientos de diferentes departamentos y obtenidos en distintos años un similar patrón de comportamiento frente a un antibiótico. No hubo ningún aislamiento que fuera resistente *in vitro* a más de dos antibióticos. En el caso de la cloxacilina se encontraron 5 aislamientos resistentes (9,4%), siendo éste el mayor número de aislamientos resistentes a un antibiótico. Estos 5 aislamientos fueron obtenidos de diferentes departamentos y en distintos años.

Cuando se comparó el porcentaje de aislamientos resistentes en *M. bovis* y *M. bovoculi* se observaron diferencias significativas en el patrón de resistencia de la cloxacilina, trimetoprim sulfametoxazol y tetraciclina ($P=0.004$ en los tres casos) (Tabla II.2). En

todos los casos *M. bovis* mostró mayor número de aislamientos resistentes en comparación a *M. bovoculi*.

Tabla II.2. Resistencia *in vitro* de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* determinados por difusión en placa de agar

Especie de <i>Moraxella</i>	% de aislamientos resistentes*												
	CX1	C30	N30	T30	PB300	SXT25	E15	TE30	NOR10	FD300	CR30	RA5	G300
<i>M. bovis</i>	16	0	4	4	4	8	0	8	4	4	0	0	4
<i>M. bovoculi</i>	4 ^E	4	0	0	4	0 ^E	4	0 ^E	0	4	0	0	4

* Los aislamientos fueron considerados resistentes cuando el crecimiento no fue inhibido alrededor del disco conteniendo la droga.

^E Diferencias significativas fueron observadas entre *M. bovis* y *M. bovoculi* ($P < 0.05$).

R resistente; CX1 cloxacilina 1 µg; C30 cloranfenicol 30 µg; N30 neomicina 30 µg; T30 oxitetraciclina 30 µg; PB300 polimixina B 300 µg; SXT25 trimetoprim sulfametoxazol 25 µg; E15 eritromicina 15 µg; TE30 tetraciclina 30 µg; NOR10 norfloxacinina 10 µg; FD300 nitrofurantoina 300 µg; CR30 cefalotina 30 µg; RA5 rifampicina 5 µg; G300 sulfisoxazole 300 µg.

Hemaglutinación de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp.

Con el objetivo de determinar si existían diferencias en la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. con respecto a la expresión de hemaglutininas, se realizó un ensayo de hemaglutinación empleando eritrocitos ovinos. En la Figura II.1 se observan a modo de ejemplo aislamientos de *Moraxella* spp. que fueron capaces de hemaglutinar eritrocitos ovinos y aislamientos que no expresaron hemaglutininas.

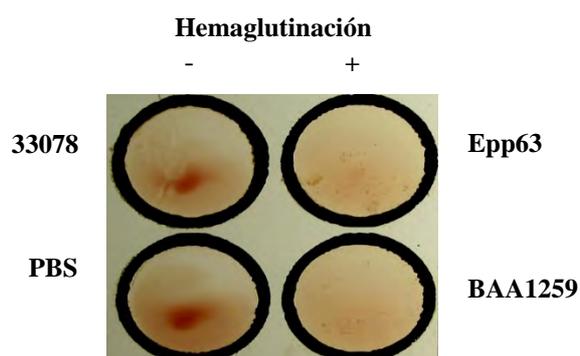


Figura II.1. Hemaglutinación positiva y negativa.

Ejemplo de cepas hemaglutinantes (Epp63 y BAA1259) y de una cepa no hemaglutinante (33078). También se observa la visualización de un control negativo realizado con PBS en lugar de una suspensión bacteriana.

Los resultados obtenidos luego de la incubación de los eritrocitos ovinos con suspensiones bacterianas de *Moraxella* spp. se detallan en la Tabla II.3. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla II.3. Aglutinación de *Moraxella* spp. a eritrocitos frescos de oveja

Aislamiento	Especie	Hemaglutinación*
Epp63	<i>Moraxella bovis</i>	+
BAA1259	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
33078	<i>Moraxella ovis</i>	-
Fs327	<i>Moraxella bovis</i>	-
Fs328	<i>Moraxella bovis</i>	+
Fs330	<i>Moraxella bovis</i>	+
Fs343	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
Sp346	<i>Moraxella bovis</i>	-
Fs347	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
Fs467	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
2419	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
2358	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
2439-2	<i>Moraxella bovoculi</i>	+

3346-II	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
Art	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
SES	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
PRO	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
TT3	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
2693	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
1965	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
64	<i>Moraxella bovis</i>	-
BM3A	<i>Moraxella bovis</i>	-
BM3B	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
EV121	<i>Moraxella bovis</i>	-
EV250	<i>Moraxella bovis</i>	+
EV345	<i>Moraxella bovis</i>	-
EV366	<i>Moraxella bovis</i>	+
EV450A	<i>Moraxella bovis</i>	+
EV450B	<i>Moraxella bovis</i>	+
EV458	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
LC2747	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
LC190	<i>Moraxella bovis</i>	+
LC010	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
NIN1	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
NIN9	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
SJ01	<i>Moraxella bovis</i>	+
SJ02	<i>Moraxella bovis</i>	+
SJ03A	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
SJ03B	<i>Moraxella bovis</i>	-
SJ07	<i>Moraxella bovis</i>	-
SJ08	<i>Moraxella bovis</i>	-
CANIA	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
CANII	<i>Moraxella bovis</i>	-
CANIIIA	<i>Moraxella bovis</i>	-
CANIIIB	<i>Moraxella bovis</i>	-
1 A1	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
3 A8	<i>Moraxella bovoculi</i>	+
5120	<i>Moraxella bovis</i>	-
5148	<i>Moraxella bovis</i>	+
771A	<i>Moraxella bovis</i>	+
771B	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
M1	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
M2	<i>Moraxella bovoculi</i>	-
M3	<i>Moraxella bovoculi</i>	+

*: + presencia de hemaglutinación; - ausencia de hemaglutinación.
Los ensayos se realizaron por triplicado.

Doce aislamientos de *M. bovis* de un total de 24 fueron capaces de aglutinar eritrocitos, mientras que en el caso de *M. bovoculi* presentaron esta capacidad 15 aislamientos de un total de 27. La expresión de hemaglutininas fue independiente del lugar y fecha de obtenido el aislamiento. A su vez, se determinó que no existieron diferencias interespecíficas entre *M. bovis* y *M. bovoculi* con respecto a la hemaglutinación de eritrocitos ovinos (Figura II.2).

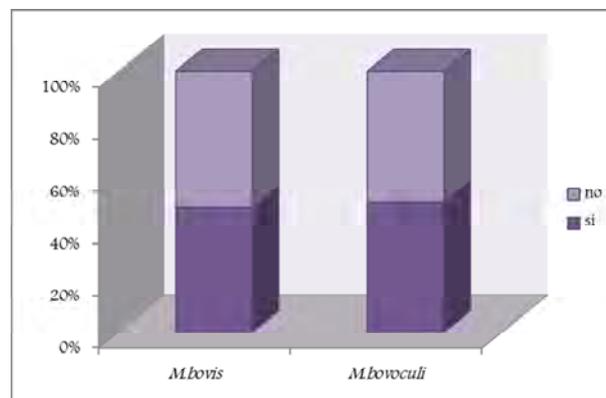


Figura II.2. Porcentaje de aislamientos hemaglutinantes de *M. bovis* y *M. bovoculi*. En violeta oscuro se observa el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* capaces de hemaglutinar. En violeta claro se observa el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* que no fueron capaces de hemaglutinar eritrocitos ovinos.

Cuantificación del biofilms formado por aislamientos de *Moraxella* spp.

Para cuantificar la formación de *biofilm* de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. se realizó la tinción con CV de las células adheridas al poliestireno y posterior solubilización del mismo con etanol. En la Figura II.3 se presentan los resultados de la DO_{540} determinada por el CV asociado a las células de *Moraxella* spp..

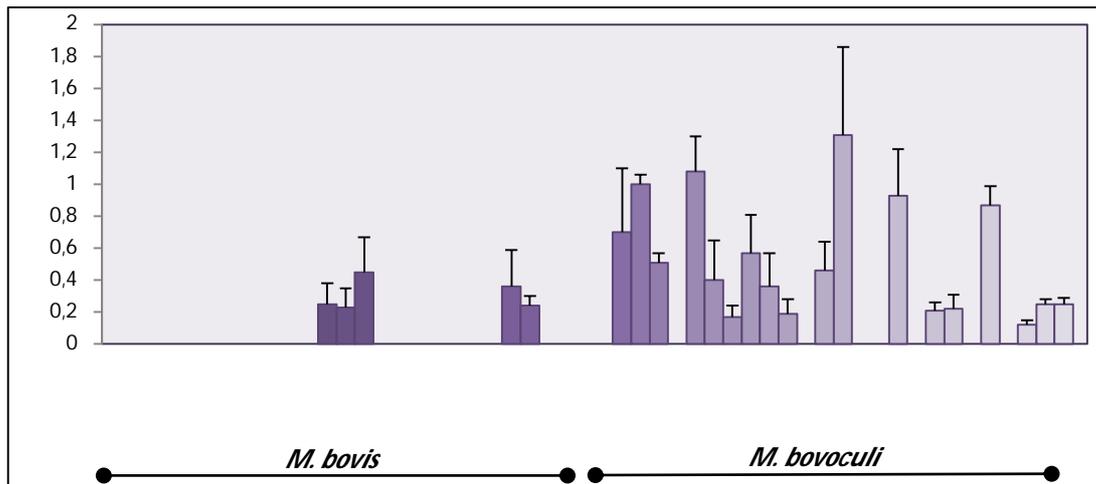


Figura II.3. Cuantificación de la formación de *biofilm* de los aislamientos de *Moraxella* spp. Cada barra representa la media de la DO₅₄₀ del CV asociado a las células adheridas al poliestireno. Cada línea vertical representa el desvío estándar de tres ensayos independientes. Con un asterisco (*) se indica la cepa de *M. ovis*.

Como se puede observar en la Figura II.3 no todos los aislamientos fueron capaces de formar *biofilm* sobre una superficie abiótica como es el poliestireno. La formación de *biofilm* no estuvo relacionada ni a la fecha ni al origen el aislamiento. De todas maneras, se puede percibir una clara diferencia entre los aislamientos de *M. bovis* y los de *M. bovoculi* con respecto a su capacidad para formar *biofilm*. En el gráfico de la Figura II.4 se representa el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* capaces de formar *biofilm*. El 18% de los aislamientos de *M. bovis* formaron *biofilm*, mientras que en el caso de *M. bovoculi* el porcentaje fue del 68%. Las diferencias observadas en la capacidad de formar *biofilm* entre ambas especies de *Moraxella* spp. fueron significativas ($P=0,0006$). A su vez, no sólo se observaron diferencias en la cantidad de aislamientos de una especie u otra capaz de formar *biofilm*, sino en la cuantificación del *biofilm* formado. En la Figura II.3 se puede apreciar que los aislamientos de *M. bovoculi* forman *biofilm* compuestos significativamente por mayor

cantidad de células que los *biofilms* formados por los aislamientos de *M. bovis* ($P=7.7 \times 10^{-18}$).

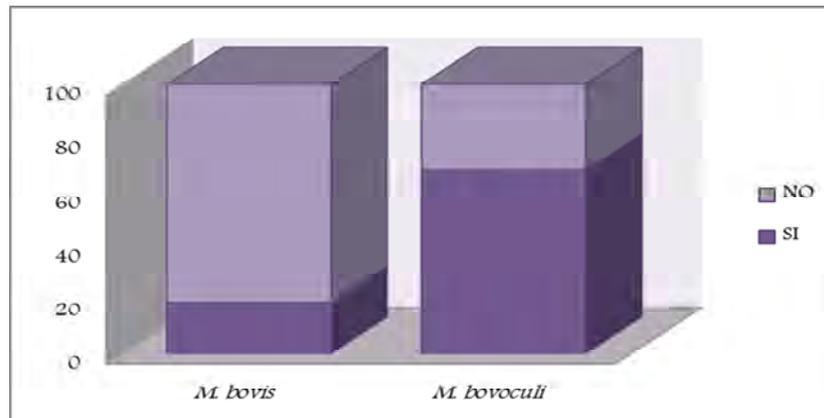


Figura II.4. Porcentaje de aislamientos formadores de *biofilms* en *M. bovis* y *M. bovoculi*. En violeta oscuro se observa el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* capaces de formar *biofilms*. En violeta claro se observa el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* que no fueron capaces de formar *biofilms*.

Autoagregación de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp.

El coeficiente de autoagregación fue analizado por triplicado y calculado para todos los aislamientos de *Moraxella* spp. usando la fórmula: $\%C = [1 - (DO_{t=30\text{min}}/DO_{t=0})] * 100$ (Figura II.5).

Cuando se comparó el coeficiente de autoagregación de los aislamientos de *M. bovis* con el coeficiente de autoagregación de los aislamientos de *M. bovoculi* no se observaron diferencias significativas interespecíficas ($P=0.465$; Figura II.6).

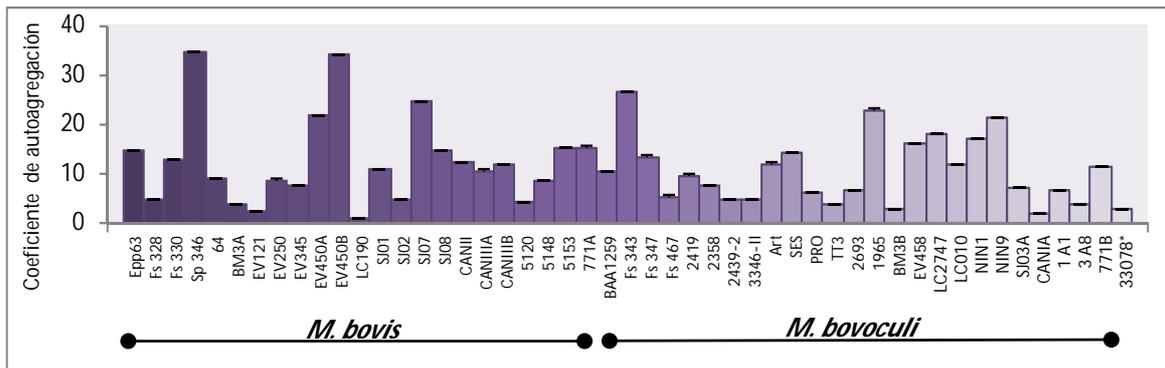


Figura II.5. Coeficiente de autoagregación de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. Cada barra representa la media del coeficiente de autoagregación con su desvío estándar. Con un asterisco (*) se indica la cepa de *M. ovis*.

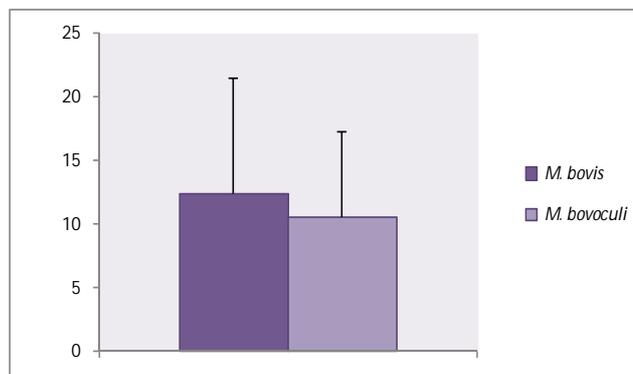


Figura II.6. Coeficiente de agregación para *M. bovis* y *M. bovoculi*.

Se presenta la media con su desvío estándar del coeficiente de agregación de *M. bovis* y *M. bovoculi*.

No se encontró una asociación entre la expresión de hemaglutininas y el coeficiente de autoaglutinación. A su vez, no se encontró una correlación entre el coeficiente de autoagregación y la capacidad de formar *biofilms* ($P=0.27$).

Análisis de PME de *M. bovis*

Con la finalidad de analizar las PME de *M. bovis* se realizó la identificación de las mismas por mapeo peptídico. En la figura II.7A se observa el gel en 2D que se obtuvo luego de la corrida de PME de la cepa Epp63 de *M. bovis*.

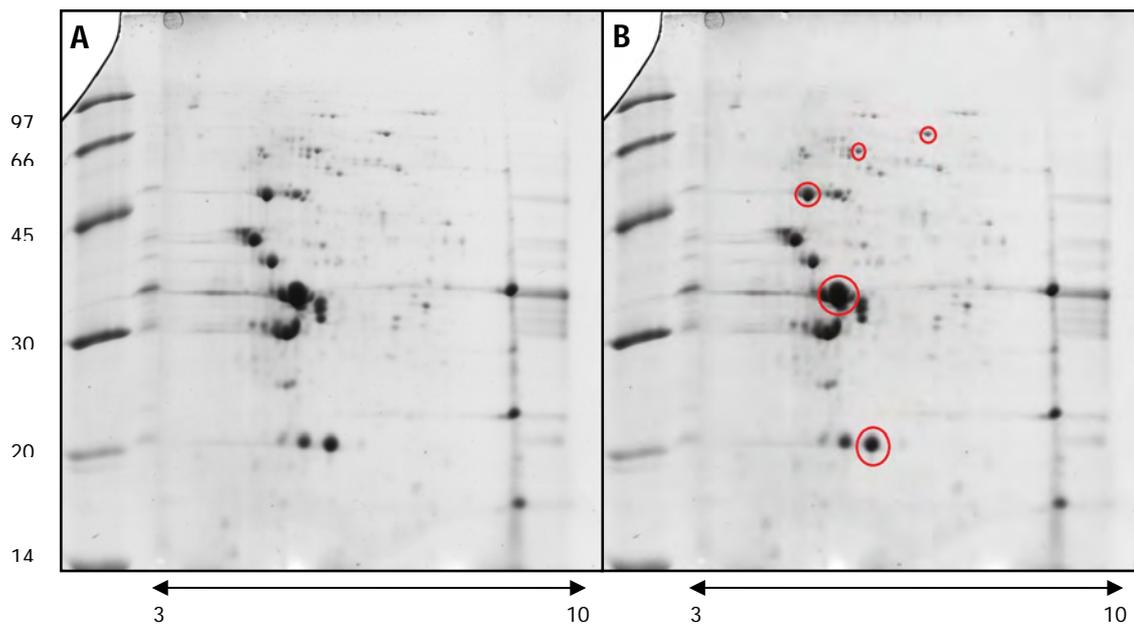


Figura II.7. Gel 2-D de PME de la cepa Epp63 de *M. bovis*. En A se observan las proteínas separadas luego de la corrida en dos dimensiones y en B se observan las proteínas seleccionadas para su análisis por MALDI-TOF.

A partir de este gel se seleccionaron 5 proteínas (Figura II.7B) que se digirieron con tripsina y el extracto proteico resultante se identificó por MALDI-TOF (Tabla II.4).

Tabla II.4. Identificación de proteínas de *M. bovis* por MALDI-TOF

Masa molecular en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa molecular teórica (kDa.)	Homología por BLAST del NCBI
68	Mb1739	70	Lipasa/fosfolipasa B (<i>Moraxella bovis</i>)
62	Mb1970	76	Proteína fimbrial (<i>Psychrobacter arcticus</i>)
50	Mb1032	52	PME E (<i>Moraxella catarrhalis</i>)
34	Mb0279	38	PME M35 (<i>Moraxella catarrhalis</i>)
31	Mb3526	22	PME J (<i>Moraxella catarrhalis</i>)

Todas las proteínas seleccionadas mostraron homología con proteínas aisladas de *M. bovis* (lipasa/fosfolipasa) o *Moraxella catarrhalis* (proteínas de membrana externa), con la excepción de la proteína Mb1970 que mostró homología con una proteína fimbrial de *Psychrobacter arcticus*.

4. Discusión

El análisis de la diversidad de cepas de *Moraxella* spp. asociadas a brotes de QIB es un requisito para un exitoso programa inmunoproláctico debido a que las cepas circulantes varían durante los brotes de la enfermedad exigiendo una caracterización

continua. A pesar de que la QIB causa serias pérdidas económicas en Uruguay, existen pocos datos disponibles acerca de la diversidad de las cepas circulantes. En este trabajo, la diversidad fenotípica de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos de brotes clínicos de QIB fue analizada por medio del patrón de resistencia a antibióticos comúnmente utilizados contra la QIB, evaluación de la hemaglutinación y autoagregación, la cuantificación del *biofilm* formado sobre superficies abióticas y la caracterización de PME presentes en *M. bovis*.

Uno de los métodos clásicos utilizados ampliamente para estudios epidemiológicos de muchas especies bacterianas es la serotipificación. Éste continua siendo un método clave para la tipificación, por ejemplo, de aislamientos de *Salmonella* y *E. coli* (Ahmed *et al.*, 2010; Eheita *et al.*, 2005). La principal limitante de esta técnica consiste en generar el panel de antisueros adecuados para cada caso. Con respecto a *Moraxella* spp. se ha sugerido que la inmunidad contra la QIB se vincula al serogrupo de la cepa responsable del brote, lo cual puede explicar que cepas recuperadas de animales enfermos deben ser continuamente monitoreadas para detectar el surgimiento de aislamientos no incluidos en las vacunas (Gil-Turnes & Aleixo, 1991; Lepper *et al.*, 1992).

En este trabajo, se intentó inicialmente poner a punto un método basado en ELISA y posteriormente un método basado en *Western blot* con el objetivo de serotipificar la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. Se emplearon sueros policlonales obtenidos en conejos contra diversos aislamientos de *Moraxella* spp. y cedidos por el Dr. Gil-Turnes de la Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Brasil. Con estas técnicas se observó una gran reactividad cruzada entre aislamientos

pertenecientes a diferentes serogrupos, motivo por el cual no fue posible utilizarlas para serotipificar la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. (datos no presentados). Estos resultados sugieren un bajo poder discriminatorio de la técnica de serotipificación.

Con el fin de tipificar la colección de aislamientos en base a perfiles de sensibilidad a antimicrobianos se evaluó la sensibilidad de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. a una amplia gama de antibióticos. Algunos de estos antibióticos se emplean en Uruguay contra la QIB y otros, pese a que no son frecuentemente usados con fines terapéuticos en nuestro país, han sido usados por investigadores de países de la región con la finalidad de antibiotipificar cepas de *Moraxella* spp. (Angelos *et al.*, 2011; Conceição *et al.*, 2004; Gil Turnes & Albuquerque, 1984; McConnel *et al.*, 2007; Zielinski *et al.*, 2000). En este trabajo no se estableció un patrón de susceptibilidad bacteriana, sino que se identificaron los aislamientos resistentes, de acuerdo a los criterios planteados en la sección Materiales y Métodos de esta Tesis. Al no haber puntos de cortes posiblemente las resistencias determinadas estén subestimadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la mayoría de los aislamientos presentaron un halo de inhibición alrededor de los antibióticos usados frecuentemente en el tratamiento de la QIB. Se encontró que el antibiótico que presentó mayor número de cepas resistentes fue cloxacilina. La resistencia a esta droga no es sorprendente ya que existen antecedentes de ello en la literatura (Brown *et al.*, 1998; Webber *et al.*, 1982). La colección de aislamientos de *Moraxella* spp. fue en general sensible a la eritromicina, resultados que concuerdan con los observados por Zielinski y colaboradores (2000). Sin embargo, fueron discordantes a los observados por George

(1990) y Shryock y colaboradores (1998) que encontraron un alto número de cepas de *M. bovis* resistente a este antibiótico. Con respecto a la tetraciclina y al trimetoprim-sulfametoxazol, se observó que *M. bovis* presentó significativamente un mayor número de aislamientos resistentes en comparación a *M. bovoculi*. De todas formas el porcentaje de aislamientos resistentes fue bajo en *M. bovis* (6%), coincidiendo con los resultados obtenidos por Angelos y colaboradores (2011) y Zielinski y colaboradores (2000) para el caso del trimetoprim-sulfametoxazol y con Carmo y colaboradores (2011) en el caso de la tetraciclina.

