



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de *Pasteurella multocida*  
aislada de alpacas con signos de neumonía**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias  
Veterinarias Mención en Salud Animal

**AUTOR**

Rocío RIMAC BELTRÁN

**ASESOR**

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rimac R. Caracterización molecular de *Pasteurella multocida* aislada de alpacas con signos de neumonía [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2016.

---

1214



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
 Universidad del Perú, DECANATO DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
 UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE  
 MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS MENCIÓN SALUD ANIMAL**

S.M.  
MTC  
68

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:30 horas del día viernes 26 de agosto del 2016, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara y constituido por los siguientes miembros: Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández (Asesor), Mg. Mercy Ramírez Velásquez, Dr. Víctor Velez Marroquín, Dr. Luis Antonio Llanco Alborno, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

**" Caracterización Molecular de *Pasteurella multocida* Aislada de Alpacas con Signos de Neumonía",** presentado por la Bachiller en Medicina Veterinaria:

**ROCÍO RIMAC BELTRÁN**

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE (19)**  
 A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal, a la Bachiller en Medicina Veterinaria **ROCÍO RIMAC BELTRÁN**

Siendo las 12:00 horas del día viernes 26 de agosto del 2016, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....  
 Dr. Raúl H. Rosadio Alcántara ( P.P.T.C)  
**Presidente**

.....  
 Mg. Mercy Ramírez Velásquez (P.Aux.D.E.)  
**Miembro**

.....  
 Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández (P.A.T.C)  
 (Asesor)

.....  
 Mg. Sc. Víctor Manuel Vélez Marroquín (P.A.T.C)  
**Miembro**

.....  
 Dr. Luis Antonio Llanco Alborno  
**Miembro**

.....  
 Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.A.D.E.)  
**Director (e) de la Unidad de Posgrado**  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
**UNMSM**



## **Dedicatoria**

Este estudio está dedicado a la familia Rimac Beltrán,

Luis H. Cusihuallpa Quispe y familia.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Raúl Rosadio y Dr. Lenin Maturrano por sus conocimientos y enseñanzas.

A la vez, se agradece al equipo de la Sección de Biología y Genética Molecular: Luis Luna, Raquel Hurtado, Jorge Maximiliano, Ana Chero, Geraldine Marcelo y Gerardo Díaz.

El presente estudio fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad INNÓVATE Perú (FINCyT), proyecto contrato N°133-FINCyT-IB-2013: “Vacunología Reversa: Desarrollo de una Vacuna de Nueva Generación para el control y/o prevención de la neumonía pasteurolosica en alpacas”



## INDICE

Resumen .....	i
Abstract .....	ii
Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Cuadros .....	iv
Lista de Figuras .....	v
Lista de Anexos .....	vii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Características de <i>Pasteurella multocida</i> .....	5
2.2. Factores de virulencia .....	6
2.2.1. Cápsula.....	6
2.2.1.1. Estructura.....	6
2.2.1.2. Genética de la Biosíntesis Capsular .....	7
2.2.1.3. Rol en la virulencia .....	8
2.2.2. Lipopolisacárido (LPS).....	9
2.2.2.1. Estructura .....	9
2.2.2.2. Papel de LPS en la virulencia.....	10
2.2.3. Fimbrias y Adhesinas.....	10
2.2.4. Toxinas.....	11
2.2.5. Proteínas de adquisición de hierro y reguladas por hierro.....	11
2.2.6. Metabolismo de ácido siálico.....	12
2.2.7. Hialuronidasa.....	13
2.2.8. Proteínas de membrana externa.....	13
2.3. Las interacciones entre las bacterias y las defensas del huésped .....	14
2.4. PCR palindrómica extragénica repetitiva (REP-PCR).....	16
2.4.1. Aplicaciones en la microbiología.....	17

	2.5. <i>Pasteurella multocida</i> en rumiantes y alpacas.....	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
	3.1. Lugar del Estudio.....	24
	3.2. Antecedentes de los aislados <i>Pasteurella multocida</i> .....	24
	3.3. Toma de muestra.....	25
	3.4. Reactivación e Identificación bioquímica.....	25
	3.5. Extracción de ADN.....	26
	3.6. Identificación por PCR .....	26
	3.7. Tipificación capsular .....	27
	3.8. Tipificación del LPS .....	27
	3.9. Genes de Virulencia .....	28
	3.10. REP-PCR.....	29
	3.11. Análisis de los perfiles electroforéticos y elaboración de dendogramas	30
IV.	RESULTADOS .....	31
	4.1. Antecedentes de los aislados <i>Pasteurella multocida</i> .....	31
	4.2. Identificación por PCR .....	32
	4.3. Tipificación capsular .....	33
	4.4. Tipificación del LPS .....	34
	4.5. Genes de Virulencia .....	34
	4.6. REP-PCR.....	36
	4.7. Análisis de los perfiles electroforéticos y elaboración de dendogramas .....	39
V.	DISCUSIÓN.....	42
VI.	CONCLUSIONES.....	49
VII.	LITERATURA CITADA.....	50
VIII.	ANEXO.....	67

## RESUMEN

La crianza de camélidos sudamericanos es el principal recurso económico para las comunidades andinas, sin embargo su producción se ve afectada por los altos porcentajes de mortalidad causada por la neumonía. *Pasteurella multocida* es un agente bacteriano frecuentemente aislado a partir de pulmones de alpacas con procesos neumónicos, sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de sus características genotípicas. Por ello, el objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente 24 aislados de *P. multocida* provenientes de alpacas con neumonía, identificados por pruebas bioquímicas y mediante la prueba de PCR a través de la amplificación del gen *kmt1* presente solo en esta especie. Posteriormente se realizó la tipificación capsular mediante la técnica de PCR múltiple obteniéndose que todos los aislados pertenecen al tipo capsular A. La tipificación en base al antígeno LPS, el cual permite la clasificación de *P. multocida* en 16 serovares agrupados en 8 genotipos, resultó en que los aislados de este estudio pertenecieron al genotipo LPS L6, correspondiente a los serovares 10, 11, 12 y 15. Además, se analizó la presencia de 4 genes codificantes de factores de virulencia (*toxA*, *tbpA*, *pfhA* y *hgbB*), detectándose en todos los aislados los genes *toxA* (100%) y *tbpA* (100%). Para evaluar la diversidad entre los aislados, se emplearon las técnicas BOX-PCR y ERIC-PCR, los cuales fueron analizados por el programa NTSYSpc 2.10 para el desarrollo de los dendogramas mostrando baja diversidad entre los aislados de alpaca, corroborado por el agrupamiento de 23/24 aislados en un único cluster. Los resultados obtenidos indican que el 100% de los aislados de *P. multocida* de alpacas son del tipo capsular A, genotipo LPS L6 (serovar 10, 11, 12 y/o 15), presentan los genes *toxA*, *tbpA* y una homogeneidad genética en la mayoría de las cepas, dando una fuerte evidencia de una fuente común de infección y posterior diseminación clonal de la cepa patógena que afectó a los animales. La información genética obtenida acerca de *P. multocida* permitirá, además de un mayor conocimiento de este patógeno, la elaboración de estrategias de control y prevención de la neumonía en alpacas.

**Palabras clave:** *Pasteurella multocida*, alpacas, neumonía, caracterización molecular

## ABSTRACT

South American Camelids production are the main economic resource for Andean communities, however, its production is affected by high rates of mortality due to pneumonia. *Pasteurella multocida* is a bacterial agent frequently isolated from lung tissue of alpaca pneumonic, however, little is known about their genotypic features. Therefore, the study aims to molecularly characterize the 24 *P. multocida* isolates from pneumonic alpacas, first identified by biochemical tests and *kmt1* gene PCR amplifying present only in this species. Subsequently, capsular typing was performed using multiplex PCR, and Capsular type A was determined in all isolates. LPS characterization, which allows the classification in 16 serovars grouped in 8 genotypes, resulted in that all isolates belonging to LPS L6 genotype, corresponding to the serovars 10, 11, 12 and 15. Besides, four virulence factors codificant genes were evaluated (*toxA*, *tbpA*, *pfhA* y *hgbB*), and *toxA* (100%) and *tbpA* (100%) genes were detected in all isolates. To assess the genetic diversity among isolates, BOX-PCR and ERIC-PCR techniques were used, and electrophoretic profiles were analyzed by the NTSYSpc 2.10 software for development and visualization of dendrograms, resulting in low diversity among alpaca isolates, corroborated by the grouping of 23/24 isolates in a single cluster. The results indicate that the 100% of the isolates of *P. multocida* from alpacas belonging to the capsular type A, LPS L6 genotype (serovar 10, 11, 12 and/or 15), were found the *toxA* and *tbpA* genes, and a genetic homogeneity in the isolates was observed, giving a strong evidence of a common source of bacterial infection, and subsequently clonal dissemination in the susceptible animals. The genetic information obtained about *P. multocida* allows, besides of a higher knowledge of the bacterial pathogen, strategies prevention developing, for the control and prevention of alpaca pneumonia.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*, alpacas, pneumonia, molecular characterization

## LISTA DE ABREVIATURAS

- atpD*: ATP sintasa subunidad B
- cbhH*: participación en la síntesis del polisacárido de tipo B
- locus cap*: región de genes de la capsula
- exbB*, *exbD*: proteína de transporte
- tonB*: provee energía para el transporte de hierro
- hgbA*: receptor de hemoglobina dependiente TonB
- fimA*: fimbria
- flp*, *flp2*: pilina
- hsf-1*, *hsf2*: fibrilla de superficie
- ptfA*: fimbria tipo IV
- pfhA*: hemaglutinina filamentosa
- pfhA1*, *pfhA2*: hemaglutinina filamentosa
- toxA*, **PMT**: toxina dermonecrótica
- hgbB*: proteína de unión a hemoglobina
- tadD*: deaminasa específico tRNA
- tbpA*, *tbpB* : receptores de transferrina
- tbpA*: proteína de unión a transferrina A
- soda*, *sodC*: superóxido dismutasa
- infB*: factor de iniciación para translocación
- rpoB*: subunidad  $\beta$  RNA polimerasa directo-ADN
- nanB*, *nanH*: proteína de membrana externa integrada (sialidasa)
- ompA*: proteína de membrana  $\beta$ -barril
- Oma87*: Oma87-Oma85 como proteína de ensamblaje
- hptE*: heptosiltransferasa
- ompH*: porina H
- pmHAS**: hialuronano sintasa
- pmHS1**: heparina
- PMCs**: condroitina
- PlpB**: lipoproteína B de *Pasteurella*

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Secuencia de cebadores empleados para la identificación de <i>P. multocida</i> .....	26
2	Secuencia de los cebadores empleados para la tipificación capsular.....	27
3	Secuencia de los cebadores empleados para la tipificación del LPS.....	28
4	Secuencia de cebadores empleados para los genes de virulencia.....	29
5	Secuencia de cebadores empleados para el rep-PCR.....	29
6	Características moleculares de las cepas control y cepas de Alpaca.....	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Pulmones con Moderada bronconeumonía lobular	31
2	<b>Calidad de ADN de aislados de <i>P. multocida</i>.</b> Carril 1-15: ADN extraído de aislados <i>P. multocida</i> de alpacas. M: Fago Lambda $\lambda$	30
3	<b>Detección molecular de <i>P. multocida</i> mediante la amplificación del gen <i>kmt1</i>.</b> Carril 1: control positivo de <i>P. multocida</i> , Carril 2-9: Aislados de <i>P. multocida</i> de alpaca, M: Marcador de peso molecular 100 bp.	32
4	<b>Análisis por PCR para la tipificación capsular de <i>P. multocida</i>.</b> M: Marcador de 100 pb, Carril 1: Cepa de ovino Tipo A (1044 pb), Carril 2: Cepa control tipo D (657 pb), Carril 3-8: Aislados de <i>P. multocida</i> de alpacas	33
5	<b>Tipificación del LPS por PCR múltiple.</b> Carril 1-14: Cepas positivas al genotipo LPS 6. Carril 15: Cepa control de genotipo LPS 3 (474 pb). Carril 16: Cepa control de genotipo LPS 6. Carril 17: Marcador de peso molecular 100 pb	34
6	<b>Cepas positivas a los genes <i>toxA</i> y <i>tbpA</i>.</b> M: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1-13: Cepa positivas a los genes <i>toxA</i> (865pb) y <i>tbpA</i> (728pb). Carril 14: Cepa positiva al gen <i>hgbB</i> (788 pb).	35
7	<b>Análisis por las técnicas BOX-PCR (carril 1-5) y ERIC-PCR (carril 6-10).</b> M <sub>1</sub> : Marcador de 100 pb. Carril 1-2: Cepas de alpaca. Carril 3-4: cepas control A y D. Carril 6-7: Cepas de alpaca, Carril 8-9: cepas control A y D. M <sub>2</sub> : Marcador de 1 kb. Carril 5 y 10: Control negativo	36
8	<b>Análisis de la técnica BOX-PCR.</b> Carril 1: Marcador de 1kb. Carril 2-16: cepas de alpaca. Carril 17: Marcador de 100 pb.	37
9	<b>Análisis de la técnica ERIC-PCR.</b> M <sub>1</sub> : Marcador de 1 kb. Carril 1-16: cepas de alpaca. Carril 17 y 18: cepas control ovino A y D. M <sub>2</sub> : marcador de 100 pb.	38
10	<b>Análisis de cepas <i>E. coli</i> (EPEC) de alpaca con BOX-PCR (izquierda) y ERIC-PCR (derecha).</b> Carril 1 y 2: Cepas <i>E. coli</i> . M <sub>1</sub> : Marcador de 1 kb, M <sub>2</sub> : Marcador de 100 pb	39

11	Dendograma del análisis BOX-PCR	40
12	Dendograma del análisis ERIC-PCR	41

## LISTA DE ANEXO

ANEXO 1. Cuadro de análisis de cepas *Pasteurella multocida* de alpacas y cepas control de ovino 68

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de camélidos sudamericanos es la fuente económica más importante para las comunidades andinas dedicadas a su crianza, sin embargo la presentación de distintas enfermedades elevan el porcentaje de mortalidad (Ameghino y De Martini, 1991), siendo los procesos neumónicos uno de los principales causas de mortalidad en alpacas neonatas. *Pasteurella multocida* es el principal agente bacteriano involucrado en neumonías agudas (Cirilo, 2008; Rosadio *et al*, 2011) y forma parte de la microbiota nasal residente de alpacas adultas (Rodríguez y Mimbela, 1981; Barsallo, 1985), sin embargo ante eventos de estrés potenciados por los factores ambientales como la época de lluvia (concordando con la época de parición) y helada (Ameghino y De Martini, 1991), este agente bacteriano se dirige hacia los pulmones, multiplicándose y colonizando los alveolos, afectando principalmente a los animales inmunocomprometidos, desarrollándose la enfermedad (Yates, 1982).

Diversos estudios reportan a *P. multocida* como causante de cuadros neumónicos en 11 de 26 alpacas diagnosticadas con neumonía (Ameghino y Calle, 1989; Ameghino, 1990).

Posteriormente, Guzmán (2011) a partir de crías de alpacas con signos de neumonía, aisló cepas de *P. multocida* en 33/57 pulmones. Este proceso neumónico generalmente es de origen multifactorial, debido a la presencia de agentes virales y bacterianos (Virus de Parainfluenza tipo 3, Virus Respiratorio Sincitial bovino y *Mannheimia haemolytica*) detectados en pulmones neumónicos de alpacas, favoreciendo la proliferación bacteriana (Guzmán *et al*, 2013; Cirilo, 2008; Rosadio *et al*, 2011).

Esta bacteria está clasificada en 5 tipos capsulares o serogrupos (A, B, D, E y F) de acuerdo a su composición capsular mediante la prueba de hemaglutinación indirecta (Carter, 1952); y en 16 serovares o serotipos basados en la expresión de antígenos lipopolisacáridos (LPS) usando el método de precipitación en agar gel (Heddleston *et al.*, 1972). Presenta también una variedad de genes de virulencia distribuidas en 7 grupos citándose algunos de ellos: adhesinas (*ptfA*, *pfhA*, *tadD*), toxinas (*toxA*), superóxido dismutasa (*tbpA*, *sodC*), sialidasas (*nanB*, *nanH*), protectinas (*ompA*, *ompH*), hialuronidasa (*pmHAS*) y los involucrados en la adquisición de hierro (*exbB*, *tonB*). Sin embargo, los procesos de tipificación mediante el uso de técnicas microbiológicas invierten una cantidad considerable de tiempo en ser realizadas, así como la serotipificación, por un limitado acceso a antisueros específicos. Por esta razón, una serie de métodos de tipificación genética se han desarrollado como un esfuerzo para permitir un mayor acceso a métodos de tipificación precisos y discriminatorios (Blackall y Mifflin, 2000).

Aunque la serotipificación de ambos antígenos capsulares y del LPS son muy útiles para la identificación de la bacteria, se ha visto limitada la información provista para estudios epidemiológicos para distinguir cepas del mismo serotipo (Amonsin *et al.*, 2002). Por ello a través de otras técnicas moleculares de análisis de diversidad, como el PFGE, es posible identificar diferencias entre cepas aisladas de un brote con fines epidemiológicos, sin embargo esta técnica emplea equipos costosos, complejos y de mucho tiempo. Visto esto, distintos estudios han optado por utilizar la técnica de PCR basado en secuencias repetitivas (REP) debido a su rapidez y menor costo.

Por ello, el objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente aislados de *P. multocida* de alpacas con procesos neumónicos, obteniéndose mayor conocimiento de este patógeno y desarrollar estrategias de control y prevención.

