

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE LAS HEMOLISINAS Y PROTEINAS
DE MEMBRANA EXTERNA DE CEPAS DE
MORAXELLA SPP. RECUPERADAS DE CASOS
DE QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA
BOVINA EN URUGUAY**



BR. CECILIA CORTINAS

ORIENTADORA: DRA. VANESSA SOSA

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE
ESTABLE, 2014.**

1. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecerle a Pablo Zunino por permitirme realizar esta pasantía en su Laboratorio.

A Vanessa Sosa que siempre estuvo presente en todos los momentos, ya sea durante el trabajo de Laboratorio como en la redacción de esta pasantía.

También a todos los compañeros del laboratorio de microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por los consejos y soluciones a problemas en cualquier momento.

A mis padres, los cuales han sido un pilar importantísimo durante toda la carrera aunque en realidad ha sido así toda mi vida. Ya se mediante el aliento cuando se perdió algún examen o alegría por algunos logros.

Al resto de mi familia la que esta y la que ya no está que también han sabido brindar el apoyo necesario en los momentos justos.

A mi amiga Eve, la cual es y será fundamental en todos los momentos, ya sean buenos o malos.

Al resto de la gente con la que he compartido muchos momentos en esta carrera de tantos vaivenes.

2. RESUMEN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad distribuida mundialmente y altamente contagiosa que causa numerosas pérdidas para el sector agropecuario de nuestro país. Comienza con un lagrimeo intenso, opacidad de la córnea y si no es tratada a tiempo puede llegar a ceguera de uno o ambos ojos. El agente etiológico tradicional de la QIB es *Moraxella bovis*, sin embargo se ha reportado que *Moraxella bovoculi* y *Moraxella ovis* también están relacionadas con la QIB. Estas bacterias Gram negativas tienen diferentes factores de virulencia: fimbrias, hemolisinas, proteínas de membrana externa y lipopolisacáridos. La manera más frecuente de combatir la QIB es mediante vacunas, el problema con ellas es que no son muy efectivas. Esto se debe a que hay diversos serotipos de fimbrias y las vacunas no cubren a todos y también a que se usan vacunas realizadas con cepas que no son prevalentes en la región. El objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad de los genes que codifican para dos factores de virulencia, una hemolisina y una proteína de membrana externa Omp79, involucrada en la captación de hierro, en *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* con el fin de aportar datos para la prevención de la QIB con vacunas.

Para el análisis sobre la variación de la hemolisina MbxA se realizaron estudios fenotípicos y genotípicos. Las 51 cepas de *Moraxella spp.* pertenecientes a la colección del Departamento de Microbiología del IIBCE fueron sembradas en agar suplementado con sangre ovina para el estudio fenotípico, las cuales resultaron todas hemolíticas y para el análisis de la variación genotípica del gen que codifica esta hemolisina se utilizó la técnica de PCR y secuenciación. Con estas secuencias se realizaron árboles filogenéticos, los cuales reflejaron un alto porcentaje de similitud intraespecífica entre las especies.

Para el estudio de la variación genotípica de la proteína de membrana externa Omp79 se amplificó un fragmento de 1138 pb del gen que codifica para esta proteína en *M. bovis*. A partir de las secuencias obtenidas se realizaron árboles filogenéticos los cuales mostraron un alto porcentaje de similitud intraespecífica.

3.INDICE:

1. Agradecimientos.....	2
2. Resumen.....	3
3. Indice.....	4
4. Introducción.....	5
4.1 Descripción de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina.....	5
4.2 Agentes etiológicos de la QIB.....	7
4.3 Factores de Virulencia.....	9
5. Objetivos.....	14
5.1 Objetivos Generales.....	14
5.2 Objetivos Específicos.....	14
6. Materiales y Métodos.....	14
6.1 Colección de Aislamientos.....	14
6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación..	16
6.3 Construcción de árboles filogenéticos.....	18
7. Resultados	19
7.1 Amplificación y secuenciación del gen <i>mbxA</i> en los diferentes aislamientos.....	19
7.2 Amplificación y secuenciación del gen OMP79 en los diferentes aislamientos.....	21
8. Discusión.....	22
9. Referencias.....	25

4. INTRODUCCION

4.1 Descripción de la Queratoconjuntivitis infecciosa

bovina:

La QIB es una enfermedad distribuida mundialmente y altamente contagiosa que causa importantes pérdidas a nivel económico y sanitario para el sector agropecuario. Estas pérdidas se producen por la reducción del peso y baja en la producción de leche en los animales enfermos, dificultades en el manejo de los animales y costos en los tratamientos sanitarios (Webber & Selby 1981). La QIB afecta directamente los ojos de los bovinos. El grupo más afectado por esta enfermedad son los terneros en destete, particularmente aquellos de destete precoz. Los primeros signos se observan entre los tres y cinco días luego de la infección. Se caracteriza por producir conjuntivitis, lagrimeo intenso seguido de opacidad de la córnea hasta la pérdida de la visión y del ojo, pudiendo llegar incluso hasta la ceguera cuando ambos ojos están afectados (Gil Turnes, 1998). La enfermedad se transmite tanto por contacto directo como por vectores mecánicos. El contagio se da por medio de descargas oculares y nasales a través de las moscas, las cuales son un factor muy importante en la transmisión de esta enfermedad. El tradicional agente etiológico de la QIB, *Moraxella bovis*, puede vivir hasta tres días en las patas de las moscas y ser recuperado de animales sanos tanto como de animales curados de la enfermedad. Se ha comprobado que existen factores que predisponen a esta enfermedad como ser: polvo, viento, radiación UV, moscas, carencia de nutrientes, animales débiles, virus, estrés y falta de estado corporal (Gerhardt *et al.*, 1982).

El único reservorio conocido para *M. bovis* son los bovinos, los cuales son portadores asintomáticos durante el invierno, aunque en algunos casos se produce enfermedad en esta estación del año. Cuando llega el verano son el origen de la infección de los animales jóvenes (Gil Turnes *et al.*, 1982).

La forma más eficiente de controlar la QIB es a través de la aplicación de vacunas. En 1982 fue elaborada una vacuna con antígenos fimbriales la cual presentó un 83% de protección en los desafíos experimentales. Esta vacuna fue utilizada en Argentina, Brasil y Uruguay desde mediados de la década de los 80 (Gil Turnes *et al.*, 1982). Sin embargo hoy en día se están utilizando vacunas constituidas por bacterinas (bacterias inactivadas).

La utilización de vacunas es importante ya que reduce la severidad de la enfermedad y los requerimientos de tratamiento en caso de contagio. Los animales vacunados protegen a los no vacunados de que contraigan la enfermedad (Bateman *et al.*, 1986).