Aunque previamente se encontró que el 3,5% de los aislamientos de *M. bovoculi* y un 20% de los aislamientos de *M. bovis* (Shryock *et al.*, 1998) eran resistentes a la oxitetraciclina (Angelos *et al.*, 2011), en nuestro estudio todos los aislamientos fueron sensibles a este antibiótico, resultado comparable al obtenido por Zielinski y colaboradores (2000) al analizar la sensibilidad de una colección de cepas de *M. bovis* a este antibiótico. Se ha sugerido que la administración parenteral de oxitetraciclina sería un tratamiento adecuado en vista de la buena difusión de la droga en la conjuntiva ocular (George, 1990).

La tipificación por perfiles de sensibilidad a antimicrobianos es de bajo poder discriminatorio, debido a que la resistencia a antimicrobianos muchas veces es portada por plásmidos que son fácilmente transferibles entre cepas y dependen de factores de selección para su estabilidad, por lo que muchas veces se pierden en los cultivos (Kado, 1998). Por esto la antibiotipificación no es viable para ser utilizada como único método de tipificación ya que muchas veces aislamientos epidemiológicamente relacionados y genéticamente indistinguibles pertenecen a antibiotipos diferentes y a

la inversa (Labarca, 2002). En este estudio, aislamientos de *Moraxella* spp. no relacionados presentaron el mismo perfil de resistencia a antibióticos, lo cual puede representar la adquisición del mismo plásmido por cepas diferentes (brote plasmídico). En tres de los antimicrobianos evaluados se observaron diferencias significativas en el porcentaje de aislamientos resistentes al comparar *M. bovis* con *M. bovoculi*.

La unión de la bacteria a las células de la superficie del hospedador es un paso crítico en el desarrollo de una infección. En *M. bovis* se han identificado fimbrias y hemaglutininas como factores de virulencia que jugarían un papel importante en la adhesión bacteriana a diferentes tipos de superficies. En este trabajo se evaluó si la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. presentaba diferencias en lo que respecta a su capacidad de aglutinar eritrocitos ovinos. Se observó que el 50% de los aislamientos fueron capaces de hemaglutinar y no se encontraron diferencias interespecíficas. En nuestro estudio todos los aislamientos de la colección se asociaron a casos clínicos y por lo tanto se los podría considerar patogénicos, aunque no todos fueron hemaglutinantes, por lo cual la patogenicidad no tendría relación con la hemaglutinación.

Por otro lado, dentro de la evaluación de la diversidad fenotípica se valoró la capacidad de los diferentes aislamientos de *Moraxella* spp. de formar *biofilms* sobre una superficie abiótica como es el poliestireno. A pesar de que se ha asociado la formación de *biofilms* como responsable de una variedad de infecciones oculares (Murugan *et al.*, 2010) aún no hay estudios exhaustivos sobre la formación de *biofilms* por *M. bovis* o *M. bovoculi*. Este trabajo es el primero que describe la formación de *biofilms* por aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Se observó una gran

heterogeneidad con respecto a la capacidad de formar *biofilms*. Esto significa que en la colección se encontraron aislamientos capaces de formar *biofilms* (un 43% de los mismos), mientras que otros aislamientos no presentaron esta propiedad. A su vez, tanto los aislamientos de *M. bovis* como los de *M. bovoculi* formaron *biofilms*, pero el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* que formaron *biofilms* fue significativamente menor que el de *M. bovoculi*. Los aislamientos evaluados en este estudio fueron obtenidos de brotes clínicos de QIB; sin embargo, no todos ellos fueron capaces de formar *biofilms*, por lo cual se puede sugerir que la formación de *biofilms* no es un requisito indispensable en la patogenicidad de *Moraxella* spp. como agente etiológico de la QIB.

En este trabajo también se evaluó la capacidad autoaglutinante de la colección de aislamientos, una medida de adhesión interbacteriana (Rickard *et al.*, 2003) que podría tener un papel importante en la formación de *biofilms* (Nyenje *et al.*, 2012). En este trabajo todos los aislamientos fueron capaces de autoaglutinar, sin embargo, no se encontró asociación entre autoaglutinación y formación de *biofilm*. Esto demuestra que la formación de *biofilm* es un proceso complejo que involucra diversos factores microbianos.

Finalmente, en el marco de la caracterización fenotípica se realizó la identificación de PME de *M. bovis*. Se obtuvieron PME que se separaron por geles 2-D y a partir de esta separación se seleccionaron cinco PME para su análisis por MALDI-TOF. Hay que tener presente que los resultados obtenidos se compararon con la información incluida en bases de datos públicas ya que hasta el momento no están disponibles los genomas de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Los resultados del MALDI-TOF indicaron que las

proteínas seleccionadas presentaron homología con una lipasa/fosfolipasa B de *M. bovis*, una proteína fimbrial de *Psychrobacter arcticus* y con tres PME de *Moraxella catarrhalis*. Hasta el momento sólo se ha caracterizado una lipasa/fosfolipasa B de *M. bovis*, la cual fue descrita en el año 2001 por Farn y colaboradores. Esta proteína está conformada por 616 aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de 65,8 kDa. En nuestro estudio la proteína que presenta homología con la lipasa/fosfolipasa de *M. bovis* presenta una masa molecular estimada de 68 kDa. Otra de las proteínas identificadas presentó una masa estimada de 62 kDa y tuvo homología con una proteína fimbrial de *Psychrobacter arcticus*, miembro de la Familia de las *Moraxellaceae*. Esta bacteria posee el gen *piB* que codifica para un sistema proteico involucrado en el ensamblaje fimbrial (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AAZ17938). El gen *piB* tiene una longitud de 1776 pb y codifica para una proteína de 591 aa con una masa molecular de 65,4 kDa. Finalmente las PME E, M35 y J de *M. catarrhalis* codifican para proteínas de 459, 358 y 191 aminoácidos, respectivamente (Bhushan *et al.*, 1994; Easton *et al.*, 2005; Hays *et al.*, 2005). A partir de los resultados obtenidos se puede sugerir que la técnica de extracción de PME, originalmente desarrollada para *Proteus mirabilis*, un uropatógeno Gram negativo, también puede ser usado para el género *Moraxella*. A su vez, con esta técnica se pudieron extraer PME que luego fueron identificadas como tales a través de MALDI-TOF.

Este trabajo describe por primera vez la capacidad de *M. bovis* y *M. bovoculi* de formar *biofilms* sobre superficies abióticas y registra la capacidad hemaglutinante y autoaglutinante de *M. bovoculi*. Los diferentes análisis llevados a cabo para caracterizar la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. desde el punto de vista fenotípico demostraron que existen aislamientos con diferentes combinaciones de

factores de virulencia. Al momento de desarrollar o formular una vacuna contra QIB es importante que la mayor diversidad de factores involucrados en la patogenicidad bacteriana esté presentes en la misma.

Parte de los resultados presentados en este Capítulo fueron publicados en *The Journal of Infection in Developing Countries* (V. Sosa, P. Zunino. "Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay", 7: 819-824; 2013).

CAPÍTULO III

C

ARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE
AISLAMIENTOS DE *MORAXELLA*
SPP. RECUPERADOS DE BROTES DE
QIB

1. Antecedentes

Con el progreso de la biología molecular se han desarrollado técnicas que facilitan el estudio de la diversidad bacteriana a nivel genético e introducen la posibilidad de caracterizar incluso diferentes cepas de una misma especie. Estas técnicas son rápidas, reproducibles y en general permiten discriminar entre microorganismos cercanamente relacionados en base a pequeñas diferencias en las secuencias del ADN (Johnsen & Nielsen, 1999). Por estos motivos, estas técnicas son ampliamente utilizadas para estudios epidemiológicos y han sido empleadas exitosamente para detectar diversidad genética en plantas, parásitos, animales y microorganismos (Lupski & Weinstock, 1992).

Como se vio en el capítulo anterior, el análisis de la diversidad de las cepas de *Moraxella* spp. es un requisito para un exitoso programa inmunoprolifáctico debido a que las cepas circulantes varían durante los brotes de la enfermedad exigiendo una caracterización continua. La importancia del tema ha llevado a que en los últimos años se hayan realizados estudios no sólo de la diversidad fenotípica (Capítulo II de esta tesis) sino que también se han realizado estudios de diversidad genotípica tanto en países de la región como en el mundo entero (Angelos & Ball, 2007b; Conceição *et al.*, 2004; Kakuda *et al.*, 2003b; 2006; Prieto *et al.*, 1999).

Estudio de la diversidad molecular del genoma bacteriano

Muchas de las técnicas moleculares usadas hoy en día para realizar estudios de tipificación se basan en la separación electroforética de fragmentos de ADN de diferentes tamaños moleculares. El resultado de la electroforesis se representa como un patrón de bandas sobre un gel. Estos patrones pueden ser extremadamente complejos y su análisis debe ser tenido en cuenta al momento de seleccionar una técnica basada en ADN-*fingerprinting*. No sólo la dificultad técnica sino que también los costos y el tiempo que insume obtener un resultado deben ser evaluados para la selección de la utilidad de un método de tipificación en particular.

REP-PCR

Generalmente las bacterias contienen en su genoma varias copias de una serie de secuencias repetitivas tales como REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y BOX (secuencias conservadas de ADN repetitivo del elemento BOX de *Streptococcus pneumoniae*) (Versalovic *et al.*, 1994). Las unidades repetidas están separadas por regiones de ADN no repetitivo, de modo que los cebadores para amplificar estas zonas por PCR se diseñan desde cada una de las mitades del elemento repetitivo y se dirigen hacia el exterior. Se ha encontrado que la técnica de REP-PCR es extremadamente confiable, reproducible, rápida y altamente discriminatoria (Versalovic *et al.*, 1994).

En Argentina, Prieto y colaboradores (1999) subdividieron 60 aislamientos de *M. bovis* en 5 grupos diferentes usando para ello la técnica de ERIC-PCR. En ese estudio

también se analizó la diversidad de LPS y el perfil de PME y se encontró que el método más discriminatorio para tipificar cepas fue el basado en técnicas moleculares.

Hasta el momento, no se han realizado estudios de diversidad genotípica para cepas de *M. bovoculi* empleando la metodología REP-PCR y para *M. bovis* sólo hay estudios de tipificación con ERIC-PCR empleando números pequeños de cepas.

Amplificación aleatoria de los fragmentos polimórficos de ADN (RAPD)

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se basa en el uso de cebadores universales cuya secuencia es independiente del genoma del organismo que es objeto de estudio. Por lo tanto, esta técnica amplifica secuencias al azar dentro del ADN genómico. Los cebadores se usan solos o en parejas, en condiciones de baja astringencia para unirse en varios sitios al ADN diana, ya sea de modo total o parcialmente complementario y, como consecuencia, se genera un patrón de amplificación característico (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

En Brasil, Conceição y colaboradores (2004) analizaron una colección de 30 cepas de *M. bovis* y encontraron 15 perfiles moleculares resultado de la combinación de datos obtenidos luego de evaluar la colección de aislamientos con 3 cebadores diferentes para RAPD-PCR. La colección de aislamientos estaba formada por cepas de *M. bovis* recuperadas de brotes de QIB ocurridos entre 1974 y el 2001 en Argentina, Brasil y Uruguay. En este mismo estudio se demostró que cepas pertenecientes a diferentes serogrupos tuvieron idéntico perfil de RAPD, demostrando que esta técnica no sería capaz de discriminar cepas pertenecientes a diferentes serotipos.

La diversidad genotípica de cepas de *M. bovoculi* con la técnica de RAPD hasta el momento no ha sido evaluada.

Electroforesis en campo pulsado

La electroforesis en campo pulsado es una de las técnicas de tipificación más reproducibles y altamente discriminatorias en comparación con otras técnicas moleculares (Goering, 1993; Maslow *et al.*, 1993; Tenover *et al.*, 1997; Warner & Onderdonk, 2003). En este caso, el genoma bacteriano es digerido con una enzima de restricción que tiene pocos sitios de reconocimiento y que genera de 10 a 30 fragmentos que van de 10 a 800 kb. Estos fragmentos de gran tamaño no pueden separarse como un patrón de diferentes bandas mediante electroforesis convencional, pero sí mediante PFGE (Schwartz & Cantor, 1984). Para esto se usa una cámara diseñada especialmente que cambia de posiciones en el gel de agarosa entre tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel (Tenover *et al.*, 1997; Warner & Onderdonk, 2003). En general las moléculas de ADN tan grandes tienen tendencia a fraccionarse durante los procesos preparativos normales, por lo cual en esta técnica se han desarrollado métodos de extracción de ADN cromosómico de células intactas embebidas en bloques de agarosa de baja temperatura de fusión, seguida de lisis *in situ* (Matushek *et al.*, 1996). Tras la consiguiente digestión y separación electroforética, los patrones de bandas resultantes pueden ser útiles en el estudio de la diversidad intraespecífica (Méndez-Álvarez *et al.*, 1995).

Hasta el momento no existen estudios que analicen la diversidad de cepas de *M. bovis* o *M. bovoculi* empleando la técnica de PFGE.

Diversidad basada en el estudio de genes bacterianos específicos

Es importante conocer la distribución y diversidad de genes codificantes de factores de virulencia ya que hay que tener presente que un candidato considerado como componente de vacunas debería estar presente y conservado entre la mayoría de los aislamientos clínicos locales. La bioinformática permite evaluar la variación genética de inmunógenos potenciales y detectar los candidatos que podrán ser en un futuro clonados, expresados y purificados como proteínas recombinantes.

Como ya se mencionó, *M. bovis* posee diversos factores de virulencia que son responsables de su patogenicidad, incluyendo la expresión de fimbrias, hemolisinas, LPS, fosfolipasas, sistemas de adquisición de hierro mediados por PME y enzimas proteolíticas e hidrolíticas. Con respecto a *M. bovoculi* existen pocos estudios que vinculen factores de virulencia y patogenicidad. En este sentido hasta el momento sólo el operón RTX, responsable de la actividad hemolítica en cepas de *M. bovis*, ha sido descrito en *M. bovoculi* y se ha sugerido que el mismo podría estar implicado en la patogenicidad de esta especie bacteriana (Angelos, 2010).

Kakuda y colaboradores (2006) evaluaron por *Southern blot* la presencia de los genes *flp* y *fap* en una colección de aislamientos clínicos de *M. bovis* obtenidos de diversas zonas geográficas. Estos genes codifican para proteínas similares a las hemaglutininas filamentosas de *Bordetella pertussis* y para una proteína accesoria específica involucrada en la secreción de las hemaglutininas, respectivamente. Ellos encontraron que los genes *flp* y *fap* están presentes en 9 de 10 cepas de *M. bovis* y sugieren que estos genes y sus productos pueden influenciar la infectividad o virulencia de este patógeno.

Cuando se evaluó en una colección de cepas de *M. bovis* la variación aminoacídica existente en la citotoxina MbxA se encontró que la misma está conservada en Estados Unidos (Angelos & Ball, 2007b). Los autores de este trabajo sugieren que las vacunas contra QIB podrían incorporar MbxA como antígeno protector contra QIB causada por *M. bovis*.

Otra subunidad bacteriana que se recomienda como componente de vacunas es la PME IrpA codificada por el gen *omp79* (Kakuda *et al.*, 2003b). Esta proteína fue detectada en aislamientos clínicos de *M. bovis* de diversos orígenes geográficos y se observó que su antigenicidad permaneció conservada en los mismos.

2. Objetivos

- Caracterizar genotípicamente una colección de aislamientos nativos de *Moraxella* spp. mediante el análisis de patrones de *DNA-fingerprinting* obtenidos por el empleo de técnicas de REP-PCR, RAPD-PCR y PFGE.
- Determinar la distribución y variabilidad genética de genes codificantes de factores de virulencia descritos para *M. bovis* en una colección de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*.

- Analizar la variabilidad observada en la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. por medio de estudios multivariados.

3. Resultados

ERIC-PCR

Cuando se empleó la técnica de ERIC-PCR para evaluar la diversidad genética de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos de brotes clínicos de QIB se obtuvieron los patrones de banda que se observan en la Figura III.1.

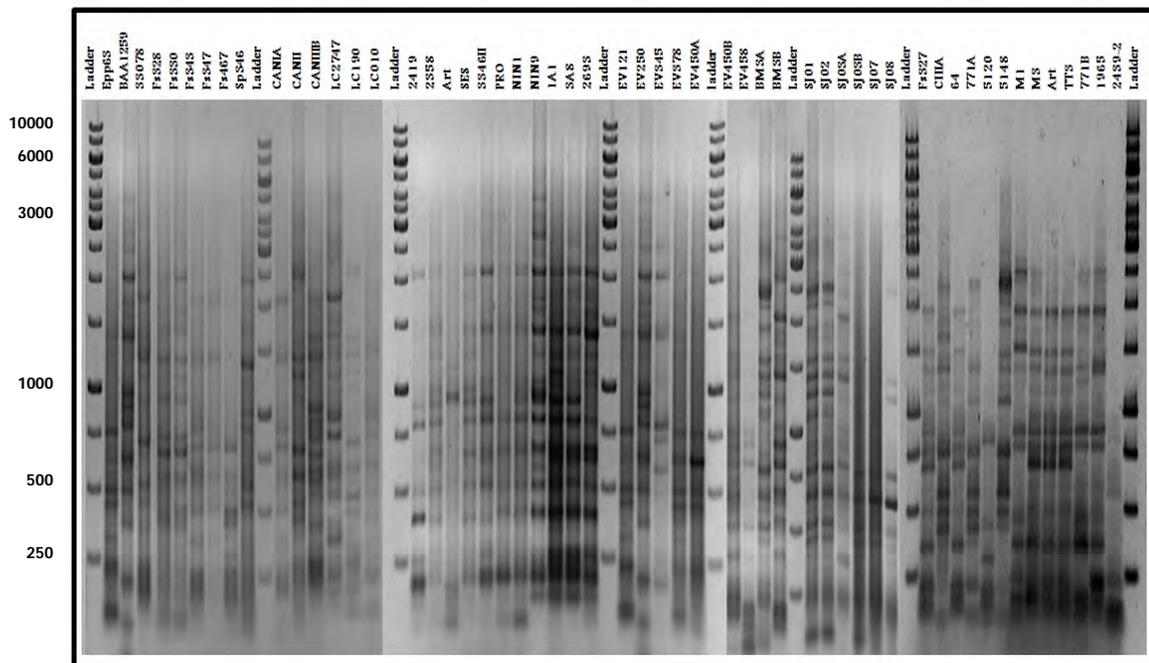


Figura III.1. Patrón de bandas generado por ERIC-PCR. Marcador de tamaño molecular (Ladder) 1 kb (Fermentas). Gel de agarosa 0.8%.

Todos los aislamientos de la colección fueron tipificables usando este juego de cebadores y se obtuvieron entre 5 y 20 bandas en el rango de 250 a 5000 pb.

Con el objetivo de determinar si la técnica de ERIC-PCR permitía agrupar a los aislamientos en base a sus atributos, se construyó un dendograma usando el algoritmo UPGMA y como medida de similitud el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (Rho) (Figura III.2).

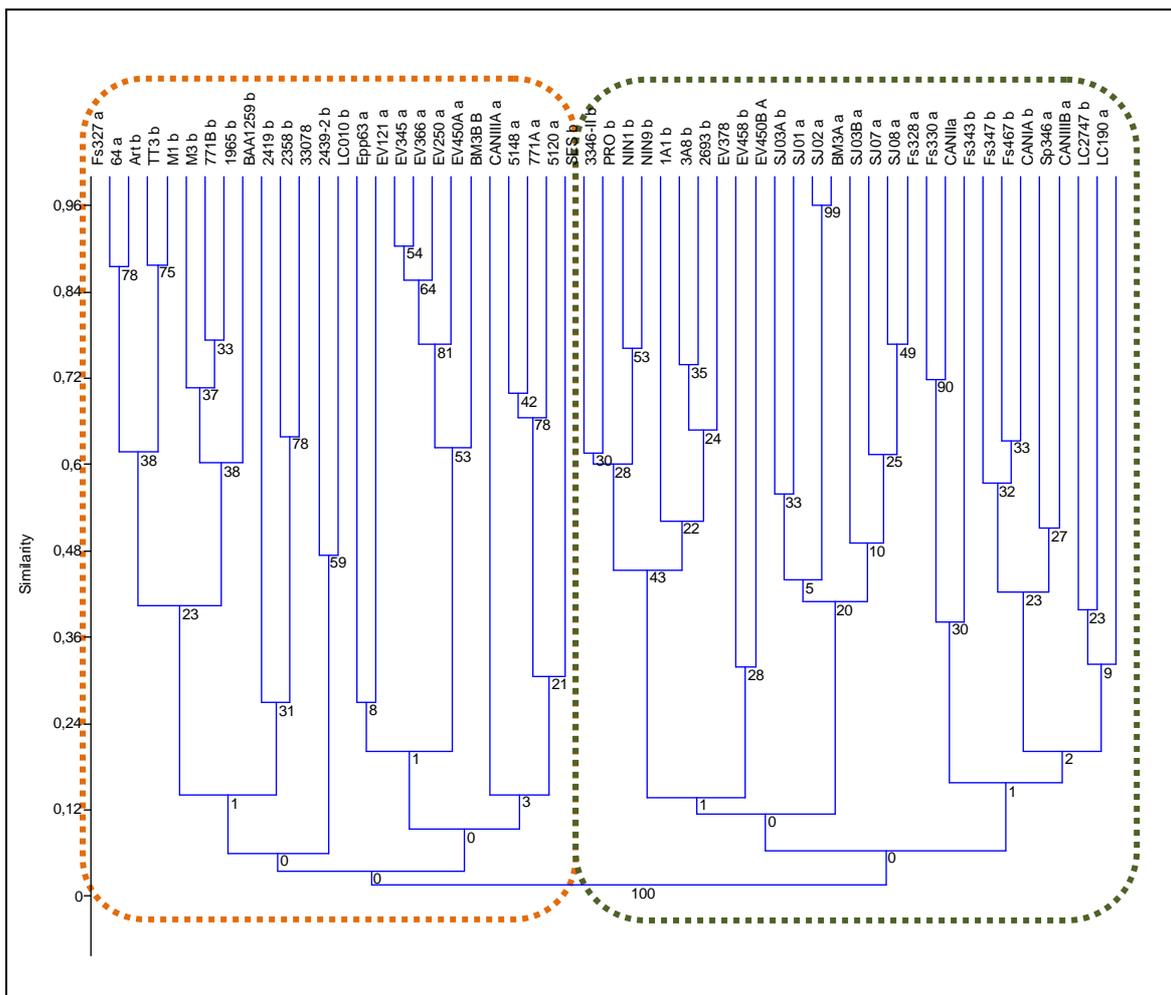


Figura III.2. Dendograma obtenido a partir del análisis por UPGMA, usando coeficiente Rho, del patrón de bandas obtenido al realizar la técnica de ERIC-PCR.

a: *M. bovis*, b: *M. bovoculi*. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 1000 réplicas.

En base al dendograma obtenido a partir del análisis de los patrones de bandas generados por ERIC-PCR se observaron principalmente dos grupos filogenéticamente diferenciados (mostrados en la Figura III.2 con color verde y anaranjado), según lo indican los valores de *bootstrap*. En cada uno de estos grupos coexistieron aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* de diferente origen geográfico y temporal y que expresan distintos factores de virulencia.

BOX-PCR

En la figura III.3 se observan los patrones de bandas obtenidos cuando se realizó la técnica de BOX-PCR a la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. Se observó amplificación en todos los aislamientos, tanto de *M. bovis* como de *M. bovoculi*.