## II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

Las bacterias del género *Pasteurellae* son organismos inmóviles, gram negativas, cocobacilares de medidas de 0,3 a 1,0 um de ancho y 1,0-2,0 um de longitud. Pueden crecer bajo condiciones aeróbicas, microaerofílicas, y crecer óptimamente a 37°C. La mayoría de las especies en el género son oxidasa y catalasa positivo y pueden fermentar glucosa y otros azúcares con la producción de ácido pero no gas. Pueden ser cultivadas en medios ricos tales como infusión de corazón cerebro y medios conteniendo sangre de rumiantes, pero no en agar MacConkey o el medio de citrato de Simmons (Boyce *et al.*, 2010)

Esta bacteria es considerada parte de la microbiota nasal residente en muchas especies de vertebrados, pero también pueden ser patógenos primarios u oportunistas. Es causante de numerosas enfermedades de mucha importancia económica para la industria ganadera, avícola y porcina, incluyendo el cólera aviar (pasteurellosis aviar) en aves, la septicemia hemorrágica (SH) en ungulados, y rinitis atrófica (RA) en cerdos. Además es un patógeno importante en una amplia gama de infecciones zoonóticas en los seres humanos (Boyce *et al.*, 2010).

## 2.1. CARACTERÍSTICAS DE *Pasteurella multocida*

Trevisan (1887), propuso el nombre del género *Pasteurella* para describir las bacterias asociadas con el cólera aviar y septicemia hemorrágica del ganado (Mutters *et al.*, 1985). Inicialmente se utilizaron una serie de diferentes nombres de especies, pero el nombre actual de *P. multocida* fue propuesto en 1938 para incluir "organismos típicos, productores de indol, septicemia hemorrágica no hemolítica" (Rosenbusch y Merchant., 1939). El género contiene actualmente 12 especies nombradas tal como figura en la lista de nombres bacterianos en la nomenclatura ([www.bacterio.cict.fr/index.html](http://www.bacterio.cict.fr/index.html)). Sin embargo, el análisis filogenético basado en la hibridación de ADN-ADN (Mutters *et al.*, 1985) y la similitud de los genes 16S rRNA y varios genes housekeeping (*infB*, *rpoB*, *sodA* y *atpT*) (Korczak y Kuhnert, 2008) sugieren fuertemente que sólo *P. multocida*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, y *Pasteurella stomatis* son miembros de *Pasteurella sensu stricto*.

*Pasteurella multocida* se encuentra mayormente asociada a enfermedades de importancia económica, siendo *P. multocida subsp. multocida* la subespecie comúnmente identificada. Una gama de métodos serológicos y genéticos han sido desarrollados para la diferenciación de cepas, de los cuales dos métodos serológicos son utilizados mayormente para tipificar cepas de *P. multocida* (Boyce *et al.*, 2010). El primer método, desarrollado por Carter (1952), es una prueba de hemaglutinación indirecta que utiliza eritrocitos sensibilizados con antígenos capsulares identificando los cinco serogrupos (A, B, D, E y F) basado principalmente en el polisacárido capsular. El segundo método serológico, desarrollado por Heddleston *et al.* (1972), es una prueba de precipitación en agar gel que reconoce los 16 serotipos basados en la expresión de antígenos lipopolisacáridos (LPS). Estudios estructurales han dilucidado que cada uno de los 16 serotipos de Heddleston expresan moléculas del LPS estructuralmente distintos (St. Michael *et al.*, 2005a, 2005b).

El sistema estándar para la serotipificación de *P. multocida* emplea ambas pruebas serológicas, el de tipo capsular seguido por el tipo de LPS (por ejemplo, una designación de A:1 es de tipo capsular A, Heddleston LPS tipo 1). Aunque es el sistema estándar de serotipificación, los métodos requieren mucho tiempo y acceso a antisueños específicos. Por esta razón, una serie de métodos de tipificación genética se han desarrollado en un esfuerzo para permitir un mayor acceso a métodos de tipificación precisos y discriminatorios (Blackall y Miflin, 2000). Además los métodos de tipificación genética permiten una mayor discriminación en comparación a los métodos serológicos y también son útiles para diferenciar aislados específicos dentro y entre los brotes.

Ensayos basados en la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido diseñados para distinguir cepas de *P. multocida* de otras especies bacterianas. En el estudio realizado por Townsend *et al.* (1998), diseñaron cebadores específicos para el gen *kmt1*, una esterasa/lipasa predicha capaces de identificar *P. multocida*. Por otro lado, también se diseñaron cebadores para diferenciar el serotipo capsular de *P. multocida* (A, B, D, E, y F) (Townsend *et al.*, 2001) en base a las secuencias dentro de los locus biosintéticos capsulares, siendo una técnica rápida y altamente sensible (Davies *et al.*, 2004).

## **2.2. FACTORES DE VIRULENCIA**

### **2.2.1. Cápsula**

#### **2.2.1.1. Estructura**

La mayoría de las cepas de *P. multocida* producen una cápsula de polisacárido en su superficie, con diferentes composiciones químicas que han sido identificadas. Cepas del tipo A expresan una cápsula de polisacárido compuesto principalmente de ácido hialurónico (Rosner *et al.*, 1992). Cepas del tipo D expresan una cápsula de polisacárido compuesto de heparina (DeAngelis *et al.*, 2002), mientras que cepas del tipo F expresan una cápsula compuesta de

condroitina (DeAngelis *et al.*, 2002). Estos polisacáridos capsulares son todos glicosaminoglicanos (GAGs) que son idénticos en estructura primaria a los componentes de la matriz extracelular eucariota, aunque la heparina y la condroitina eucariota son sulfatados mientras que los polisacáridos capsulares bacterianos no lo son. En eucariotas, GAGs son componentes estructurales esenciales con un papel crítico en la adhesión célula-célula y en la regulación de la actividad de diversas proteínas (Boyce *et al.*, 2010).

La presencia de estas moléculas en el hospedero significa que no hay ningún, o muy limitado, reconocimiento de acogida de bacterias encapsuladas por estos polisacáridos. Este mimetismo molecular es fundamental para las bacterias para evitar la respuesta inmune del hospedero. La estructura química exacta de los polisacáridos expresado por cepas tipo B y E no han sido dilucidados, pero el tipo B está compuesta de manosa, arabinosa y galactosa (Boyce *et al.*, 2010)

### **2.2.1.2. Genética de la Biosíntesis Capsular**

Las secuencias de nucleótidos de los *loci* biosintéticos capsulares de *P. multocida* tipos A y B (Chung *et al.*, 1998; Boyce *et al.*, 2000) y las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis del polisacárido serotipo-específico de los tipos D, E, y F fueron analizados (Townsend *et al.* 2001). La organización genética de cada *locus* muestra similitud al grupo II de los operones biosintéticos capsular en otras bacterias gram-negativas y los genes pueden ser agrupados en tres regiones. La Región 1 contiene genes predichos para codificar proteínas implicadas en la exportación del polisacárido a la superficie a través de un sistema de transporte de casete de unión-ATP; los genes en la región 1 están muy conservados entre todos los cinco serotipos. Participación de *hexA* (serotipo A:1) y *cexA* (serotipo B:2) en el transporte del polisacárido a la superficie bacteriana se ha confirmado por mutagénesis (Boyce y Adler., 2000; Chung *et al.*, 2001).

La Región 2 contiene genes predichos para codificar las proteínas implicadas en la síntesis de polisacáridos serotipo-específico. Cada una de las sintetas responsables de la polimerización del ácido hialurónico (PmHAS), heparina (PmHS1) y la condroitina (PMCs), polisacáridos expresados por los serotipos A, D, y F, respectivamente, han sido confirmados por mutagénesis y/o ensayos funcionales (DeAngelis *et al.*, 1998; DeAngelis y Padgett - McCue 2000; Kane *et al.*, 2006). Estas sintetas son transferasas bifuncionales, capaces de adición tanto del ácido glucurónico y N - acetil glucosamina o N - acetil galactosamina a la molécula. Implicación del producto codificado por el gen *bcbH* que está involucrado en la síntesis del polisacárido de tipo B ha sido confirmada por mutagénesis (Boyce y Adler, 2001).

La Región 3 contiene genes predichos de estar implicado en la lipidación y unión superficial de los polisacáridos; estos genes están muy conservados entre todos los cinco serotipos. El nivel de expresión de la cápsula es reducida en condiciones bajas de hierro libre y la presencia de ciertos antibióticos (Jacques *et al.*, 1991, 1994; Melnikow *et al.*, 2008). Análisis de una cepa sin cápsula indicó que había reducido altamente la transcripción a través del locus *cap* (Watt *et al.*, 2003).

Aunque este informe inicial no descartó la posibilidad de que la transcripción reducida se deba a mutaciones en las regiones promotoras de *cap*, recientemente se ha demostrado que la pérdida de la transcripción a través del locus *cap* en forma espontánea surgen mutantes sin cápsula similar, resultado de mutaciones en un activador transcripcional de transacción (Boyce *et al.*, 2010)

### **2.2.1.3. Rol en la virulencia**

Diversos estudios demuestran una reducción en la virulencia en cepas sin cápsulas, o tratadas con enzimas degradantes de cápsula, además de utilizar mutantes acapsulares. Cepas mutantes acapsulares fueron construidos a partir de cepas A y B observándose una reducida

virulencia en pollos y ratones (Boyce y Adler., 2000, 2001; Chung *et al.*, 2001). El mutante tipo A fue altamente susceptible a la muerte durante el crecimiento en el suero aviar con el complemento activo. Por otra parte, la cepa tipo salvaje fue capaz de crecer rápidamente *in vivo* en el músculo de pollo, mientras que el mutante sin cápsula fue rápidamente destruido (Chung *et al.*, 2001)

La cepa de tipo B acapsular fue de cuatro a seis veces más sensible a la captación por macrófagos *in vitro* y fue eliminado rápidamente de la sangre, hígado y el bazo de los ratones infectados. Por lo tanto, la presencia de la cápsula es una barrera fundamental que permite a las cepas de *P. multocida* evitar las defensas inmunitarias innatas del huésped (Boyce y Adler., 2000, 2001)

## **2.2.2. Lipopolisacárido (LPS)**

### **2.2.2.1.Estructura**

Los lipopolisacáridos (LPS) son parte de la estructura de la membrana externa de mucha importancia en las bacterias gram negativas. Al análisis de la cepa VP161, serotipo A:1, su estructura LPS expresa cantidades iguales de dos glicoformas diferentes designados A y B. Estas glicoformas presentan la estructura de núcleo externo idénticos, sin embargo sus estructuras de núcleo interno son distintas (St Michael *et al.*, 2005c). La expresión simultánea de dos estructuras distintas en el núcleo interno unido a una extensión oligosacárido conservada es inusual, siendo solamente observado en *P. multocida* y especies relacionadas a *Mannheimia haemolytica*. Es posible que la expresión simultánea de estos múltiples glicoformas de LPS confiere alguna ventaja en la supervivencia *in vivo* de *P. multocida*.

### 2.2.2.2. Papel de LPS en la virulencia

Diversos estudios se han enfocado en la enfermedad del cólera aviar para conocer más acerca el rol del LPS en la patogénesis, utilizando la cepa virulenta *P. multocida* A:1 VP161. Realizando una reducción de la longitud del LPS implicó una reducción en la virulencia de esta enfermedad (Harper *et al.*, 2004; Boyce *et al.*, 2009). En otro estudio, se aisló el LPS de una cepa tipo B y fue administrada por vía endovenosa en un búfalo ocasionando los signos clínicos de la septicemia hemorrágica (Horadagoda *et al.*, 2002), sin embargo el LPS de una cepa tipo A en pavipollo fueron resistentes a su efecto (Rhoades y Rimler 1987; Mendes *et al.*, 1994). Por ello, las diferentes respuestas del huésped, las diferencias en la estructura LPS en diferentes serotipos pueden afectar a la intensidad de la respuesta inmune innata.

### 2.2.3. Fimbrias y Adhesinas

En el genoma de *P. multocida* hay genes (fimbrias tipo IV: *ptfA*, fimbria: *fimA*, pilina: *flp*, *flp2*, fibrilla de superficie: *hsf-1* y *hsf-2*) que codifican proteínas similares y como tal han sido observadas en algunas cepas de *P. multocida* serotipo A, que fueron capaces de adherirse a la mucosa epitelial, pero no en la superficie de estas cepas. Fimbrias tipo IV (pili) asociados a la virulencia en otras bacterias, debido a su papel en la adhesión a la superficie de la célula hospedera, han sido aislados y caracterizados a partir de *P. multocida* tipos A, B y D (Ruffolo *et al.*, 1997).

El análisis del gen *ptfA* aislado y secuenciado, mostraron variación significativa entre las cepas (Doughty *et al.*, 2000). Sin embargo, el papel de las estructuras fimbriales de *P. multocida* en la virulencia sigue siendo no probada (Harper *et al.*, 2006). Los genes *pfhaB1* y *pfhaB2* (hemaglutinina filamentosa) presentan una similitud significativa con una clase de genes que codifican hemaglutininas filamentosas, los cuales en *Bordetella pertussis* tiene un rol importante

en la colonización del tracto respiratorio superior (Kimura *et al.*, 1990; Mooi *et al.*, 1992). La mutación de estos dos genes evidenció una reducida virulencia en ratones (Fuller *et al.*, 2000), además una mutante *pfhaB2* de una cepa aviar P1059, fue inoculada intranasalmente siendo altamente atenuada; sin embargo cuando se administró vía endovenosa, solo fue una moderada atenuación sugiriendo que tiene un rol importante en la colonización inicial (Tatum *et al.*, 2005).

#### **2.2.4. Toxinas**

La toxina dermonecrótica (PMT) es la única toxina identificada en *P. multocida* causante de las lesiones de la rinitis atrófica en cerdos (Foged *et al.*, 1987; Rimler y Rhoades, 1989), observándose la resorción ósea debido a la proliferación incontrolada de los osteoclastos, inhibiéndose los osteoblastos (Sterner-Kock *et al.*, 1995; Mullan y Lax, 1998). Al igual que las toxinas del cólera y la tos ferina, PMT activa las células dendríticas a madurar las células, pero, a diferencia de las otras toxinas, es un pobre adyuvante y parece suprimir la respuesta de anticuerpos (Bagley *et al.*, 2005). Se ha propuesto que PMT bloquea la quimiotaxis (la migración de las células dendríticas hacia los nódulos linfáticos regionales) y podrían, por lo tanto, en una infección natural, limitar el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (Blocker *et al.*, 2006).

#### **2.2.5. Proteínas de adquisición de hierro y reguladas por hierro**

El hierro es importante para la sobrevivencia de las bacterias, y el análisis del genoma de la cepa PM70 de *P. multocida* reveló que codifica 53 proteínas similares a las implicadas en la adquisición o consumo de hierro (May *et al.*, 2001). Se sometieron cultivos de *P. multocida* en distintas concentraciones de hierro demostrando la presencia de proteínas reguladas por los niveles de hierro, denominándolas proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) (Snipes *et al.*, 1988; Choi-Kim *et al.*, 1991). Cepas de *P. multocida* incubadas en condiciones

limitadas de hierro indujeron una respuesta inmune más fuerte en ratones en comparación a cepas cultivadas en condiciones normales de hierro (Kennett *et al.*, 1993) concluyéndose que los IROMPs podrían desempeñar un rol significativo en la inmunidad (Glisson *et al.*, 1993; Ruffolo *et al.*, 1998).

Hay dos receptores de transferrina (TbpA y TbpB) para la unión a hierro (Gray-Owen y Schryvers, 1996), sin embargo en un estudio identificaron solo el TbpA en bovinos (Ogunnariwo y Schryvers, 2001), en contraste, este receptor puede no estar presente en todas las cepas de *P. multocida* ya que en un estudio detectaron el gen *tbpA* en algunos aislados clínicos de bovino y ovino (Ewers *et al.*, 2006). Debido a las diferentes proteínas involucradas en la adquisición de hierro (ExbB, ExbD, Tonb, HgbA) se cree que tiene un papel importante en la enfermedad (Fuller *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2002a). ExbB, ExbD y TonB son parte del complejo de transporte TonB, necesaria para transportar y suministrar energía para el secuestro de hierro y HgbA se prevé que sea una proteína de unión de hemoglobina necesario para la adquisición de hierro de proteínas del huésped (Bosch *et al.*, 2002b).

#### **2.2.6. Metabolismo de ácido siálico**

*P. multocida* produce sialidasas, presentes también en otras bacterias cuya función es eliminar el ácido siálico de las proteínas glicosiladas y lípidos de la célula huésped como fuente de carbono, pudiendo mejorar la virulencia bacteriana por desenmascarar los receptores clave del hospedero y/o reducir la efectividad de las defensas del huésped tales como mucina (Scharmman *et al.*, 1970; Drzeniek *et al.*, 1972; White *et al.*, 1995). Después del desafío transtorácica con *P. multocida* o *M. haemolytica* en cabras, se produjeron sialidasas bacterianas (Straus y Purdy, 1994; Straus *et al.*, 1996).

Dos sialidasas, NanH (proteína asociada a membrana externa) y NanB (proteína de autotransporte), han sido clonados y caracterizados a partir de un aislado de *P. multocida* de cólera

aviar (Mizan *et al.*, 2000). Estas sialidasas difieren en su especificidad, proponiéndose que mejoraría la capacidad metabólica de *P. multocida* en el huésped (Mizan *et al.*, 2000). Además, cada vez hay más pruebas que sugieren que *P. multocida* es capaz de captar ácido siálico desde el ambiente tanto para la sialilación de los componentes celulares, siendo esencial para la virulencia en ratones y utilizarlos como nutrientes a través de una vía catabólica (Steenbergen *et al.*, 2005).

### **2.2.7. Hialuronidasa**

La hialuronidasa está presente en la mayoría de las cepas de tipo B, causantes de la septicemia hemorrágica en bovinos aunque su función en la patogénesis aún no ha sido determinada. En un estudio analizaron 74 cepas de *P. multocida* de distintos serogrupos, que detectándose solo en aislados del tipo B de casos de septicemia hemorrágica poseían la hialurodinasa (Carter y Chengappa, 1980). Además en otro estudio de 176 cepas, obtuvieron los mismos resultados del estudio mencionado anteriormente, aunque más específico al serotipo B:2 (Rimler y Rhoades, 1994).