Estudios realizados en *M. bovis* revelan la existencia de siete serotipos distintos de fimbrias (A-G). Una cepa puede producir más de un tipo distinto de fimbria. Los serotipos tienen entre 70-80% de similitud entre ellos, a su vez, se pueden producir recombinaciones y crear nuevos serotipos. Esto es un problema para combatir la enfermedad. El uso de vacunas monovalentes, presenta la desventaja de que bajo la presión selectiva de anticuerpos circulantes, las cepas de *M. bovis* expresan fimbrias cuya antigenicidad está alterada haciendo que el ganado vacunado no sea resistente a la infección (Atwell *et al.*, 1994).

Por otro lado, tampoco se puede producir una vacuna que proteja contra todos los serotipos distintos que existen (Lepper *et al.*, 1993). Estos factores sumados a la utilización de cepas que no son prevalentes en la región o que son de otras regiones para la preparación de las vacunas, la diversidad antigénica del agente etiológico y la ausencia de estudios epidemiológicos podrían explicar algunas de las frecuentes fallas de las vacunas (Rochedo & Gil Turnes 2003).

4.2 Agentes etiológicos de la QIB:

En diversos estudios realizados se han descrito distintas especies pertenecientes a la familia *Moraxellaceae*, las cuales están involucradas en el desarrollo de la QIB. Estas especies son *M. bovis*, *Moraxella bovoculi* y *Moraxella ovis* (Angelos *et al.*, 2007 y Cerny *et al.*, 2006).

Las tres especies comparten varias características. Son bacterias Gram negativas, se visualizan en pares o cadenas cortas. Son inmóviles, oxidasa y catalasa positiva, son aerobios, no esporulan, ni fermentan carbohidratos. No crecen en Agar MacConkey ni en Agar Salmonella-Shigella. Son sensibles a la penicilina. Tienen actividad lipasa y producción de indol (Angelos *et al.*, 2007).

M. bovis es la especie más estudiada de las tres. Es un bacilo que no reduce el nitrato. Este microorganismo sí tiene una gelatinasa que hidroliza la gelatina. No tiene actividad fosfatasa alcalina ni despolimeriza el ADN pero sí tiene actividad estearasa (Postma *et al.*, 2008). Tampoco desamina la fenilalanina. Tiene actividad hemolítica y citotóxica mediante la expresión de exotoxinas del tipo RTX (Angelos 2003). En agar suplementado con sangre ovina *M. bovis* forma colonias lisas o rugosas las cuales llegan a medir 1 a 3 mm de diámetro. Estas colonias son circulares, grisáceas-blancuzcas, de consistencia friable y presentan un halo de beta hemólisis (Rochedo & Gil Turnes 2003).

En el caso de la especie bacteriana *M. bovoculi* su morfología es de coco o diplococo. Esta bacteria reduce el nitrato, muchas de las cepas desaminan la fenilalanina y no tiene actividad fosfatasa alcalina (Angelos y Ball 2007). Hidroliza la esculina pero no la gelatina, tiene actividad estearasa y descarboxila la ornitina. No tiene producción de ácido sulfhídrico, no fermenta glucosa, xilosa, manitol, lactosa, fructosa, maltosa ni la sacarosa (Angelos *et al.*, 2007). No se conoce su rol exacto en la patogenicidad de la QIB y sigue incierto porque no hay estudios publicados que hayan definido la relación entre las heridas de la córnea con la infección de *M. bovoculi*.

Sin embargo, hay evidencia de la prevención de la QIB mediante la vacunación autógena con bacterinas de *M. bovoculi* (Angelos 2010). Esta observación sugiere un papel de *M. bovoculi* en la enfermedad. Mediante análisis moleculares se encontró un operón completo muy similar al operón RTX de *M. bovis* el cual se lo denominó *mbvCABD*. Junto con el operón *mbvCABD* se encontró un gen *toIC* flanqueando a *mbvCABD* al igual que en el operón RTX de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que *M. bovoculi* tiene un rol en la patogenicidad de la QIB. También se observó un alto porcentaje de similitud en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos entre *M. bovoculi* y *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2007).

El mecanismo de la actividad hemolítica y citotóxica de *M. bovoculi* está mediada por una hemolisina similar a la de *M. bovis*. La atenuación de la actividad hemolítica después de un tratamiento con calor sugiere que la exotoxina es proteica e igual que la RTX de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2007).

De la especie *M. ovís* se conoce muy poco, su forma es de coco, reduce el nitrato, pero no hidroliza la gelatina. Tiene actividad fosfatasa alcalina y estearasa, pero no actividad desoxirribonucleasica ni desamina la fenilalanina. Es productora de una o más exotoxinas sensibles al calor que tienen actividad hemolítica en eritrocitos bovinos y actividad citotóxica en eritrocitos y células epiteliales bovinas (Cerny *et al.*, 2006).

Se encontró que *M. ovís* requiere de daño en la córnea u otros factores de predisposición para causar enfermedad en el ganado. Se la ha encontrado en brotes en ovejas domésticas, cabras, cérvidos, ciervos, antílopes y alces en Wyoming y Idaho (Dubay *et al.*, 2000).

4.3 Factores de virulencia:

Bacterias aisladas de casos clínicos de QIB en medio agar suplementado con sangre ovina forman colonias rugosas que autoaglutinan en agua destilada y aglutinan eritrocitos de distintas especies, estas son características asociadas a la producción de fimbrias. Estas proteínas son factores primarios de virulencia, las cuales son utilizadas para adherirse a las células epiteliales del hospedero. Existen otros factores de virulencia que empiezan a actuar luego de la colonización, como las hemolisinas, proteínas de membrana externa (OMP), lipopolisacáridos somático (LPS) y fosfolipasas (Gil Turnes 1982).

Las fimbrias son el principal factor de virulencia para iniciar la colonización del hospedero, ya que sin ellas no se puede establecer una infección ocular. Ellas logran mantener a la bacteria adherida a pesar del lagrimeo y el movimiento de los párpados. Existen dos tipos funcionales de fimbrias las tipo I y las tipo Q (Atwell *et al.*, 1994).

Las fimbrias tipo Q son las que logran la adherencia de la bacteria a la córnea bovina y las fimbrias tipo I son las que permiten a la bacteria mantenerse adherida y establecer la infección (Fulks *et al.*, 1990). Una misma cepa es capaz de producir los dos tipos de fimbrias. Esta capacidad de producir los dos tipos de fimbrias se debe a una inversión, de una longitud de 2,1Kb, en el ADN cromosomal. Los genes que codifican para las fimbrias se encuentran en este segmento invertible, el cual produce fimbrias tipo I o fimbrias tipo Q. La orientación de este segmento determina cual tipo de fimbria se va a transcribir (Marrs *et al.*, 1988).