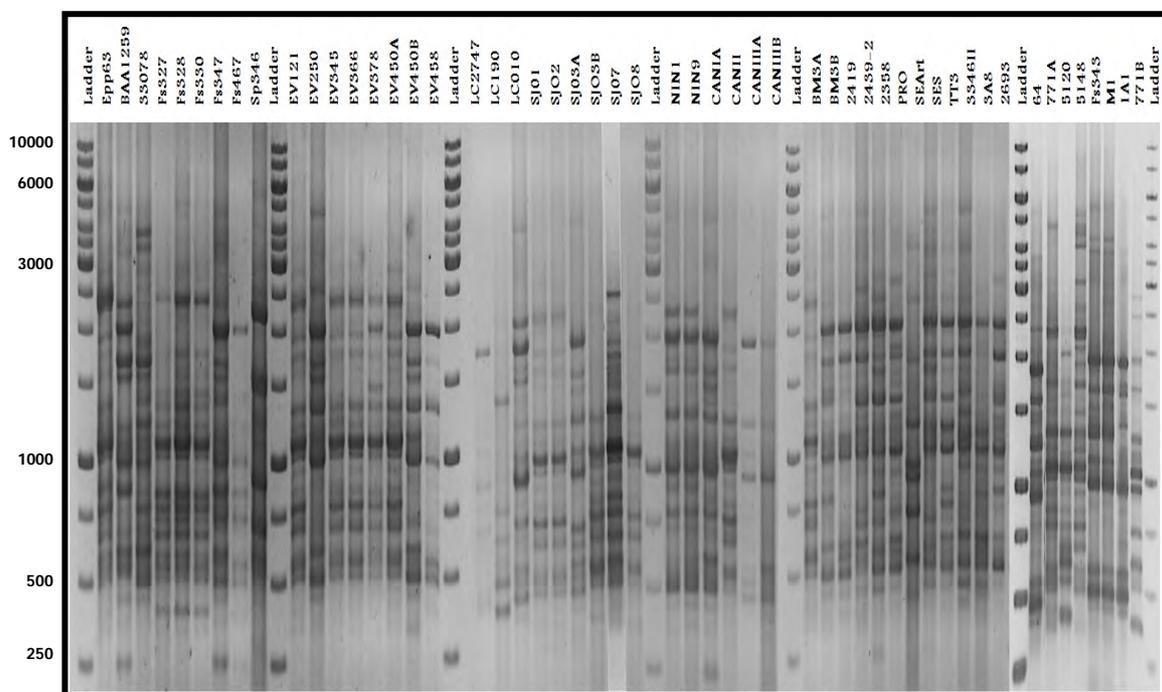


Figura III.3. Patrón de bandas generado por BOX-PCR. Marcador de tamaño molecular (Ladder) 1 kb (Fermentas). Gel de agarosa 0.8%.

El número de bandas obtenido usando la técnica de BOX-PCR fue de entre 5 a 21 bandas que estuvieron en el rango de 250 pb hasta las 6000 pb. En este caso, y al igual que lo observado cuando se realizó ERIC-PCR, el elevado número de patrones de bandas obtenidos indicaron que existe una elevada heterogeneidad genética entre los aislamientos de *Moraxella* spp. circulantes en nuestro país.

Cuando se analizó la relación filogenética existente entre los aislamientos de la colección, producto de la técnica de BOX-PCR, se obtuvo el dendograma observado en la figura III.4.

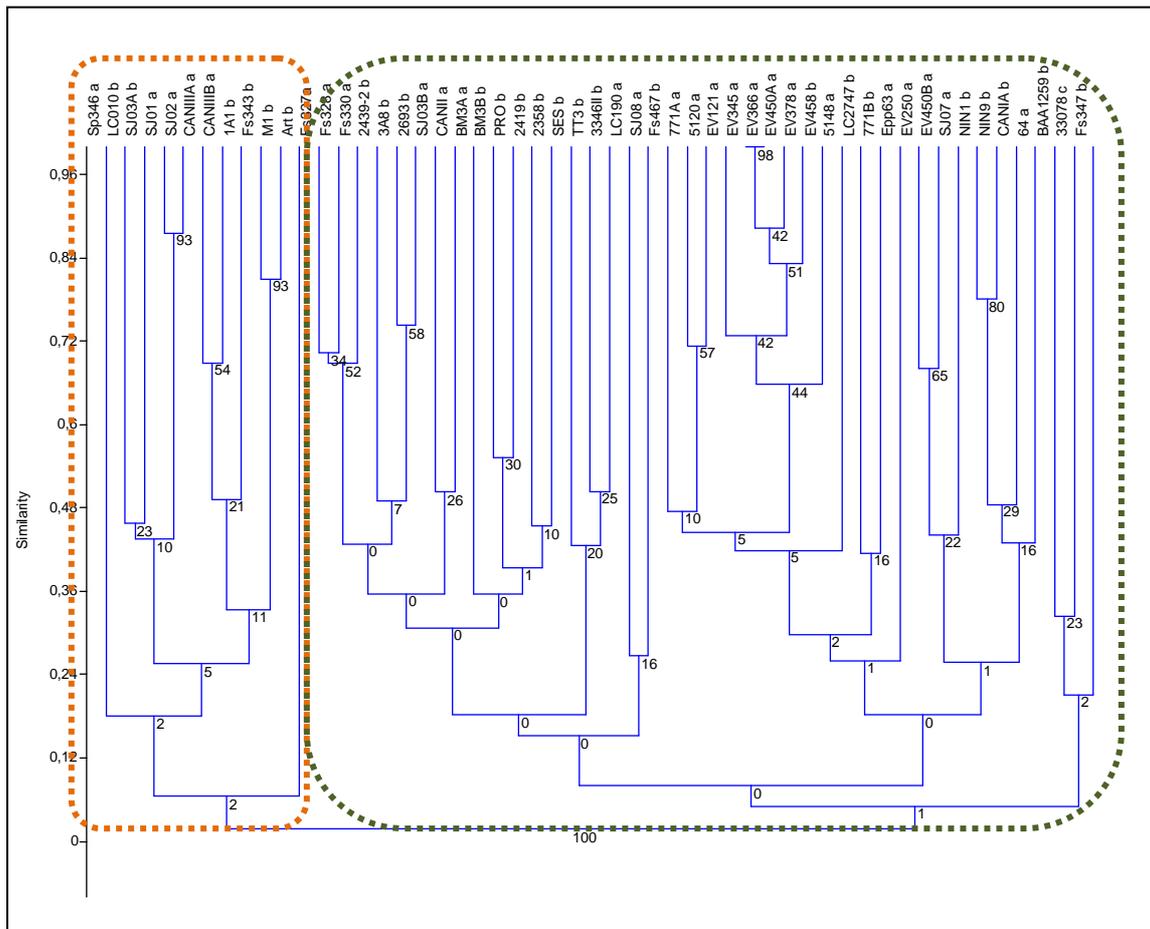


Figura III.4. Dendograma obtenido a partir del análisis por UPGMA, usando coeficiente Rho, del patrón de bandas obtenido al realizar la técnica de BOX-PCR.

a: *M. bovis*, b: *M. bovoculi*. El bootstrap del árbol consenso es producto de 1000 réplicas.

Usando esta técnica de tipificación también se obtuvieron principalmente dos grupos filogenéticos (indicados en color anaranjado y verde en la figura III.4), según lo marca el valor de *bootstrap*, que agruparon aislamientos que no compartieron características en común.

RAPD-PCR

Los patrones de bandas de los aislamientos de *Moraxella* spp. generados por RAPD-PCR cuando se usaron los cebadores JWOPA7 y JWP1 fueron heterogéneos (Figura III.5). Estos cebadores eran la primera vez que se evaluaban en *Moraxella* spp. y fueron capaces de amplificar todos los aislamientos de la colección.

El número de bandas polimórficas obtenido con RAPD-PCR fue de 1 a 12 bandas. Estas bandas se ubicaron en el rango de 250-6000 pb cuando se usó el cebador JWP1 y de 250-5000 pb cuando se usó el cebador JWOPA7. Cuando se realizó RAPD-PCR usando el cebador JWP1 se evaluó el aislamiento LC2852 como grupo externo. Este aislamiento, identificado en este mismo estudio como *Microbacterium schleiferi*, también fue aislado de un brote de QIB y fue considerado microbiota asociada a la conjuntiva bovina. LC2852 presentó un perfil de bandas único que fue similar al generado por los aislamientos de *Moraxella* spp.

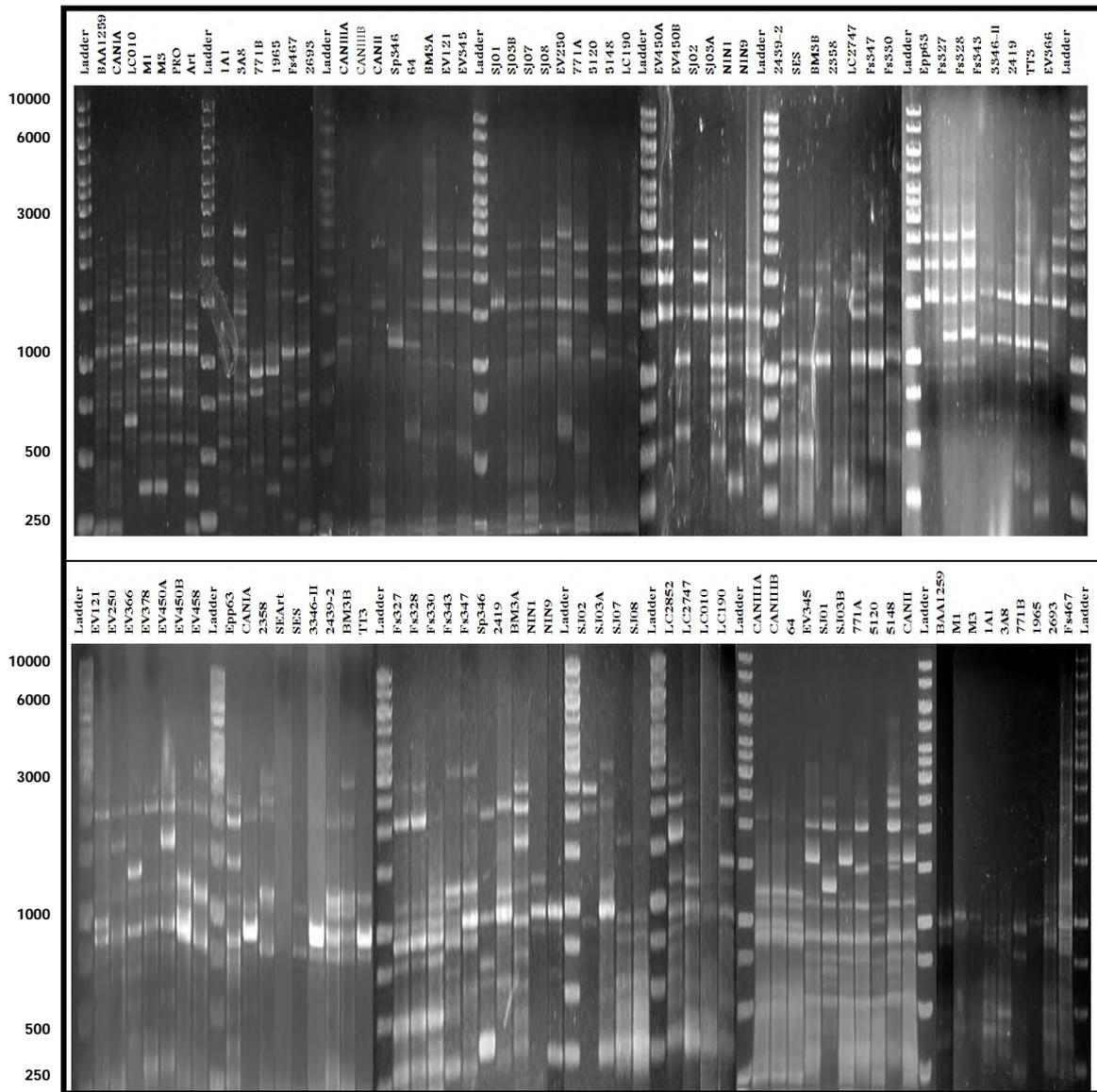


Figura III.5. Patrón de bandas generado por RAPD-PCR usando los cebadores JWOPA7 (figura superior) y JWP1 (figura inferior). Marcador de tamaño molecular (Ladder) 1 kb (Fermentas). Gel de agarosa 0.8%.

En base al análisis de los patrones de bandas generados con los cebadores JWOPA7 y JWP1 se construyeron los dendogramas presentados en la figura III.6, superior e inferior, respectivamente. El elevado número de patrones de bandas diferentes obtenidos indican, como a su vez lo corrobora el valor de *bootstrap* obtenido, que existe una elevada heterogeneidad genética entre aislamientos circulantes en nuestro país

tanto de *M. bovis* como de *M. bovoculi*. Pese a que en este caso también se observaron grupos filogenéticamente definidos (indicados en color anaranjado y verde en la Figura III.6), tampoco fue posible correlacionar los patrones de banda con especie, origen, características fenotípicas u otras características genotípicas de los aislamientos.

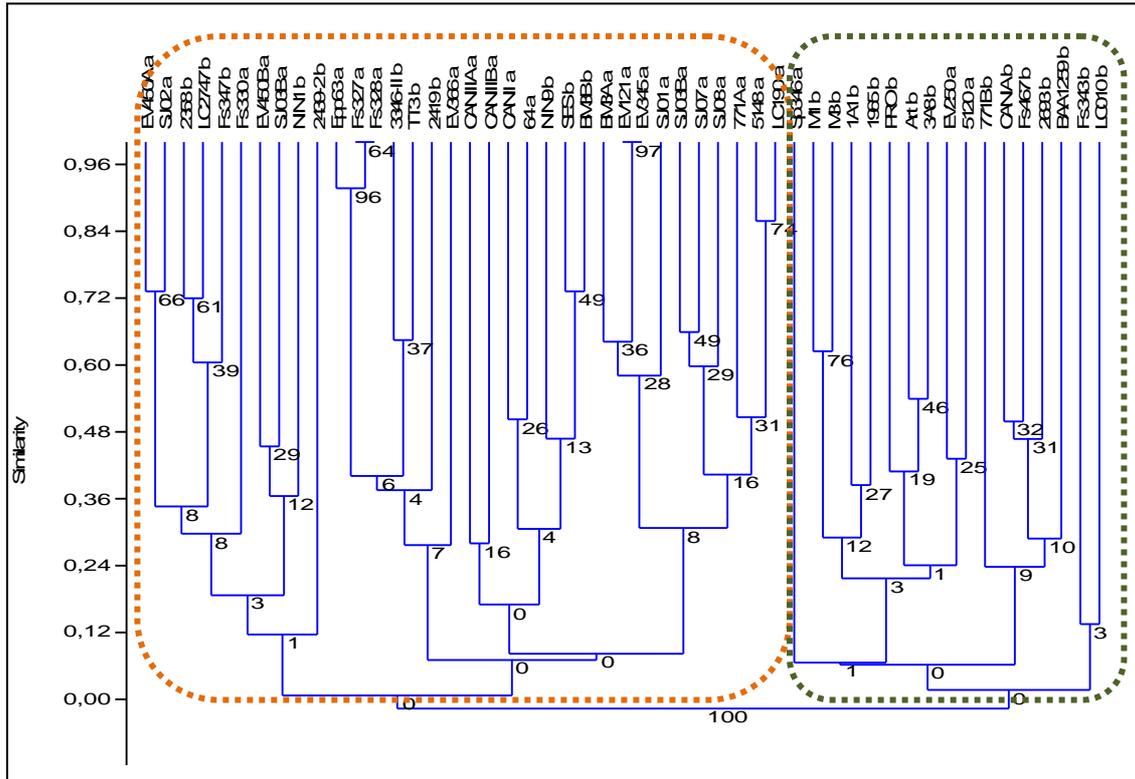
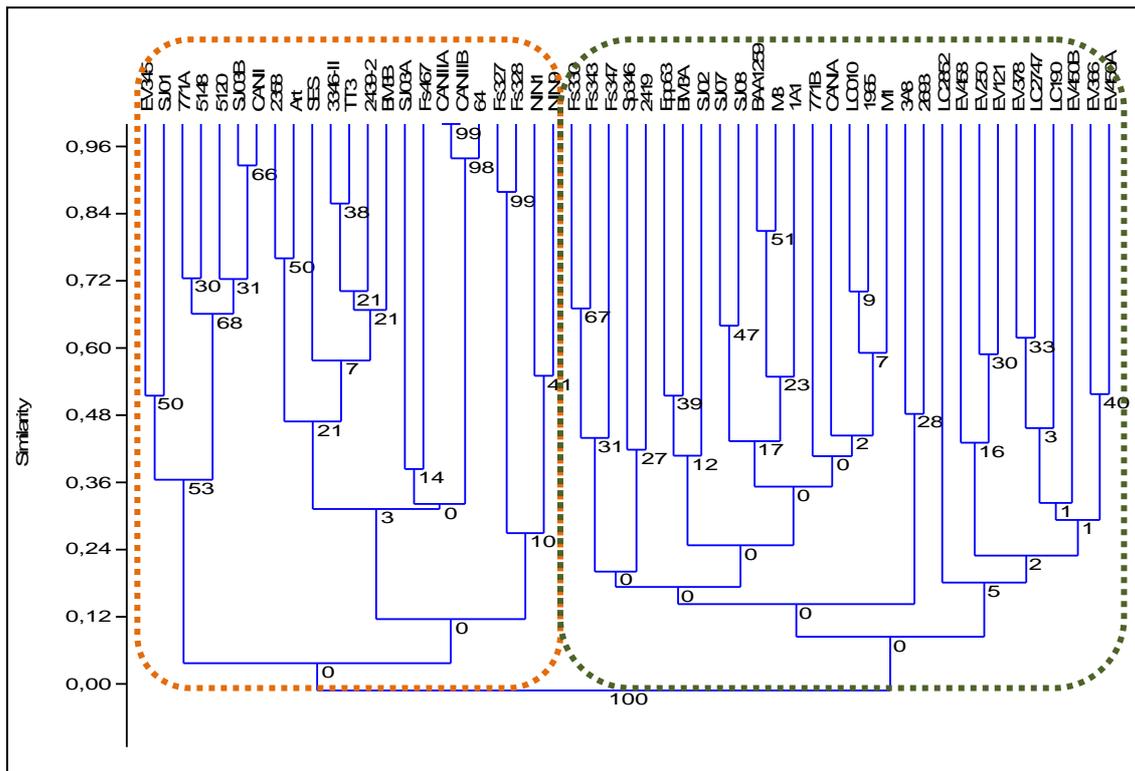


Figura III.6. Dendrograma obtenido a partir del análisis por UPGMA, usando coeficiente Rho, del patrón de bandas obtenido al realizar la técnica de RAPD-PCR con los cebadores JWP1 (panel superior) y JWOPA7 (panel inferior).

a: *M. bovis*, b: *M. bovoculi*. El bootstrap del árbol consenso es producto de 1000 réplicas.

Evaluación de la diversidad molecular por PFGE

De acuerdo a la literatura no existen hasta el momento estudios realizados en los cuales se analice la diversidad de cepas de *M. bovis* o *M. bovoculi* por PFGE. Por este motivo, para la puesta a punto de la técnica se tuvieron presentes lineamientos generales del CDC y protocolos utilizados para cepas de *Moraxella catharralis*. Para la puesta a punto de la suspensión bacteriana se emplearon suspensiones bacterianas correspondientes a la escala MacFarland N° 3, 4,5 y 6. Los resultados obtenidos con las concentraciones correspondientes a la escala MacFarland N° 4,5 y 6 fueron similares en cuanto a la intensidad de banda obtenida, por lo que se eligió la correspondiente a la N°6 para analizar la colección de aislamientos de *Moraxella* spp.

A su vez, se evaluaron dos enzimas de restricción, *XbaI* y *SmaI*, para determinar con cuál de ellas se obtenían mejores resultados. Se escogió la enzima *SmaI* de PROMEGA como la más adecuada para la caracterización de *M. bovis* y *M. bovoculi* ya que produjo bandas claras y bien separadas.

Finalmente, se estableció que una corrida de 20 horas brindaba los mejores resultados.

Corrida de PFGE

La corrida electroforética en campo pulsado se realizó evaluando 24 aislamientos de la colección que incluyeron aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Los resultados de la corrida se presentan en la figura III.7.

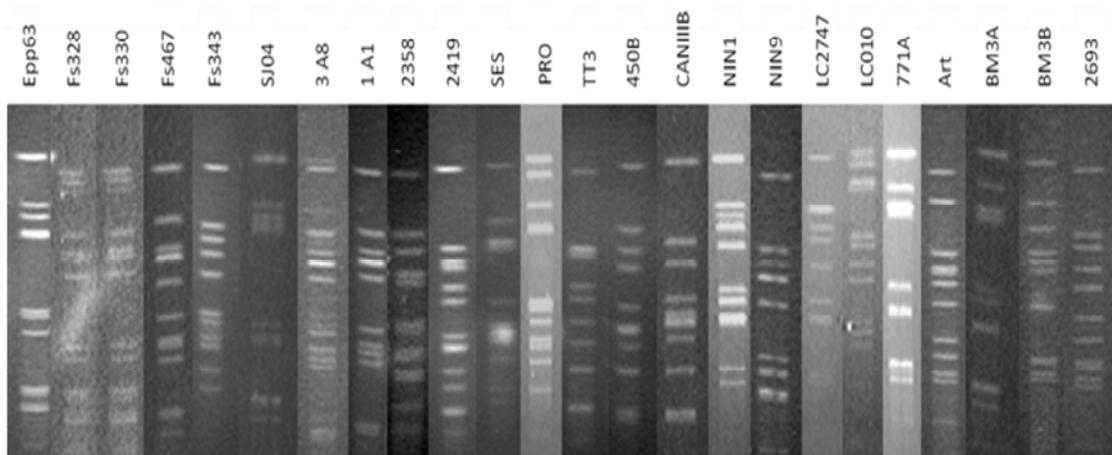


Figura III.7. Patrones de bandas obtenidos usando la técnica de PFGE. Fragmentos de restricción generados por la enzima de restricción *Sma*I.

La digestión con la enzima de restricción *Sma*I generó entre 9 y 12 fragmentos de ADN genómico. En la figura III.8 se presenta el dendograma generado a partir del patrón de bandas generado con la técnica de PFGE y usando el algoritmo UPGMA y la medida de similitud euclidiana.

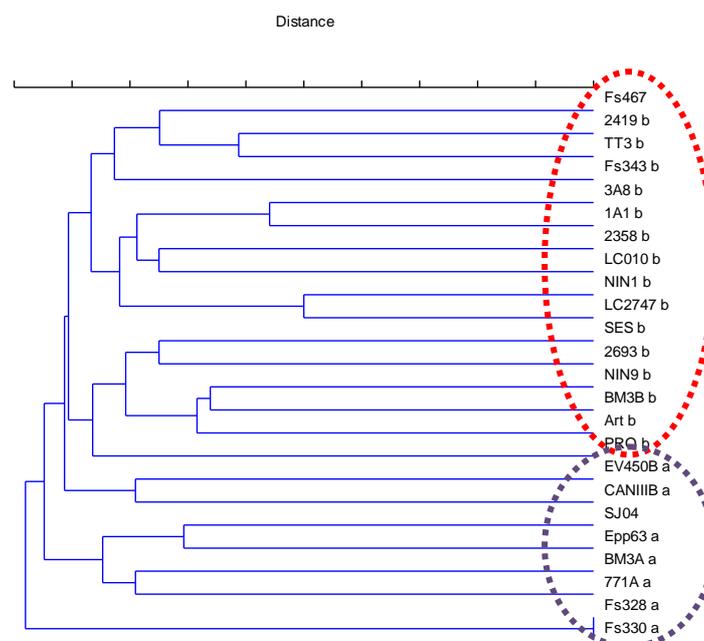


Figura III.8. Dendograma obtenido a partir del análisis por UPGMA del patrón de bandas obtenido al realizar la técnica de PFGE. a: *M. bovis*, b: *M. bovoculi*.