### **2.2.8. Proteínas de membrana externa**

Investigaciones iniciales reportaron la presencia de una proteína en la membrana externa de *P. multocida* de 37kDa, como posible inmunógeno protectorio (Lu *et al.*, 1988). Los anticuerpos producidos contra la proteína de 37kDa fueron capaces de proteger pasivamente conejos y ratones (Lu *et al.*, 1991). Otra proteína de 39kDa fue identificada en la cepa *P. multocida* A:3 P1059 y los anticuerpos producidos evitaron la adhesión de *P. multocida* en fibroblastos embrionales de pollo (Borrathybay *et al.*, 2003; Al-Haj Ali *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2004a,b). Una proteína también de 39kDa fue identificada como PlpB (lipoproteína B de Pasteurella) capaz de estimular

protección cruzada de serotipo (Rimler, 2001; Tabatabai y Zehr, 2004) y quizás sea una proteína de transporte ABC requerido para la captación de metionina en la célula (Merlin *et al.*, 2002).

Otra proteína principal de *P. multocida* es la OmpH confiriendo protección contra la enfermedad en ratones desafiados (Marandi y Mittal, 1997) y en aves vacunadas con cepa nativa (Luo *et al.*, 1997). Entre las proteínas con función de posibles adhesinas son OmpA, Oma87, Pm1069 y las proteínas relacionadas a hierro, Tbp (proteína de unión a transferrina) y el receptor TonB-HgbA (Dabo *et al.*, 2005). La OmpA parece tener un papel más directo con la adhesión ya que proteínas homologas a esta en *E. coli* y otras bacterias son adhesinas importantes (Dabo *et al.*, 2003).

### **2.3.LAS INTERACCIONES ENTRE LAS BACTERIAS Y LAS DEFENSAS DEL HUÉSPED**

*P. multocida* se encuentra en la orofaringe de animales sanos al parecer por largos periodos (De Alwis *et al.*, 1990; Muhairwa *et al.*, 2000), sin embargo no se conoce aún a detalle cómo puede llegar a invadir y colonizar el pulmón u otro tejido. Cuando es inoculada en la tráquea, fácilmente coloniza el tracto respiratorio inferior pasando rápidamente al sistema vascular (Wilkie *et al.*, 2000).

En el caso de mamíferos se requiere de factores predisponentes, como una infección previa por virus (ganado) o por *Mycoplasma* (cerdos) o por estrés. La mayoría de cepas de *P. multocida* son comensales sin embargo al parecer cualquier cepa tiene la capacidad de causar enfermedad como la neumonía (Cameron *et al.*, 1996). En la infección en aves, puede localizarse temporalmente en órganos tales como el hígado y el bazo (pájaros) donde podría ingresar a la sangre. La cápsula bacteriana y el LPS juegan un papel crítico en *P. multocida* por que confiere

resistencia a diferentes componentes del sistema inmune innato del hospedero (Boyce y Adler, 2000; Chung *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2004).

Las enfermedades son referidas como “septicemias” en el cólera aviar y septicemia hemorrágica, sin embargo la multiplicación de este agente en sangre *in vivo* aún no ha sido determinado. Las bacterias en sangre pueden estar en pocas cantidades mientras que en tejidos como el hígado en el cólera aviar pueden multiplicarse rápidamente (Pabs-Garnon y Soltys, 1971). Así que, la bacteriemia observada posiblemente sea debido a efectos de la multiplicación en tejidos como el hígado (cólera aviar) o tejido peritonsilar (septicemia hemorrágica) (Pabs-Garnon y Soltys, 1971., De Alwis *et al.*, 1990). Las lesiones observadas son petequias sobre la serosa y superficies epicárdicas. Tal vez, las lesiones y signos clínicos podrían ser causados por el LPS (Horadagoda *et al.*, 2002), aunque su rol al inicio de la enfermedad aún es desconocido (Harper *et al.*, 2007a 2007b; Boyce *et al.*, 2009).

En otro estudio se evaluaron dos cepas de *P. multocida*, una virulenta (VP161) y otra no virulenta (VP17), los cuales hubo diferencia en los perfiles de citoquina en pollo. Aun no se conoce bien que factores pudieron influir en las distintas respuestas, sin embargo se detectó que la cepa VP17 expresa LPS atípicos y tiene una mutación en el gen *hptE* (heptosiltransferasa). En la cepa VP161, el gen *hptE* es importante para la expresión de las glicofomas LPS A y B, pero no para la C (Boyce *et al.*, 2009), siendo objetivo de varios estudios en la actualidad.

## 2.4. PCR PALINDRÓMICA EXTRAGÉNICA REPETITIVA (REP-PCR)

El genoma microbiano presenta secuencias de ADN repetitivas, representando hasta el 5% del genoma (Ussery *et al.*, 2004), siendo muchos de estos elementos de función desconocida, localizándose en ambas regiones (intergénicas y extragénicas). Diversos estudios sugieren que algunos de estos elementos repetitivos podrían estar involucrados en la síntesis o catabolismo de ARN y ADN (Tobes y Ramos, 2005) o ser mediadores de la evolución del genoma (Schmidt y Anderson, 2006). Estos elementos repetitivos son típicamente compuestos de la duplicación de genes, tales como los rRNA y tRNA de codificación, elementos de secuencia de inserción, transposones, polinucleótidos cortos repetidos, elementos repetitivos de mosaico y otras secuencias repetitivas o palindrómicas (Sadowsky y Hur, 1998; Versalovic y Lupski, 1998).

El tamaño de los elementos repetitivos intercalados varía de 15pb a cientos de pares de bases de longitud (Versalovic y Lupski, 1998). Como se mencionó anteriormente, muchas especies bacterianas presentan numerosas secuencias repetitivas (Ussery *et al.*, 2004., Tobes y Ramos, 2005), algunos pueden presentar elementos repetitivos localizándose en un grupo limitado de bacterias, otras presentan las secuencias de ADN palindrómica extragénica repetitivo (REP) detectándose en muchas especies bacterianas filogenéticamente relacionadas (Sadowsky y Hur, 1998; Versalovic y Lupski, 1998; Tobes y Ramos, 2005). Dado que cada cepa tiene secuencias repetitivas en su genoma, la técnica de PCR genera amplicones de distintos tamaños en proporción directa a la distancia genómica entre los sitios de unión de elementos repetitivos adyacentes (Ishii y Sadowsky, 2009). La distribución de los amplicones genera una huella digital de ADN genómico para cada cepa bacteriana (Rademaker *et al.*, 2008).

La técnica es denominada PCR basada en secuencias repetitivas (Versalovic *et al.*, 1991) o PCR palindrómica extragénica repetitiva (rep-PCR). Esta técnica es muy útil para identificar, rastrear y analizar diversidad en microorganismos, además de ser una técnica simple y rápida a

comparación de otros métodos con el mismo fin, por ejemplo, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Sadowsky y Hur, 1998; Versalovic *et al.*, 1998; Rademaker *et al.*, 2008). En contraste, hibridaciones ADN:ADN, secuenciación de genes 16S rRNA o ribotipificación son más útiles que rep-PCR para distinguir las bacterias a nivel genérico o especie. La mayoría de estudios de rep-PCR han usado poli-trinucleotidos cortos, tales como (GTG)<sub>5</sub>, 35-40 pb secuencias REP, 124-127 pb secuencias consenso intergénica repetitivo de enterobacterias (ERIC), o de 154 pb elemento BOX como sitios claves para la PCR (Versalovic *et al.*, 1991, 1994; Rademaker *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Hahm *et al* (2003) compararon las técnicas rep-PCR, PCR múltiple, PFGE, ribotipificación y AFLP para caracterizar cepas de *Escherichia coli* y concluyeron que rep-PCR y PFGE fueron los métodos de toma de huellas digitales de ADN más discriminativos (Ishii y Sadowsky, 2009). Así mismo, en otro estudio, reportaron que las técnicas rep-PCR, PFGE y tipificación de secuencia multilocus (MLST) tenían mayor poder discriminante que perfiles de plásmido y la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos cuando subtipificaron cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium obtenidos de diversos animales (Foley *et al.*, 2006).

#### **2.4.1. Aplicaciones en la microbiología**

Rep-PCR es una técnica utilizada ampliamente para estudios de epidemiología molecular, simbioses de plantas, asociaciones entre cepas microbianas particulares o patovares de enfermedades específicas de humano, animal o plantas y un gran número de otros microorganismos ambiental y médicamente relevantes (Sadowsky y Hur, 1998; Versalovic *et al.*, 1998; Frye y Healy, 2006; Rademaker *et al.*, 2008). En la contaminación ambiental por *E. coli*, generalmente la fuente no se conoce (Ishii y Sadowsky, 2008), sin embargo la técnica rep-PCR ha sido utilizado en busca de diferenciar entre *E. coli* genéticamente casi idénticos, pero

ecotípicamente distintas procedentes de diversas fuentes de hospedero (Dombek *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2004).

También ha sido empleado para analizar la diversidad genética entre bacterias fijadoras de nitrógeno (Sadowsky y Hur, 1998), y en la filogenia de cepas de *Nitrobacter* aisladas de diferentes orígenes geográficamente y ecofisiológicamente distintos (Vanparys *et al.*, 2007). Además, es posible distinguir entre patógenos de plantas estrechamente relacionadas (Sadowsky *et al.*, 1996).

Aunque la técnica de rep-PCR, se ha utilizado generalmente para genotipado y seguimiento, también tiene otros usos. Por ejemplo, rep-PCR se ha utilizado para generar sondas de DNA específicas de cepa y especie por rep-PCR en *Campylobacter* (Giesendorf *et al.*, 1993), *Helicobacter* (Kwon *et al.*, 1998) y *Burkholderia* (Matheson *et al.*, 1997). En estos casos, las bandas de ADN específicas para especies o cepas de interés, fueron aislados directamente a partir de geles (Giesendorf *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 1998) o por clonación de los productos de rep-PCR (Matheson *et al.*, 1997). Después de las pruebas de especificidad, estos fragmentos pueden ser útiles como sondas de hibridación para la detección de especies o cepas bacterianas en muestras ambientales específicas.

## **2.5. *Pasteurella multocida* EN RUMIANTES Y ALPACAS**

Los camélidos sudamericanos son el principal recurso económico de las comunidades andinas sin embargo la producción se ve afectada por la elevada mortalidad en alpacas neonatales (Ameghino y De Martini, 1991) especialmente causado por procesos neumónicos, donde *Pasteurella multocida* es el principal agente involucrado en neumonías agudas (Cirilo, 2008; Rosadio *et al.*, 2011). *P. multocida* se encuentra en la flora nasal de las alpacas adultas (Rodríguez y Mimbela, 1981; Barsallo, 1985), pero ante eventos de estrés potenciados por los factores

ambientales como la época lluvia (concordante a la época de parición) y helada (donde se reporta las temperaturas mas bajas) (Ameghino y De Martini, 1991), este agente bacteriano se dirige hacia los pulmones, depositándose en los alveolos, afectando principalmente a los animales inmunocomprometidos, desarrollándose la enfermedad (Yates, 1982).

Investigaciones iniciales reportan a *P. multocida* causante de cuadros neumónicos en 42.3% (11/26) en alpacas diagnosticadas con neumonía (Ameghino y Calle, 1989; Ameghino, 1990). Posteriormente, Guzmán (2011) a partir de crías de alpacas con signos neumónicos muestreados en las épocas de lluvia y helada, el 58% (33/57) de animales presentaron cepas de *P. multocida* en pulmones de crías y tuis. Así mismo se reporta el aislamiento de este agente en 45.8% (11/24) en la época de parición y en 56% (15/27) en la época de esquila, en pulmones neumónicos de crías de alpacas (Cirilo *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013). En otro estudio realizado en CIICAS – La Raya y Maranganí se encontró 60% (18/30) de frecuencia de aislamiento de *P. multocida* a partir de alpacas muertas por neumonía (León, 2012). Se considera que este proceso generalmente es de origen multifactorial, dada la presencia de agentes virales y bacterianos, como el virus de Parainfluenza tipo 3, Virus Respiratorio Sincitial bovino y *Mannheimia haemolytica* detectados en pulmones neumónicos de alpacas, favoreciendo la proliferación bacteriana (Cirilo, 2008; Rosadio *et al.*, 2011; Guzmán *et al.*, 2013).

Esta bacteria está clasificada en 5 tipos capsulares o serogrupos (A, B, D, E y F) según su composición capsular mediante la prueba de hemaglutinación indirecta (Carter, 1952); y en 16 serotipos basados en la expresión de antígenos lipopolisacáridos (LPS) usando el método precipitación en agar gel (Heddleston *et al.*, 1972), y presenta también genes de virulencia distribuidas en 7 grupos citándose algunos de ellos: adhesinas (*ptfA*, *pfhA*, *tadD*), toxinas (*toxA*), superóxido dismutasa (*tbpA*, *sodC*), sialidasas (*nanB*, *nanH*), protectinas (*ompA*, *ompH*), hialuronidasa (*pmHAS*) y los involucrados en la adquisición de hierro (*exbB*, *tonB*). Sin embargo dichos procesos mediante técnicas microbiológicas es prolongado, así como la serotipificación, donde ambas técnicas requieren mucho tiempo y acceso a antisueros específicos. Por esta razón, una serie de métodos de tipificación genética se han desarrollado en un esfuerzo para permitir un

mayor acceso a métodos de tipificación precisos y discriminatorios (Blackall y Miflin, 2000). Así, en el estudio realizado por Townsend *et al.* (2001) desarrollaron el sistema de tipificación capsular mediante el PCR múltiple, así como también fue realizado para el LPS por Harper *et al.* (2015), permitiendo una rápida y efectiva identificación del serogrupo, serotipo, y la identificación de los principales factores de virulencia de *P. multocida* (Ewers *et al.*, 2006).

La cápsula es un factor de virulencia determinante para la sobrevivencia en el hospedero (Boyce y Adler, 2000). Cada tipo capsular o serogrupo se asocia a una enfermedad y especie animal en particular: el serogrupo A se asocia con el Cólera aviar (Christensen y Bisgaard, 1997) y las enfermedades respiratorias del bovino como la Fiebre del embarque y la Neumonía enzoótica en terneros menores de 6 meses de edad (Frank, 1989); los serogrupos E y B se asocian con la Septicemia hemorrágica del ganado bovino y porcino (Carter y Alwis, 1989; De Alwis, 1992); y la enfermedad de la Rinitis atrófica del cerdo se asocia al serotipo D (Bethe *et al.*, 2009). El LPS es un antígeno inmunodominante para protección homologa estimulada por vacunas bacterianas (Carter y Annau, 1953), además en el análisis de la cepa *P. multocida* VP161, la molécula LPS fue esencial por su habilidad de causar enfermedad aguda (Boyce *et al.*, 2000; DeAngelis *et al.*, 2002).

Diversos estudios han determinado la asociación de ciertos tipos capsulares con la presencia de factores de virulencia (Katsuda *et al.*, 2013; Khamesipour *et al.*, 2014). En un estudio, comparando las cepas aisladas de bovinos aparentemente sanos (tracto respiratorio superior) y enfermos (pulmones con procesos neumónicos), obtuvieron como resultado que los genes de virulencia *tbpA* (proteína de unión a transferrina A), *pfhA* (hemaglutinina filamentosa), y *pmHAS* (hialuronano sintasa) fueron asociados al tipo capsular A y *pfhA*, *tbpA* y *hgbB* (proteína de unión a hemoglobina) a la presencia de la enfermedad, donde estos genes de virulencia fueron considerados como marcadores epidemiológicos y se cree que tienen una fuerte asociación positiva con los brotes de la enfermedad en bovinos (Katsuda *et al.*, 2013).

Siguiendo con el mismo modelo de estudio, 30 cepas de *P. multocida* fueron analizadas para el tipo capsular y sus genes de virulencia. En animales sanos se aislaron 5 cepas de tipo capsular A y a partir de animales enfermos 18 cepas del tipo capsular A, 5 del tipo capsular D y 2 no tipificables. Al análisis de los genes de virulencia dentro del grupo de los enfermos (*tbpA*, *ptfA*, *hgbB*, *hgbA*, *ompA*, *ompH*) fueron detectados con mayor frecuencia (72-100%) y en menor frecuencia los genes *toxA* (13%), *pmHAS* (40%), *tadD* (48%), no detectándose los genes *toxA*, *pmHAS* en el grupo de los sanos. Además que los genes *pmHAS*, *tbpA* y *hgbB* fueron detectados en mayor frecuencia en el serotipo A y la *toxA* fue únicamente detectada en ese serotipo (Khamesipour *et al.*, 2014).

En otro estudio, de un total de 141 cepas de *P. multocida* aisladas a partir de bovinos con neumonía, 126 fueron del serogrupo A, 12 del serogrupo D y 3 del serogrupo B, detectándose los genes de virulencia *pfhA*, *ptfA*, *nanB*, *tadD* en más del 81% de los aislados (Jamali *et al.*, 2014). Así mismo, un estudio realizado a partir de aislados de *P. multocida* de chivos (n=21) y ovejas (n=67) con procesos neumónicos, 59 fueron del tipo capsular A, 12 del tipo capsular B, 6 para cada tipo capsular D y F, 5 no tipificables, encontrándose el gen *tbpA* (80%), *hgbB* (67%), *pfhA* (95%) y la *toxA* (48%), siendo este último gen de virulencia, detectado en mayor frecuencia en las cepas del tipo capsular A, y en menor frecuencia en los serogrupos mencionados anteriormente (Sarangi *et al.*, 2015). En ovinos sacrificados en mataderos de España, reveló sólo serogrupos A y D de *P. multocida*, en su mayoría toxigénicos (portadores de *toxA*), asociadas a lesiones neumónicas en ovinos destinados para consumo. También se encontraron frecuencias de *toxA*, *pfhA* y *tbpA* de 75,9%, 9,2%, 97,7% respectivamente (Pinto, 2011). Narayan *et al.* (2014) detectaron en bovinos frecuencias de *toxA* (0%), *pfhA* (94,4%), *tbpA* (100%) siendo similar a los resultados obtenido por Verma *et al* (2013).