Los lipopolisacáridos somáticos también juegan un rol importante en la patogenicidad de *M. bovis*, los cuales estimulan macrófagos, células

endoteliales y linfocitos, que a su vez liberan una serie de citoquinas conocidas como factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-6 (Wannemuehler *et al.*, 1989).

Estas citoquinas inducen la adhesión de neutrófilos y monocitos del endotelio vascular, activando y atrayendo células inflamatorias y mediadores de choque endotóxico. La liberación de endotoxinas induce otros eventos, como la activación de la vía alternativa del sistema del complemento y la cascada de coagulación y reclutamiento de neutrófilos y macrófagos activados aumentando el proceso inflamatorio en el foco de infección. El flujo continuo de neutrófilos al foco infeccioso y la respuesta inflamatoria en los tejidos adyacentes causa la formación de tejido residual (Rochedo& Gil Turnes 2003).

Las hemolisinas son una familia de toxinas formadoras de poros llamadas exotoxinas RTX. Esta familia de proteínas bacterianas se caracteriza por formar poros en las membranas citoplasmáticas de las células blanco, provocando un eflujo de potasio, desequilibrio osmótico y lisis de la misma. En este caso las células blanco pueden ser células epiteliales de la córnea, eritrocitos o leucocitos. Esta exotoxina es dependiente de calcio para llevar a cabo la lisis de los eritrocitos o leucocitos y células epiteliales de la córnea (Angelos *et al.*, 2003). Estudios anteriores sugieren que la lisis osmótica ocurre seguida de un flujo rápido de calcio, este efecto es dependiente de la concentración, sugiriendo que el tiempo de exposición y de descarga de la toxina son factores importantes (Clinkerbeard&Thiessen 1991).

Mediante anticuerpos monoclonales se investigó la existencia de más de una citotoxina secretada por *M. bovis*. Este estudio demostró que la toxicidad sobre las células epiteliales de la córnea puede ser neutralizada mediante la preincubación de las preparaciones de la exotoxina de *M. bovis* con anticuerpos monoclonales. La explicación para esta observación es que la actividad hemolítica y citotóxica son debidas a la misma exotoxina, por lo que la bacteria no produciría más de una exotoxina (Billson *et al.*, 2000).

La familia de exotoxinas RTX está codificada por un operón clásico compuesto por 4 genes llamados A, B, C y D arreglados de la siguiente forma 5'-CABD-3'. La molécula de la citotoxina estructural esta codificada por el gen

rtxA. La activación del gen *rtxA* ocurre por la acilación de residuos de lisina mediado por el producto del gen *rtxC*. La secreción de la toxina RtxA activada es facilitada por la acción combinada de las proteínas RtxB y RtxD (Hess&Angelos, 2006).

Hay evidencia que asocia a la citotoxina de *M. bovis* con la familia de exotoxinas RTX a través de experimentos que demostraron que anticuerpos monoclonales de la hemolisina alfa RTX de *Escherichia coli* (*HlyA*) reconocieron una proteína de 110 KDa en los extractos proteicos de cepas hemolíticas de *M. bovis*. Se identificó el operón RTX completo. El gen *mbxC* se predice que activa a *mbxA*. De las 4 proteínas RTX de *M. bovis*, *MbxC* y *MbxD* son las más parecidas a otras *RtxC* y *RtxD*. La proteína *MbxC* se presume que tiene 168 aminoácidos, *MbxD* tiene 475 aminoácidos. *MbxB* es la más conservada de las 4 proteínas con casi el 70% de identidad aminoacídica con *HlyB* de *E. coli*. Todavía no se sabe si *MbxB* inicia en la primera metionina y tiene 737 aminoácidos o si inicia en la metionina número 21 y tiene 717 aminoácidos y se asemeja al resto de las RtxB (Angelos *et al.*, 2003).

También se realizaron estudios con respecto al cambio de fenotipo hemolítico a no hemolítico. Esto ocurre cuando se inocula *M. bovis* en agar suplementado con sangre ovina y hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual se produce este fenómeno. Algunas de las posibilidades es la pérdida de plásmidos virulentos que contienen genes RTX, pérdida de islas de patogenicidad que contienen genes RTX y la ganancia o pérdida de genes que regulan la expresión de otros genes (Billson *et al.*, 2000). Mediante la técnica de *Western Blot* se analizó un cultivo de una cepa no hemolítica y no se detectó la presencia de *MbxA*; sin embargo no se conoce si esta cepa perdió la habilidad de sintetizar la exotoxina activa o si es sintetizada pero no excretada. En otras cepas estudiadas no se encontró el operón RTX pero si la región flanqueante 5'. Estudiando esta región se encontró una transposasa. Es posible que el fenotipo no hemolítico se desarrolle a partir del fenotipo hemolítico mediante la pérdida de los genes *mbx* utilizando la transposasa (Angelos *et al.*, 2001).

Se encontraron una variedad de enzimas hidrolíticas como ser estearasas C4, estearasas-lipasas C8, lipasa C4, fosfoamidasa, fosfatasa y gelatinasas (Frank & Gelber 1981).

Además de los factores de patogenicidad antes nombrados, *M. bovis* también posee proteínas de membrana externa (OMP). Este patógeno tiene la habilidad de adaptarse a los cambios ambientales incluyendo la capacidad de adquirir hierro desde el hospedero para poder seguir con la producción de proteínas y la síntesis de ADN (Fenwick *et al.*, 1996). El hierro es el cofactor de una gran variedad de enzimas y proteínas redox que juegan papeles críticos en procesos vitales. Por todo esto el hierro es un elemento esencial para todos los microorganismos. Sin embargo, las concentraciones de hierro a nivel extracelular en los tejidos de los mamíferos son extremadamente bajas, porque es secuestrado para compuestos tales como ferritina, el grupo hemo y la hemoglobina o puede estar unido a proteínas con alta afinidad por el hierro como la lactoferritina (Lf) o la transferrina (Tf) (Kakuda *et al.*, 2003). Para superar la deficiencia de hierro durante la infección, las bacterias han desarrollado un conjunto de elementos para obtener este nutriente esencial. Un mecanismo común desarrollado por un gran número de especies bacterianas involucra la síntesis y liberación de una pequeña molécula que quela el hierro llamada sideróforo. La expresión de sistemas de adquisición de hierro es un componente importante de la adaptación bacteriana al crecimiento *in vivo*. La producción de sideróforos por bacterias patógenas es regulado por la concentración de hierro ambiental y es correlativo con su virulencia (Fenwick *et al.*, 1996).