El análisis de patrones de bandas obtenidos con la técnica de PFGE reveló que los aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* se agruparon en *clusters* diferenciados (indicados en círculos de color rojo para el caso de los aislamientos de *M. bovoculi* y en color violeta para el caso de los aislamientos de *M. bovis*).

Diversidad molecular basada en el estudio de la distribución y variabilidad de genes de virulencia

Se seleccionaron cinco genes que codifican factores que estarían involucrados en la virulencia de *M. bovis* y potencialmente en la virulencia de *M. bovoculi*. La amplificación de estos genes por PCR fue evaluada en toda la colección de aislamientos. Estos genes fueron *toIC* (codifica una PME cuya asociación con otras proteínas genera un poro de salida al exterior celular), *omp79* (codifica una PME de 79 kDa involucrada en la captación de hierro), *fur* (gen involucrado en la regulación de la captación de hierro), *mbxA* (gen que codifica una citotoxina) y *plb* (codifica una lipasa/fosfolipasa).

Las fimbrias también son un importante factor de virulencia de *Moraxella* spp. pero la amplificación de los genes que las codifican no fue evaluada dado que se escogieron para su análisis antígenos con mayor probabilidad de estar conservados en los distintos aislamientos. Las fimbrias son antígenos altamente variables, dado por la posibilidad de recombinación sitio específica que tienen así como la existencia de varios serotipos fimbriales, como se mencionó anteriormente.

La distribución de los genes *toIC*, *omp79*, *fur*, *mbxA* y *plb* que codifican potenciales factores involucrados en la virulencia de *M. bovis* y *M. bovoculi* se presentan en la tabla III.1. Se consideró un ensayo negativo cuando no se pudo amplificar el gen luego de tres ensayos independientes dando negativo y sí se pudo amplificar en el control positivo (que en todos los casos fue la cepa Epp63 de *M. bovis*).

Tabla III.1. Distribución de factores de virulencia en aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*

Aislamiento	Origen	Especie	<i>toIC</i>	<i>omp79</i>	<i>fur</i>	<i>mbxA</i>	<i>plb</i>
Epp63	ATCC	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
CANIIIA	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-
CANIIIB	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-
EV250	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
EV450B	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-
Fs327	USA, Kansas	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
Fs328	USA, Kansas	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
Fs330	USA, Kansas	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
Sp346	USA, Kansas	<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-
64	Uy (2009)	<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-
BM3A	Uy, Cerro Largo (2005)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
EV121	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
EV345	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
EV366	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
EV450A	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>	+	-	-	+	-
LC190	Uy, Flores (2006)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
SJ01	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	-
SJ02	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
SJ03B	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
SJ07	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
771A	Uy, Florida (2009)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
CANII	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
SJ08	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+
5120	Uy, Paysandú (2009)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	+
5148	Uy, Paysandú (2009)	<i>M. bovis</i>	+	+	-	+	-
BAA1259	ATCC	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
NIN9	Uy, Tacuarembó (2007)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
BM3B	Uy, Cerro Largo (2005)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	+	+	-
CANIA	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
Fs347	USA, Kansas	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
Fs343	USA, Kansas	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
LC010	Uy, Flores (2006)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
LC2747	Uy, Flores (2006)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
M1	Uy, Rocha (2009)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
M2	Uy, Rocha (2009)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
M3	Uy, Rocha (2009)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
NIN1	Uy, Tacuarembó (2007)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-

PRO	Uy, Canelones (2007)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
3346-II	Uy, Mercedes (1983)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
2419	Uy, Florida (1983)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
Art	Uy, Florida (1983)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
2358	Uy, Salto (2004)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
SES	Uy, Salto (2004)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
SJ03A	Uy, San José (2007)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
TT3	Uy, Treinta y Tres (2007)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
1A1	Uy, Treinta y Tres (2008)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
3A8	Uy, Treinta y Tres (2008)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	+
771B	Uy, Paysandú (2009)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
1965	Uy, San José (2008)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
Fs467	USA, Kansas	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
2439-2	Uy, San José (1983)	<i>M. bovoculi</i>	-	+	-	+	-
2693	Uy (2008)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-
EV458	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovoculi</i>	-	-	-	+	-

+: amplificación del gen; -: no amplificación del gen.

Como se puede observar en la tabla III.1 los genes que codifican los diferentes factores de virulencia de *Moraxella* spp. en estudio se pudieron amplificar en la mayoría de los aislamientos de *M. bovis* y solamente en algunos de los aislamientos de *M. bovoculi*. Estas diferencias observadas probablemente se deban a que los cebadores fueron diseñados en base a la secuencia nucleotídica de aislamientos de *M. bovis* y no de *M. bovoculi* (estos genes no están aún descritos en *M. bovoculi* y no se cuenta con el genoma de *M. bovoculi* aún de libre acceso).

Cuando se analizó la distribución de los genes de virulencia *plb*, *toIC*, *fur*, *mbxA* y *omp79* en la colección de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* no se observó que los aislamientos se agruparan según su origen geográfico (Figura III.9A) o año de aislamiento (Figura III.9B).

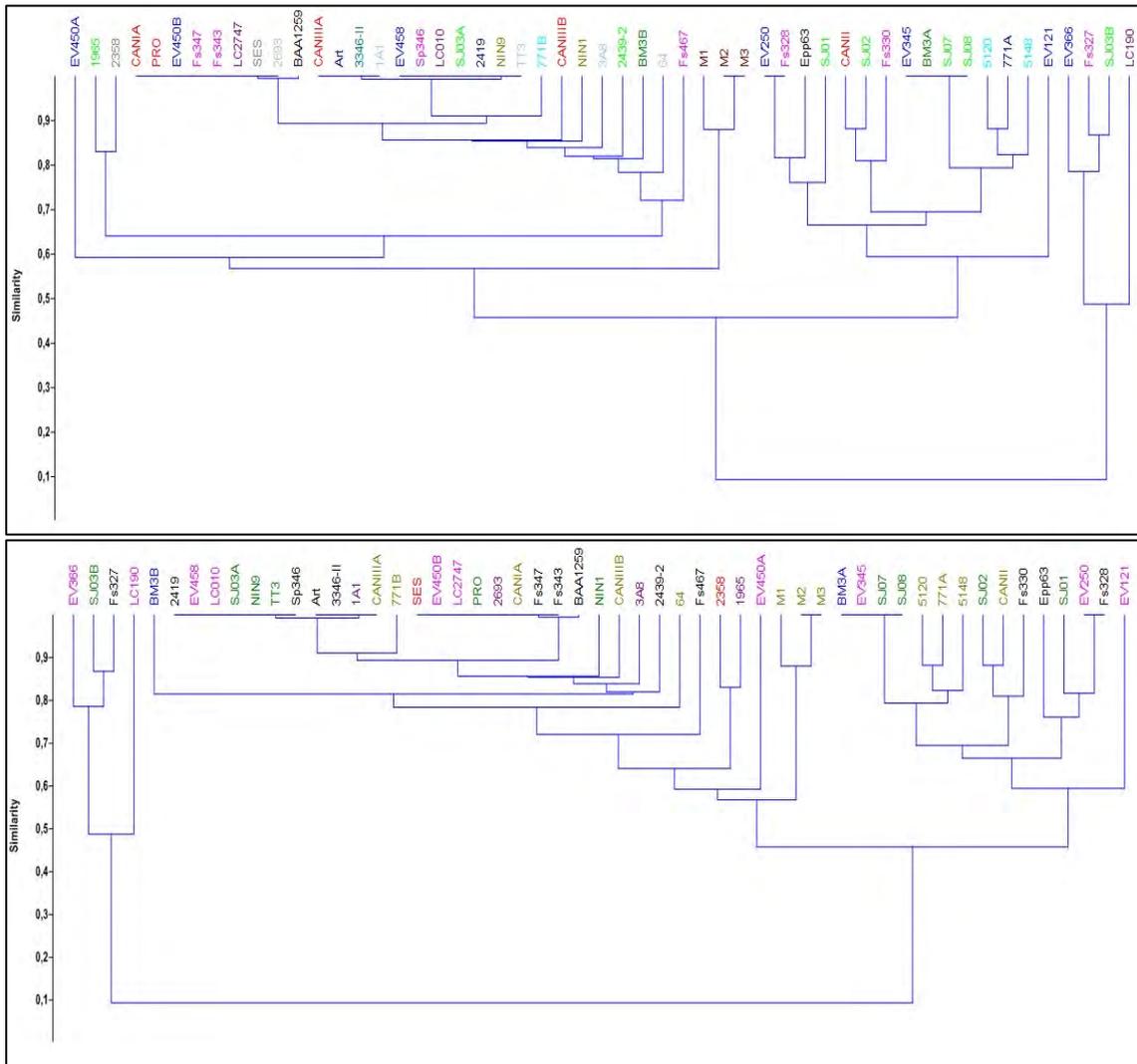


Figura III.9. Dendrograma obtenido a partir del análisis por UPGMA, usando coeficiente Rho, de la distribución de genes codificantes de factores de virulencia en *M. bovis* y *M. bovoculi*. En A los aislamientos se encuentran marcados con diferentes colores dependiendo del origen geográfico. En B los aislamientos se encuentran marcados en diferentes colores dependiendo del año de obtenido el aislamiento.

Distribución y variabilidad del gen *omp79*

El gen *omp79* de *M. bovis* codifica una PME de 79 KDa, IrpA, que se reprime en presencia de hierro (Kakuda *et al.*, 2003a). Este gen tiene 2750 pb de los cuales en este trabajo se amplificaron 1138 pb que fueron de la posición 840 a la 1980 aproximadamente (Figura III.10). El 80% de los aislamientos de *M. bovis* amplificó el gen *omp79*. En *M. bovoculi* se observó la amplificación de este gen en sólo 1 de los 28 aislamientos analizados (3.6% de los casos) (Tabla III.1).

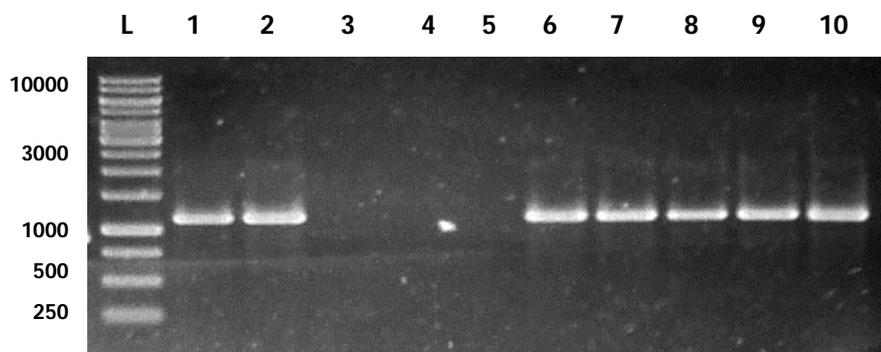


Figura III.10. Amplificación por PCR del gen *omp79*. L: marcador de tamaño molecular (Fermentas 1Kb). Carril 1: Epp63; carril 2: EV366; carril 3: 64; carril 4: CANIIIB; carril 5: BAA1259; carril 6: EV250; carril 7: Fs327; carril 8: Fs328; carril 9: Fs330; carril 10: BM3A.

Todos los genes amplificados fueron purificados, secuenciados y su secuencia editada fue comparada con las que se encuentran en la base de datos del *GenBank*. En todos los casos los genes amplificados presentaron homología (97-100%) con el gen *omp79* descrito para *M. bovis*. Las secuencias nucleotídicas del gen *omp79* fueron alineadas usando el programa ClustalX y en base a esta alineación se estudió la relación filogenética entre los aislamientos (Figura III.11).

A partir del dendograma obtenido y de sus valores de *bootstrap* se pudo observar que filogenéticamente el gen *omp79* estaría conservado solamente en alguno de los aislamientos tal como lo indican los agrupamientos obtenidos (remarcados en violeta en la Figura III.11). No se observaron diferencias notorias cuando se compararon los agrupamientos obtenidos con la secuencia nucleotídica con los obtenidos con las secuencias traducidas. En ninguno de los casos estos agrupamientos estuvieron relacionados con características fenotípicas, de patrones de bandas generados por las técnicas de *DNA fingerprinting*, ni con el año ni lugar de obtenido el aislamiento.

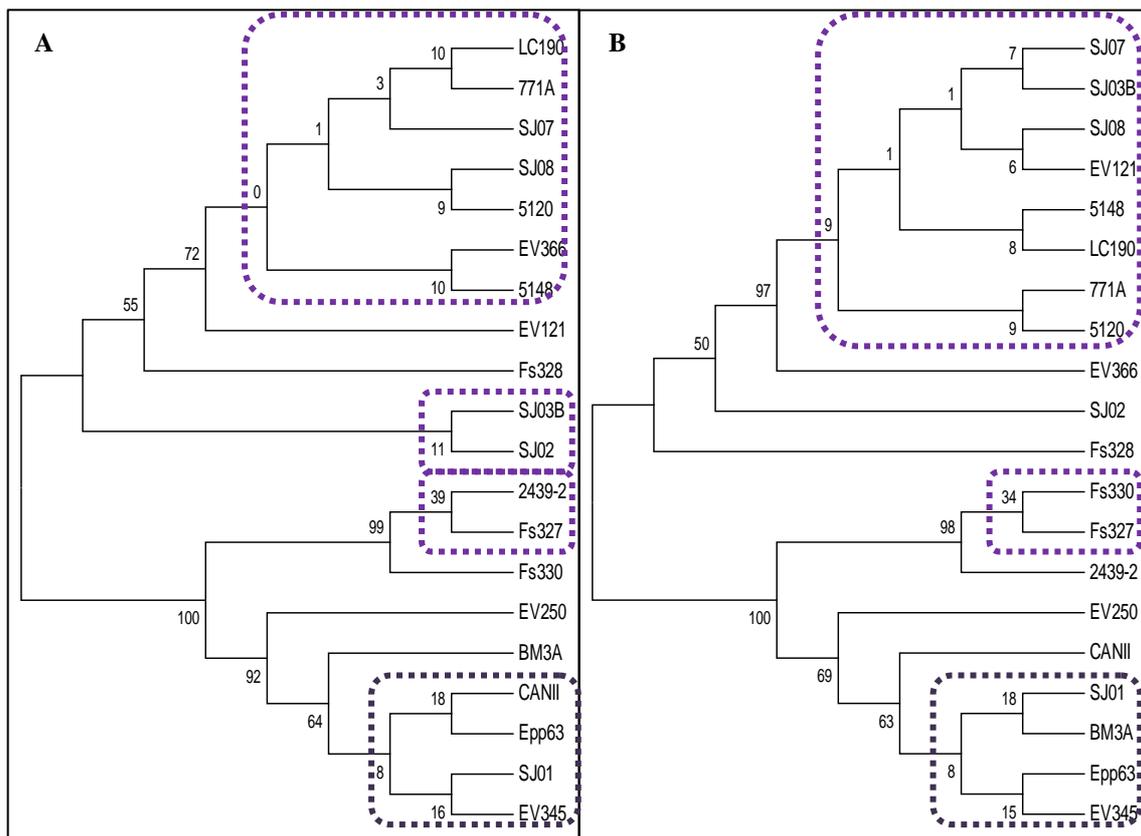


Figura III.11. Filogenia molecular de la secuencia nucleotídica (A) y traducida (B) del gen *omp79* analizada por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 500 réplicas. El tipo de sustitución que se evaluó fue el nucleotídico y el aminoacídico, según correspondiera. Para el análisis de la secuencia nucleotídica se empleó el modelo de Kimura 2-parámetros y para el análisis aminoacídico se empleó el código genético estándar y el modelo de Jones-Taylor-Thornton.

El único aislamiento de *M. bovoculi* que amplificó el gen *omp79*, el aislamiento 2439-2, agrupó con un cepa obtenida en el Estado de Kansas, EE.UU. tanto cuando se analizó la secuencia nucleotídica como cuando se analizó la secuencia traducida.

Distribución y variabilidad del gen *plb*

El gen *plb* de *M. bovis* de 2067 pb codifica una proteína de 616 aa, la fosfolipasa B (Farn *et al.*, 2001). La actividad enzimática de esta proteína sobre fosfolípidos de membrana puede llevar a la lisis de las células eucariotas (Postma *et al.*, 2008). En este trabajo se amplificaron 1360 pb que van de la posición 550 a la 1910 aproximadamente (Figura III.12).

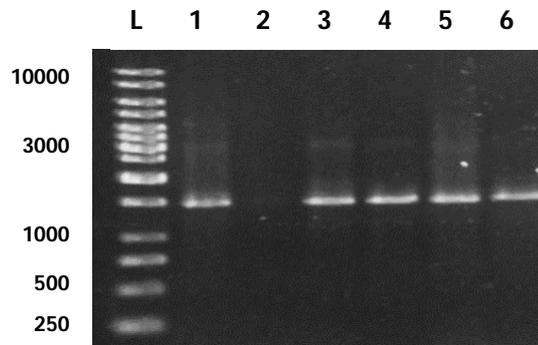


Figura III.12. Amplificación por PCR del gen *plb*. L: marcador de tamaño molecular (Fermentas 1Kb). Carril 1: Epp63; carril 2: BAA1259; carril 3: SJ02; carril 4: EV250; carril 5: Fs330; carril 6: Fs327.

Cuando se analizó por PCR la presencia del gen *plb* en la colección de aislamientos se encontró que el 76% de los aislamientos de *M. bovis* presentaron este gen, mientras que en *M. bovoculi* sólo uno de los 28 aislamientos de la colección lo hizo (3,6%) (Tabla III.1). Una vez que las secuencias fueron amplificadas por PCR se procedió a la

purificación del amplicón observado para su posterior secuenciación. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron procesadas y su homología corroborada con el gen *plb* de *M. bovis* publicado en la base de datos del *GenBank*. Dado que todas las secuencias presentaron homología (mayor del 98%) con el gen *plb* de *M. bovis*, las mismas fueron alineadas usando el programa bioinformático ClustalX. A partir de las secuencias nucleotídicas alineadas se construyeron árboles filogenéticos (basados en la secuencia nucleotídica y la secuencia traducida) para estudiar la relación molecular de los aislamientos basadas en el gen *plb* (Figura III.13). Para la construcción de los árboles se agregó la secuencia nucleotídica del gen *plb* de la cepa Dalton 2d de *M. bovis* (indicada en la Figura III.13 como “secuencia publicada”) accesible en el *GenBank* (N° acceso AY032849.1; Farn *et al.*, 2001).

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen *plb* que codifica para la fosfolipasa B de *M. bovis* demostró que aproximadamente el 50% de estas secuencias estarían conservadas entre de los aislamientos de *M. bovis* (indicadas en la Figura III.13 en color rojo) tanto a nivel nucleotídico como a nivel de secuencias aminoacídicas deducidas. Las diferencias observadas a nivel de la topología del árbol filogenético observado con las secuencias nucleotídicas se mantuvieron a nivel de secuencia traducida. La secuencia nucleotídica de la cepa publicada en el *GenBank* se agrupó con la mayoría de las cepas conservadas.

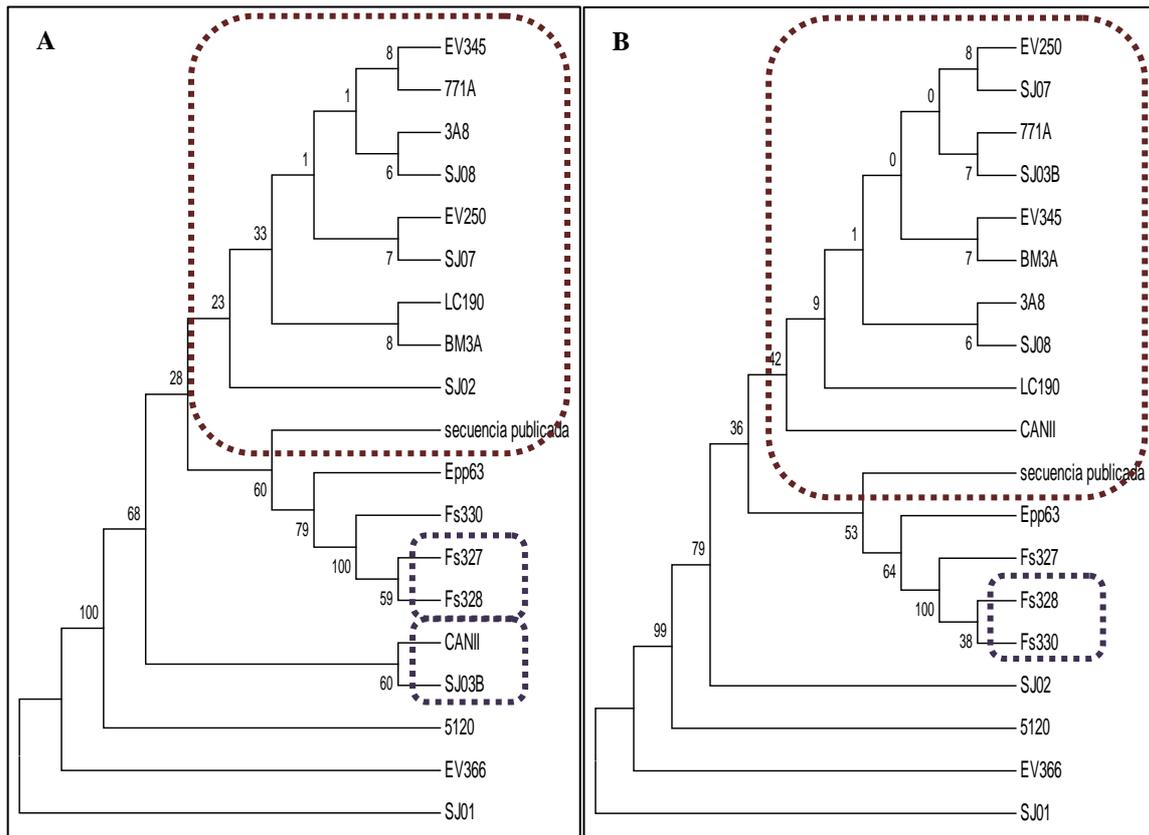


Figura III.13. Filogenia molecular de la secuencia nucleotídica (A) y traducida (B) del gen *p/b* analizada por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 500 réplicas. El tipo de sustitución que se evaluó fue el nucleotídico y el aminoacídico, según correspondiera. Para el análisis de la secuencia nucleotídica se empleó el modelo de Kimura 2-parámetros y para el análisis aminoacídico se empleó el código genético estándar y el modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

Distribución y variabilidad del gen *toC*

El gen *toC* que codifica la proteína TolC de *M. bovis* y que está involucrada en la secreción de la toxina MbxA junto a la acción de las proteínas MbxB y MbxD (Angelos *et al.*, 2001; Wandersman & Delepelaire, 1990), fue evaluado en toda la colección de aislamientos. En este trabajo, de los 1300 pb que posee el gen *toC* se amplificaron 886 pb (Figura III.14).

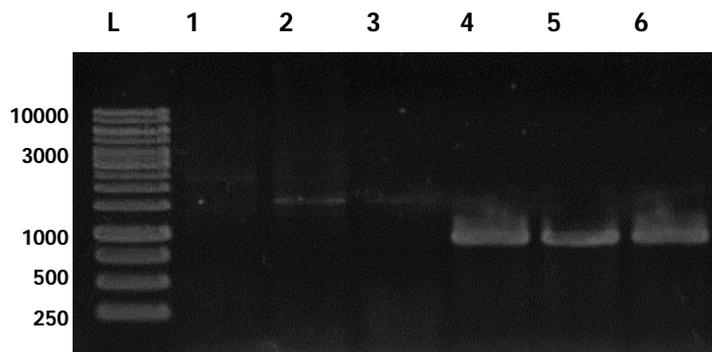


Figura III.14. Amplificación por PCR del gen *toC*. L: marcador de tamaño molecular (Fermentas 1Kb). Carril 1: BAA1259; carril 2: NIN1; carril 3: 64; carril 4: EV250; carril 5: Epp63; carril 6: Fs327.