Aunque la serotipificación de ambos antígenos capsulares y del LPS son muy útiles para la identificación de la bacteria, se ha visto limitada la información provista para estudios epidemiológicos para distinguir entre diferentes cepas del mismo serotipo (Amonsin *et al.*, 2002). En un estudio a partir de bovinos de una granja que murieron por neumonía, los aislados de *P.*

*multocida* mostraron una significativa diversidad entre cepas quizás debido a la introducción de animales, variación genética, vacunación, etc; sin embargo esta diversidad fue difícil de interpretar porque todas las cepas fueron aisladas de un mismo brote (Taylor *et al.*, 2010). En otro estudio, se describe en cepas de *P. multocida* aisladas en Gran Bretaña y Estados Unidos, una correlación entre diferencias en el perfil genético por PFGE y grado de patogenicidad, siendo destacado la importancia del análisis de diversidad entre cepas no apenas para una determinación rápida de perfil patogénico, también para el desarrollo de vacunas (Dagleish *et al.*, 2016). A pesar de que la técnica molecular “Gold Estándar” para la evaluación de la diversidad genética es la PFGE (Electroforesis en gel de Campo Pulsado) por su alto poder discriminatorio (Foxman *et al.*, 2005), esta técnica requiere de equipos costosos y muy complejos.

Visto esto, distintos estudios han empezado a emplear la técnica de PCR basado en secuencias repetitivas (REP) debido a su rapidez y menor costo. La técnica REP-PCR fue utilizada para caracterizar 38 aislados de *P. multocida*. El alto grado de homogeneidad observado entre las cepas del serotipo B y E de casos de septicemia hemorrágica (SH) proporcionó evidencia de un perfil asociado a la enfermedad que puede servir como un nuevo método para la identificación de cepas de SH independientemente del serotipo (Townsend *et al.*, 1997). En otro estudio, 67 aislados de *P. multocida* de distintas especies y regiones geográficas entre animales salvajes y domésticos con la técnica REP-PCR, se obtuvieron 23 perfiles distintos agrupados en 8 *clusters*, y no hubo especificidad entre hospedero, tipo, región o patogenicidad. Los perfiles rep-PCR de los aislados obtenidos de animales salvajes y domésticos fueron muy similares, e incluso dos bandas estuvieron presentes en todos los aislados a pesar de ser de distinto serotipo (Saxena *et al.*, 2006). En otro estudio realizado en cerdos, se aislaron 17 cepas de *P. multocida* de 36 hisopados tonsilares, en el Sur de Vietnam, y se obtuvo 9 perfiles distintos REP y se observó cierta correlación con los aislados de *P. multocida* de un brote previo de Australia en cerdos y en Vietnam en patos (Townsend *et al.*, 2000).

Dada la amplia clasificación de *P. multocida*, el presente estudio tuvo como objetivo emplear la técnica de PCR para la identificación, tipificación, detección de genes de virulencia

así como evaluar la diversidad a partir de cepas de *P. multocida* aisladas de pulmones con signos de neumonía de crías de alpacas.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.LUGAR DEL ESTUDIO**

Los 24 aislados de *P. multocida* provinieron de alpacas del centro experimental La Raya – Universidad del Altiplano (UNA) del departamento de Puno en el año 2014, durante los meses de Enero a Febrero, que concuerda con la época de lluvias. El procesamiento y análisis de los aislados se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se emplearon dos cepas *P. multocida* de ovino como referencia donado por la Universidad Complutense de Madrid (España).

#### **3.2. ANTECEDENTES DE LOS AISLADOS *Pasteurella multocida***

Los aislados provinieron de un grupo de 46 animales de tres puntas distintas: 1 punta de Suri (n=14) y 2 puntas de Huacayas (n=32), de los cuales solo 24 fueron positivos a *Pasteurella multocida* (6 suris y 18 huacayas). Las edades oscilaron entre 1 a 2 meses de edad. Todo animal que fallecía, eran trasladados a la sala de necropsia del Centro experimental La Raya-UNA,

consultándose al pastor encargado de la punta, que observaba días anteriores o en el momento del fallecimiento. Los signos clínicos considerados para neumonía fueron los siguientes: depresión, anorexia, secreción o no en la nariz, respiración superficial. A la necropsia, las lesiones macroscópicas como congestión pulmonar y bronconeumonía fueron las lesiones observadas mayormente.

### **3.3. TOMA DE MUESTRA**

Las muestras de pulmón con lesiones fueron cultivadas en agar sangre incubadas a 37°C por 24 horas en el laboratorio del Centro experimental La Raya – UNA, seleccionándose colonias de color grisáceo, no hemolíticas de aspecto mucoso, sospechosas de ser *P. multocida* (Koneman, 1992; Carter, 1989), conservándose en caldo BHI (Merck, Brain Heart Infusion) y en glicerol al 20%, para su traslado y procesamiento en la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **3.4. REACTIVACIÓN E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

Los aislados congelados fueron reactivados en agar sangre por 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis. Posteriormente se seleccionaron las colonias de color grisáceo, no hemolíticas de aspecto mucoso, sospechosas de ser *P. multocida* (Koneman, 1992; Carter, 1989). Para su identificación se realizaron las siguientes pruebas: tinción gram (negativa), oxidasa (positivo), catalasa (positivo), indol (positivo), confirmándose por API 20NE de Biomerux siguiendo las instrucciones del fabricante, finalizándose con la conservación de los aislados en crioperlas.

### 3.5.EXTRACCIÓN DE ADN

Los aislados identificados por pruebas bioquímicas de ser *P. multocida* fueron cultivadas en 1 ml de caldo infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion Broth, MERCK) a 37°C por 24 horas en condiciones aeróbicas. Posteriormente se realizó la extracción de ADN con el Kit *Purification Wizard Genomic DNA Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6.IDENTIFICACIÓN POR PCR

El ensayo de PCR fue realizado empleando los cebadores específicos que amplifican una secuencia interna de 460pb del gen *kmt1*, siguiendo las condiciones descritas previamente por Townsend *et al.* (1998), considerando algunas modificaciones. Dicho gen es una esterasa/lipasa predicha que está presente solo en *P. multocida*. La mezcla de reacción consistió en 1U de *Taq* DNA polimerasa, 1.5mM de cloruro de magnesio, 10 µM de cada cebador (Cuadro 1), 25-50 ng de ADN y 1 µM de cada nucleótido (Applied Biosystems). Las condiciones para la amplificación de los cebadores fueron 95°C durante 5 minutos como desnaturación inicial seguido de 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 58°C durante 40 s y 72°C durante 1 minuto, y finalmente una extensión final de 72° C por 5 minutos.

**Cuadro 1.** Secuencia de cebadores empleados para la identificación de *P. multocida*

Gen	Secuencia	Tamaño pb
<i>kmt1</i>	(F) GCT GTA AAC GAA CTC GCC C (R) ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	460 pb

**Fuente:** Townsend *et al* (1998)

### 3.7. TIPIFICACIÓN CAPSULAR

La tipificación capsular de los aislados fueron realizados con los cebadores diseñados por Townsend *et al.* (2001) descritos en el Cuadro 2, con las siguientes condiciones: para la mezcla de PCR, 1X Master Mix, 3.2  $\mu$ M de cada cebador, y 25-50 ng de muestra de ADN. Las condiciones para la amplificación de los cebadores fueron 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión final de 72° C por 5 minutos.

**Cuadro 2.** Secuencia de los cebadores empleados para la tipificación capsular

Tipo Capsular	Gen	Secuencia	Tamaño pb
A	<i>hyaD-hyaC</i>	(F) TGCCAAAATCGCAGTCAG (R) TTGCCATCATTGTCAGTG	1044 pb
B	<i>bcbD</i>	(F) CATTATCCAAGCTCCACC (R) GCCCGAGAGTTTCAATCC	760 pb
D	<i>dcbF</i>	(F) TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC (R) CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657 pb
E	<i>ecbJ</i>	(F) TCCGCAGAAAATTATTGACTC (R) GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511 pb
F	<i>fcbD</i>	(F) AATCGGAGAACGCAGAAATCAG (R) TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851 pb

**Fuente:** Townsend *et al.* (2001)

### 3.8. TIPIFICACIÓN DEL LPS

En el caso de la tipificación del LPS se emplearon los cebadores diseñados por Harper *et al.* (2015), descritos en el cuadro 3. Para esta prueba se empleó un volumen final de 30  $\mu$ l, 1x Master Mix (Quiagen), cebadores a 2.6 mM, 2  $\mu$ l de ADN bacteriano. Las condiciones de la PCR multiple fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min y 72 °C por 2.5 min, y una extensión final de 72 °C por 5 min.

**Cuadro 3.** Secuencia de los cebadores empleados para la tipificación del LPS

Genotipo LPS	Serovar	Secuencia	Tamaños bp
L1	1, 14	(F) ACATTCCAGATAATACACCCG (R) ATTGGAGCACCTAGTAACCC	1307 pb
L2	2, 5	(F) CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC (R) TTTGATTTCCCTTGGGATAGC	810 pb
L3	3, 4	(F) TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC (R) CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA	474 pb
L4	6, 7	(F) TTTCCATAGATTAGCAATGCCG (R) CTTTATTTGGTCTTTATATATACC	550 pb
L5	9	(F) AGATTGCATGGCGAAATGGC (R) CAATCCTCGTAAGACCCCC	1175 pb
L6	10, 11, 12, 15	(F) TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG (R) AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG	668 pb
L7	8, 13	(F) CCTATATTTATATCTCCTCCCC (R) CTAATATATAAACCATCCAACGC	931 pb
L8	16	(F) GAGAGTTACAAAAATGATCGGC (R) TCCTGGTTCATATATAGGTAGG	255 pb

Fuente: Harper *et al* (2015)

### 3.9.GENES DE VIRULENCIA

Para la detección de los genes de virulencia se emplearon cuatro pares de cebadores (Cuadro 4) para la identificación de los siguientes genes: *toxA* (Toxina A), *tbpA* (Proteína de unión a transferrina A), *hgbB* (Proteína de unión a hemoglobina) y *pflA* (Hemaglutinina filamentosa). La PCR múltiple utilizó un volumen final de 20 µl, empleando 1x Master mix (Quiagen), 2 µl de ADN y 3.2 mM de cada cebador, siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, hibridación a 54°C por 50 segundos y 72°C por 50 segundos de extensión, finalizando con 72°C por 10 minutos.

**Cuadro 4.** Secuencia de cebadores empleados para los genes de virulencia

Gen	Secuencia	Tamaño bp
<i>pfhA</i>	(F) AGCTGATCAAGTGGTGAAC (R) TGGTACATTGGTGAATGCTG	275 bp
<i>hgbB</i>	(F) ACCGCGTTGGAATTATGATTG (R) CATTGAGTACGGCTTGACAT	788 bp
<i>toxA</i>	(F) CTTAGATGAGCGACAAGGTT (R) GGAATGCCACACCTCTATA	865 bp
<i>tbpA</i>	(F) TTGGTTGGAAACGGTAAAGC (R) TAACGTGTACGGAAAAGCCC	728 bp

**Fuente:** Ewers *et al* (2006)

Todos los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa (2% de agarosa en 0.5X TBE) por 2 horas y teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización por irradiación UV.

### 3.10. REP-PCR

Posteriormente, los aislados fueron sometidos a la técnica rep-PCR con los cebadores descritos por Versalovic *et al.* (1991, 1998, descritos en el cuadro 5. El protocolo para realizar el BOX-PCR y ERIC-PCR consistió en un volumen final de 20  $\mu$ l con 1  $\mu$ M de dNTPs, 3 mM de cloruro de magnesio, 2  $\mu$ M de cada cebador y 1.5U de *Taq* polimerasa con 2  $\mu$ l (50-100 ng) de muestra de ADN. Las condiciones de la PCR fueron 95°C por 5 minutos para una desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de 94°C por 3 segundos, 92°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto y 65°C por 8 minutos, con una extensión final de 65°C de 8 minutos.

**Cuadro 5.** Secuencia de cebadores empleados para el rep-PCR

Nombre	Secuencia
BOX A1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G
ERIC1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C
ERIC2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G

**Fuente:** Versalovic *et al* (1991, 1994)

Todos los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa (2% de agarosa en 0.5X TBE) por 3 horas y teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización por irradiación UV.

### **3.11. ANÁLISIS DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS Y ELABORACION DE DENDOGRAMAS**

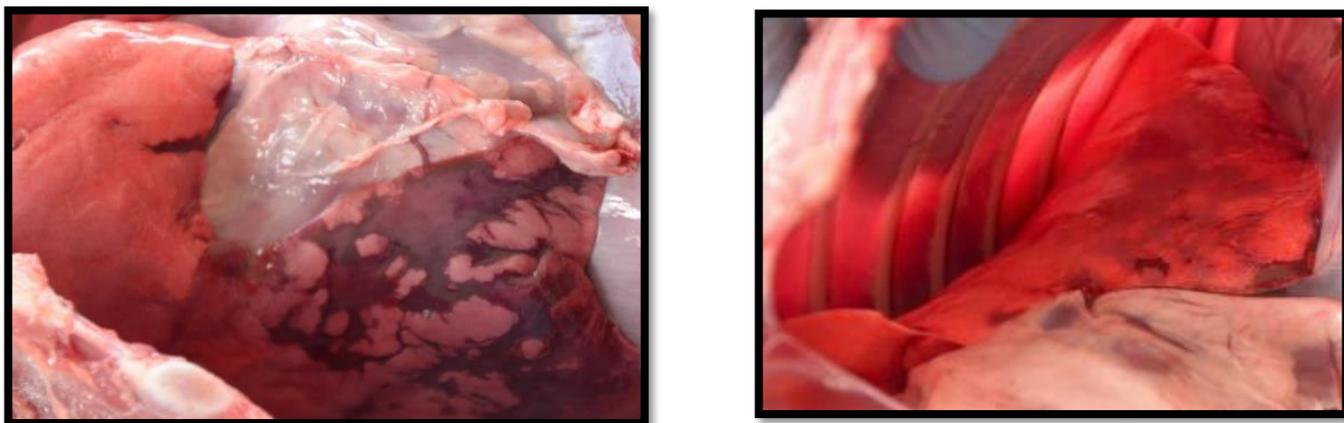
El programa NTSYSpc 2.1m es empleado para realizar análisis de relaciones dentro o entre grupos de individuos (poblaciones o muestras de población), aplicándose un análisis de conglomerados. El algoritmo UPGMA (Promedios aritméticos no ponderados entre grupos por pares) de Sneath y Sokal (1993) es el método más común, donde los índices de similitud dentro o entre las muestras de población se comparan entre si utilizando las distancias euclidianas entre los genotipos pareados. Los grupos del método UPGMA relacionan los individuos y calcula las distancias genéticas relativas dentro y entre los grupos. Estas distancias se utilizan para crear un denominado diagrama de clúster, o dendograma, que ilustra las relaciones genéticas calculadas a partir de los datos de huellas digitales de ADN.

Para evaluar la diversidad de los aislados, se realizó el análisis de agrupamiento (clusters) para generar dos dendogramas usando el programa bioinformático NTSYSpc 2.10m, empleando para ello el método UPGMA basado en el coeficiente de similaridad de Dice. La matriz de distancias se construyó a partir de datos binarios (presencia/ausencia de bandas) obtenidos del análisis de los BOX-PCR y ERIC-PCR.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. ANTECEDENTES DE LOS AISLADOS *Pasteurella multocida*

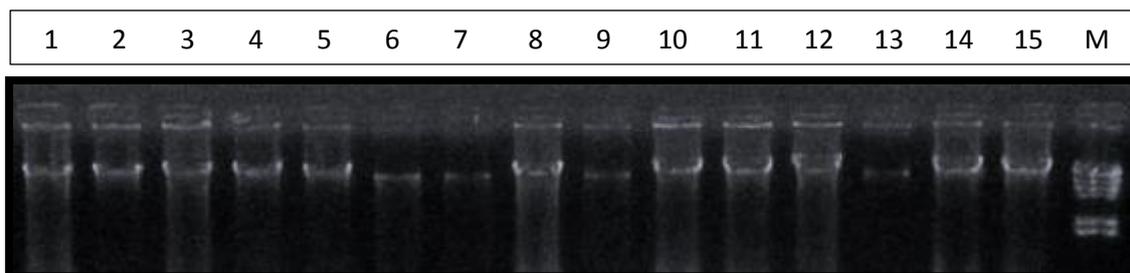
Los 24 aislados de *Pasteurella multocida* provinieron de animales con lesiones macroscópicas compatibles con neumonía, detectándose positivos en dos puntas (Huacaya y Suri). Las lesiones comúnmente identificadas a nivel de todo el grupo fue congestión y bronconeumonía, siendo en los animales positivos, 54.2% (n=13) bronconeumonía y 45.8% (n=11) congestión pulmonar. En este estudio no se realizó el análisis histopatológico de las muestras.



**Figura 1.** Pulmones con Moderada bronconeumonía lobular

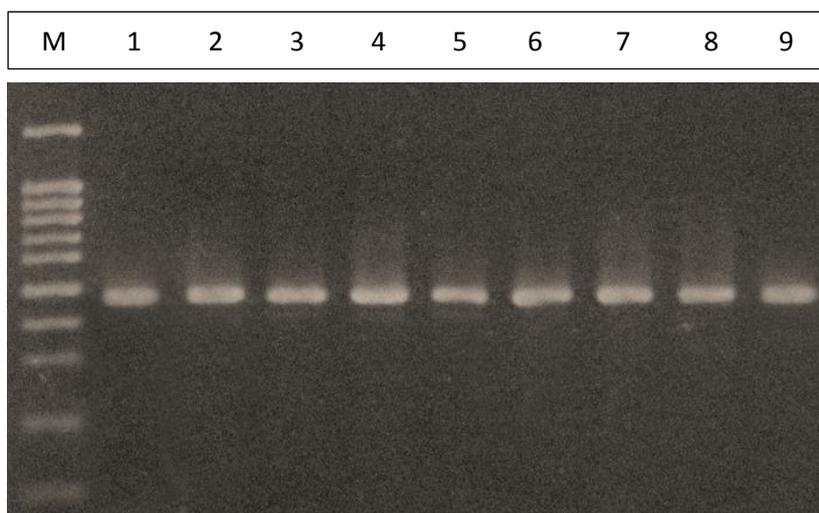
## 4.2. IDENTIFICACIÓN POR PCR

Los 24 aislados reactivados fueron identificadas como *Pasteurella multocida* por pruebas bioquímicas. Realizada la extracción del material genético de las muestras, se observó la calidad de ADN de los aislados que se muestra como una banda de alto peso molecular, observado en un gel de agarosa al 1% (Figura 2).