Los sideróforos actúan removiendo el hierro contenido en las proteínas del hospedero. Luego éste se une a los receptores de la superficie celular que importa hierro o a los complejos de sideróforos dentro de la célula bacteriana. Sin embargo, hay especies bacterianas de las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* que han desarrollado otro sistema, el cual remueve hierro directamente desde Tf y Lf mediante receptores específicos, designados como proteína Tf-binding (Tbps) y proteína Lf-binding (Lbps).

Las proteínas de membrana externa hierro reprimibles de *Neisseria* patogénica spp son *FrpB* y *FetA* y la de *Moraxella catarrhalis* es *CopB*. Aunque hay similitudes en la secuencia de aminoácidos de *FetA* y *CopB*, se han reportado diferencias funcionales. Una inactivación insercional de *FetA* no alteró la adquisición de hierro desde Tf y Lf pero abolió la unión férrica. En comparación, una mutación de inserción de *copB* pierde la capacidad de adquirir hierro desde Tf y Lf. Se ha demostrado que el nivel de expresión de la OMP de 79kDa de *M. bovis*, llamada *IrpA*, es en respuesta a la concentración de hierro ambiental. Esta respuesta al hierro y su localización sugieren que esta molécula está involucrada en el sistema de adquisición de hierro. Recientemente, los genes para Lbps y Tbps de *M. bovis* fueron clonados y secuenciados y se vio que las proteínas de membrana externa que están involucradas en la adquisición de hierro son muy conservadas. En base al tamaño molecular se propuso que *IrpA* podría ser homóloga de *FrpB*, *FetA* y *CopB*. También la secuencia nucleotídica del fragmento del gen amplificado mediante PCR inverso y la secuencia aminoacídica N-terminal de *IrpA* indica que *IrpA* está cercanamente relacionada con *FrpB*, *FetA* y *CopB* (Kakuda *et al.*, 2003). El responsable de la regulación del metabolismo del hierro en los procariotas es la proteína Fur. Cuando la concentración citoplasmática de hierro férrico sube, el complejo Fur se une a una secuencia consenso de 19 pares de bases llamada la caja Fur, la cual se encuentra en la región del promotor de los genes de adquisición de hierro reprimiendo la transcripción de estos genes (Yu *et al.*, 2002). Estos genes fueron clonados y secuenciados y se demostró que las proteínas están involucradas en la adquisición de Tf y Lf en los tejidos de bovinos. Estos descubrimientos sugieren que el gen *irpA* es regulado por Fur a nivel de la transcripción (Kakuda *et al.*, 2003).

5.OBJETIVOS:

5.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad de los genes que codifican para dos factores de virulencia, una hemolisina y una proteína de membrana externa Omp79, involucrada en la captación de hierro, en *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* con el fin de aportar datos para el desarrollo de una nueva vacuna contra la QIB.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la variabilidad fenotípica y genotípica de la hemolisina MbxA de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*
- Identificar la variabilidad genotípica de la proteína de membrana externa (OMP79) involucrada en la captación de hierro de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*.

6.MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colección de aislamientos:

En este trabajo se empleó una colección de 51 aislamientos de *Moraxella* spp. generada entre los años 1983 y 2009 (Tabla 1). Esta colección está formada por aislamientos provenientes de diversas localidades geográficas del país y también de casos ocurridos en Kansas, EEUU que fueron cedidas gentilmente al Departamento de Microbiología del IIBCE por el Dr. Brad Fenwick (Kansas State University).

La obtención de las muestras se llevó a cabo por personal especializado y se realizó mediante un hisopado del globo ocular, con precaución de no contactar con párpados o pestañas. Posteriormente, los hisopos se introdujeron en tubos conteniendo medio de transporte.

La siembra bacteriológica se realizó en agar suplementado con sangre ovina al 5% y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Anteriormente dichas cepas se habían identificado bioquímica y molecularmente (Sosa y Zunino 2012).

Luego estas cepas fueron conservadas a -20°C en criotubos conteniendo medio caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol 12% con el fin de tenerlos disponibles para el trabajo diario en el laboratorio. También se conservaron cepas a -80°C para su almacenamiento a largo plazo.

NOMBRE	ORIGEN	HOMOLOGIA	AÑO
Epp63	Cepa referencia (<i>M. bovis</i> , ATCC), Marrs <i>et al.</i> , 1985	<i>Moraxella bovis</i>	1985
BAA1259	Cepa referencia (<i>M. bovoculi</i> , ATCC), Angelos <i>et al.</i> , 2007	<i>Moraxella bovoculi</i>	2007
33078	Cepa referencia (<i>M. ovis</i> , ATCC), Bryn <i>et al.</i> , 1977	<i>Moraxella ovis</i>	1977
Fs 327	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovis</i>	
Fs 328	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovis</i>	
Fs 330	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovis</i>	
Fs 343	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovoculi</i>	
Sp 346	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovis</i>	
Fs 347	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovoculi</i>	
Fs 467	Kansas, EEUU	<i>Moraxella bovoculi</i>	
Art	Uruguay, Artigas	<i>Moraxella bovoculi</i>	2004
CANIA	Uruguay, Canelones	<i>Moraxella bovoculi</i>	2008
CANII	Uruguay, Canelones	<i>Moraxella bovis</i>	2008
CANIIIA	Uruguay, Canelones	<i>Moraxella bovis</i>	2008
CANIIIB	Uruguay, Canelones	<i>Moraxella bovis</i>	2008
PRO	Uruguay, Canelones	<i>Moraxella bovoculi</i>	2007
BM3A	Uruguay, Cerro Largo	<i>Moraxella bovis</i>	2005
BM3B	Uruguay, Cerro Largo	<i>Moraxella bovoculi</i>	2005
LC2747	Uruguay, Flores	<i>Moraxella bovoculi</i>	2006
LC190	Uruguay, Flores	<i>Moraxella bovis</i>	2006
LC010	Uruguay, Flores	<i>Moraxella bovoculi</i>	2006
771A	Uruguay, Florida	<i>Moraxella bovis</i>	2009
771B	Uruguay, Florida	<i>Moraxella bovoculi</i>	2009
2419	Uruguay, Florida	<i>Moraxella bovoculi</i>	1983