Se observó amplificación del gen *toIC* en el 84% de los aislamientos de *M. bovis*. No se amplificó este gen en ninguno de los aislamientos de *M. bovoculi* (Tabla III.1). Las secuencias nucleotídicas del gen *toIC* fueron editadas y corroborada su similitud con secuencias publicadas en la base de datos del *GenBank*. Una vez que se comprobó que todas las secuencias presentaban homología (que estuvo entre 97-100%) con el gen *toIC*, las mismas fueron alineadas usando el programa ClustalX. A partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas se construyó un árbol filogenético usando además de las secuencias nucleotídicas de los aislamientos de la colección, secuencias nucleotídicas disponibles en el *GenBank* para genes *toIC* de *Moraxella* spp.. En este sentido, se evaluó la secuencia nucleotídica del gen *toIC* de la cepa Tifton de *M. bovis* (Nº acceso al *GenBank*: AF205359.3), la cepa 237 de *M. bovoculi* (Nº acceso al *GenBank*: DQ155435.1) y la cepa ATCC 33078 de *M. ovis* (Nº acceso al *GenBank*: DQ155443.1) (Figura III.15). Además de estas secuencias se evaluó como secuencia externa la secuencia nucleotídica del gen *plb* que codifica para una fosfolipasa B de la cepa Dalton 2d de *M. bovis* (Nº acceso al *GenBank*: AY032849; Farn *et al.*, 2001).

También se construyó un árbol filogenético empleando para esto la secuencia que se obtiene de la traducción de la secuencia nucleotídica (Figura III.15B). En este caso también se emplearon las secuencias externas que habían sido evaluadas para la construcción del árbol basado en secuencias nucleotídicas.

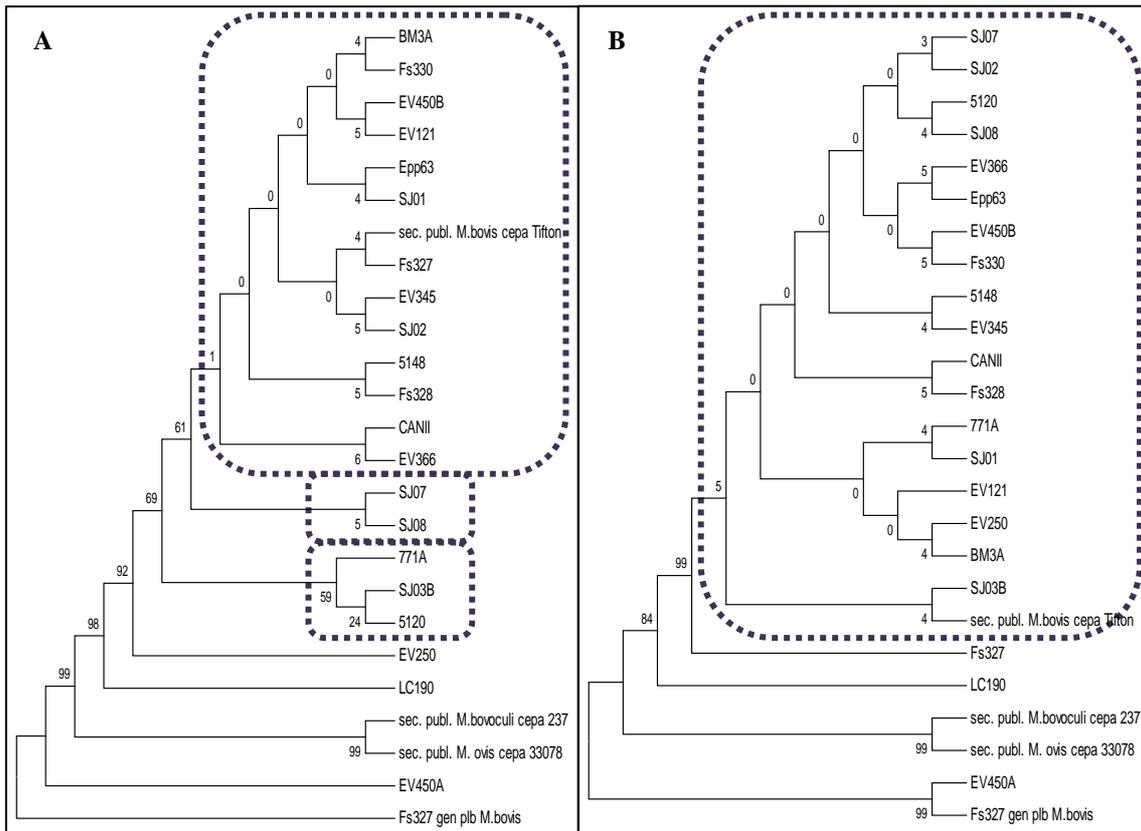


Figura III.15. Filogenia molecular de la secuencia nucleotídica (A) y traducida (B) del gen *toC* analizada por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 500 réplicas. El tipo de sustitución que se evaluó fue el nucleotídico y el aminoacídico, según correspondiera. Para el análisis de la secuencia nucleotídica se empleó el modelo de Kimura 2-parámetros y para el análisis aminoacídico se empleó el código genético estándar y el modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

Como se puede apreciar en la Figura III.15 el 62% de los aislamientos de la colección presentaron homología del gen *toC* a nivel nucleotídico. Este porcentaje fue mayor (86%) cuando se analizó la secuencia traducida de este gen. Estos resultados

demuestran que este gen está conservado en la colección de aislamientos de *Moraxella* spp..

Como se puede apreciar en la figura III.15 A y B la secuencia que codifica para *tolC* de los aislamientos de *M. bovis* de la colección agruparon con la cepa Tifton de *M. bovis* que fue usada como secuencia de referencia. Sin embargo, las secuencias que codifican para el gen *tolC* en *M. bovoculi* y en *M. ovis* no agruparon ni entre ellas ni con ninguna de las secuencias del resto de la colección. La secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen *plb* de *M. bovis* tampoco agrupó con ninguna de las secuencias *tolC* de *M. bovis*.

Distribución y variabilidad del gen *mbxA*

La hemolisina MbxA, codificada por el gen *mbxA* y que fue identificada inicialmente en *M. bovis* y posteriormente fue identificada una homóloga en *M. bovoculi* (en este caso fue llamada MbvA), también es un importante factor de virulencia bacteriano para ambas especies bacterianas (Angelos *et al.*, 2007). El gen *mbxA* fue amplificado tanto en aislamientos de *M. bovis* como en aislamientos de *M. bovoculi*. (Tabla III.1) usando los cebadores P-hem start y New B gene up, previamente empleados por Angelos y Ball (2007b) para estudiar la relación genética entre citotoxinas de *M. bovis* de diferentes orígenes geográficos. Con estos cebadores se obtuvo un amplicón de aproximadamente 3500 pb que incluyó los genes *mbxC* y *mbxB*, los cuales se encuentran adyacentes a *mbxA* (Figura III.16).

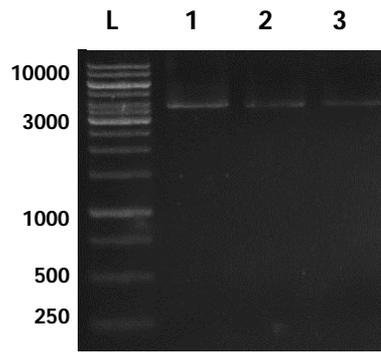


Figura III.16. Amplificación por PCR del gen *mbxA*. L: marcador de tamaño molecular (Fermentas 1Kb). Carril 1: BAA1259; carril 2: Epp63; carril 3: NIN1.

Con las secuencias nucleotídicas editadas, lo primero que se hizo fue corroborar la homología del amplicón obtenido. Posteriormente y con el objetivo de determinar si las secuencias codificantes de la proteína MbxA de *M. bovis* estaban conservadas entre los aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* se compararon las secuencias nucleotídicas y traducidas del gen *mbxA*, figura III.17 y III.18, respectivamente. En este trabajo se estudiaron los extremos 3' y 5' de forma separada y se secuenció al azar el 60% de los aislamientos.

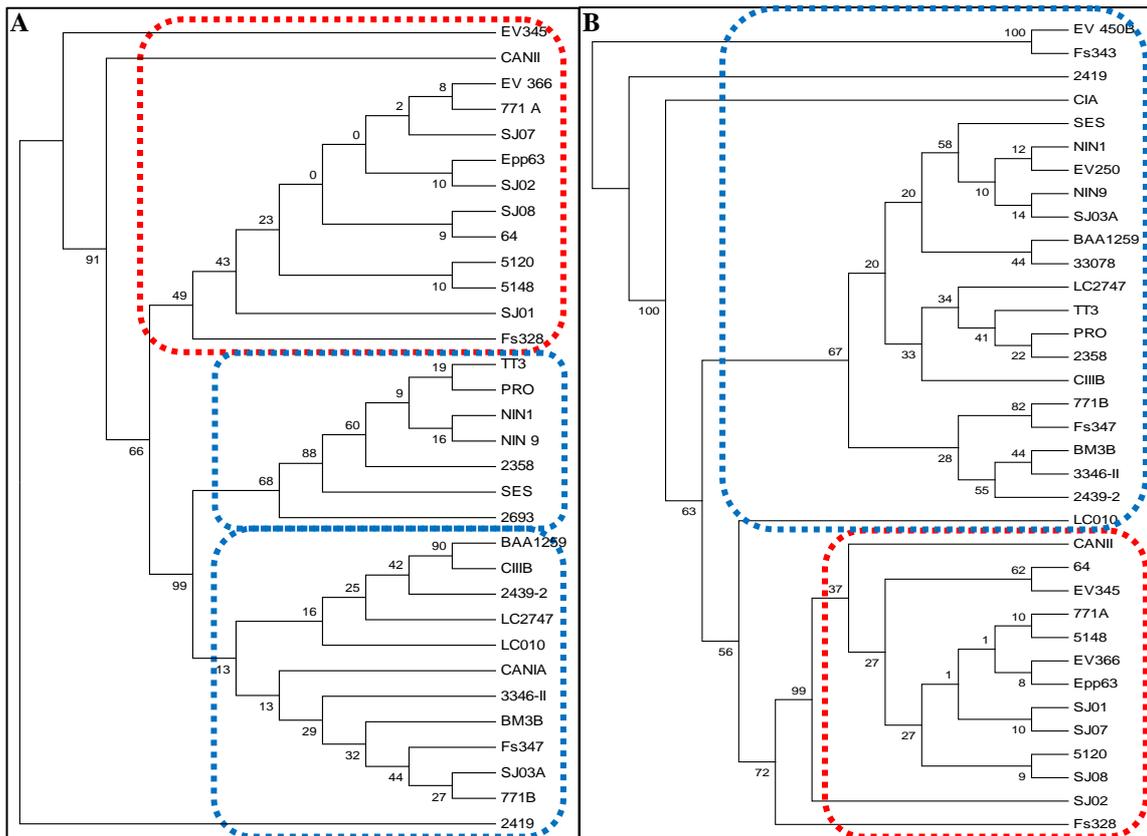


Figura III.17. Filogenia molecular de la secuencia nucleotídica del extremo 5´ (A) y 3´ (B) del gen *mbxA* analizado por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 500 réplicas. El tipo de sustitución que se evaluó fue el nucleotídico y el modelo fue el de Kimura 2-parámetros. En rojo se muestran los aislamientos de *M. bovis*, mientras que en azul se muestran los aislamientos de *M. bovoculi*.

Al analizar la secuencia nucleotídica (Figura III.17) y traducida (Figura III.18) de los extremos 5´ y 3´ del gen *mbxA* se observa que los aislamientos de la colección de *Moraxella* spp. se agrupan mayoritariamente de acuerdo a la especie a la cual pertenecen (en las Figuras III.17 y III.18 se observa en grupos delimitados en rojo los aislamientos de *M. bovis* y en azul los de *M. bovoculi*). Los agrupamientos obtenidos estuvieron respaldados por el valor de *bootstrap* obtenido.

Los aislamientos no solo presentaron diferencias interespecíficas sino también intraespecie (este se puede determinar al observar los valores obtenidos de *bootstrap* dentro de cada especie).

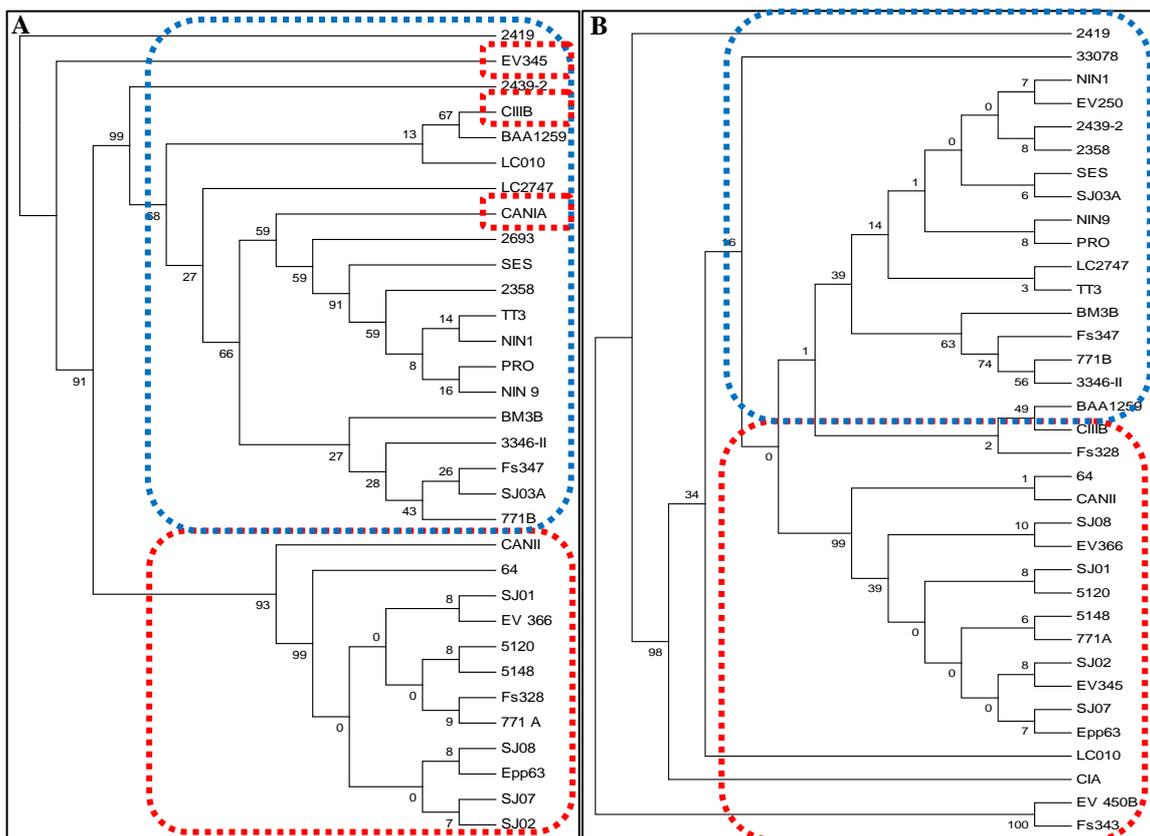


Figura III.18. Filogenia molecular de la secuencia traducida del extremo 5' (panel A) y 3' (panel B) del gen *mbxA* analizado por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 500 réplicas. El tipo de sustitución que se evaluó fue el aminoacídico, el código genético estándar y el modelo fue el de Jones-Taylor-Thornton (JTT). En rojo se muestran los aislamientos de *M. bovis*, mientras que en azul se muestran los aislamientos de *M. bovoculi*.

Distribución y variabilidad del gen *fur*

El gen *fur* de *M. bovis* está involucrado en la adquisición de hierro por este patógeno, cuando el mismo se encuentra en limitación de este elemento en la naturaleza. Este

gen está formado por 729 pb y codifica para una proteína de 151 aa (Kakuda *et al.*, 2003b). En este trabajo de los 729 pb se amplificó un segmento de 338 pb (Figura III.19).

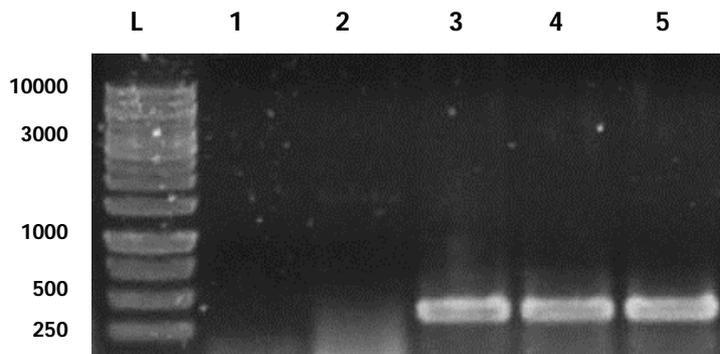


Figura III.19. Amplificación por PCR del gen *fur*. L: marcador de tamaño molecular (Fermentas 1Kb). Carril 1: BAA1259; carril 2: NIN1; carril 3: Epp63; carril 4: LC190; carril 5: SJ07.

La presencia de *fur* fue evaluada en la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. y se encontró que ninguno de los aislamientos de *M. bovoculi* amplificó este gen, mientras que el 44% de los de *M. bovis* sí lo hizo (Tabla III.1). Las secuencias nucleotídicas del gen que codifica la proteína Fur de los distintos aislamientos de *M. bovis* que componen la colección fueron editadas y una vez que se evaluó su homología con secuencias publicadas en el *Genbank* para el gen *fur* (en todos los casos la homología fue mayor del 97%), se las alineó y se estudió su relación filogenética (Figura III.20). En base a los valores de *bootstrap* obtenidos se pudo observar que este gen no se encuentra conservado a nivel de secuencia nucleotídica en los diferentes aislamientos de *M. bovis* de la colección. En el caso de las secuencias traducidas se observó menor

diversidad genética en el gen *fur*, tal como lo determinan los valores de *bootstrap* obtenidos.

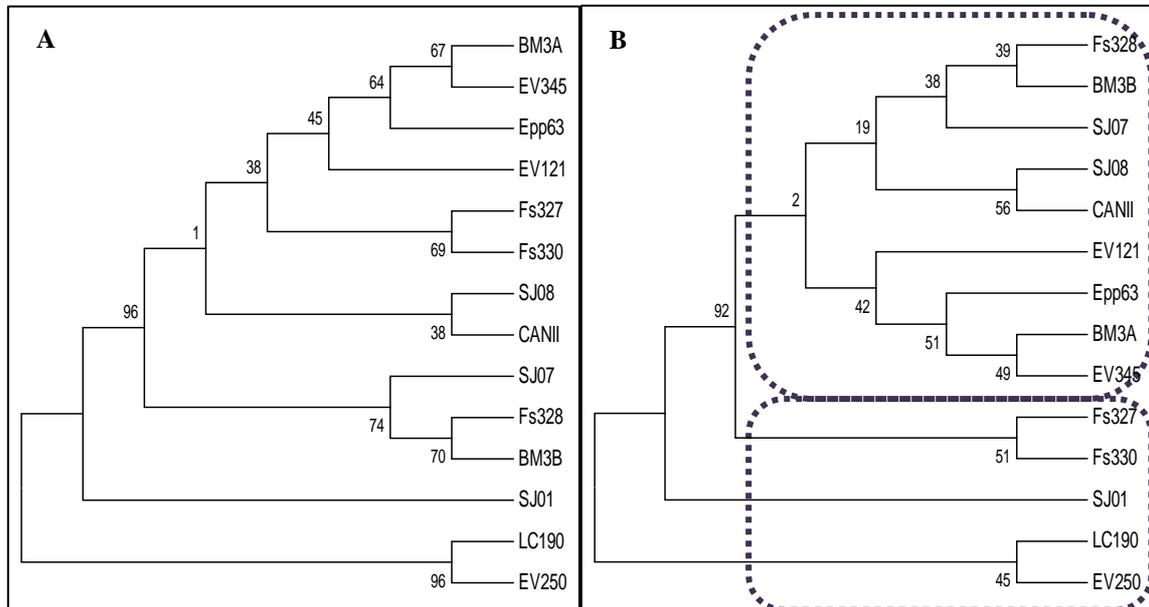


Figura III.20. Filogenia molecular de la secuencia nucleotídica (A) y traducida (B) del gen *fur* analizada por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* del árbol consenso es producto de 500 réplicas. El tipo de sustitución que se evaluó fue el nucleotídico y el aminoacídico, según correspondiera. Para el análisis de la secuencia nucleotídica se empleó el modelo de Kimura 2-parámetros y para el análisis aminoacídico se empleó el código genético estándar y el modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

Análisis global caracterización fenotípica y genotípica

En base a los resultados fenotípicos y genotípicos (sólo se incluyó para el análisis genotípico la distribución de genes que codifican potenciales factores de virulencia de *M. bovis* y *M. bovoculi*) obtenidos se construyó una matriz de 0-1 tal como se detalla en Materiales y Métodos y se evaluó si existían relaciones que permitieran discriminar o relacionar los diferentes aislamientos (Figura III. 21).

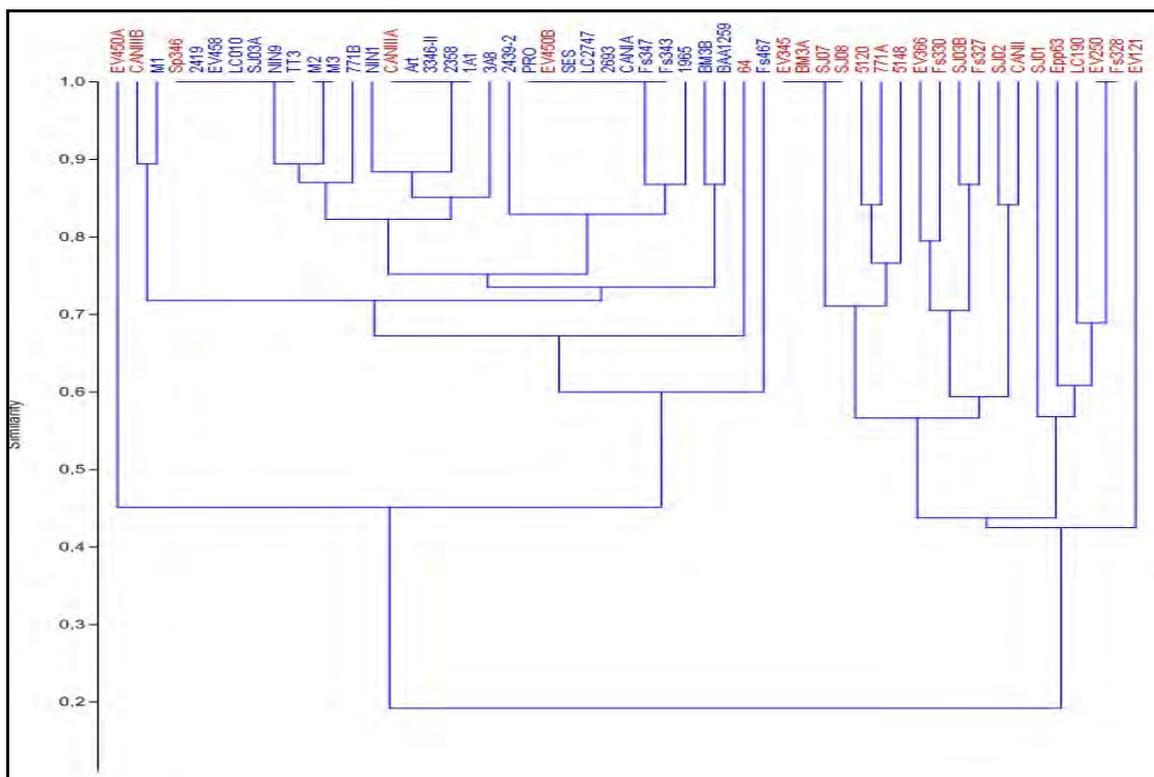


Figura III.21. Análisis de *Cluster* usando UPGMA y coeficiente de similaridad de Rho. Los aislamientos de *M. bovis* se encuentran en color rojo mientras que los aislamientos de *M. bovoculi* se encuentran en color azul.