**Figura 2. Calidad de ADN de aislados de *P. multocida*.** Carril 1-15: ADN extraído de aislados *P. multocida* de alpacas. M: Fago Lambda  $\lambda$

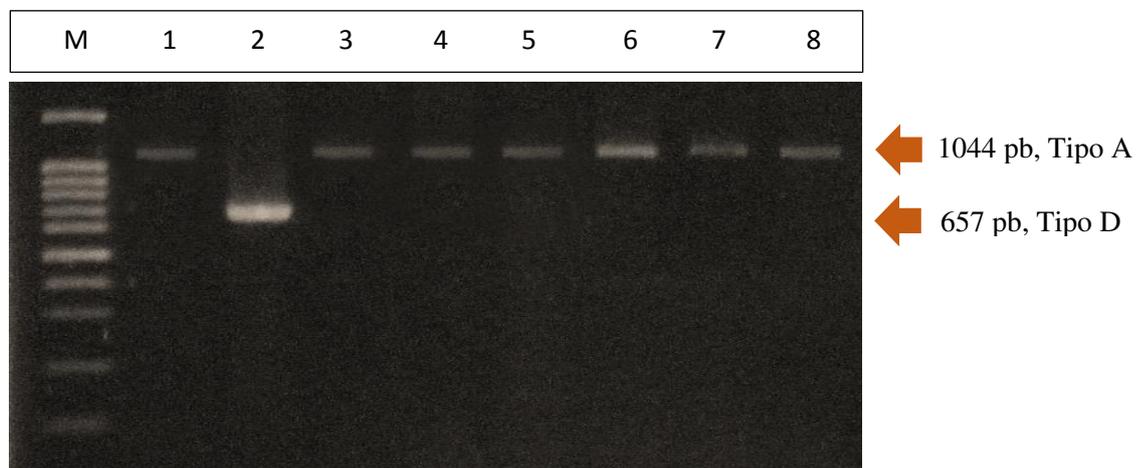
Al análisis molecular mediante la técnica de PCR para identificar a *P. multocida*, todas las muestras amplificaron una sola banda de 460 pb indicando la amplificación del gen *kmt1*, confirmando la identificación bioquímica (Figura 3).



**Figura 3. Detección molecular de *P. multocida* mediante la amplificación del gen *kmt1*.** Carril 1: control positivo de *P. multocida*, Carril 2-9: Aislados de *P. multocida* de alpaca, M: Marcador de peso molecular 100 bp.

### 4.3. TIPIFICACIÓN CAPSULAR

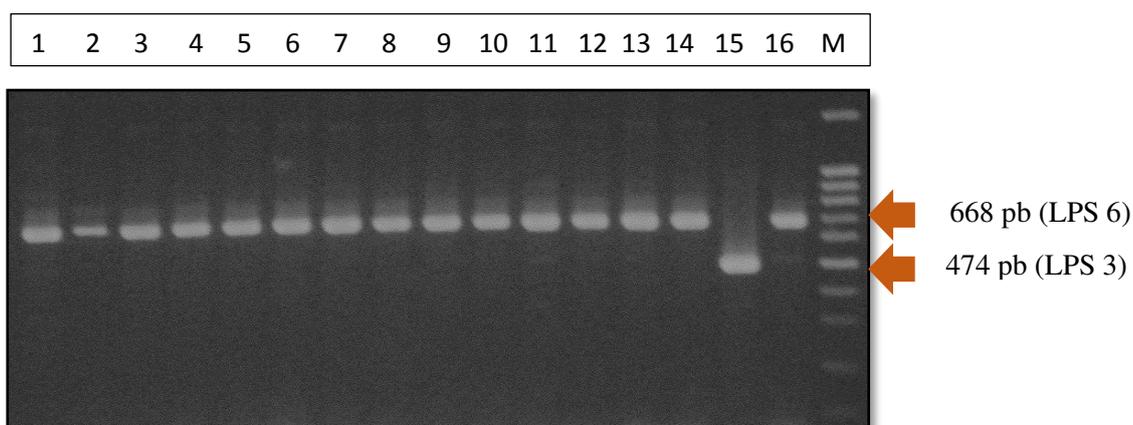
Para la tipificación capsular, primero se evaluaron dos cepas control de *P. multocida* aisladas de ovino, amplificándose el tipo capsular A correspondiente al gen *hyaD-hyaC* de 1044 pb y el tipo capsular D por el gen *dcbF* de 657pb. Luego de la evaluación del protocolo de PCR con las cepas control, se procedió a evaluar las cepas de *P. multocida* aisladas de alpaca, amplificándose en todas el gen *hyaD-hyaC* (1044 pb) indicando que las 24 cepas son del tipo capsular A (Figura 4).



**Figura 4. Análisis por PCR para la tipificación capsular de *P. multocida*.** M: Marcador de 100 pb, Carril 1: Cepa de ovino Tipo A (1044 pb), Carril 2: Cepa control tipo D (657 pb), Carril 3-8: Aislados de *P. multocida* de alpacas

#### 4.4. TIPIFICACIÓN DEL LPS

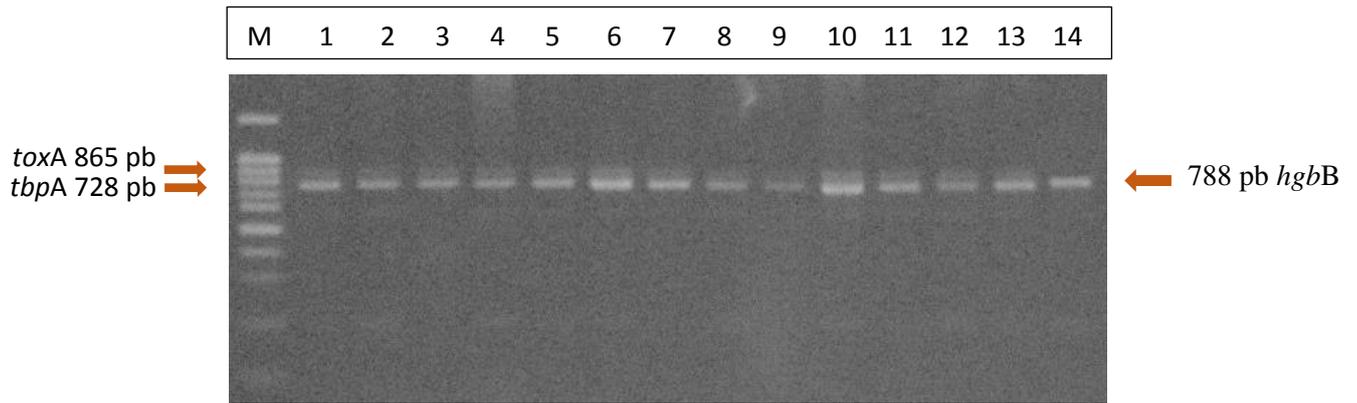
Al realizar el análisis de tipificación del LPS en base al esquema desarrollado por Harper *et al.* (2015), las cepas control de ovino amplificaron el genotipo LPS 3 (474 pb) y LPS 6 (668 pb) siendo su tipo capsular D y A respectivamente. Los aislados de alpaca amplificaron únicamente el genotipo LPS 6 correspondiente a los serovares 10, 11, 12 y 15. El genotipo LPS 3 corresponde a los serovares 3 y 4 (Figura 5).



**Figura 5. Tipificación del LPS por PCR múltiple.** Carril 1-14: Cepas positivas al genotipo LPS 6. Carril 15: Cepa control de genotipo LPS 3 (474 pb). Carril 16: Cepa control de genotipo LPS 6. Carril 17: Marcador de peso molecular 100 pb

#### 4.5. GENES DE VIRULENCIA

Posteriormente las cepas de *P. multocida* control y aislados de alpaca fueron analizadas para observar la presencia de factores de virulencia. La cepa control tipo D, LPS 3 amplificó el gen *pfhA* (275 pb) y la cepa control tipo A, LPS 6 el gen *hgbB* (778 pb). Los aislados de alpaca amplificaron los siguientes genes: *toxA* (100%) y gen *tbpA* (100%), no detectándose el gen *pfhA* ni *hgbB* (Figura 6).



**Figura 6. Cepas positivas a los genes *toxA* y *tbpA*.** M: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1-13: Cepa positivas a los genes *toxA* (865pb) y *tbpA* (728pb). Carril 14: Cepa positiva al gen *hgbB* (788 pb).

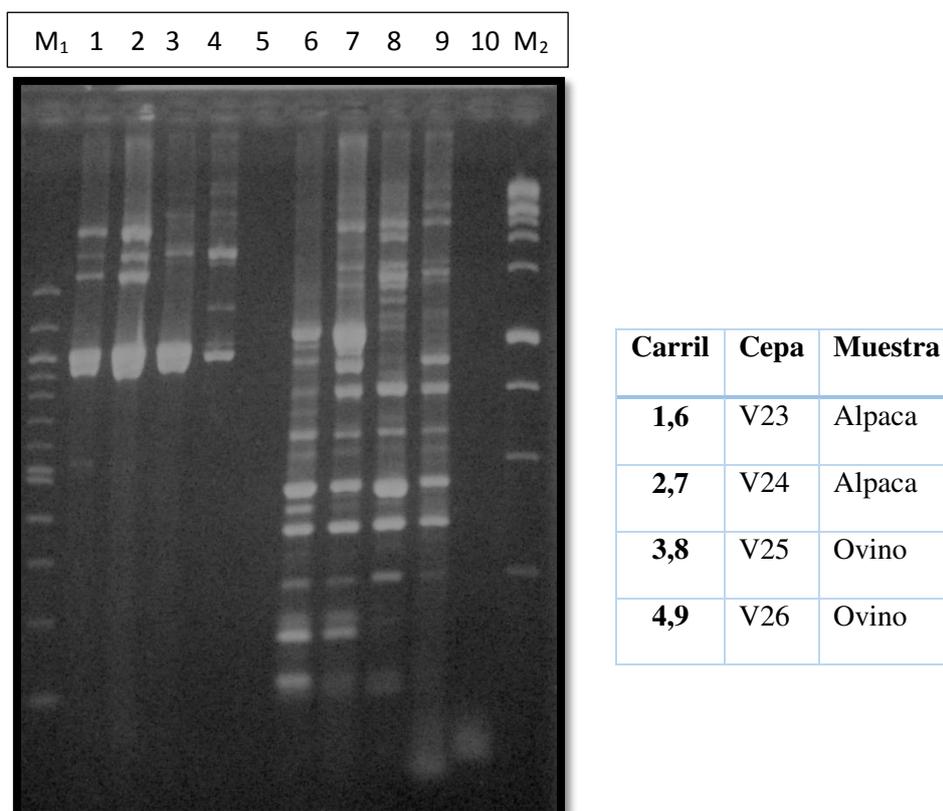
Al análisis de las cepas de *P. multocida* tanto los controles y los aislados de alpacas, se obtuvo la siguiente tabla correspondiente a sus resultados por la técnica de PCR múltiple (Cuadro 6)

**Cuadro 6:** Características moleculares de las cepas control y cepas de Alpaca

Muestra	Especie	Tipo Capsular	Genotipo LPS	Serovar	Gen de virulencia
Cepa control	Ovino	A	LPS 6	10,11,12,15	<i>hgbB</i>
Cepa control	Ovino	D	LPS 3	3,4	<i>pfhA</i>
Aislados	Alpaca	A	LPS 6	10,11,12,15	<i>toxA, tbpA</i>

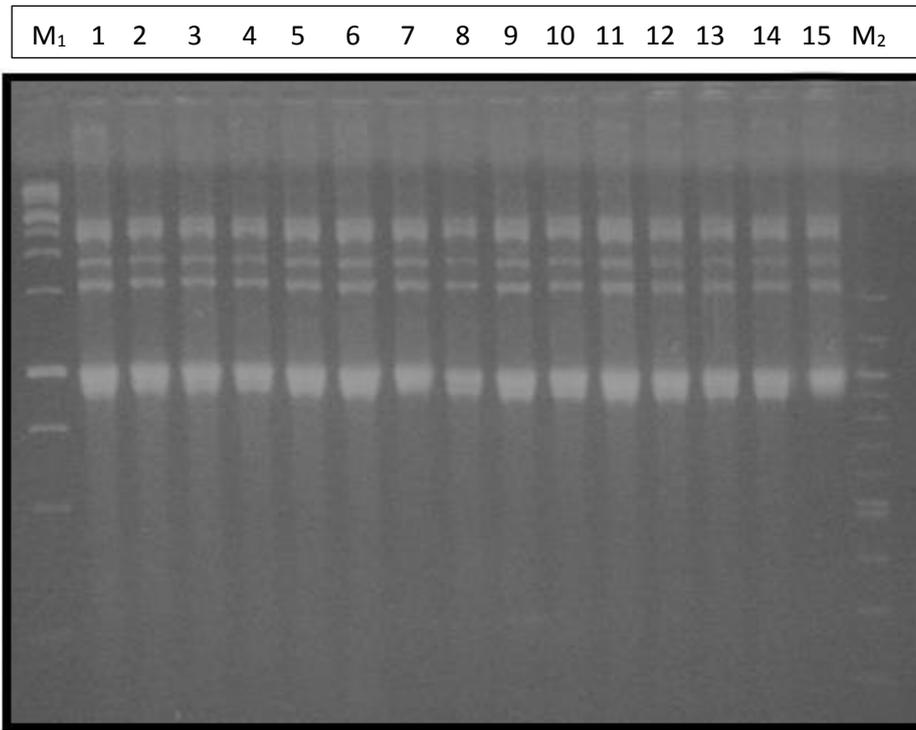
#### 4.6. REP-PCR

Dada las características de las cepas control (A y D de ovino) y los aislados de alpaca mencionadas anteriormente, se procedió a realizar la técnica de rep-PCR para saber si hay diferencias entre ellas. Para la estandarización del protocolo se analizaron las dos cepas control y dos cepas de alpaca con la técnica BOX-PCR y ERIC-PCR, observándose entre ellas diferencias de número de bandas, resultando cada cepa con un patrón distinto de bandas (Figura 8).



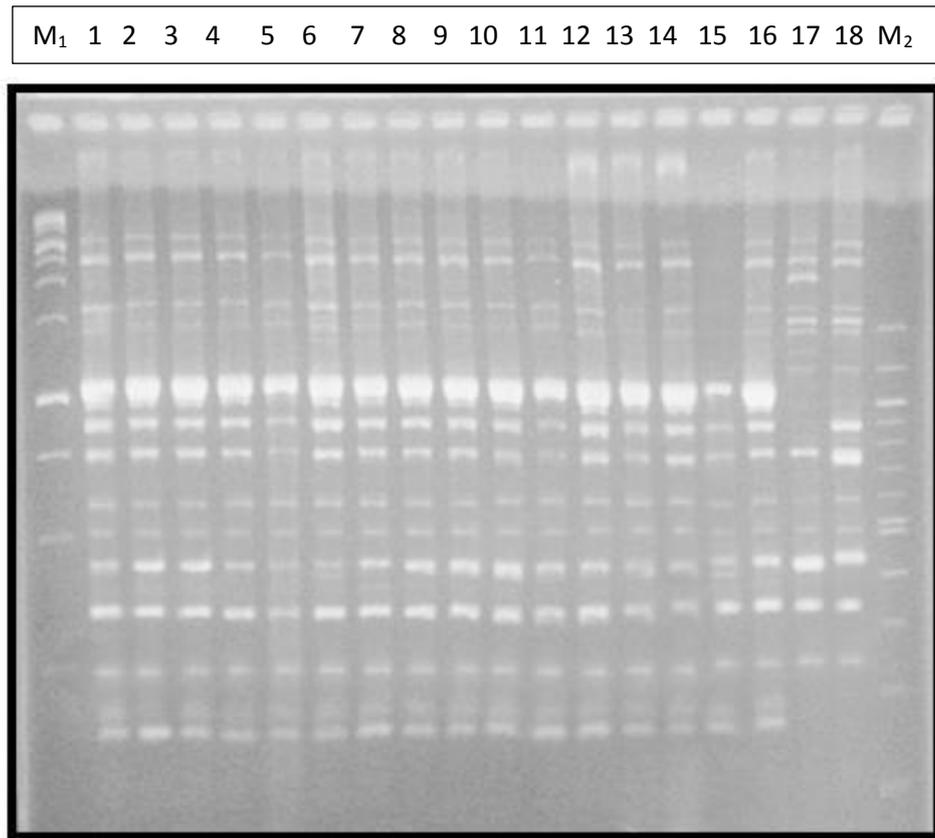
**Figura 7. Análisis por las técnicas BOX-PCR (carril 1-5) y ERIC-PCR (carril 6-10).** M<sub>1</sub>: Marcador de 100 pb. Carril 1-2: Cepas de alpaca. Carril 3-4: cepas control A y D. Carril 6-7: Cepas de alpaca, Carril 8-9: cepas control A y D. M<sub>2</sub>: Marcador de 1 kb. Carril 5 y 10: Control negativo

Al análisis por BOX-PCR, las 22 cepas de alpaca restantes amplificaron las mismas cantidades y tamaños de bandas, a diferencia de las dos cepas analizadas anteriormente, resultando en un patrón de bandas distintas (Figura 9).