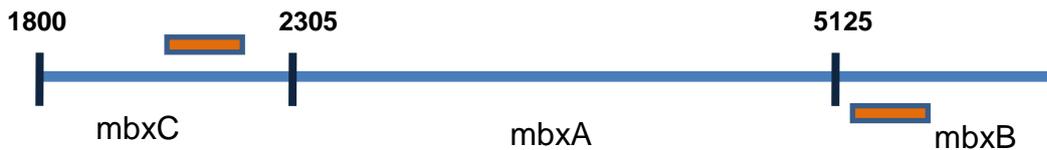
64	Uruguay, Florida	<i>Moraxella bovis</i>	2009
EV121	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovis</i>	2006
EV250	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovis</i>	2006
EV345	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovis</i>	2006
EV366	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovis</i>	2006
EV450A	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovis</i>	2006
EV450B	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovis</i>	2006
EV458	Uruguay, Maldonado	<i>Moraxella bovoculi</i>	2006
3346-II	Uruguay, Mercedes	<i>Moraxella bovoculi</i>	1983
5120	Uruguay, Paysandú	<i>Moraxella bovis</i>	2009
5148	Uruguay, Paysandú	<i>Moraxella bovis</i>	2009
2358	Uruguay, Salto	<i>Moraxella bovoculi</i>	1983
SES	Uruguay, Salto	<i>Moraxella bovoculi</i>	2004
SJ01	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovis</i>	2007
SJ02	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovis</i>	2007
SJ03A	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovoculi</i>	2007
SJ03B	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovis</i>	2007
SJ07	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovis</i>	2007
SJ08	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovis</i>	2007
2439-2	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovis</i>	1983
1965	Uruguay, San José	<i>Moraxella bovoculi</i>	2008
NIN1	Uruguay, Tacuarembó	<i>Moraxella bovoculi</i>	2007
NIN9	Uruguay, Tacuarembó	<i>Moraxella bovoculi</i>	2007
TT3	Uruguay, Treinta y Tres	<i>Moraxella bovoculi</i>	2007
1 A1	Uruguay, Treinta y Tres	<i>Moraxella bovoculi</i>	2008
3 A8	Uruguay, Treinta y Tres	<i>Moraxella bovoculi</i>	2008
2693	Uruguay	<i>Moraxella bovoculi</i>	2008

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

6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Se recuperaron las cepas en agar suplementado con sangre ovina durante 24 horas a 37°C. Este cultivo bacteriano puro se utilizó para la extracción de ADN genómico, la cual se realizó utilizando un kit comercial (EZ-DNA Simple Genomic DNA Isolation Reagent Biological Industries) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se amplificó el gen que codifica para la hemolisina MbxA mediante PCR utilizando los *primers* P-hem y New B gene up diseñados para *M. bovis* por Angelos y Ball 2007. Estos *primers* amplifican un fragmento de 3700 pb, el cual incluye al gen que codifica para la hemolisina MbxA formado por 2500 pb. Las secuencias de los *primers* fueron: New B gene up 5'-ACCTTATCCATCACAACTGAAAAAC-3' y P-hem 5'-ATHGAYTGGATHGCNCCNTTYGGNGAY-3' (Figura 1).



—: *primers mbxF* (se une a 2182) y *mbxR* (se une a 5885) = 3700 pb
mbxA: tiene 2800 pb aprox.

Fig. 1. Esquema de los genes que codifican para la hemolisina MbxA, MbxB y MbxC y los *primers* usados para la amplificación correspondiente.

También se amplificó parte del gen que codifica para la proteína de membrana externa OMP79 empleando los *primers* OMP79r y OMP79f diseñados mediante el programa computacional “Primer3plus”. Estos *primers* amplifican 1138 pb del gen OMP79. Las secuencias de los *primers* utilizados son: OMP79f 5'- GATTTGCTAAAACACACTGA-3' y OMP79r 5'- TGGCTTGTCTGCTTTTG-3'. En ambos casos los *primers* utilizados fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (USA).

El PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L conteniendo 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 2,5 μ L de buffer de PCR 10X, 0,5 μ L de mix de deoxinucleótido trifosfato 6 mM, 0,5 μ L de cada primer 20 μ M, 0,2 μ L de Taq ADN polimerasa 5U y 4 μ L del ADN bacteriano extraído anteriormente. Todos los productos utilizados fueron de la marca comercial Fermentas. Se realizaron controles negativos conteniendo agua miliQ en lugar de ADN molde en cada corrida en paralelo.

El programa utilizado para amplificar el gen *mbxA* consistió en 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 56°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos y 4 minutos a 72°C usando el termociclador T1 Biometra.

Para el caso de la amplificación de la proteína de membrana externa OMP79 el programa fue de 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 45°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos y 4 minutos a 72°C usando el mismo termociclador.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (w/v), empleando solución tampón de corrida TBE (10,8 g de Tris; 5,5 g de ácido bórico; 4 ml de EDTA 0,5 M, pH 8; por litro). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 minutos aproximadamente para verificar su amplificación.

En paralelo a la muestra a analizar se corrió un marcador de tamaño 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 minutos en bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se analizó en un transiluminador de luz UV.

6.3 Secuenciación y Construcción de árboles filogenéticos:

La purificación y secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR fue realizada por MACROGEN Inc. (Corea del Sur). Para la secuenciación se empleó un secuenciador automático.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, las mismas se alinearon y se compararon con las publicadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology* (NCBI) por medio de la herramienta informática BLASTn para determinar la identidad de las mismas.

Para el análisis de las secuencias las mismas se editaron usando el programa DNABaser, con las secuencias editadas se procedió a su alineamiento empleando el programa ClustalX que crea alineamientos de secuencias nucleotídicas y el programa bioinformático MEGA, el cual crea un alineamiento múltiple a partir de las secuencias para luego construir árboles filogenéticos usando métodos basados en caracteres. Mediante estos análisis fue posible establecer la relación filogenética entre los distintos aislamientos de la colección.

7.RESULTADOS

7.1 Amplificación y secuenciación del gen *mbxA* en los diferentes aislamientos:

La amplificación del gen que codifica para la hemolisina MbxA dió como resultado un fragmento de 3700 pares de bases que era lo esperado para este gen (Figura 2). Este gen se amplificó para toda la colección de aislamientos.