Se observó que en términos generales los aislamientos de *M. bovis* aparecieron agrupados al igual que lo que sucedió con los aislamientos de *M. bovoculi*. Estos resultados es altamente probable que estén condicionados a la no amplificación de los genes *omp79*, *fur*, *toIC* y *plb* en aislamientos de *M. bovoculi*.

Dentro del grupo de aislamientos de *M. bovis* no se observó ningún aislamiento de *M. bovoculi*. Sin embargo, dentro del grupo de *M. bovoculi* sí se observaron cinco aislamientos de *M. bovis*. Cuatro de estos aislamientos de *M. bovis* que agruparon con *M. bovoculi* (EV450A, EV450B, CANIIIA y CANIIIB) fueron capaces de formar *biofilms* (esta capacidad estuvo presente en sólo 5 aislamientos de *M. bovis*). Otra característica que comparten estos aislamientos es que en los cinco casos ninguno amplificó los

genes *omp79*, *fur* y *plb*. Cuatro de ellos tampoco fueron capaces de amplificar *tolC*, mientras que uno sí lo hizo (EV450A)

4. Discusión

Para un exitoso programa inmunoproláctico es necesario analizar la divergencia entre las cepas que conforman las vacunas y las cepas circulantes ya que se ha propuesto que la inmunización favorece la selección de cepas que son diferentes de las cepas componentes de vacunas. Es importante que las vacunas incluyan la mayor diversidad de cepas circulantes para que el espectro de protección de las mismas sea el mayor posible. Por lo tanto, conocer la diversidad genética de cepas de *Moraxella* spp. involucradas en el establecimiento y desarrollo de la QIB permitirá desarrollar vacunas más eficientes contra la enfermedad.

En este capítulo de la Tesis se evaluó la diversidad genotípica de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. empleando para esto diferentes aproximaciones. Por un lado, se evaluó la diversidad en lo que respecta a la generación de patrones de ADN-*fingerprinting* resultado de las técnicas de ERIC-PCR, BOX-PCR, RAPD-PCR y PFGE. Por otro lado, se analizó la distribución y variabilidad de genes que codifican para factores de virulencia de *M. bovis* y posibles marcadores patogénicos de *M. bovoculi* como lo son los genes *omp79*, *plb*, *tolC*, *mbxA* y *fur*.

Cuando la diversidad genotípica de los aislamientos fue analizada usando RAPD-PCR, una alta heterogeneidad de patrones de bandas fue observado. Este resultado fue similar al obtenido por Conceição y colaboradores (2004) cuando analizaron una colección de cepas clínicas de *M. bovis* obtenidas de Argentina, Brasil y Uruguay usando la misma técnica pero con otros cebadores y un número menor de aislamientos.

Se encontró que secuencias tanto del tipo ERIC como BOX están presentes en el genoma de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Cuando la colección de aislamientos fue analizada por ERIC-PCR, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Prieto y colaboradores (1999). Estos autores analizaron cepas de *M. bovis* obtenidas de Argentina y observaron un alto grado de heterogeneidad intraespecífica. Por otro lado, la técnica de BOX-PCR fue usada por primera vez para tipificar cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Los resultados obtenidos indicaron que BOX-PCR permitió tipificar las diferentes cepas y que la heterogeneidad intra-específica fue alta y no fue posible correlacionar perfiles de bandas y características de las cepas. Este resultado fue similar al obtenido en el caso de RAPD y ERIC-PCR.

Con respecto a PFGE se logró poner a punto la técnica por primera vez para el análisis de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Los resultados obtenidos con la técnica de PFGE fueron una primera aproximación dado que no se evaluó la totalidad de la colección de aislamientos. Se encontró una gran diversidad genética por lo que no fue posible agrupar a los aislamientos en base a su origen geográfico o espacial, pero sí se observó una tendencia a agrupar los aislamientos en base a su especie.

Este es el primer trabajo que describe la diversidad genotípica de *M. bovoculi* usando distintas técnicas de ADN-*fingerprinting*. Los resultados obtenidos indicaron que no existió una relación entre origen geográfico y/o temporal de los aislamientos, atributos asociados a la patogenicidad de *M. bovis* y *M. bovoculi* y los perfiles de ADN-*fingerprinting* obtenidos. En general, todas las técnicas evaluadas produjeron complejos patrones de ADN-*fingerprinting* para todos los aislamientos evaluados mostrando un alto poder discriminatorio para la tipificación de *Moraxella* spp. Esta amplia diversidad genética probablemente esté asociado a la facilidad de intercambio o rearrreglo genéticos de aislamientos de *Moraxella* spp. asociados a brotes clínicos de QIB. Los resultados obtenidos en este trabajo ratifican la necesidad de realizar monitoreos para evaluar la situación en forma periódica y optimizar las estrategias de elaboración de vacunas e inmunización contra la QIB.

Para avanzar en la comprensión de los mecanismos de *Moraxella* spp. involucrados en la patogénesis de la QIB, así como para plantear estrategias de tratamiento o inmunización también es importante determinar la distribución y variabilidad de genes codificadores de potenciales factores de virulencia presentes en *M. bovis* y *M. bovoculi*. En este sentido se evaluaron genes codificantes de factores de virulencia en *M. bovis* y potencialmente en *M. bovoculi* que se encontrarían relacionados con la patogénesis de la QIB causada por estos patógenos. Estos antígenos deben estar conservados entre la mayoría de los aislamientos clínicos locales para poder tener un papel efectivo en la prevención de la enfermedad.

La mayoría de los genes en estudio fueron amplificados mayoritariamente en *M. bovis*. Este fue el caso de los genes *omp79*, *plb*, *tolC* y *fur*. Estos resultados no significan que

los aislamientos de *M. bovoculi* no presenten estos genes, pero sí que probablemente existan diferencias en sus secuencias que no le permitieron a los cebadores, diseñados en base a las secuencias nucleotídicas publicadas de *M. bovis*, amplificar el ADN de los aislamientos de *M. bovoculi*. Al momento de realizar este trabajo aún no se contaba con el genoma secuenciado de *M. bovis* y *M. bovoculi* por lo cual, el diseño de cebadores se realizó teniendo en cuenta las secuencias nucleotídicas de genes publicados en el *GenBank* que correspondieron a *M. bovis*.

En el caso de los genes *tolC*, *omp79*, *plb* y *fur* se observó que la secuencia nucleotídica que los codifica presenta diversidad genética en la colección de aislamientos de *M. bovis*. En el caso de estos genes, se observó que las secuencias traducidas estuvieron más conservadas que las secuencias nucleotídicas. Este resultado es de esperar ya que un aminoácido puede estar codificado por más de un triplete de nucleótidos.

El gen *mbxA* fue el único que pudo ser amplificado en la totalidad de la colección de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Este resultado era de esperar ya que éste fue un criterio de inclusión. A pesar de que este gen presentó diversidad intraespecífica e interespecífica, a partir de este trabajo se puede sugerir que las hemolisinas serían los mejores componentes de vacunas basadas en subunidades proteicas dado que se encontró que este gen fue el único que se pudo amplificar en el 100% de la colección de aislamientos con el mismo conjunto de cebadores. Considerar el producto de este gen como candidato de vacunas había sido previamente propuesto por Angelos y Ball (2007b).

El análisis realizado en base a los resultados de la caracterización fenotípica y genotípica de factores de virulencia en la colección de aislamientos demostró que los

mismos no se agruparían en base al origen del cual fueron obtenidos ni al año de obtenidos así como tampoco a las características patogénicas de los mismos. Las diferencias fenotípicas y genotípicas que se observaron en los aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* es importante que sean tenidas en cuenta al momento del diseño de estrategias de tratamiento y prevención de la QIB.

Parte de los resultados presentados en este Capítulo fueron publicados en *The Journal of Infection in Developing Countries* (V. Sosa, P. Zunino. "Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay", 7: 819-824; 2013).

CAPÍTULO IV

A

NALÍISIS DE LA BIOTA BACTERIANA
ASOCIADA A BROTES DE QIB

1. Antecedentes

La biota bacteriana y fúngica de la conjuntiva sana ha sido estudiada en diversas especies animales, incluyendo perros, gatos, ovejas, llamas, cerdos, caballos, bisontes, conejos, pájaros, ciervos, zarigüeyas y mapaches (Cooper *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 1994; 1999; Dubay *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1988; Pinard *et al.*, 2002). La población bacteriana de ojos sanos está compuesta predominantemente por microorganismos Gram positivos (Dupont *et al.*, 1994; Haghkhan *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2005). En general, se considera que la presencia de hongos en la conjuntiva de diversos animales es transitoria y podría ser explicada por la exposición de los animales al medio ambiente (Gerding *et al.*, 1993). Sin embargo, frecuentemente se aíslan hongos en equinos y bovinos dado que el ambiente en el cual habitan contiene alta concentración de materia orgánica. *Aspergillus* spp. es el hongo más frecuentemente aislado y la infección con este potencial patógeno puede provocar trauma ocular (Samuelson *et al.*, 1984).

Con respecto a la biota conjuntival bacteriana normal de bovinos, Barbar y colaboradores (1986) estudiaron la flora normal de terneros sanos y encontraron que *M. bovis*, *Moraxella catarrhalis* y *Mycoplasma bovoculi* serían los principales componentes de la biota normal bovina. Por otro lado, Sarma y colaboradores (1989) aislaron en la biota normal de bovinos principalmente *Streptococcus* spp. y en menor proporción *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium bovis* y *Micrococcus* spp..

Los microorganismos que habitan la superficie externa del ojo pueden jugar un papel fundamental en los mecanismos de defensa. Estos microorganismos pueden proteger los ojos secuestrando los nutrientes de los organismos invasores o mediante la secreción de sustancias con propiedades antimicrobianas (Eichenbaum *et al.*, 1987; Chandler & Gillette, 1983). En este sentido, se ha demostrado que *Staphylococcus* spp. produce lisis y agentes inhibidores de microorganismos (Hsu & Wiseman, 1967). Estos agentes son activos contra un gran número de bacterias Gram positivas y en menor número contra bacterias Gram negativas.

Desbalances en la biota microbiana normal pueden ocurrir luego del tratamiento con antibióticos o cuando los mecanismos de defensa inmune del hospedador están comprometidos (Gerding & Kokamo, 1990). Esto puede favorecer la colonización microbiana así como la selección de especies resistentes a antibióticos. Esta colonización puede ser por microorganismos que se conformaban la biota del animal sin sintomatología clínica de infección (Gerding *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 1978).

Tradicionalmente se ha considerado a *M. bovis*, perteneciente a la familia Moraxellaceae, como el agente etiológico de los brotes de QIB (Baptista, 1979; Gil Turnes & Albuquerque, 1984). Estudios recientes han establecido la existencia de otras especies pertenecientes al género *Moraxella*, *M. ovis* (anteriormente denominada *Branhamella ovis*) y *M. bovoculi* asociadas a brotes de QIB, aunque aún no se ha establecido su papel en la etiología y patogénesis de la enfermedad (Angelos *et al.*, 2007; Elad *et al.*, 1988).

Un estudio realizado por Hare y colaboradores (2008) encontró que *Moraxella* spp. se aisló en muy baja proporción de animales con QIB. Otros microorganismos se encontraron con mayor frecuencia asociados a brotes de QIB. Dentro de estos se

encontró *Exiguobacterium acetylicum*, *Arthrobacter gandavensis* y *Arthrobacter luteolus*, que son bacilos Gram positivos, difíciles de identificar y cuyo hábitat puede ser el suelo pero que se han adaptado a vivir en condiciones adversas. También se aisló *Pseudomonas* spp, un patógeno asociado a diferentes enfermedades de vacunos; *Aeromonas* spp., un patógeno Gram negativo descrito como el agente etiológico de diversas enfermedades animales y *Acinetobacter* spp., una bacteria distribuida ampliamente en la naturaleza, principalmente en el suelo (Hare *et al.*, 2008).

2. Objetivos

Identificar componentes de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB utilizando técnicas microbiológicas clásicas así como técnicas moleculares.

3. Resultados

En este trabajo se escogieron 20 aislamientos con el objetivo de analizar fenotípica y genotípicamente componentes de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB. Estos aislamientos son parte de este trabajo y se detallan sus características geográficas y

espaciales en la Tabla 1. Se seleccionaron colonias cuyas características macroscópicas no correspondían con las descritas para *Moraxella* spp.. El criterio de selección de las mismas fue que hubiese al menos tres colonias iguales por placa.

Características fenotípicas de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB

A los aislamientos de brotes de QIB, no identificadas como *Moraxella* spp., se les evaluó su tipo de tinción al realizar la técnica de Gram y sus características celulares al observarlas al microscopio óptico (Tabla IV-1).

Tabla IV-1. Características morfológicas de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB

Cepa	Tinción de Gram	Forma celular	Asociación celular
Fs337	Positivo	Cocos	Pares, tétradas
2959	Negativo	Cocobacilos	Pares o cadenas
SER	Positivo	Bacilos	Solos, pares o cadenas
FVL	Negativo	Coco	Pares
3346-I	Negativo	Bacilo	Pares
BM5A	Negativo	Cocobacilos	Pares o cadenas
BM5B	Positivo	Cocos	Pares o cadenas
BM6	Positivo	Cocos	Solos, cortas cadenas
EV083	Negativo	Cocobacilos	Pares
EV094	Positivo	Bacilos	Ramificados
EV228	Positivo	Coco	Cadenas
EV541	Positivo	Coco	Pares
LC3718	Positivo	Bacilos	Cortos, aislados
LC2842	Positivo	Bacilos	Pares
LC2694	Positivo	Cocobacilo	Pares
LC2680	Positivo	Bacilos	Cadenas
LC2852	Positivo	Cocobacilos	Cadenas
LC008	Positivo	Coco	Cadenas
SJ04	Negativo	Coco	Pares
CANVIA	Positivo	Cocobacilos	Pares

La mayoría de las bacterias aisladas (14 de un total de 20) fueron Gram positivas. Se encontró una amplia diversidad de tipos de colonias, tanto en lo que respecta a su tamaño como a su coloración. La forma celular y su tipo de asociación también abarcaron un amplio espectro.

Una vez determinadas las características morfológicas microscópicas, se estudiaron las características bioquímicas de la colección de aislamientos (Tabla IV-2).

Tabla IV-2. Características bioquímicas de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB

Aislamiento	Ureasa	Movilidad	Catalasa	Oxidasa	Hemólisis	Indol	DNasa	FD	Gelatinasa	McC	FERMENTACIÓN		
											TSI		GAS
											Pico	Fondo	
Fs337	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	Ac	Ac	-
2959	-	-	+	-	-	-	-	+	-	ND	Alc	Alc	-
SER	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	+	Ac	Ac	-
FVL	-	+	+	-	-	-	ND	-	+	+	Ac	Ac	-
3346-I	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	Alc	Alc	-
BM5A	-	-	+	-	ND	ND	+	+	-	ND	ND	ND	ND
BM5B	ND	-	+	+	+	-	+	ND	+	+	Ac	Ac	-
BM6	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
EV083	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	Ac	A1c	-
EV094	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	ND	ND	-
EV228	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	Ac	Ac	-
EV541	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	ND	ND
LC3718	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	Alc	Alc	-
LC2842	-	-	+	ND	-	+	-	-	-	-	Alc	Alc	-
LC2694	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Alc	Alc	-
LC2680	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Alc	Alc	-
LC2852	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	Alc	Alc	-
LC008	ND	-	+	-	+	ND	ND	-	+	-	Ac	Ac	-
SJ04	ND	-	+	-	+	ND	-	-	-	+	Alc	Alc	-
CANVIA	+	-	+	-	-	-	ND	-	ND	-	Alc	Alc	-

Abreviaciones: FD expresión de fenilalanina desaminasa; McC crecimiento en medio MacConkey; + reacción positiva; - reacción negativa, ND no determinado.

Características genotípicas de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB

Para conocer la identidad molecular de los aislamientos asociados a brotes de QIB y no pertenecientes al género *Moraxella* se realizó la extracción de ADN de la colección de aislamientos y el mismo se utilizó para amplificar por PCR el gen que codifica para el ADNr 16S usando los cebadores 1492r y 27f. El amplicón obtenido fue purificado y secuenciado. Las secuencias obtenidas fueron editadas usando el programa bioinformático *DNA Baser* y comparado su secuencia con secuencias publicadas en la base de datos del *GenBank* (Tabla IV-3).

Tabla IV-3. Identificación molecular de la biota bacteriana asociada a casos de QIB

Cepa	Descripción	Puntaje	% Secuencia cubierta	% Identidad
Fs337	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2582	97%	99%
2959	<i>Acinetobacter</i> spp.	2054	75%	99%
SER	<i>Desemzia incerta</i>	2532	100%	99%
FVL	<i>Pantoea</i> spp.	1376	98%	84%
3346-I	<i>Pseudomonas</i> spp.	1413	89%	97%
BM5A	<i>Acinetobacter</i> spp.	2577	99%	99%
BM5B	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	2601	99%	99%
BM6	<i>Granulicatella</i> spp.	1982	95%	93%
EV083	<i>Pasteurella multocida</i>	2608	98%	99%
EV094	<i>Cellulomonas</i> spp.	1864	100%	91%
EV228	<i>Staphylococcus</i> spp.	2449	99%	98%
EV541	<i>Cellulomonas flavigena</i>	2433	99%	98%
LC3718	<i>Aeromicrobium</i> spp.	2407	97%	98%
LC2842	<i>Microbacterium</i> spp.	2358	99%	99%
LC2694	<i>Trueperella pyogenes</i>	1572	97%	88%
LC2680	<i>Microbacterium</i> spp.	2370	98%	98%
LC2852	<i>Microbacterium schleiferi</i>	2368	96%	98%
LC008	<i>Staphylococcus</i> spp.	2519	98%	99%
LC009	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	2564	99%	99%
SJ04	<i>Acetobacter</i> spp.	2021	100%	99%
CANIB	<i>Desemzia incerta</i>	2610	100%	100%
CANVIA	<i>Arthrobacter</i> spp.	2200	98%	95%
CANVIB	<i>Desemzia incerta</i>	2663	100%	99%

La caracterización fenotípica ya había sugerido una amplia diversidad de géneros y especies bacterianas asociadas a brotes de QIB. Esto fue corroborado por la secuenciación del gen ADNr 16S. Entre las bacterias identificadas luego de la secuenciación encontramos aquellas que son patógenos o potencialmente patógenos de animales y/o humanos como *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus pluranimalium*, *Granulicatella* spp., *Pasteurella multocida*, *Trueperella pyogenes*, *Acinetobacter* spp., *Pantoea* spp. y *Pseudomonas* spp. y otras que son componentes de la biota ambiental como *Desemzia incerta* y *Cellulomonas* spp..

Las secuencias nucleotídicas de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB fueron alineadas usando el programa bioinformático ClustalX y evaluada su relación filogenética empleando el programa MEGA (Figura IV-1) con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Kimura 2-parámetros. En el estudio filogenético se incluyeron todas las cepas obtenidas de brotes clínicos de QIB, no sólo las identificadas en este capítulo de la Tesis sino que también las que presentaron homología con *M. bovis* y *M. bovoculi* y secuencias nucleotídicas publicadas en el *GenBank* para diverso tipo de bacterias.

El resultado de la afiliación filogenética de los diferentes aislamientos se presenta en la Figura IV-1. En el árbol filogenético obtenido se observó por un lado los aislamientos de *M. bovis* y por otro lado los aislamientos de *M. bovoculi*, pero ambas especies cercanas filogenéticamente. Por otro lado se encontró al resto de los aislamientos secuenciados en este capítulo del trabajo. Finalmente se ingresaron para el análisis secuencias que se encuentran accesibles en el *GenBank* y que no fueron obtenidas de brotes de QIB. Estas últimas se usaron como grupos externos de secuencias obtenidas en otros trabajos.

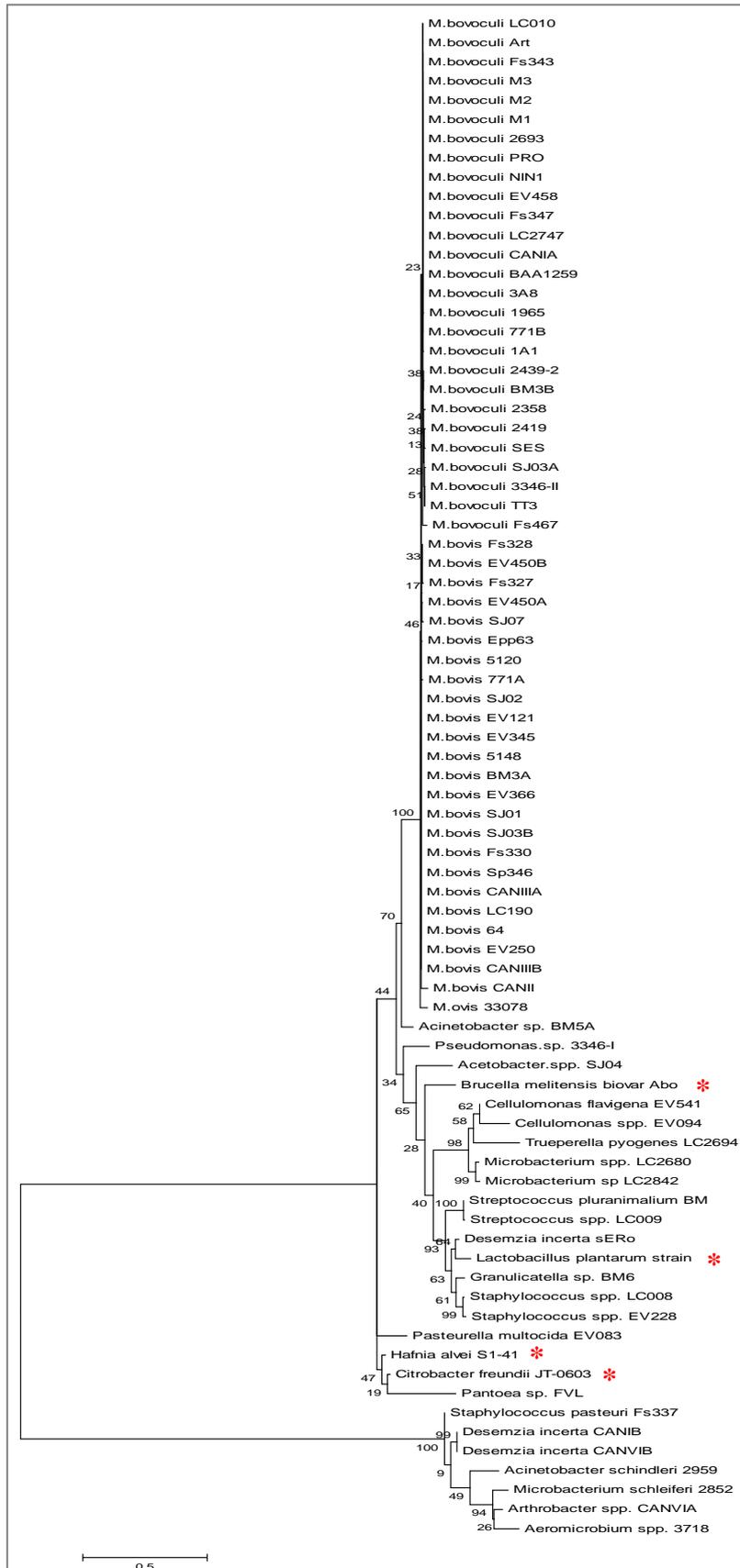


Figura IV-1. Filogenia molecular del ADNr de cepas obtenidas de casos de QIB y de secuencias externas (marcadas con un *) analizadas por el método de Máxima verosimilitud. El *bootstrap* es producto de 1000 réplicas.