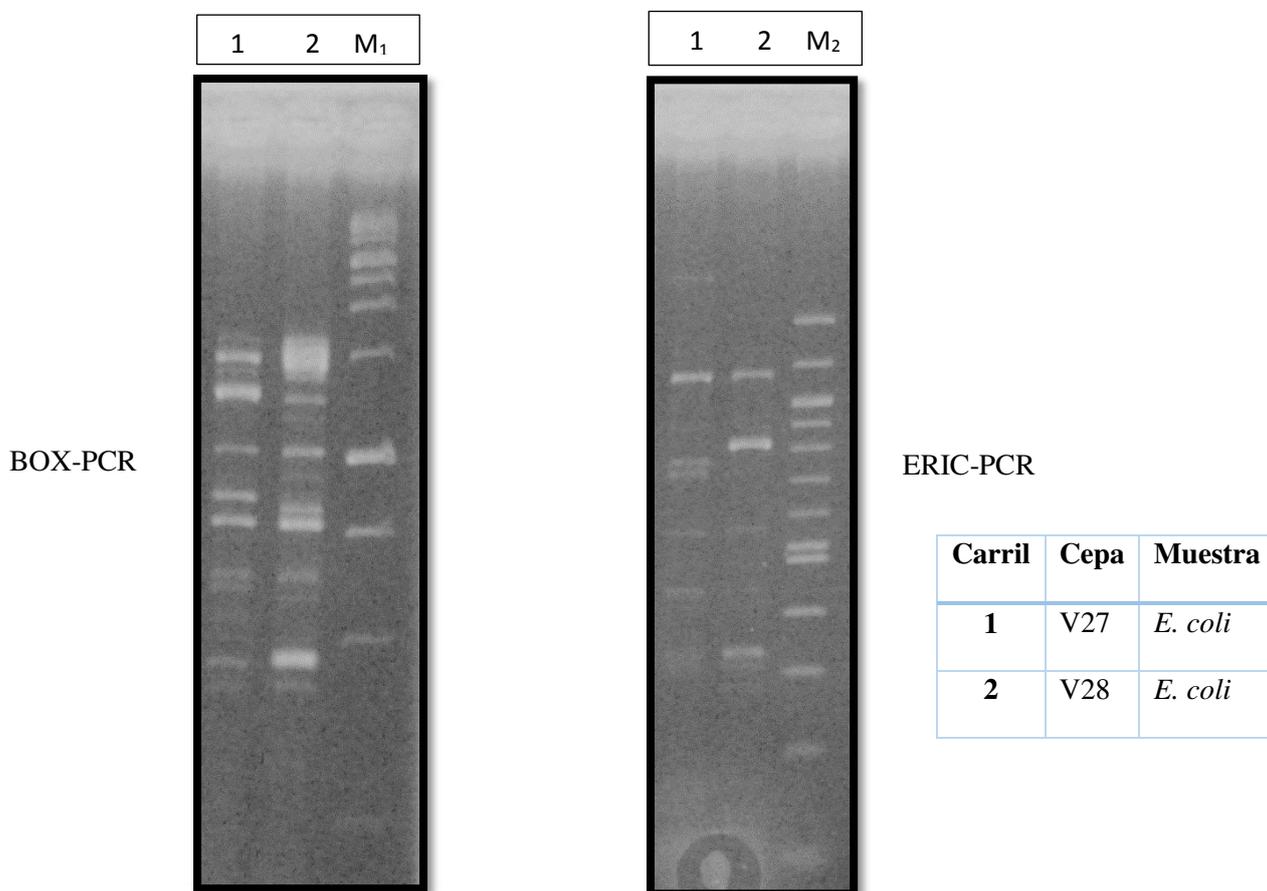
**Figura 8. Análisis de la técnica BOX-PCR.** Carril 1: Marcador de 1kb. Carril 2-16: cepas de alpaca. Carril 17: Marcador de 100 pb.

A la vez se realizó el análisis con ERIC-PCR, detectándose diferencia de tamaños y presencia de bandas entre los aislados de alpaca, obteniéndose un patrón para los 22 aislados de alpacas, como el resultado por BOX-PCR (Figura 10).



**Figura 9. Análisis de la técnica ERIC-PCR.** M<sub>1</sub>: Marcador de 1 kb. Carril 1-16: cepas de alpaca. Carril 17 y 18: cepas control ovino A y D. M<sub>2</sub>: marcador de 100 pb.

Se realizó también el análisis de BOX-PCR y ERIC-PCR de dos cepas de *E. coli* aisladas de alpacas sin diarrea, del genotipo EPEC (*E. coli* enteropatógena) para observar la diferencia con las cepas de *P. multocida* de alpacas y ovinos.

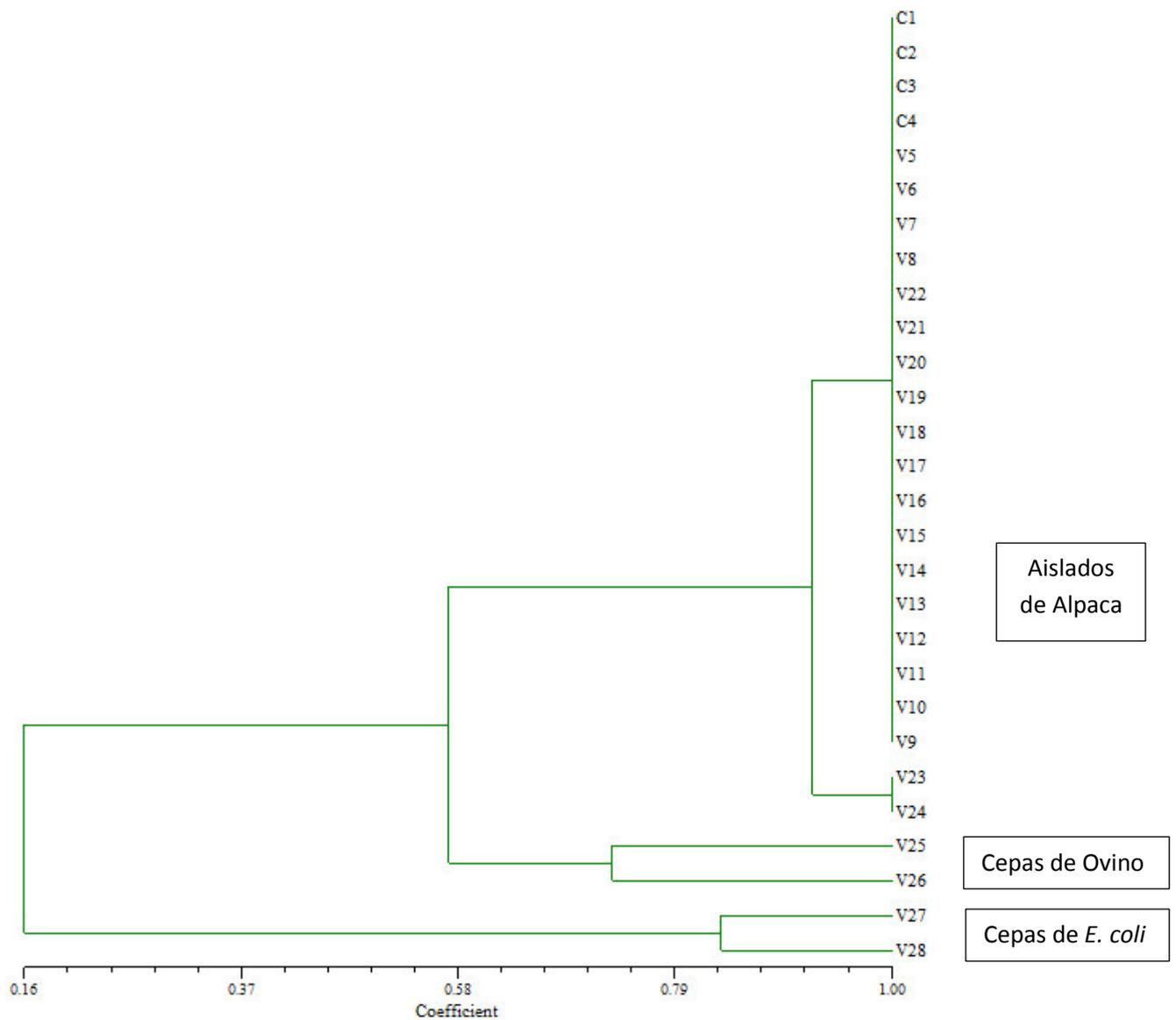


**Figura 10. Análisis de cepas *E. coli* (EPEC) de alpaca con BOX-PCR (izquierda) y ERIC-PCR (derecha). Carril 1 y 2: Cepas *E. coli*. M<sub>1</sub>: Marcador de 1 kb, M<sub>2</sub>: Marcador de 100 pb**

#### 4.7. ANÁLISIS DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS Y ELABORACIÓN DE DENDOGRAMAS

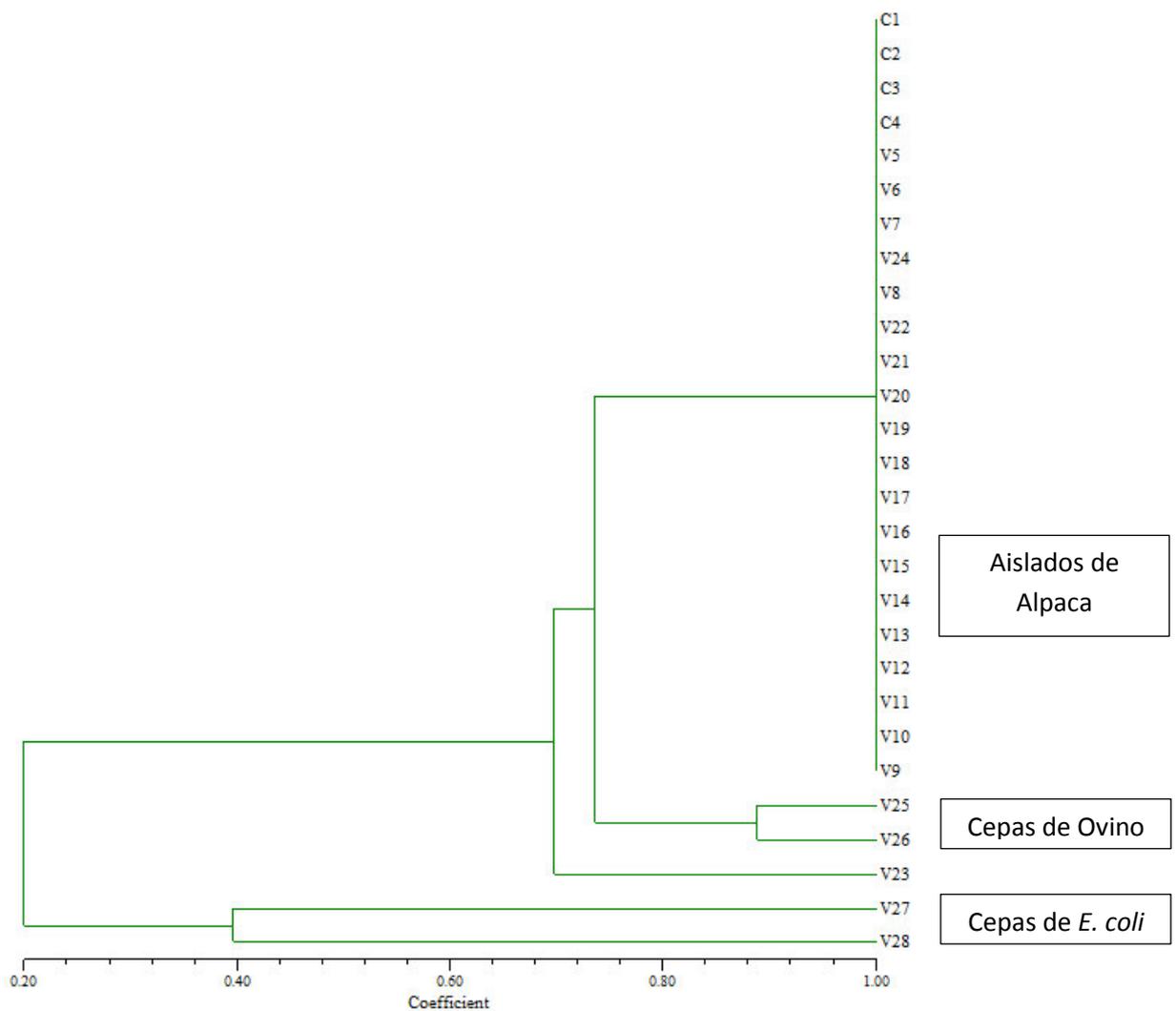
Posteriormente a los análisis BOX-PCR y ERIC-PCR, se desarrollaron dos dendogramas basados en la ausencia y presencia de bandas para determinar si hay diversidad entre ellas, incluyendo en el análisis, los resultados obtenidos de las cepas de *E. coli* mencionados anteriormente.

En el dendograma obtenido por BOX-PCR, los aislados de *P. multocida* formaron un único *cluster* muy alejado de las cepas de *E. coli* (V27, V28). Los 24 aislados de alpacas se agruparon en un *cluster*, en el cual se observaron dos grupos, el primero conformado por 22 aislados, mientras que los dos aislados restantes (V23, V24) se agruparon en otro grupo. Además las cepas control de ovino (V25, V26) se agruparon en otro *cluster* diferenciándose de los aislados de alpaca (Figura 11).



**Figura 11.** Dendograma del análisis BOX-PCR

En el dendograma obtenido por el análisis ERIC-PCR, los aislados de *P. multocida* también se diferenciaron de las cepas de *E. coli* (V27, V28). Las cepas de ovino formaron un único *cluster*, más cercano a la mayoría de los aislados de alpacas, a diferencia de un único aislado de alpaca (V23), que se separa del *cluster* de alpaca y ovino (Figura 12).



**Figura 12.** Dendrograma del análisis ERIC-PCR

## V. DISCUSIÓN

Los camélidos sudamericanos son el principal recurso económico para las comunidades andinas, siendo la fibra, el producto comercial más apreciado en esta especie. Sin embargo debido a la zona geográfica donde habita con condiciones climática extremas, es blanco de enfermedades generando altos porcentajes de mortalidad, afectando la producción. Entre las principales enfermedades esta la neumonía, como segunda causa principal de mortalidad, sobretodo en crías llegando a porcentajes de 27.5% en crías y 26.3% en tuis en los años 1973-1979 (Ramírez, 1989).

Investigaciones iniciales reportan el aislamiento de *Pasteurella multocida* como el agente causante de neumonía en alpacas (Cirilo, 2008; Rosadio *et al*, 2011), sin embargo no se conocen características propias de este agente patógeno. Por ello el objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente aislados de *Pasteurella multocida* de crías de alpacas con signos de neumonía, a través de técnicas moleculares para un mayor conocimiento de este patógeno de gran interés en nuestro país y buscar alternativas para su prevención.

Veinte y cuatro aislados sospechosos de *Pasteurella multocida* de alpacas con signos de neumonía, procedentes del Centro experimental La RAYA de la Universidad del Altiplano

(UNA) del departamento de Puno, del año 2014 fueron conservadas en glicerol al 20% y en crioperlas para luego reactivarlas y analizarlas. Además, dos cepas control de *P. multocida* de ovino fueron empleadas para la estandarización de las pruebas moleculares. Los 24 aislados de alpaca, fueron positivas a *P. multocida* por pruebas bioquímicas, confirmándose su mantenimiento en los ceparios.

El tiempo que toma para la identificación de *P. multocida* por pruebas bioquímicas tiende a ser prolongado, por lo que diversos estudios emplean la identificación molecular por medio del ensayo de PCR, técnica altamente sensible y rápida (Townsend *et al*, 1998). Por ello los 24 aislados fueron analizados también mediante la técnica de PCR, el cual mediante la amplificación de un fragmento del gen *kmt1* (460 pares de bases) (Figura 3), confirma la identificación bioquímica de todos los aislados.

Posteriormente a la identificación por PCR, los aislados fueron evaluados para determinar el tipo capsular mediante la técnica desarrollada por Townsend *et al* (2001). Las 24 cepas analizadas pertenecieron al serogrupo A (100%) (Figura 4), no detectándose la presencia de los demás serogrupos de *P. multocida* (B, D, E, F), resultados similares a lo reportado por Jamali *et al* (2014) quien identifica 89.4% de presencia del serogrupo A a partir de 141 aislados de *P. multocida* de bovino con infección respiratoria. Además diversos estudios realizados en bovino con signos clínicos (Katsuda *et al.*, 2013) y en ovino, caprinos sin datos del estado de los animales (Sarangi *et al.*, 2015); como en otras especies también identifican este serogrupo predominantemente (Ewers *et al.*, 2006). Así mismo, en otro estudio indican que el serogrupo más comprometido en enfermedades respiratorias del bovino es el tipo A (Frank, 1989) y altamente adaptado al hospedero bovino (Ewers *et al.*, 2006).

La tipificación del LPS en *P. multocida* se divide en 16 serovares por la técnica de precipitación en agar gel (Heddleston *et al.*, 1972), sin embargo es un método complejo. Además en diversos estudios se ha reportado que ese sistema no siempre se obtiene resultados

reproducibles (Singh *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 1993). Por ello, otro sistema de tipificación fue desarrollada por Harper *et al* (2015) quien en su estudio indica que los 16 serovares de *P. multocida* se pueden clasificar de acuerdo a la estructura interna del LPS, agrupando los serovares en 8 genotipos de LPS. Los aislados de alpacas, fueron analizadas por medio del PCR múltiple, amplificando una banda de 668 pb correspondiente al genotipo LPS L6, que agrupa los serovares 10, 11, 12 y 15. Las cepas control A y D, amplificaron para el genotipo LPS L6 y LPS L3 (474 pb), respectivamente, siendo este ultimo genotipo que agrupo a los serovares 3 y 4 (Figura 5).