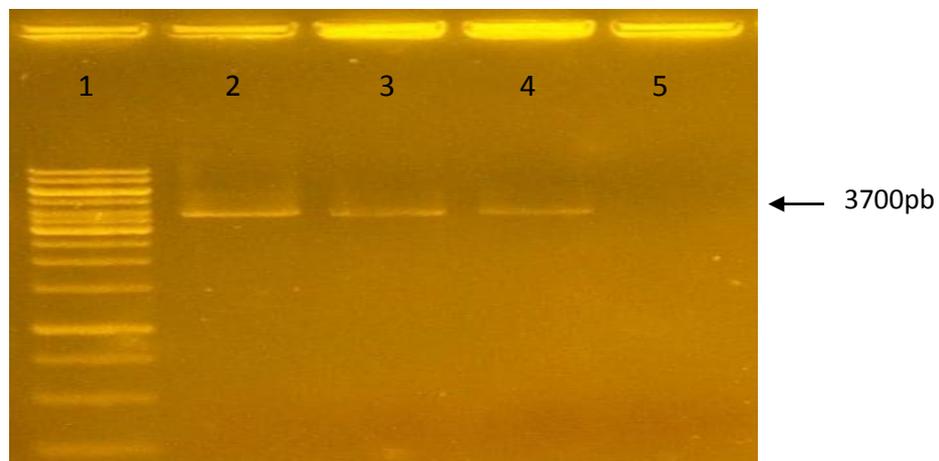


Fig.2 Productos de la amplificación por PCR del gen que codifica para la hemolisina *mbxA*. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-4: amplicones obtenidos. Carril 5: control negativo. Los productos exhiben el tamaño predicho de unos 3700 pares de bases.

Cuando se analizaron las secuencias nucleotídicas del gen *mbxA* obtenidas en este estudio con las presentes en la base de datos del NCBI se observó cierto porcentaje de similitud con secuencias publicadas para otras cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi*.

Mediante la construcción de árboles filogenéticos se estudió la relación evolutiva de este gen. Los resultados obtenidos cuando se analizaron las secuencias nucleotídicas codificantes de las regiones 5' y 3' se presentan en la Figura 3.

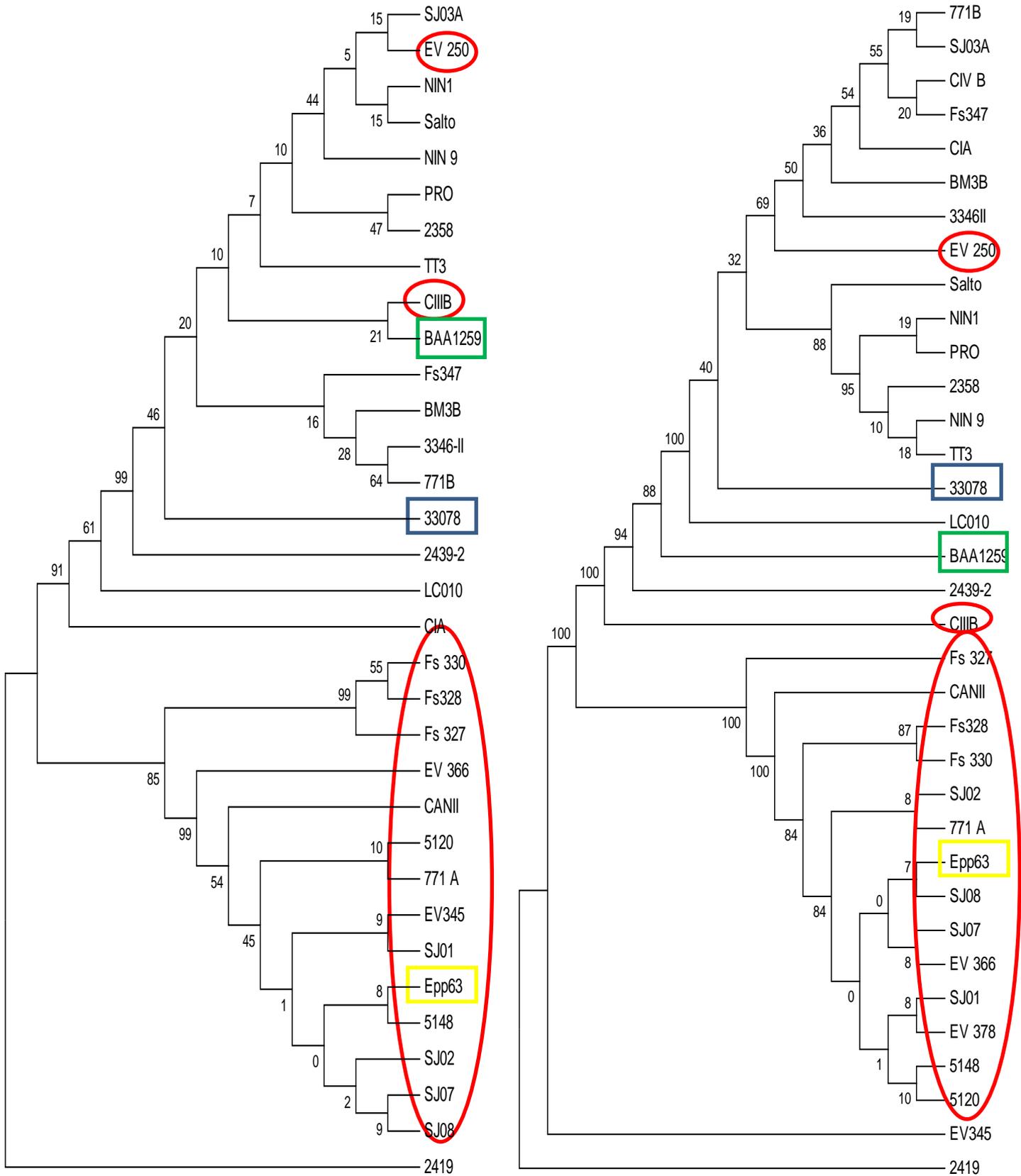


Figura 3. En el árbol filogenético de la izquierda se observan los resultados obtenidos de la secuenciación del extremo 5' del gen que codifica para la hemolisina, mientras que en el de la derecha se observan los resultados obtenidos cuando se secuenció el extremo 3' de este gen. En rojo se engloban los aislamientos que presentan

homología con *M. bovis*, en azul se encuentra *M. ovis* y sin círculo las secuencias con homología con *M. bovoculi*. También se marcan en color amarillo la cepa de referencia de *M. bovis* y en color verde la de *M. bovoculi*.

7.2 Amplificación y secuenciación del gen OMP79 en los diferentes aislamientos:

En el caso del gen que codifica para la proteína de membrana externa OMP79 se obtuvieron amplicones del tamaño esperado que era 1138 pares de bases en los aislamientos de *M. bovis* (Figura 4). Sin embargo no se obtuvieron amplicones en el caso de los aislamientos de *M. bovoculi*.