4. Discusión

La microbiota asociada a los brotes de QIB podría llegar a tener un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Hasta el momento son escasos los estudios sobre la biota de bovinos sanos y la de bovinos con sintomatología de QIB. El objetivo de este capítulo de la Tesis fue realizar una primera aproximación al estudio de la microbiota asociada a brotes de QIB.

Al momento de obtener los presuntos aislamientos de *Moraxella* spp. de las placas donde se realizó el cultivo del hisopado de la conjuntiva de animales con sintomatología clínica de QIB también se observaron otras colonias cuya descripción no era la esperada para *M. bovis* o *M. bovoculi*. Estas colonias fueron seleccionadas con la finalidad de caracterizar la biota bacteriana que se encuentra asociada a brotes de QIB. En este sentido, el objetivo de este capítulo de la Tesis fue caracterizar aislamientos bacterianos obtenidos de brotes de QIB pero no identificadas como *Moraxella* spp. Se realizó una identificación fenotípica que consistió en la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica y una identificación molecular que consistió en la secuenciación del gen ADNr 16S. Finalmente se estudió la relación filogenética de todos los aislamientos analizados en esta Tesis y de secuencias externas no obtenidas en esta Tesis y cuya secuencia fue obtenida de la base de datos del *GenBank*.

La caracterización fenotípica y genotípica demostró que los aislamientos asociados a brotes de QIB pertenecieron a diversos géneros y familias bacterianas. La mayoría de las bacterias aisladas fueron Gram positivas (70%). Se ha descrito que la microbiota

bacteriana cultivable ocular normal de bovinos esta predominantemente formada por bacterias Gram positiva (Dupont *et al.*, 1994; Haghkhan *et al.*, 2005; Kudirkiene *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2005).

Se encontraron cepas pertenecientes a los siguientes géneros y especies: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *P. multocida*, *T. pyogenes*, *D. incerta*, *Cellulomonas*, *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Acetobacter* y *Arthrobacter*.

Staphylococcus y *Streptococcus* son géneros bacterianos comúnmente aislados de la conjuntiva de animales con sintomatología clínica (Kudirkiene *et al.*, 2006). *Staphylococcus* es el género bacteriano de mayor importancia clínica dentro de la familia Staphylococcaceae. En la actualidad el género *Staphylococcus* comprende más de 30 especies diferentes. En este trabajo se identificaron dos aislamientos pertenecientes al género *Staphylococcus* sin poder determinar a qué especie correspondían y se identificó un aislamiento con homología con *S. pasteurii*. Ésta es una especie coagulasa-negativa del género *Staphylococcus*, descrita por primera vez en 1993 por Chesneau y colaboradores y es un patógeno que afecta tanto a animales como a humanos.

Por otro lado, el género *Streptococcus* comprende una amplia diversidad de especies, incluyendo *S. pluranimalium*. Esta fue una especie aislada en este trabajo en 2 de los 20 casos y se ha descrito que se ha obtenido de casos de mastitis subclínica, del tracto genital y amígdalas de ganado, de amígdalas de cabra y gatos y del tracto respiratorio de canarios (Devriese *et al.*, 1999).

El género *Acinetobacter* fue otro de los géneros identificados en este trabajo. El mismo se distribuye ampliamente en la naturaleza, está compuesto por bacterias importantes

en el suelo, contribuyendo a su mineralización y son una importante fuente de infección en los hospitales para los pacientes inmunocomprometidos. Este microorganismo ya fue previamente asociado a brotes de QIB por Hare y colaboradores (2008). *Actinobacter* puede ser recuperada de cultivos enriquecidos de prácticamente todo tipo de muestras obtenidas del suelo o agua (Peleg *et al.*, 2008). Esto junto a la capacidad de estas bacterias de colonizar cualquier superficie (Doughari *et al.*, 2011) hace que sea probable que la misma sea un contaminante ambiental que en condiciones favorables se asocie a casos de QIB.

Por su parte, *Pantoea* spp. fue otro género identificado en este trabajo. Éste es un género bacteriano que incluye varias especies y que está ampliamente distribuido en la naturaleza. Se lo aísla con frecuencia del agua, tierra, plantas (ya sea como epífitas así como patógenas), heces animales y también como patógeno de humanos. Por este motivo esta bacteria probablemente también sea un contaminante ambiental que en situación propicia colonice la conjuntiva bovina.

En este trabajo *Pseudomonas* fue un patógeno también asociado a brotes de QIB. Este patógeno ya había sido asociado a la conjuntiva de bovinos con QIB (Hare *et al.*, 2008). El género *Pseudomonas* demuestra una gran diversidad metabólica lo que lo hace capaz de colonizar un amplio rango de nichos (Madigan & Martinko, 2005).

Otro aislamiento identificado en este trabajo perteneció al género *Granulicatella* el cual comprende varias especies que pueden causar infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos y pueden ser aislados de una variedad de muestras clínicas incluyendo sangre, orina, fluido cerebroespinal, heridas de tejidos y otros especímenes. Ésta es la primera vez que se describe este microorganismo asociado a brotes de QIB.

Otro género identificado en este trabajo fue *Pasteurella* el cuál se encuentran habitualmente como comensal de las mucosas del tracto digestivo y respiratorio superior de mamíferos y aves aparentemente sanos de todo el mundo. En ese caso se llegó a identificar a nivel de especie, siendo *P. multocida* la especie identificada. *P. multocida* ha sido aislada de muchas especies animales (vacas, búfalos, cerdos, cabras, pavos, pollos, patos, gansos, gatos, perros, etc.), tanto domésticas como salvajes, a partir de animales aparentemente sanos y enfermos (Snipes *et al.*, 1988a; Rimler & Rhoades, 1989). Estos microorganismos de las vías respiratorias posiblemente puedan invadir nichos cercanos como son las conjuntivas.

Trueperella pyogenes, previamente denominada *Arcanobacterium*, es aislada comúnmente de rumiantes domesticados y salvajes como un patógeno oportunista. Este patógeno causa mastitis, abortos y diversas infecciones piogénicas (Oikonomou *et al.*, 2012). Su similaridad de nichos podría hacer que *T. pyogenes* pueda bajo condiciones favorables colonizar la conjuntiva bovina.

Desemzia incerta, por su parte, ha sido asociada a insectos (Steinhaus, 1941). En este caso dado que los insectos son los principales vectores de la enfermedad, es posible que haya sido a través de ellos que esta bacteria colonizara la conjuntiva bovina.

Las *Cellulomonas* son un género bacteriano capaz de degradar la celulosa. Enzimas que degradan polisacáridos, tal como la celulasa, están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Pueden ser encontradas en todo tipo de organismos incluyendo mamíferos, plantas, algas, mohos, bacterias y fagos (Bhat, 2000; Oshima *et al.*, 2002). En los rumiantes existe una amplia diversidad de microorganismos capaces de degradar componentes fibrosos, tal como la celulosa y hemicelulosa, por lo cual las *Cellulomonas* spp. son biota normal de esta especie animal. En tal sentido, se ha

descrito hace pocos años dos nuevas especies de *Cellulomonas*, *Cellulomonas chitinilytica* y *Cellulomonas composti*, ambas aisladas del *compost* de granjas productoras de ganado (Kang *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2008). Por estos motivos no fue sorprendente encontrar un aislamiento perteneciente a este género bacteriano como biota asociada a brotes de QIB.

El género *Aeromicrobium* fue descrito por primera vez por Miller y colaboradores en 1991. Las especies asignadas al género *Aeromicrobium* han sido aisladas de zonas con hierbas y suelos. En este trabajo un aislamiento presentó homología con el género *Aeromicrobium*. Al ser este un microorganismo ambiental es probable que pueda colonizar la conjuntiva bovina en situaciones favorables.

Por otra parte, los miembros del género *Microbacterium* han sido aislados de un amplio rango de hábitats ambientales que incluyen plantas, suelo, agua, productos lácteos y humanos. Existen más de 50 especies descritas para este género bacteriano (Dastager *et al.*, 2008). Al ser *Microbacterium* un microorganismo ambiental es probable que el mismo también encuentre las condiciones más favorables para colonizar la conjuntiva bovina cuando se haya desarrollado la QIB.

Acetobacter es un género de bacterias del ácido acético (BAA) caracterizado por su habilidad de convertir el etanol en ácido acético en presencia de aire. Las BAA están presentes en frutas, flores, sabia de palma, suelo y abejas (Park *et al.*, 2012), por este motivo es posible de sugerir su posible colonización ocular cuando las condiciones así la favorezcan.

Arthrobacter es otro género de bacterias comúnmente encontradas en el suelo. Es más, la mayoría de los componentes cultivables de la comunidad microbiana aeróbica pertenece al género *Arthrobacter* (Crocker *et al.*, 2000). Este género bacteriano, a su

vez, ha sido detectado en varias superficies ambientales, tales como sedimentos, minas profundas, acuíferos, volcanes (Crocker *et al.*, 2000) y ha sido previamente asociada su presencia a brotes de QIB (Hare *et al.*, 2008).

Es probable que muchas de las bacterias identificadas en este trabajo y cuyo hábitat es el medio ambiente en el cual habita el ganado, sean patógenos oportunistas capaces de colonizar la conjuntiva en condiciones favorables o sean un contaminante ambiental al momento de obtener la muestra de la conjuntiva de los animales enfermos. Estas muestras son muestras clínicas de campo y se obtienen tomando todas las precauciones posibles para no sobrecontaminarlas pero no son obviamente obtenidas en condiciones estériles.

Las bacterias identificadas como biota asociada a QIB fueron filogenéticamente diversas. El papel de esta biota no está esclarecido aún. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron realizar una primera aproximación al estudio de la biota bacteriana asociada con la QIB en nuestro país.

C ONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La QIB es una enfermedad de importante relevancia, constituyendo un grave problema económico y sanitario que afecta a la producción bovina en nuestro país.

Este trabajo constituyó la primera descripción sobre la detección de aislamientos de *M. bovoculi* vinculados a brotes clínicos de QIB en Uruguay. Asimismo, se detectaron aislamientos de *M. bovis* asociadas a la enfermedad, pero no de *M. ovis*. Tanto *M. bovis* como *M. bovoculi* se encontraron en igual proporción. Las cepas de *M. bovoculi* pertenecieron a diversos departamentos de Uruguay, incluyendo los departamentos de Artigas, Salto, Soriano, Cerro Largo, Treinta y Tres, Flores, San José, Tacuarembó y Canelones. Se confirmó que *M. bovoculi* se diferencia claramente de *M. bovis* desde el punto de vista fenotípico y genotípico. A su vez, a partir de este trabajo se sugirió que *M. bovoculi* existe desde hace más de dos décadas en nuestro país y ha sido mal clasificada. Es importante que las vacunas comerciales contra QIB estén compuestas por ambas especies de *Moraxella* spp. para tener un mayor porcentaje de cobertura contra la enfermedad.

La colección de aislamientos fue caracterizada fenotípicamente, encontrándose que hasta el momento de realizar esta tesis, ésta era la primera evaluación de la capacidad de patógenos de bovinos de formar *biofilm* sobre superficies abióticas. Se observó que la proporción de aislamientos de *M. bovoculi* que formaron *biofilms* fue mayor que la de aislamientos de *M. bovis*. A su vez, la cuantificación del *biofilm* formado también fue mayor para *M. bovoculi*. Dentro de las perspectivas de este trabajo se encuentra avanzar en el análisis de la formación de *biofilms* en superficies abióticas y bióticas por parte de los aislamientos de *Moraxella* spp..

Asimismo se evaluó la capacidad de los aislamientos de autoaglutinar y se encontró que todos los aislamientos presentaron esta propiedad. Otra propiedad asociada a la

capacidad de adhesión que se evaluó fue la expresión de hemaglutininas, encontrándose que su expresión *in vivo* fue similar en las dos especies de *Moraxella* spp. Por otro lado, se realizó la extracción e identificación de PME de la cepa de referencia de *M. bovis* y se encontró que las proteínas extraídas presentaron homología con PME de otros patógenos, ya que hasta el momento de realizar esta tesis no se contaba con el genoma de *M. bovis* de libre acceso. Finalmente se evaluó el patrón de resistencia de la colección de aislamientos de *Moraxella* spp. a diferentes antibióticos, encontrándose que la mayoría de los aislamientos fueron sensibles a la mayor parte de antibióticos evaluados y que existieron diferencias en tres de estas drogas antibacterianas.

Cuando se evaluó la diversidad genómica con las técnicas de *ADN-fingerprinting* se observó la existencia de distintos genotipos correspondientes a los aislamientos de *Moraxella* spp. causantes de QIB en nuestro país. Si bien todas las técnicas usadas difirieron en la heterogeneidad de genotipos en los cuales se agruparían los aislamientos nativos de *Moraxella* spp., en ninguno de los casos fue posible correlacionar los patrones de banda con datos epidemiológicos o características patogénicas. Hay que tener en cuenta que las técnicas de ERIC, BOX y RAPD-PCR son utilizadas en general para ver diversidad en un grupo de aislamientos que presentan características en común y no para estudios epidemiológicos. PFGE fue la única técnica de *ADN-fingerprinting* que no se realizó con la totalidad de la colección de aislamientos y fue la única cuyos resultados preliminares sugieren una agrupación de los aislamientos en base a su especie. Como perspectiva de este trabajo se encuentra terminar de analizar la colección de aislamientos para ampliar los resultados aquí presentados. Con los datos que contamos, de todas formas, se puede afirmar que los

aislamientos clínicos de *Moraxella* spp. en nuestro medio presentarían una elevada heterogeneidad genética, probablemente asociada a la facilidad de intercambio o rearrreglo genéticos de estas bacterias. Los resultados obtenidos ratifican la necesidad de realizar monitoreos periódicos para evaluar la situación epidemiológica de la QIB en nuestro país.

La distribución y variabilidad de factores de virulencia también fue estudiada encontrándose que los genes *plb*, *tolC*, *fur* y *omp79* fueron amplificados mayoritariamente en *M. bovis* pero no en *M. bovoculi*. El gen *mbxA* fue el único que con el mismo juego de cebadores usados pudo ser amplificado en aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*, por lo tanto, se consideró que podría ser un candidato para vacunas basadas en subunidades bacterianas. Como perspectiva de este trabajo se encuentra evaluar la presencia de los genes *plb*, *tolC*, *fur* y *omp79* en *M. bovoculi* usando para esto cebadores degenerados, bajando las condiciones de *annealing* u otras técnicas moleculares para este fin. Los resultados aquí presentados sugieren posibles diferencias con respecto a la virulencia de ambas especies de *Moraxella* asociadas a QIB. Este aspecto también es importante que sea profundizado en su estudio y tiene que ser tenido en cuenta en la formulación de vacunas contra QIB.

Finalmente, se realizó una primera aproximación al estudio de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB. A partir de este estudio se encontraron patógenos animales que por su cercanía de nicho podrían, bajo condiciones favorables, colonizar la conjuntiva de los bovinos. Por otro lado, se identificaron bacterias cuyo hábitat es el ambiente, pudiendo en casos propicios colonizar la conjuntiva bovina. Como parte de la perspectiva de este trabajo sería importante hacer un estudio de la biota de los animales sanos y animales con sintomatología de QIB para de esta forma establecer

con mayor certeza la naturaleza de la biota asociada a brotes de QIB. También sería interesante determinar si la biota se ve alterada luego de un programa de inmunización.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen con la comprensión de diversos aspectos vinculados a la etiología y la patogenia de la QIB así como al diseño de estrategias dirigidas a su prevención. En especial, los resultados demuestran que existe una alta heterogeneidad en lo que respecta a las cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* causantes de QIB cuya dispersión en el país no se correlaciona con patrones geográficos o temporales.

Los resultados de estos trabajos ya han sido tomados en cuenta por un Laboratorio uruguayo dedicado a la elaboración de vacunas contra QIB, con el fin de reformular e incrementar la cobertura de estos productos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adegbola RA, Old DC, Senior BW (1983) The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for the urinary tract. *J Med Microbiol.* 16:427-31.
- Ahmed A, Egwu GO, Garba HS, Magaji AA (2010) Prevalence of bacterial pathogens and serotyping of *E. coli* isolates from diarrhoeic lambs in Sokoto state, Nigeria. *Sokoto J Vet Sci.* 8: 42-45.
- Allen JA. (1919) A preliminary note on infectious keratitis. *JAVMA.* 54: 306-313.
- Angelos JA, Ball LM (2007a) Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Vet Diagn Invest.* 19: 532-534.
- Angelos JA, Ball LM (2007b) Relatedness of cytotoxins from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*. *Vet Microbiol.* 124: 382-6.
- Angelos JA, Hess JF, George LW (2001) Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *Am J Vet Res.* 62: 1222-1228.
- Angelos JA, Hess JF, George LW (2003) An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Vet Microbiol.* 92: 363-377.
- Angelos JA, Hess JF, George LW (2004) Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin - ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine* 23: 537-545.
- Angelos JA, Spinks PQ, Ball LM, George LW. (2007a) *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 789-795.
- Angelos JA, Ball LM, Hess JF (2007b) Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet Microbiol.* 125: 73-79.
- Angelos JA, Bonifacio RG, Ball LM, Hess JF (2007c). Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin - ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vet Microbiol.* 125: 274 - 283.
- Angelos JA (2010) *Moraxella*. En: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Cuarta edición. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO (Eds). Willey-Blackwell. Cap. 24.
- Angelos JA, Lane VM, Ball LM, Hess JF (2010) Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Res Commun.* 34: 229-239.
- Angelos JA, Ball LM, Byrne BA (2011) Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Vet Diagn Invest.* 23: 552-555.
- Annuar BO, Wilcox GE (1985) Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. *Res Vet Sci.* 39: 241-246.
- Alexander D (2011) Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Vet Clin Food Anim* 26: 487-503.

- Atwell JL, Tennent JM, Lepper AW, Elleman TC (1994) Characterization of pilin genes from seven serologically defined prototype strains of *Moraxella bovis*. J Bacteriol. 176: 4875-4882.
- Baptista PJP (1979) Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. Br Vet J. 135: 225-42.
- Barner RD (1952) A study of *Moraxella bovis* and its relation to bovine keratitis. Am J Vet Res. Z3: 132-144.
- Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol Adv. 18: 355-383.
- Bhushan R, Craigie R, Murphy TF (1994) Molecular cloning and characterization of outer membrane protein E of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. J Bacteriol. 176: 6636-6643.
- Biblioni R, Pérez PF, Garrote BL, Disalvo EA, De Antoni GL (2001) En Methods in Enzymology. Microbial growth in biofilms part. A (ed.) Doyle RJ. Vol. 336, pg. 411-227. New York: Academic Press
- Billing FS (1889) Contagious inflammation of the cornea in cattle. Nebraska Agric Exper Stat Bull. 10: 217-252.
- Billson FM, Hodgson JL, Egerton JR, Lepper AW, Michalski WP, Schwartzkoff CL, Lehrbach PR, Tennent JM (1994) A haemolytic cell - free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against infectious bovine keratoconjunctivitis. FEMS Microbiol Lett. 124: 69-74 .
- Billson FM, Harbour C, Wojtek P, Michalski JM, Tennent JR, Egerton, Hodgson JL (2000) Characterization of Hemolysin of *Moraxella bovis* Using a Hemolysis-Neutralizing Monoclonal Antibody. Infect Immun. 68: 3469-3474.
- Blackall PJ, Miflin JK (2000) Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. Avian Pathol. 29: 271-287.
- Blood D, Radostits O (1992) Medicina Veterinaria. Septima Edición. Vol 2. Interamericana McGraw, Nueva York.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248.
- Brown M, Brightman A, Fenwick B Rider M (1998) Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review J Vet Intern Med. 12: 259-266.
- Bryan HS, Helper LC, Killinger AH, Rhoades HE, Mansfield ME (1973) Some bacteriologic and ophthalmologic observations on bovine infectious keratoconjunctivitis in an Illinois beef herd. J Am Vet Med Assoc. 163: 739-741.
- Burns MJ, O'Connor AM (2008) Assessment of methodological quality and sources of variation in the magnitude of vaccine efficacy: a systematic review of studies from 1960 to 2005 reporting immunization with *Moraxella bovis* vaccines in young cattle. Vaccine 26: 144-152.
- Carmo PMS, Vargas AC, Rissi DR, Oliveira-Filho JC, Pierezan F, Lucena RB, Leivas Leite FL, Barros CSL (2011) Surto de ceratoconjuntivite infecciosa bovina e hemonose causando mortalidade em bezerros. Pesq Vet Bras. 31: 374-378.

- Cerny HE, Rogers DG, Gray JT, Smith DR, Hinkley S (2006) Effects of *Moraxella* (Branhamella) ovis culture filtrates on bovine erythrocytes, peripheral mononuclear cells, and corneal epithelial cells. *J Clin Microbiol.* 44:772-776.
- Conceição FR, Paolicchi F, Cobo AL, Gil-Turnes C (2003) Antigenic relationships of *Moraxella bovis* isolates recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil, and Uruguay between 1983 and 2000. *Can J Vet Res.* 67: 315-318.
- Conceição FR, Bertonecelli DM, Storch OB, Paolicchi F, Cobo AL, Gil-Turnes C (2004) Antibiotic susceptibility of *Moraxella bovis* recovered from outbreaks of Infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay Between 1974 and 2001. *Braz J Microbiol.* 35: 364-366.
- Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol.* 15: 137-140.
- Crocker FH, Fredrickson JK, White DC, Ringelberg DB, Balkwill DL (2000) Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiology.* 146: 1295-1310.
- Chandler RL, Baptista PJ, Turfrey B (1979) Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Comp Pathol.* 89: 441-448.
- Chandler RL, Smith K, Turfrey BA (1985) Exposure of bovine cornea to different strains of *Moraxella bovis* and to other bacterial species in vitro. *J Comp Pathol* 95: 415.
- Chesneau O, Morvan A, Grimont F, Labischinski H, el Solh N (1993) *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 237-44.
- Dastager SG, Lee JC, Ju YJ, Park DJ, Kim CJ (2008) *Microbacterium kribbense* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 2536-2540.
- Davey ME, O' Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 847-867.
- Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, Arlet G, Brisse S (2009) Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea* agglomerans Strains by Multilocus Gene Sequencing. *J Clin Microbiol.* 47: 300-310.
- Devriese, LA, Bañadme P, Collins MD, Alvarez N, Pot B, Hommez J, Butaye P, Haesebrouck F (1999) *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1221-1226
- DIGESA (2012) Boletín Epidemiológico N°1. MGAP, DIGESA.
- Dodt RM (1977) The prevalence of bovine keratoconjunctivitis in a beef cattle herd in north eastern Queensland. *Aust Vet J.* 53: 128.
- Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ (2000) Use of repetitive DNA sequences and the PCR To differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2572-2577.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8: 881-890.

- Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S (2011) The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes Environ.* 26: 101–112.
- Dupont C, Carrier M, Higgins R (1994) Bacterial and fungal flora in healthy eyes of birds of prey. *Can Vet J.* 35: 699–701.
- Easton DM, Smith A, Gallego SG, Foxwell AR, Cripps AW, Kyd JM (2005) Characterization of a Novel Porin Protein from *Moraxella catarrhalis* and Identification of an Immunodominant Surface Loop. *J Bacteriol.* 187: 6528–6535.
- Elad D, Yeruham I, Bernstein M (1988) *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. *Zentralbl Veterinärmed B.* 35: 431–434.
- Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK (1995) *Biofilm*-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)* 9: 102–109.
- Elleman TC, Hoyne PA, Lepper AW (1990) Characterization of the pilin gene of *Moraxella bovis* Dalton 2d and expression of pili from *M. bovis* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 58: 1678–1684.
- Farn JL, Strugnell RA, Hoyne PA, Michalski WP, Tennent JM (2001) Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *J Bacteriol.* 183: 6717–6720.
- Fenwick B, Rider M, Liang J, Brightman A (1996) Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. *Vet Microbiol.* 48: 315–324.
- Frank SK, Gerber JD (1981) Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. *J Clin Microbiol.* 13: 269–371.
- Fraser J, Gilmour JL (1979) The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis* from the eyes of cattle and sheep. *Res Vet Sci.* 27:127–128.
- Freter R (1981) Mechanisms of association of bacteria with mucosal surfaces. *Ciba Found Symp* 80: 36–55.
- Funk L, O'Connor AM, Maroney M, Engelken T, Cooper VL, Kinyon J, Plummer P (2009) A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. *Vaccine* 27: 4585–4590.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13: 34–40.
- Gallagher CII (1954) Investigation of the etiology of infectious ophthalmia of cattle. *Aust Vet J.* 30: 61–68.
- Galvão KN, Angelos JA (2010) Ulcerative blepharitis and conjunctivitis in adult dairy cows and association with *Moraxella bovoculi*. *Can Vet J.* 51: 400–402.
- George LW, Borrowman AJ, Angelos JA (2005) Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am J Vet Res* 66: 136–142.

- Gil-Turnes C (1983) Hemagglutination, Autoagglutination and Pathogenicity of *Moraxella bovis* Strains. Can J Comp Med. 47: 503-504.
- Gil-Turnes C, Albuquerque IMB (1984) Serotypes and antibiotic sensitivity of *Moraxella bovis* isolated from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. Can J Comp Med. 46: 428-430.
- Gil Turnes C, Aleixo JAG (1991) Quantification of *Moraxella bovis* haemagglutinating adhesins with monoclonal antibodies. Lett Appl Microbiol. 13: .55-57.
- Gil Turnes C, Araújo FL (1982) Serological characterization of strains of *Moraxella bovis* using double immunodiffusion. Can J Comp Med. 46: 165-168.
- Glass HW, Gerhardt RR (1983) Recovery of *Moraxella bovis* (Hauduroy) from the crops of face flies (Diptera: Muscidae) fed on the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis J Econ Entomol. 76: 532.
- Gould S, Dewell R, Tofflemire K, Whitley RD, Millman ST, Opriessnig T, Rosenbusch R, Trujillo J, O'Connor AM (2013) Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. Vet Microbiol. 164: 108–115.
- Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Rogers DG (1995) Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytolysin. Vet Microbiol. 43: 183–196.
- Haghkhah M, Sarchahi A, Molazem M (2005) Conjunctival flora in normal dogs. J Vet Res. 9: 79-83.
- Hare WR, Hoyt PG, Hohn C, Higgins JA (2008) Ribosomal RNA-based analysis of the bacterial flora from the conjunctivae of cattle with bovine keratoconjunctivitis (BKC). Vet Microbiol. 131: 358-368.
- Hays,JP, van Selm S, Hoogenboezem T, Estevao S, Eadie K, van Veelen P, Tommassen,J., van Belkum,A, Hermans PW (2005) Identification and Characterization of a Novel Outer Membrane Protein (OMP J) of *Moraxella catarrhalis* That Exists in Two Major Forms. J Bacteriol. 187: 7977-7984.
- Heinrich DW, Glasgow AC (1997) Transcriptional regulation of type 4 pilin genes and the site-specific recombinase gene, piv, in *Moraxella lacunata* and *Moraxella bovis*. J Bacteriol. 179: 7298-7305.
- Hess JF, Angelos JA (2006) The *Moraxella bovis* RTX toxin locus mbx defines a pathogenicity island. J Med Microbiol. 55: 443–449.
- Høien-Dalen PS, Rosenbusch RF, Roth JA (1990) Comparative characterization of the leukocidic and hemolytic activity of *Moraxella bovis*. Am J Vet Res. 51: 191–196.
- Horsnell JM, Teale CM (1987) Characterisation of the Outer Membrane Protein Antigens of British Field Isolates of *Moraxella bovis*. Vet Microbiol, 15: 181-189.
- Hughes DE (1981) Infectious Keratoconjunctivitis. En Diseases of Cattle in the Tropics: Economics and Zoonotic Relevance. Ristic M, McIntyre I (Eds). Springer.

- Hughes DE, Pugh GW, McDonald TJ (1965) Ultraviolet radiation and *Moraxella bovis* in the etiology of Bovine Infectious Keratoconjunctivitis. Am J Vet Res. 26:1331-1338.
- Hughes DE, Pugh GW, McDonald TJ (1968a) Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and *Moraxella bovis* infection: determination of optimal irradiation. Am J Vet Res. 29: 821-827.
- Hughes DE, Pugh GW, McDonald TJ (1968b) Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and *Moraxella bovis* infection: Resistance to re-exposure with homologous and heterologous *Moraxella bovis*. Am J Vet Res. 25: 829-833.
- Hughes DE, Pugh GW (1970) A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. J Am Vet Med Assoc. 157: 443-51.
- Hughes DE, Pugh GW (1971) Experimentally induced bovine infectious keratoconjunctivitis: effectiveness of intramuscular vaccination with viable *Moraxella bovis* culture. Am J Vet Res. 32: 879-886.
- Hughes DE, Pugh GW (1972) Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: vaccination with nonviable *Moraxella bovis* culture. Am J Vet Res. 33: 2475-2479.
- Hughes DE, Pugh GW, Kohlmeier RH, Booth GD, Knapp BW (1976) Effects of vaccination with a *Moraxella bovis* bacterin on the subsequent development of signs of corneal disease and infection with *M bovis* in calves under natural environmental conditions. Am J Vet Res. 37: 1291-1305.
- Hultgren S, Abraham S, Caparon M, Falk P, St Geme III, Normark JS (1993) Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. Cell 73: 887-901.
- INAC (2013). Boletín semanal. Edición especial cierre del año 2012.
- Jackson FC (1953) Infectious keratoconjunctivitis of cattle. Am J Vet Res. 14: 19-25.
- Jayappa HG, Lehr C (1986) Pathogenicity and immunogenicity of pilated and nonpilated phases of *Moraxella bovis* in calves. Am J Vet Res. 47: 2217-2221.
- Johnsen K, Niesel P (1999) Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. FEMS Microbiol Lett. 173: 155-162.
- Jones FS, Little RB (1923) Am Infectious ophthalmia of Cattle. J Exp Med. 38: 139-148.
- Jones FS, Little RB (1924) The transmission and treatment of infectious ophthalmia of cattle. J Exptl Med. 35: 803-810.
- Kado CI (1998) Origen and evolution of plasmid. Antonie van-Leeuwenhoek. 73: 117-126.
- Kakuda T, Oishi D., Tsubaki S, Takai S (2003a) Cloning and characterization of the fur gene from *Moraxella bovis*. Microbiol Immunol. 47: 411-417.

- Kakuda T, Oishi D, Tsubaki S, Takai S (2003b) Molecular cloning and characterization of a 79-kDa iron-repressible outer-membrane protein of *Moraxella bovis*. FEMS Microbiol Lett. 225: 279-284.
- Kakuda T, Sarataphan N, Tanaka T, Takai S (2006) Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. Vet Microbiol. 118:141-147.
- Kang MS, Im WT, Jung HM, Kim MK, Goodfellow M, Kim KK, Yang HC, An DS, Lee ST (2007) *Cellulomonas composti* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from cattle farm compost. Int J Syst Evol Microbiol. 57: 1256-1260.
- Killinger A (1977) Economic impact of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. Vet Med Small Anim Clin Agric Pract. 618-620.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 16: 111-120.
- Kolpecky KE, Pugh GW, McDonald TJ (1986) Infectious bovine keratoconjunctivitis: contact transmission. Am J Vet Res. 47: 622.
- Kolter R, Greenberg EP (2006) Microbial sciences: the superficial life of microbes. Nature 441: 300-302.
- Kopecky KE, Pugh GW, McDonald TJ (1980) Wavelength of ultraviolet radiation that enhances onset of clinical infectious bovine keratoconjunctivitis. Am J Vet Res. 41: 1412-1415.
- Kudirkienė E, Žilinskas H, Šiugždaite J (2006) Microbial Flora Of The Dog Eyes. Vet Med Zoot. 34: 18-21.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001 MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 17: 1244-1245
- Labarca JL (2002) Utilización del antibiograma como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias. Rev Chil Infect. 19: 157-160.
- Lane D J, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 6955-6959.
- Langford EV, Dorward WJ (1969) A mycoplasma isolated from cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. Can J Comp Med. 35: 275-279.
- Lehr C, Jayappa HG, Good RA (1985) Serologic and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. Cornell Vet. 75: 484-492.
- Lenich AG, Glasgow AC (1994) Amino acid sequence homology between Piv, an essential protein in site-specific DNA inversion in *Moraxella lacunata*, and transposases of an unusual family of insertion elements. J Bacteriol. 176: 4160-4164.
- Lepper AW, Barton IJ (1987) Infectious bovine keratoconjunctivitis: seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. Aust Vet J. 64:33-39.

- Lepper AWD, Elleman TC, Hoyne PA, Lehrbach PR, Atwell JL, Schwartzkoff CL, Egerton JR, Tennent JM (1993) A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis, *Vet Microbiol.* 36: 175–183.
- Lepper AWD, Hermans LR (1986) Characterization and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. *Aust Vet J.* 63: 401-405.
- Lepper AWD, Moore LJ, Atwell JL, Tennent JM (199) The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Microbiol.* 32:177-187.
- Lepper AWD, Power BE (1988) Infectivity and virulence of Australian strains of *Moraxella bovis* for the murine and bovine eye in relation to pillus serogroup sub-unit size and degree of pilliation. *Aust Vet J.* 65: 305–309.
- Libardoni F, Scherer CFC, Farias L, Vielmo A, Balzan C, de Vargas AC (2012) *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 32: 743-746.
- Ludwig W, Schleifer KH (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 15: 155-73
- Lupski JR, Weinstock GM (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol.* 174: 4525-4529.
- Lwoff A (1939) Revisión et démembrement des Hemophilae. Le genre *Moraxella*. *Nov Gen Ann Ins Pasteur.* 62: 168-176.
- Madigan M, Martinko J (Ed) (2005) *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed. edición). Prentice Hall.
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP (1996) Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 34: 1129-35.
- Makinde AA, Ezeh AO, Onoviran O, Umo I (1985) Prevalence of serum antibodies to *Moraxella bovis* in cattle in Nigeria. *Br Vet J.* 141: 643.
- Marrs CF, RuehlWW, Schoolnik G, Falkow S (1988) Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *J Bacteriol.* 170: 3032–3039.
- Marrs CF, Rozsa FW, Hackel M, Stevens SP, Glasgow AC (1990) Identification, cloning, and sequencing of piv, a new gene involved in inverting the pilin genes of *Moraxella lacunata*. *J Bacteriol.* 172: 4370–4377.
- Marrs CF, Schoolnik G, Koomey JM, Hardy J, Rothbard J, Falkow S (1985) Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. *J Bacteriol.* 163: 132–139.
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD (1993) Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis.* 17: 153-62

- Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK (1996) Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 39: 2598-2600.
- McConnel CS, Shum L, House JK (2007) Antimicrobial susceptibility of Australian bovine *Moraxella* isolates. *Aust Vet J.* 85: 70-71.
- McConnel CS, Shum L, Gleeson BI, House JK (2008) Serologic cross-reactivity of Australian *Moraxella bovis* to vaccinal bacterin strains as determined by competitive ELISA. *Aust Vet J.* 86: 124-129.
- Méndez-Álvarez S, Pavón V, Esteve I, Guerrero R, Gaju R (1995) Analysis of bacterial genomes by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiol SEM.* 11: 323-336.
- Miller ES, Woese CR, Brenner S (1991). Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 41: 363-368.
- Mitter SN (1915) Contagious ophthalmia among cattle. *Vet J.* 7Z: 28-29.
- Mohanty SB, Lillie MG (1970) Relationship of infectious bovine keratoconjunctivitis virus to the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Cornell Vet.* 60: 3-9 .
- Moore LJ, Lepper AWD (1991) A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. *Vet Microbiol.* 29: 75-83.
- Moore LJ, Rutter JM (1987) Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. *J Clin Microbiol* 25: 2063-2070.
- Murugan K, Usha M, Malathi P, Al-Sohaibani AS, Chandrasekaran M (2010) Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus* spp. among patients with conjunctivitis. *Pol J Microbiol* 59: 233-239.
- Nagy A, Vandersmissen E, Kapp P (1989) Further data to the aetiology, pathogenesis and therapy of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 12: 115-127.
- Nayar PSG, Saunders JR (1975) Infectious bovine keratoconjunctivitis. I. Experimental production. *Can J Comp Med.* 39: 22-31.
- Nyenje ME, Green E, Ndip RN (2012) Biofilm Formation and Adherence Characteristics of *Listeria ivanovii* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods in Alice, South Africa. *Sci World J.* 2012: 1-7.
- O'Connor AM, Shen HG, Wang C, Opriessnig T (2012) Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Vet Microbiol.* 155: 374-380.
- Oikonomou G, Silva Machado V, Santisteban C, Schukken YH, Carvalho Bicalho R (2012) Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. *PLOS One* 7: 1-14.
- Olsen GJ, Lane DL, Giovannoni SJ, Pace NR (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol.* 40: 337-365.

- Olsen GJ, Woese CR (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7:113-123.
- Oshima H, Miyazaki R, Ohe Y, Hayashi H, Kawamura K, Kikuyama S (2002) Isolation and sequence of a novel amphibian pancreatic chitinase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 132: 381–388.
- Ostle AG, Rosenbusch RF (1985) Immunogenicity of *Moraxella bovis* hemolysin. *Am J Vet Res.* 46: 1011–1014.
- O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 30: 295-304.
- Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol.* 9: 1–55.
- Park J, Yoon S, Kim S, Lee B, Cheong H (2012) Characterization and fibrinolytic activity of *Acetobacter* sp. FP1 isolated from fermented pine needle extract. *J Microbiol Biotechnol.* 22: 215-219.
- Peleg A, Seifert H, Paterson D (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 21: 538–582.
- Pettersson GR, Garza Ramos J (1982) La erradicación de las enfermedades de los animales y el desarrollo socioeconómico de América Latina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1: 723-732.
- Pettersson B, Kodjo A, Ronaghi M, Uhlen M, Tonjum T (1998) Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *Int J Syst Bacteriol.* 48: 75-89.
- Piccini CD, Barbé FM, Legnani-Fajardo CL (1998) Identification of iron-regulated outer membrane proteins in uropathogenic *Proteus mirabilis* and its relationship with heme uptake. *FEMS Microbiol Lett.* 166: 243-8.
- Postma GC, Carfagnini JC, Minatel L (2008) *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 29: 449-458.
- Prado MR, Rocha MF, Brito EH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MF, Sidrim JJ (2005) Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Vet Ophthalmol.* 8: 33-7.
- Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285-293.
- Prieto CI, Aguilar MO, Yantorno OM (1999) Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Vet Microbiol.* 70: 213-223.
- Prieto CI, Bosch A, Zielinski G, Cuneo J, Yantorno OM (2008) Vaccine against infectious bovine keratoconjunctivitis: a new approach to optimize the production of highly piliated *Moraxella bovis* cells. *Vaccine* 26: 6542–6549.

- Prieto CI, Rodriguez ME, Bosch A, Chirido FG, Yantorno OM (2003) Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili. *Vet Microbiol.* 91: 157–168.
- Pugh GW, Hughes DE, Packer RA (1970) Bovine infectious keratoconjunctivitis: Interactions of *Moraxella bovis* and infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res.* 3Z: 653-662
- Pugh GW, McDonald TJ, Kopecky KE, Kvasnicka WG (1986) Infectious bovine keratoconjunctivitis: evidence for genetic modulation of resistance in purebred Hereford cattle. *Am J Vet Res.* 47: 885-889.
- Pugh GW, Hughes DE (1970a) Comparison of the virulence of various strains of *Moraxella bovis*. *Can J Comp Med.* 34: 333-340
- Pugh GW, Hughes DE (1971) Infectious bovine keratoconjunctivitis induced by different experimental methods. *Cornell Vet.* 61: 23–45.
- Pugh G, Hughes DE (1966) The isolation and characterization of *Moraxella bovis*. *Am J Vet Res.* 27: 957-962.
- Pugh GW Jr, Hughes DE, McDonald TJ (1968) Keratoconjunctivitis produced by *Moraxella bovis* in laboratory animals. *Am J Vet Res.* 29: 2057-2061.
- Pugh GW, Hughes DE (1975) Experimental Production of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Comparison of Serological and Immunological Responses Using Pili Fractions of *Moraxella bovis*. *Can J Comp Med.* 40: 60-66.
- Pugh GW, Hughes DE, Booth GD (1978) Serologic response of vaccinated cattle to strains of *Moraxella bovis* isolated during epizootics of keratoconjunctivitis. *Am J Vet Res.* 39: 55.
- Pugh GW, Hughes DE, Booth GD (1977) Experimentally induced infections bovine keratoconjunctivitis: effectiveness of a pilus vaccine against exposure to homologous strains of *Moraxella bovis*. *Am J Vet Res.* 38: 1519–1522.
- Pugh GW, McDonald TJ. 1982. Experimental infectious bovine keratoconjunctivitis: efficacy of a vaccine prepared from nonhemolytic strains of *Moraxella bovis*. *Am J Vet Res.* 43: 1081-1084.
- Pugh GW, McDonald TJ (1986) Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res* 47: 2343–5.
- Punch N (1985) Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res Vet Sci.* 39: 179-187.
- Reid JJ, Anigstein L (1945) Investigations on keratoconjunctivitis in cattle on the Gulf coast of Texas. *Texas Rep Biol Med.* 3: 187-203.
- Rogers DG, Chevillie NF, Pugh GW (1987a) Conjunctival lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. *Vet Pathol.* 24: 554–559.
- Rogers DG, Chevillie NF, Pugh GW (1987b) Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. *Vet Pathol.* 24: 287–295.

- Ryan PD, Harper DAT, Whalley JS (1995) PALSTAT, Statistics for palaeontologists. Chapman & Hall (now Kluwer Academic Publishers).
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 11: 94–100.
- Rimler RB, Rhoades KR (1989) Solubilization of membrane-associated crossprotection factor(s) of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis.* 33: 258–263.
- Ruehl WW, Marrs C, Fernandez R, Falkow S, Schoolnik GK (1988) Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *J Exp Med.* 168: 983–1002.
- Ruehl WW, Marrs C, Beard MK, Shokooki V, Hinojoza JR, Banks S (1993) Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. *Mol Microbiol.* 7:285–8.
- Schwartz DC, Cantor C (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67–75.
- Shiell BJ, Tachedjian M, Bruce K, Beddome G, Farn JL, Hoyne PA, Michalski WP (2007) Expression, purification and characterization of recombinant phospholipase B from *Moraxella bovis* with anomalous electrophoretic behavior. *Protein Expr Purif.* 55: 262–272 .
- Shryock TR, White DW, Werner CS (1998) Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. *Vet Microbiol.* 61: 305–309.
- Slatter DH, Edwards ME, Hawkins CD, Wilcox GE (1982) A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Aust Vet J.* 59: 65–68.
- Smith PG, Blankenship T, Hoover TR, Powe T, Wright JC (1990) Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *Am J Vet Res.* 51: 1147–1150.
- Snipes KP, Carpenter TE, Corn JL, Kasten RW, Hirsh DC, Hird DW, McCapes RH (1988). *Pasteurella multocida* in wild mammals and birds in California: prevalence and virulence for turkeys. *Avian Dis.* 32: 9–15.
- Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Benneth GL (2005) Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. *J Anim Sci.* 83: 507–18.
- Stackebrandt E (1988) Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. *Can J Microbiol* 34: 552–556.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 846–849.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 1043–1047.

- Steinfeld H, Wassenaar T, Jutzi S (2006) Livestock production systems in developing countries: status, drivers, trends. *Rev Sci Tech.* 25: 505-516.
- Steinhaus E (1941) A study of the bacteria associated with thirty species of insects. *J Bacterial* 42: 757-790.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
- Sykes JA, Dmochowski L, Grey CE, Russell WO (1962) Isolation of a virus from infectious bovine keratoconjunctivitis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 111: 51-57.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV (1997) How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 18: 426-439.
- Thrift FA, Overfield JR (1974) Impact of pinkeye (infectious bovine kerato-conjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. *J Anim Sci.* 38: 1179-1184.
- Van Geem T, Broce AB (1985) Significance of cattle discharges and secretions as protein sources for ovarian development in the face fly (Diptera: muscidae). *Environ Entomol.* 14: 60-64.
- Vandergaast N, Rosenbusch RF (1989) Infectious bovine keratoconjunctivitis epizootic associated with area-wide emergence of a new *Moraxella bovis* pilus type. *Am J Vet Res.* 50: 1437-1441.
- Versalovic JSM, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic Fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol.* 5: 25-40.
- Wandersman C, Delepelaire P (1990) TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 4776-4780.
- Ward JK, Nielson MK (1979) Pinkeye (Bovine infectious keratoconjunctivitis) in beef cattle. *J Anim Sci.* 49: 361-366.
- Webber JJ, Selby LA (1981) Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc.* 179: 823-826.
- Webber JJ, Fales WH, Selby LA (1982) Antimicrobial Susceptibility of *Moraxella bovis* Determined by Agar Disk Diffusion and Broth Microdilution. *Antimicrob Agents Chemoth.* 21: 554-557.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51: 221-271.

- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. PNAS 87: 4576–4579.
- Yeruham I, Perl S, Elad D (2001) Infectious bovine keratoconjunctivitis and lymphofollicular hyperplasia of the third eyelid in heifers. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 48: 137-41.
- Yoon MH, Ten LN, Im WT, Lee ST (2008) Cellulomonas chitinilytica sp. nov., a chitinolytic bacterium isolated from cattle-farm compost. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 1878-1884.
- Yu R, Schryvers AB (1994) Transferrin receptors on ruminant pathogens vary in their interaction with the C - lobe and N - lobe of ruminant transferrins. Can J Microbiol. 40: 532–540.
- Yu RH, Schryvers AB (2002) Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. Biochem Cell Biol 80: 81–90.
- Zbrun MV, Zielinski GC, Piscitelli HC, Descargab C, Urbanib LA, Defain Tesorieroc MV, Hermidac L (2012) Evaluation of anti-*Moraxella bovis* pili immunoglobulin-A in tears following intranasal vaccination of cattle. Res Vet Sc. 93: 183–189.
- Zhang S, Splendiani A, dos Santos LM, Livingston AG (1998) Determination of pollutant diffusion coefficients in naturally formed biofilms using a single tube extractive membrane bioreactor. Biotechnol Bioeng 59: 80-89.
- Zielinski G, Piscitelli H, Perez-Monti H, Stobbs LA (2000) Antibiotic sensitivity of an Argentine strain collection of *Moraxella bovis*. Vet Ther. 1: 199-204.



ACADEMIA NACIONAL DE VETERINARIA

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA

OTORGA EL

PREMIO ACADEMIA NACIONAL DE VETERINARIA 2009 AUSPICIADO POR LA SOCIEDAD URUGUAYA DE BUIATRIA

Al trabajo: **ETIOLOGIA DE LA QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA**
BOVINA EN URUGUAY

Autores: VANESSA SOSA, CECILIA CORTINAS, CLAUDIA PEREIRA, PABLO ZUNINO



Dra. Julia Szwarz
Secretaria

Raúl Casas

Dr. Raúl Casas Olascoaga
Presidente



Montevideo, 11 de diciembre 2009