En la mayoría de estudios no indican el tipo de LPS de las cepas *P. multocida* en rumiantes, sin embargo en algunos casos llegan a la tipificación completa de la cepa indicando cepas del serovar 10 (cepa PM1128) en bovino (Harper *et al.*, 2015) y 12 en caprinos y ovinos (tipo capsular F). Otro estudio en cepas de bovino tipificada como tipo D:12 (P4881) (Ewers *et al.*, 2006), pero a través de la técnica de PCR múltiple para cápsula, dió como resultado el tipo A, esto debido a la carencia de expresión o sensibilidad de la tipificación serológica. Las cepas control y cepas de alpacas no fueron sometidas al análisis por el sistema Heddleston, universalmente utilizado para la tipificación, sin embargo los serovares proporcionado por el análisis por PCR múltiple concuerda con otros estudios.

En humanos y en otras especies, como en aves y conejos han sido detectados los serovares 12, 13. Posiblemente esto se deba a una infección cruzada de *P. multocida* entre especies, dado que en las alturas de la sierra de nuestro país, hay vizcachas semejante al conejo, siendo su hábitat en el sur del Perú y quizás debido a la presencia de esos animales más la crianza mixta con ovinos, bovinos, la bacteria *P. multocida* permanezca en el ambiente siguiendo su ciclo de infección.

La patogenicidad del LPS aún es poco conocida, por lo que es objetivo de muchos estudios actualmente, además en ensayos experimentales donde inoculan únicamente el LPS en bovinos fue posible observar signos clínicos (Boyce *et al.*, 2009), sin embargo no siempre se produce como en el caso de aves (Mendes *et al.*, 1994).

El análisis de la presencia de 4 genes codificantes de factores de virulencia, con funciones distintas de importancia para la sobrevivencia del patógeno, *toxA*, *tbpA*, *pfhA* y *hgbB*, dió como resultado que, los genes *toxA* (100%) y *tbpA* (100%) fueron detectados en todas las cepas (Figura 6), no detectándose la *pfhA* y *hgbB*. Diversos estudios reportan la presencia del gen *toxA* está relacionada al serogrupo D, además de ser la causante de la rinitis atrófica en cerdos (Bethe *et al.*, 2009) sin embargo también se ha detectado en cepas del tipo capsular A en rumiantes (Ewers *et al.*, 2006; Shayegh *et al.*, 2008, 2010; Jaglic *et al.*, 2005), como bovinos (Khamesipour *et al.*, 2014), ovinos (Shayegh *et al.*, 2008) y chivos (Sarangi *et al.*, 2015) en porcentajes menores (12-50%) a lo reportado en cerdos y en nuestro estudio.

El gen *tbpA* también fue identificado en todos los aislados, y en otros estudios reportan su presencia tanto en animales sanos (51.4%) como enfermos (90.8%) (Katsuda *et al.*, 2013). Este gen *tbpA* fue identificado por primera vez a partir de una cepa *P. multocida* tipo B, de un caso de septicemia hemorrágica en búfalos y ganado doméstico, indicando que la presencia de este gen podría estar relacionado con la virulencia (Veken *et al.*, 1994), y sobre todo en cepas tipo B (Ewers *et al.*, 2006), y que cepas *tbpA* negativas, estarían relacionadas a otras enfermedades o ser comensales (Ogunnariwo y Schryvers, 2001).

El gen *pfhA* no fue identificado en este estudio, y en ovinos su presencia podría estar relacionada con la patogenicidad del microorganismo. Así, en un estudio realizado en ovinos con neumonía (Shayegh *et al.*, 2008) a partir de 7 cepas de *P. multocida* no detectaron a este gen. Sin embargo en otros estudios si se ha reportado la presencia de este gen hasta un 95.5% en *P. multocida* aisladas de ovinos con neumonías (Sarangi *et al.*, 2015), bovinos (Katsuda *et al.*, 2013), chivos (Sarangi *et al.*, 2015) y búfalos (Ewers *et al.*, 2006), así como el gen *hgbB* que también es detectado en las especies mencionadas anteriormente.

Otros reportes mencionan la relación significativa de los genes *pfhA* y *tbpA* con el tipo capsular A, además los genes *pfhA*, *tbpA* y *hgbB* fueron considerados significativamente más

prevalentes en animales con signos clínicos, pudiendo ser marcadores del potencial patogénico de cepas *P. multocida* (Katsuda *et al.*, 2013, Ewers *et al.*, 2006), sin embargo en nuestro estudio no se detecta el gen *pfhA* ni *hgbB*, pero si el gen *tbpA* pudiendo ser un gen específico de *P. multocida* aisladas de alpacas, y podría estar relacionado a la presencia de lesiones a nivel pulmonar (congestión pulmonar y bronconeumonía) Además en otros estudios en bovinos, identificaron el gen *pfhA* en el 100% de cepas analizadas, y determinaron que no hubo asociación en cuanto al serogrupo o estatus de la enfermedad (Verma *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos y los estudios realizados en otras especies podrían indicar que *P. multocida* aislada de alpacas llevaría consigo factores de virulencia específicos para estos hospedadores y podrían ayudar mucho en establecer los mecanismos de infección y estrategias de prevención.

En otro estudio, Hurtado (2015) caracterizó el genoma de una cepa de *P. multocida* de alpaca denominándola “UNMSM”, identificando distintos genes de virulencia, como la *toxA*, *tbpA*, *hgbB*, que a través de la técnica de PCR múltiple en este estudio fue posible también detectarlos (*toxA*, *tbpA*), sin embargo la no detección del gen *hgbB* sugiere la elaboración de secuencias de cebadores específicos para los genes de virulencia de alpacas para así poder analizar mas aislados de *P. multocida* en esta especie.

Diversos estudios han elaborado protocolos para identificar diversidad entre cepas, en base a secuencias repetitivas extragénicas en el genoma bacteriano, que hace capaz de detectar diferencias entre cepas, de utilidad epidemiología. Por ello se elaboraron cebadores para la identificación de estas secuencias, entre ellas tenemos BOX y ERIC. Los aislados de alpaca fueron analizados con la técnica rep-PCR, con dos secuencias: BOX y ERIC desarrollados por Versalovic *et al* (1991, 1994). Las muestras analizadas con BOX-PCR, y ERIC-PCR gran parte de las cepas de alpacas presentaron los mismos tamaños y patrones de bandas, diferenciándose de las cepas control de ovino. Posteriormente se analizaron cepas de *E. coli* (EPEC) para la elaboración de los dendogramas mediante el programa NTSYSpc 2.10 m.

Realizados los dendogramas mediante los análisis por BOX-PCR y ERIC-PCR, los aislados de *P. multocida* se agruparon en un único *cluster* diferenciándose claramente de las cepas de *E. coli* (EPEC) de alpaca verificando el poder discriminatorio de la prueba. Los dos dendogramas mostraron las cepas de ovino agrupándose en un *cluster*, diferenciándose de las alpacas, sin embargo, hay diferencia entre los resultados obtenidos por las técnicas rep-PCR. Por la técnica ERIC-PCR (figura 12) hubo un aislado de alpaca (V23) que se alejó de la mayoría de los aislados de la misma especie y las de ovino, además que no formó otro grupo de dos aislados como lo realizado por el BOX-PCR (figura 11), en la que incluía al mismo aislado V23 y V24.

Los resultados obtenidos en los dendogramas, evidenció una reducida diversidad genética entre los aislados de *P. multocida* de alpaca, por lo que se sugiere como posible causa de la infección, una cepa de *P. multocida* procedente de una única fuente infecciosa, y se diseminó clonalmente entre los animales susceptibles. En un estudio realizado en Vietnam, Townsend *et al* (2000) reportaron que algunas de las cepas de *P. multocida* aisladas de cerdos mostraron perfiles muy parecidos en cepas aisladas de un brote en Australia y de aves de corral de Vietnam, indicando la gran utilidad de esta prueba a nivel epidemiológico. A pesar que las cepas *P. multocida* de ovino se agruparon, diferenciándose de los aislados de alpacas, posiblemente ante la comparación con cepas aisladas de rumiantes de nuestro país, la semejanza sea mayor, hasta incluso la formación de un único cluster, ya que en el estudio realizado por Allasi (2014), concluye que la cepa *P. multocida* UNMSM de alpaca tiene características genómicas muy semejantes a una cepa de bovino.

Además, en un estudio a partir de bovinos de una granja que murieron por neumonía, los aislados de *P. multocida* mostraron una significativa diversidad entre cepas quizás debido a la introducción de animales, variación genética, vacunación, etc; sin embargo esta diversidad fue difícil de interpretar porque todas las cepas fueron aisladas de un mismo brote (Taylor *et al.*, 2010). En el caso del CIP-La Raya, poseen una punta de machos de suris y huacayas, que luego son llevados a las distintas puntas para la reproducción de animales, quizás este contacto podría

ser un factor para la baja diversidad detectada en los aislados de alpacas, ya que los aislados V23 y V24 provinieron de alpacas huacayas de una misma punta.

Por lo tanto, a través de los diversos análisis moleculares y genéticos empleados, fue posible realizar la caracterización molecular de las cepas de *P. multocida* aisladas de alpacas con signos de neumonía. Se ha logrado identificar al patógeno, determinar el serogrupo y serovar, conocer los principales factores de virulencia propios de patógenos de alpacas y establecer que una cepa de *P. multocida* se diseminó clonalmente entre los animales afectados por neumonía. Esta información contribuirá a la obtención de mayor información y conocimiento de este patógeno que permitirán desarrollar estrategias de control y prevención contra uno de los patógenos causantes de altos porcentajes de mortalidad en alpacas.

## VI. CONCLUSIONES

- Todos los aislados de *P. multocida* fueron confirmados por la detección del gen *kmt*
- Todos los aislados pertenecieron al serogrupo A y al genotipo LPS 6 (serovares: 10,11 12 y 15).
- Los genes de virulencia *toxA* y *tbpA* estuvieron presentes en las cepas de *P. multocida* de alpacas con signos neumónicos.
- Se detectó una baja diversidad entre los aislados de alpaca (homogeneidad genética), evidenciándose como posible causa de la infección, una cepa de *P. multocida* que se diseminó clonalmente entre los animales afectados por neumonía

## VII. LITERATURA CITADA

- **Al-haj Ali H, Sawada T, Hatakeyama H, Katayama Y, Ohtsuki N, Itoh O. 2004.** Invasion of chicken embryo fibroblast cells by avian *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 104: 55–62.
- **Ali HA, Sawada T, Hatakeyama H, Ohtsuki N, Itoh O. 2004<sup>a</sup>.** Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. Vet Microbiol 100: 43–53.
- **Ali HA, Sawada T, Noda K. 2004<sup>b</sup>.** Protectivity of an immunoaffinity-purified 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice. J Vet Med Sci 66: 1603–1604.
- **Allasi CN.** Analisis comparativo de dos genommas de *Pasteurella multocida* asociado a neumonia de alpacas y bovinos. Tesis para Biologa Genetista Biotecnóloga. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 48 p.

- **Ameghino E., DeMartini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Perú: IVITA-UNMSM.
- **Ameghino E. 1990.** Avances sobre investigación en salud animal Camélidos Sudamericanos. IVITA. UNMSM. Bol. Div. N° 23. 25-30 pp.
- **Ameghino E, Calle S. 1989.** Aislamiento de *Pasteurella multocida* de procesos neumónicos en crías de alpaca. En: XII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA). Lima.
- **Amonsin A, JF Wellehan, LL Li, J Laber, V Kapur. 2002.** DNA fingerprinting of *P. multocida* recovered from avian source. J. Clin. Microbiol, 40(8): 3025-3031.
- **Bagley KC, SF Abdelwahab, RG. Tuskan, GK Lewis. 2005.** *Pasteurella multocida* toxin activates human monocyte - derived and murine bone marrow - derived dendritic cells in vitro but suppresses antibody production in vivo. Infect. Immun. 73: 413 – 421.
- **Barsallo J. 1985.** Agentes bacterianos encontrados en el aparato respiratorio de alpacas adultas aparentemente normales. Anales de la V Conven. Internac. Sobre Camel. Sudamer. 36 p.
- **Bethe A, Wieler LH, Selbitz HJ, Ewers C. 2009.** Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. Vet Microbiol 139, 97-105.
- **Blackall P J y Miflin JK. 2000.** Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. Avian Pathol. 29:271 – 287.
- **Blocker D, Berod L, Fluhr JW, Orth J, Idzko M, Aktories K. Norgauer J. 2006.** *Pasteurella multocida* toxin (PMT) activates RhoGTPases, induces actin polymerization and inhibits migration of human dendritic cells, but does not influence macropinocytosis. Int Immunol 18: 459–464.
- **Bosch M, Garrido E, Llagostera M, de Rozas AMP, Badiola I, Barbe J. 2002a.** *Pasteurella multocida* exbB, exbD and tonB genes are physically linked but independently transcribed. FEMS Microbiol Lett 210: 201–208.

- **Bosch M, Garrido ME, Llagostera M, De Rozas AMP, Badiola I, Barbe J. 2002b.** Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. Infect Immun 70: 5955–5964.
- **Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Ohtsu N, Takagi M, Nakamura S, Kawamoto E. 2003.** A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. Vet Microbiol 97: 229–243.
- **Boyce JD, B Adler. 2000.** The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) . Infect. Immun. 68 : 3463 – 3468 .
- **Boyce JD, JY Chung, B Adler. 2000.** Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) . Vet. Microbiol. 72 : 121 – 134
- **Boyce JD, B Adler. 2001.** Acapsular *Pasteurella multocida* B:2 can stimulate protective immunity against pasteurellosis. Infect. Immun. 69 : 1943 – 1946.
- **Boyce JD, M Harper, F St Michael, M John, A Aubry, H Parnas, et al. 2009.** Identification of novel glycosyltransferases required for assembly of the *Pasteurella multocida* A:1 lipopolysaccharide and their involvement in virulence. Infect. Immun. 77 : 1532 – 1542 .
- **Boyce JD, Harper M, Wilkie IW, Adler B. 2010.** Pathogenesis of bacterial infections in animals, Capitulo 17. Ed. Cuarta. pp. 325-346
- **Cameron RDA, O' Boyle D, Frost AJ, Gordon AN, Fegan N. 1996.** An outbreak of hemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in a large pig herd. Aust. Vet. J. 73: 27 – 29 .
- **Carter GR. 1952.** The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida*. Can. J. Med. Sci. 30:48–53
- **Carter GR, Annau E. 1953.** Isolation of capsular polysaccharides from colonial variants of *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res. 14(52):475–478.
- **Carter GR, Chengappa MM. 1980.** Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. J Clin Microbiol 11: 94–96.

- **Carter GR y De Alwis MCL. 1989.** Haemorrhagic septicaemia. In: Pasteurella and Pasteurellosis, Adlam C. & Rutter J.M., eds. Academic Press, London, UK, 131–160.
- **Carter GR. 1989.** Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria (España, Acribia).
- **Christensen JP, y M Bisgaard. 1997.** Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. Avian Pathol. 26:461-483
- **Choi-Kim K, Maheswaran SK, Felice LJ, Molitor TW. 1991.** Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 28: 75–92.
- **Chung JY, YM Zhang, B Adler. 1998.** The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. FEMS Microbiol. Lett. 166: 289 – 296 .
- **Chung JY, I Wilkie, JD Boyce, KM Townsend, AJ Frost, M Ghoddusi, et al. 2001.** Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. Infect. Immun. 69 : 2487 – 2492 .
- **Cirilo CE, Manchego SA, Rivera HH, Rosadio AR. 2012.** Coexistencia de virus y bacterias en Neumonías agudas en alpacas neonatas. Rev Inv Vet, Peru 23(3): 317-335.
- **Cirilo CE. 2008.** Identificación de agentes virales y bacterianos causantes de neumonías agudas en crías de alpacas. Tesis de Maestría. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 93 p.
- **Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. 2003.** Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. Microb Pathog 35: 147–157.
- **Dabo SM, Confer AW, Hartson SD. 2005.** Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. Vet Microbiol 110: 265–275.
- **Davies RL, R. MacCorquodale, S Reilly. 2004.** Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. Vet. Microbiol. 99 : 145 – 158.

- **De Alwis MCL, Wijewardana TG, Gomis AI, Vipulasiri AA. 1990.** Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection) in buffaloes. Trop. Anim. Health Prod. 22:185 – 194 .
- **De Alwis MCL. 1992.** Haemorrhagic septicaemia – a general review. Br. Vet. J, 148, 99-112.
- **DeAngelis PL, W Jing, RR Drake, AM Achyuthan. 1998.** Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. J. Biol. Chem. 273: 8454 – 8458 .
- **DeAngelis PL, AJ Padgett-McCue. 2000.** Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. J. Biol. Chem. 275:24124 – 24129 .
- **DeAngelis PL, NS Gunay, T Toida, W J Mao, RJ Linhardt. 2002.** Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. Carbohydr. Res. 337 : 1547 – 1552 .
- **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.
- **Doughty SW, Ruffolo CG, Adler B. 2000.** The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 72: 79–90.
- **Drzeniek R, Scharmann W, Balke E. 1972.** Neuraminidase and N-acetylneuraminase pyruvate-lyase of *Pasteurella multocida*. J Gen Microbiol 72: 357–368.
- **Ewers AC, Becker L, Bethe A, Kiessling MS, Filter M, Wieler LH. 2006.** Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet Microbiol 114 (3-4): 304-317
- **Foged NT, KB Pedersen, F Elling. 1987.** Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS Microbiol. Lett. 43 : 45 – 51 .