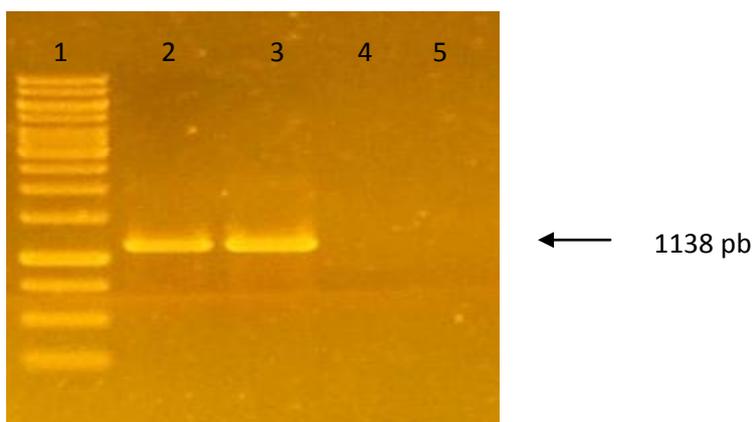


Fig. 4. Productos de la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína de membrana externa omp79. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-3: amplicones obtenidos para aislamientos de *M. bovis*. Carril 4: control negativo. Carril 5: amplicón no obtenido cuando se analizó el ADN de un aislamiento de *M. bovoculi*. Los productos exhiben el tamaño predicho de unos 1138 pares de bases.

Con las secuencias obtenidas para los aislamientos con similitud *M. bovis* se realizó un árbol filogenético para observar cómo se desarrollaba la relación entre los aislamientos. Estos resultados se presentan en la Figura 5.

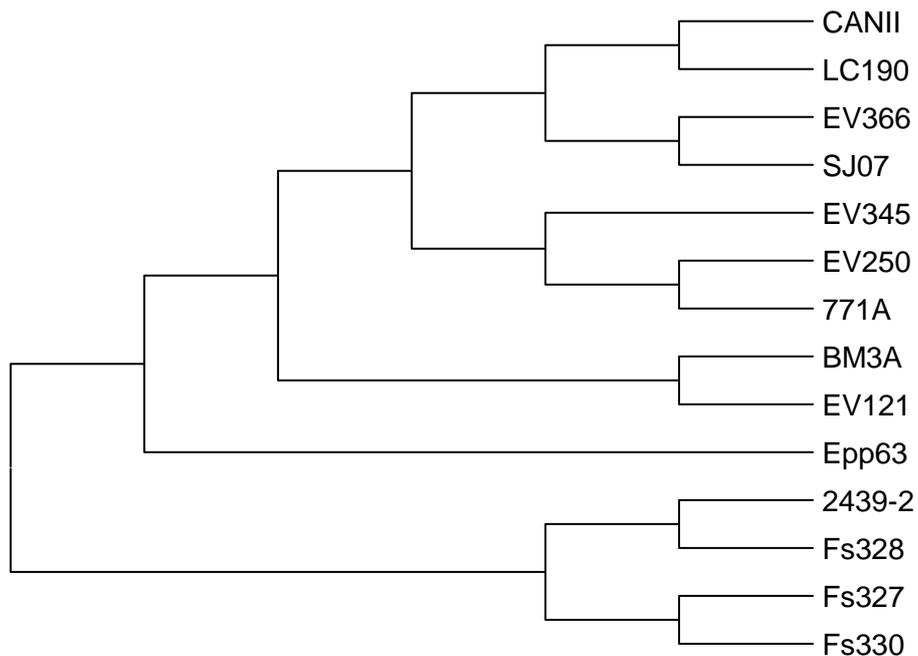


Figura 5. En el árbol filogenético se observan los resultados obtenidos de la secuenciación del gen que codifica para la proteína de membrana externa OMP79. Estas secuencias son solo las de los aislamientos con homología *M.bovis*.

8. DISCUSION

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad altamente contagiosa que causa importantes pérdidas en términos económicos y sanitarios para el sector agropecuario no sólo a nivel nacional sino también a nivel mundial (Webber & Selby 1981). La QIB afecta directamente los ojos de los bovinos, los cuales son el único reservorio de esta enfermedad. Los animales más afectados son los terneros en destete (Gerhardt et al., 1982).

En estudios relacionados con el desarrollo de la QIB se han descubierto distintas especies del genero *Moraxella* responsables de la enfermedad. Estas son *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis* (Angelos et al 2007 y Cerny et al 2006).

Estas bacterias poseen varios factores de virulencia entre los cuales encontramos fimbrias, hemolisinas, proteínas de membrana externa (OMP), lipopolisacáridos somáticos (LPS) o fosfolipasas. Las hemolisinas forman parte de una familia de toxinas formadoras de poros llamadas exotoxinas RTX (Angelos et al 2007). Se caracterizan por producir poros en las membranas citoplasmáticas de las células epiteliales de la córnea, eritrocitos o leucocitos (Angelos et al 2003). Las proteínas de membrana externa (OMP) son otro tipo de factor de virulencia. El hierro es sumamente importante ya que se utiliza como cofactor de enzimas en diversas reacciones de producción de proteínas y síntesis de ADN, aunque se usa para tantas reacciones es escaso en el medio extracelular y por este motivo es tan elemental (Fenwick et al 1996). La proteína de membrana externa de 79 kDa de *M. bovis* llamada *IrpA* se expresa dependiendo el nivel de hierro ambiental. El gen de esta proteína es regulado mediante una secuencia nucleotídica llamada caja fur la cual regula su nivel de transcripción (Kakuda et al 2003).

Con el objetivo de contribuir al estudio de los factores de virulencia que le otorgan el potencial patogénico a los agentes etiológicos de la QIB, en este trabajo se determinó la variabilidad genotípica de la hemolisina MbxA y la variabilidad genotípica de la proteína de membrana externa de 79 kDa (OMP79) en una colección de aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi*.

Para observar la variación genotípica del gen *mbxA* se lo amplificó generando un fragmento de 3700 pb, el cual incluye el gen *mbxA* completo y parte de los genes *mbxB* y *mbxC*. Una vez amplificados, los amplicones fueron purificados y secuenciados. Estas secuencias fueron alineadas usando herramientas bioinformáticas y agrupadas con la finalidad de estudiar la relación filogenética entre las mismas. Los árboles construidos en base a la secuencia del gen *mbxA* están conformados por dos ramas. Una de las cuales

está integrada por secuencias pertenecientes a cepas de *M. bovis* y otra a una mezcla de secuencias de *M. bovoculi*, *M. bovis* y *M. ovis*.

La estructura filogenética observada demuestra un alto porcentaje de similitud entre las secuencias nucleotídicas de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Este resultado indicaría una alta homogeneidad intraespecífica del gen *mbxA* en las dos especies causantes de QIB en Uruguay. Este alto porcentaje de similitud se podría deber a que es un gen muy conservado.

Estos genes son altamente conservados debido a que son factores de virulencia y tienen que funcionar sin ser detectados por el huésped. La mezcla de secuencias podría indicar que aunque existen diferencias entre los factores de virulencia de las distintas especies estas no son tan marcadas. Esta homología también se da a nivel de las distintas localizaciones geográficas, ya que los 51 aislamientos son de 12 departamentos diferentes (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Flores, Florida, Maldonado, Soriano, Paysandú, Salto, San José, Tacuarembó y Treinta y Tres) e incluso hay aislamientos de la ciudad de Kansas, EEUU. Sin embargo, estas diferencias geográficas no se ven reflejadas en las ramas de los árboles filogenéticos ya que cada rama es homogénea en su composición no importa de dónde sea la cepa sino de que especie sea. Este aspecto puede ser de importancia para la selección de componentes de vacunas contra la QIB ya que podrían ser utilizadas en todo el territorio nacional.

En el caso del gen que codifica para la proteína de membrana externa OMP79 solo se obtuvieron amplicones en los aislamientos con homología *M. bovis* de aproximadamente 1138 pb los cuales corresponden al tamaño predicho. Estas secuencias fueron analizadas mediante programas bioinformáticos y se construyó un árbol filogenético, el cual demostró un alto porcentaje de similitud intraespecífico entre las diferentes secuencias. En base al estudio realizado no se puede asegurar que *M. bovoculi* no presente genes codificantes de la proteína de membrana externa de 79 kDa, pero sí que las secuencias codificantes son diferentes entre ambas especies. Estas diferencias

entre las secuencias nucleotídicas de *M. bovis* y *M. bovoculi* tienen que ser consideradas para el diseño de nuevas vacunas.

Para continuar con este estudio se planean hacer trabajos a nivel de proteínas de membrana externa para poder realizar sugerencias más fehacientes en cuanto a la existencia y el funcionamiento de la proteína de membrana externa de 79 kDa en las cepas de *M. bovoculi*.

9. REFERENCIAS

Angelos, J. *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis: cause or coincidence?. *Vet clin food anim* 26 p73-78. 2010.

Angelos, J., Hess, J. y George, L. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *AJVR*, vol 62 n°8. 2001.

Angelos, J., Hess, J. y George, L. An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Veterinary microbiology* 92 p363-377. 2003.

Angelos, J., Ball, L. y Hess, J. Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology* 125 p73-79. 2007.

Angelos, J. y Ball, L. Relatedness of cytotoxins from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology* 124, p382-386. 2007.

Angelos, J., Spinks, P., Ball, L. y George, L. *Moraxella* sp. Nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, p789-795. 2007.

Atwell, J., Tennent, J., Lepper, A. & Elleman, T. Characterization of pilin genes from seven serologically defined prototype strains of *Moraxella bovis*. Journal of bacteriology, v176, n16, p 4875-4882. 1994.

Bateman, K., Leslie, K. & Scholl, T. A field trial of a pilated *Moraxella bovis* bacterin for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. Can J comp med, v27, p 23-27. 1986.

Billson, F., Harbour, C., Michalski, W., Tennent, J., Egerton, J. y Hodgson, J. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysin neutralizing monoclonal antibody. Infection and immunity, vol 68 n°6 p 3469-3474. 2000.

Cerny, H., Rogers, D., Gray, J., Smith, D., Hinkley, S. Effects of *Moraxella (Branhamella) ovis* Culture Filtrates on Bovine Erythrocytes, Peripheral Mononuclear Cells, and Corneal Epithelial Cells. Journal of Clinical Microbiology, v 44, p 772-776, 2006.

Clinkerbeard, K. y Thiessen, A. Mechanism of action of *Moraxella bovis* hemolysin. Infection and immunity, vol59, n°3 p1148-1152. 1991.

Dubay, S., Williams, E., Mills, K. y Boerger-Fields, A. Association of *Moraxella ovis* with keratoconjunctivitis in mule deer and moose in Wyoming. Journal of Wildlife diseases, 36 (2), pp 241-247. 2000.

Fenwick, B., Rider, M., Liang, J. y Brighman, A. Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. Veterinary Microbiology 48, p 315-324. 1996.

Frank, S. y Gerber, J. Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. Journal of Clinical Microbiology, v13, p 269-271. 1981.

Fulks, K., Marrs, C., Stevens, S., Green, M. Sequence analysis of the inversion region containing the pilin genes of *Moraxella bovis*. Journal of Bacteriology, v172, p310-316. 1990.

Gerhardt, R., Allen, J., Greene, W. The role of face flies in an episode of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.180, p.156-159, 1982.

Gil Turnes, C. Reyes, J.C.S., Araujo, F.L. Comparação da proteção induzida por vacinas de *Moraxella bovis* com e sem antígenos de pili. In: XVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1982, Camboriu, SC, Brasil.

Gil Turnes, C. Ceratoconjuntivite Infeciosa Bovina. In: RIET-COREA, F., SCHILD, A.L. E MENDEZ, M.C. Doenças de Ruminantes e Equinos. Ed. Universitária/UFPel. p 180-191. 1998.

Hess, J. & Angelos, J. The *Moraxella bovis* RTX toxin locus *mbx* defines a pathogenicity island. *Journal of Medical Microbiology*, v 55, p 443-449, 2006.

Kakuda, T., Oishi, D., Tsubaki, S., Takai, S. Molecular cloning and characterization of a 79-kDa iron-repressible outer-membrane protein of *Moraxella bovis*. *FEMS Microbiology Letters* v 225, p 279-284, 2003.

Lepper, A., Elleman, T., Hoyne, P., Lehrbach, P., Atwell, J., Schwartzkoff, C., Egerton, J. y Tennent, J. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary microbiology*, v36, p 175-178. 1993.

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.

Marrs, F., Ruehl, W., Schoolnik, G. y Falkow, S. Pilin gene variation of *M. bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *J bacterial* 170 (7):3032-9. 1988.

Postma, G., Carfagnini, J. y Minatel, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: An update, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, doi:10.1016/j.cimid.2008.04.001. 2008.

Rochedo, F. & Gil Turnes, C. *Moraxella bovis*: influencia das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. *Ciencia Rural*, Santa Maria v33, n4, p778-787, 2003.

Sosa, V., Zunino, P. Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated with infectious bovine keratoconjunctivitis in Uruguay. *The Veterinary Journal* (2012), doi:10.1016/j.tvjl.2012.01.011

Wannemuehler, Y., Johansen, K. y Rosenbusch, R. Identification of *Moraxella bovis* by using a monoclonal antibody to a lipopolysaccharide epitope. *Journal of clinical microbiology* vol27, n°12. P2881-2883. 1989.

Webber, J.& Selby, L. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, v.179, p. 823-826, 1981.

Yu, R. y Schryvers, A. Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochem cell biol* 80. p.81-90. 2002.