- **Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, Simjee S, Zhao S. 2006.** Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol* 44: 3569–3577.
- **Frank GH. 1989.** Pasteurellosis of cattle. In: *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. Eds C. Adiam
- **Frye SR y Healy M. 2006.** Molecular strain typing using repetitive sequence based PCR. In *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Tang, Y.W., and Stratton, C. (eds). New York, NY, USA: Springer, pp. 444–471
- **Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. 2000.** Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature - tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29: 25 – 38.
- **Ghanizadeh A, Jabbari AR, Shayegh J, Sanchuli A, Banihashemi R. 2015.** Genotyping of *Pasteurella multocida* ovine and bovine isolates from Iran based on PCR-RFLP of *ompH* gene. *Archives of Razi Institute*, Vol. 70, No. 3: 151-156
- **Giesendorf BA, Van Belkum A, Koeken A, Stegeman H, Henkens MH, Van der Plas J, Goosens H, Niesters HG, Quint WG. 1993.** Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 31: 1541– 1546.
- **Glisson JR, Contreras MD, Cheng IHN, Wang C. 1993.** Crossprotection studies with *Pasteurella multocida* bacterins prepared from bacteria propagated in iron-depleted medium. *Avian Dis* 37: 1074–1079.
- **Gray-Owen SD, Schryvers AB. 1996.** Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* 4: 185–191.
- **Guzmán K. 2011.** Identificación de polimorfismos del gen *tlr4* en crías de alpacas con cuadros de neumonías por *Pasteurella multocida*. Tesis para Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 70 p.

- **Guzmán K, Rosadio R, Maturrano L, Manchego A. 2013.** Asociación de agentes virales y bacterianos en cuadros de neumonías agudas en alpacas tuis. Rev. investig. vet. Perú vol.24 no.4 Lima dic. /dic.
- **Hahm BK, Maldonado Y, Schreiber E, Bhunia AK, Nakatsu CH. 2003.** Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, repPCR, PFGE, ribotyping and AFLP. J Microbiol Methods 53: 387–399
- **Harper M, AD Cox, F St. Michael, IW Wilkie, JD Boyce, B Adler. 2004.** A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. Infect. Immun. 72: 3436 – 3443 .
- **Harper M, Boyce J, Adler B. 2006.** Minireview: *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol Lett. 265:1-10
- **Harper M, JD Boyce, AD Cox, F St Michael, I Wilkie, P Blackall, et al. 2007a.** *Pasteurella multocida* expresses two LPS glycoforms simultaneously both in vitro and in vivo but only a single form is required for virulence: identification of two acceptor specific heptosyl I transferases. Infect. Immun. 75 : 3885 – 3893.
- **Harper M, Cox AD, St. Michael F, Parnas H, Wilkie I, Blackall PJ. 2007b.** Decoration of *Pasteurella multocida* LPS with phosphocholine is important for virulence. J. Bacteriol. 189:7384 – 7391 .
- **Harper M, John M, Turni C, Edmunds M, St. Michael F, Adler B, Blackall PJ, Cox AD, Boycea JD. 2015.** Development of a rapid multiplex PCR to genotype *Pasteurella multocida* strains using the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus J. Clin. Microbiol., 53. pp. 477–485
- **Heddleston KL, JE Gallagher, PA Rebers. 1972.** Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteruella multocida* from avian species. Avian. Dis. 16: 925 – 936.
- **Horadagoda NU, JC Hodgson, GM Moon, TG Wijewardana, PD Eckersall. 2002.** Development of a clinical syndrome resembling haemorrhagic septicaemia in the buffalo

following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B:2 endotoxin and the role of tumour necrosis factor - alpha . Res. Vet. Sci. 72 : 194 – 200 .

- **Hurtado CR.** Analisis comparativo del genoma de *Pasteurella multocida* aislado de alpaca (*Vicugna pacos*) con una cepa virulenta asociado a neumonias de cerdo (*Sus scrofa*). Tesis para Bióloga Genetista Biotecnóloga. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 47 p.
- **Ishii S, Hansen DL, Hicks RE, Sadowsky MJ. 2007.** Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environ Sci Technol* 41: 2203–2209.
- **Ishii S y Sadowsky MJ. 2008.** *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environ* 23: 101–108.
- **Ishii S y Sadowsky MJ. 2009.** Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol* 11 :733-740.
- **Jacques M, A Lebrun, B Foiry, M Dargis, F Malouin. 1991.** Effects of antibiotics on the growth and morphology of *Pasteurella multocida*. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 2663 – 2668.
- **Jacques M, M Belanger, MS Diarra, M Dargis, F Malouin. 1994.** Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and *in vivo*. *Microbiol.* 140 : 263 – 270 .
- **Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Pavlik I, Alexa P, Bartos M. 2005.** Characterisation and comparison of *Pasteurella multocida* isolated from different species in the Czech Republic : capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotxin production. *Vet. Med-Czech.* 50: 345-354.
- **Jamali H, Rezagholipour M, Fallah S, Dadrasnia A, Chelliah Sh, Velappan RD, Chuan WKS, Ismail S. 2014.** Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Pasteurella multocida* isolated from bovine respiratory infection. *Journal Vet. Microbiology.* 202: 381-383.

- **Johnson LK, Brown MB, Carruthers EA, Ferguson, JA, Dombek PE, Sadowsky M.J. 2004.** Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl Environ Microbiol* 70: 4478–4485
- **Kane TA, CL White, PL DeAngelis. 2006.** Functional characterization of PmHS1, a *Pasteurella multocida* heparosan synthase. *J. Biol. Chem.* 281: 33192 – 33197.
- **Katsuda K, Hoshino K, Ueno Y, Kohmoto M, Mikami O. 2013.** Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Vet. Microbiol.* 167, 737–741.
- **Khamesipour F, Momtaz H, Mamoreh MA. 2014.** Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolates from slaughter cattle in Iran. *Front. In Microbiology.* Vol 5. Art. 536.
- **Kennett L, Muniandy N, Mukkur TKS. 1993.** Comparative Protective Potential of Non-living Intact Cells and Purified Outer Membrane and Associated Proteins of *Pasteurella multocida* Type B:6 Grown Under Iron-Regulated Conditions. In: *Pasteurellosis in Production Animals*, ACIAR Proceedings No. 43 (Patten BEea, ed.), pp. 144–149. ACIAR Press, Canberra.
- **Kimura A, Mountzouros KT, Relman DA, Falkow S, Cowell JL. 1990.** *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* 58:7–16.
- **Koneman E. 1992.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (Philadelphia, EEUU., J.B. Lippincott Company)
- **Korczak B y Kuhnert P. 2008.** Phylogeny of *Pasteurellaceae*. In *Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects*. P. Kuhnert and H. Christensen (eds.). Norwich, UK : Horizon Scientific Press, pp. 27 – 52.

- **Kwon DH, El-Zaatari AK, Woo JS, Perng CL, Graham DY, Go MF. 1998.** REP-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal diseasespecific *Helicobacter pylori* strains. *Digest Dis Sci* 43: 980– 987
- **León LC. 2012.** Identificación de bacterias de la familia Pasteurellaceae causantes de procesos neumónicos en crías de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
- **Lu YS, Afendis SJ, Pakes SP. 1988.** Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3 in rabbits. *Infect Immun* 56: 1532–1537.
- **Lu YS, LaiWC, Pakes SP, Nie LC. 1991.** A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against Pasteurellosis. *Infect Immun* 59: 172–180.
- **Luo Y, Glisson JR, Jackwood MW, Hancock RE, Bains M, Cheng IH, Wang C. 1997.** Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73. *J Bacteriol* 179: 7856–7864.
- **Marandi MV, Mittal KR. 1997.** Role of outer membrane protein H (ompH)- and ompA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 65: 4502–4508.
- **Matheson VG, Munakata-Marr J, Hopkins GD, McCarty PL, Tiedje JM., Forney LJ. 1997.** A novel means to develop strain-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment. *Appl Environ Microbiol* 63: 2863–2869.
- **May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS, Kapur V. 2001.** Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3460–3465.
- **Mizan S, Henk A, Stallings A, MaierM, Lee MD. 2000.** Cloning and characterization of sialidases with 2-60 and 2-30 sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* 182: 6874–6883.

- **Melnikow E, C Schoenfeld, V Spehr, R Warrass, N Gunkel, M Duszenko, et al. 2008.**  
A compendium of antibiotic - induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. *Vet. Microbiol.* 131 : 277 – 292 .
- **Mendes S, KP Carmichael, JC Nunnally, JR Glisson, IH Cheng, BG Harmon. 1994.**  
Lesions resulting from attempted Shwartzman reaction in turkey poultts inoculated with *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide. *Avian. Dis.* 38 : 790 – 796 .
- **Merlin C, Gardiner G, Durand S, Masters M. 2002.** The *Escherichia coli* metD locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ). *J Bacteriol* 184: 5513–5517.
- **Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, Van der Heide HG, Walvoort HC, Guinee PA. 1992.** Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog* 12: 127–135.
- **Muhairwa AP, Christensen JP, and M. Bisgaard. 2000.** Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. *Avian Pathol.* 29: 133 – 142.
- **Mullan PB, Lax AJ. 1998.** *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 63: 340–345.
- **Mutters M, P. Ihm, S Pohl, W Frederiksen, W Mannheim. 1985.** Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35 : 309 – 322 .
- **Narayan SL, Priyadarshini A, Kumar S, Prasad T, Kumar GS, Konasagara NV, Pal SV. 2014.** Virulence genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from multiple hosts from India. *Sci World J (Hindawi)* 2014: 1-10.
- **Ogunnariwo JA, Schryvers AB. 2001.** Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* 183: 890–896.

- **Pabs-Garnon LF y Soltys MA. 1971.** Multiplication of *Pasteurella multocida* in the spleen, liver and blood of turkeys inoculated intravenously. *Can. J. Comp. Med.* 35: 147 – 149.
- **Pinto JC. 2011.** Epidemiología molecular de las poblaciones bacterianas de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* asociadas a la presencia de lesiones neumónicas en corderos en matadero. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 213 p
- **Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic, JV, De Bruijn FJ. 2008.** Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuck, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., and van Elsas, J.D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp. 611–644.
- **Ramírez A. 1989.** Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. XII Reunión científica anual APPA. Libro de resumen. Lima, Perú. 85 p.
- **Rimler RB, Rhoades KR. 1989.** *Pasteurella multocida*. In: *Pasteurella and Pasteurellosis* (Adlam C & Rutter JM, eds), pp.37–73. Academic Press Limited, London.
- **Rimler RB, Rhoades KR. 1994.** Hyaluronidase and chondroitinase activity of *Pasteurella multocida* serotype B:2 involved in hemorrhagic septicaemia. *Vet Rec* 134: 67–68.
- **Rimler RB. 2001.** Purification of a cross-protective antigen from *Pasteurella multocida* grown in vitro and in vivo. *Avian Dis* 45: 572–580.
- **Rhoades KR, RB Rimler. 1987.** Effects of *Pasteurella multocida* endotoxins on turkey poults. *Avian. Dis.* 31 : 523 – 526.
- **Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. 2011.** Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurellamultocida* and *Mannheimiahemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. *Small Ruminant Res.* doi:10.1016/j.smallrumres.2011.02.001

- **Rodríguez H, Mimbela M. 1981.** Microbiología de secreción nasal y bucal de alpacas. Resúmenes de proyectos de investigación realizados por la UNMSM. Periodo 1980-1981. Tomo III.
- **Rosenbusch CT, IA Merchant. 1939.** A study of the hemorrhagic septicemia *Pasteurellae*. J. Bacteriol. 37 : 69 – 89.
- **Rosner H, HD Grimmecke, YA Knirel, AS Shashkov. 1992.** Hyaluronic acid and a (1 - 4) -  $\beta$  - D - xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. Carbohydr. Res. 223 : 329 – 333.
- **Ruffolo CG, JM Tennent, WP Michalski, B Adler. 1997.** Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. Infect. Immun. 65 : 339 – 343.
- **Ruffolo CG, Jost BH, Adler B. 1998.** Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. Vet Microbiol 59: 123–137.
- **Sadowsky MJ, Kinkel LL, Bowers JH, Schottel JL. 1996.** Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. Appl Environ Microbiol 62: 3489–3493.
- **Sadowsky M.J y Hur HG. 1998.** Use of endogenous repeated sequences to fingerprint bacterial genomic DNA. In Bacterial Genomics: Physical Structure and Analysis. de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., and Weinstock, G.M. (eds). New York, NY, USA: Chapman & Hall, pp. 399–413.
- **Sarangi LM, Thomas P, Gupta SK, Priyadarshini A, Kumar S, Nagaleekar VK, Kumar A, Singh VP. 2015.** Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. Journal Comp. Immuno. Microbio. Inf. Diseases. 38: 33-39.
- **Saxena MK, Singh VP, Kumar AA, Chaudhuri P, Sinhg VP, Shivachandra SB, Biswas A, Sharma B. 2006.** REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from wild and domestic animals in India. Vet Res Commun.; 30(8):851-61.

- **Scharmman WR, Drzeniek R, Blobel H. 1970.** Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. Infect Immun 1: 319–320.
- **Schmidt AL y Anderson LM. 2006.** Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues. Biol Rev 81: 531–543.
- **Singh R, Blackall PJ, Remington B, Turni C. 2013.** Studies on the presence and persistence of *Pasteurella multocida* serovars and genotypes in fowl cholera outbreaks. Avian Pathol.42:581-5
- **Shayegh J, Atashpaz S, Hejazi MS. 2008.** Virulence genes profile and Typing of ovine *Pasteurella multocida*. Asian Jr of Animal and Veterinary Advances 3: 206-213.
- **Shayegh J, Parvizi M, Hejazi MS. 2010.** Diversity of caprine and ovine *Pasteurella multocida* isolates based on 16 rRNA gene sequencing. Iranian Jr of Veterinary Research. 11: 33
- **Sneath PH y Sokal RR. 1973.** Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- **Snipes KP, Hansen LM, Hirsh DC. 1988.** Plasma- and ironregulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 49: 1336–1338.
- **St. Michael F, J Li, AD Cox. 2005a.** Structural analysis of the core oligosaccharide from *Pasteurella multocida* strain X73. Carbohydr. Res. 340 : 1253 – 1257 .
- **St. Michael F, Vinogradov E, Li J, Cox AD. 2005b.** Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* genome strain Pm70 and identification of the putative lipopolysaccharide glycosyltransferases. Glycobiology 15: 323 – 333.
- **St. Michael F, J Li, E Vinogradov, S Larocque, M Harper, AD Cox. 2005c.** Structural analysis of the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida* strain VP161: identification of both Kdo - P and Kdo - Kdo species in the lipopolysaccharide. Carbohydr. Res. 340:59 – 68.

- **Sterner-Kock A, Lanske B, Uberschar S, Atkinson MJ. 1995.** Effects of the *Pasteurella multocida* toxin on osteoblastic cells in vitro. *Vet Pathol* 32: 274–279.
- **Steenbergen SM, Lichtensteiger CA, Caughlan R, Garfinkle J, Fuller TE, Vimr ER.. 2005.** Sialic acid metabolism and systemic pasteurellosis. *Infect Immun* 73: 1284–1294.
- **Straus DC, Purdy CW. 1994.** In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* A1 in goats after transthoracic challenge. *Infect Immun* 62: 4675–4678.
- **Straus DC, Cooley JD, Purdy CW. 1996.** In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella multocida* A:3 in goats after transthoracic challenge. *Curr Microbiol* 33:266–269.
- **Tabatabai LB, Zehr ES. 2004.** Identification of five outer membrane-associated proteins among cross-protective factor proteins of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 72: 1195–1198.
- **Tatum FM, AG Yersin, RE Briggs. 2005.** Construction and virulence of a *Pasteurella multocida fhaB2* mutant in turkeys. *Microb. Pathog.* 39 : 9 – 17 .
- **Taylor JD, Fulton RW, Dabo SM, Lehenbauer TW, Confer AW. 2010.** Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest.* 22(3):366–375.
- **Tobes R y Ramos JL. 2005.** REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environ Microbiol* 7: 225–228.
- **Townsend KM, Dawkins HJS, Papadimitriou JM. 1997.** REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. *Research in Veterinary Science*, 63, 151-155.
- **Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJS. 1998.** Development of PCR assays for species – and type - specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:1096 – 1100.

- **Townsend KM, Hanh TX, O'Boyle D, Wilkie I, Phan TT, Wijewardana TG, Trung NT, Frost AJ. 2000.** PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. *Vet. Microbiol.* 72:69-78.
- **Townsend KT, JD Boyce, JY Chung, AJ Frost, B Adler. 2001.** Genetic organization of *Pasteurella multocida cap* loci and the development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 924 – 929.
- **Trevisan V. 1887.** Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il period d'incubazione dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha costratta l'infezione rabbica. *Rend. R. 1st. Lomb. Sci. Ler. Ser. II,* 88-105.
- **Ussery DW, Binnewies TT, Gouveia-Oliveira R., Jarmer H, Hallin PF. 2004.** Genome update: DNA repeats in bacterial genomes. *Microbiology* 150: 3519–3521.
- **Vanparys B, Spieck E, Heylen K, Wittebolle L, Geets J, Boon N, De Vos, P. 2007.** The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* 30: 297–308.
- **Veken JW, Oudega B, Luirink J, De Graaf FK. 1994.** Binding of bovine transferrin by *Pasteruella multocida* serotype B2,5, a strain which causes haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle. *FEMS Microbiol Lett.* 115: 254-257.
- **Verma S, Sharma M, Katoch S, Verma L, Kumar S, Dogra V, Chahota R, Dhar P, Singh G. 2013.** Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet Res Commun.* 2013 Mar; 37(1):83-9.
- **Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. 1991.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 24: 6823-6831.
- **Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. 1994.** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5:25-40.

- **Versalovic J y Lupski, JR. 1998.** Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. In *Bacterial Genomics: Physical Structure and Analysis*. de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., and Weinstock, G.M. (eds). New York, NY, USA: Chapman & Hall, pp. 38–48.
- **Versalovic JV, De Bruijn FJ, Lupski JR. 1998.** Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., and Weinstock, G.M. (eds). New York, NY, USA: Chapman & Hall, pp. 437–454.
- **Watt JM, E Swiatlo, MM Wade, FR Champlin. 2003.** Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 225 : 9 – 14 .
- **White DJ, Jolley WL, Purdy CW, Straus DC. 1995.** Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A-3 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* 63: 1703–1709.
- **Wilkie IW, Grimes SE, Boyle DO, Frost AJ. 2000.** The virulence and protective efficacy for chickens of *Pasteurella multocida* administered by different routes. *Vet. Microbiol.* 72 : 57 – 68 .
- **Wilson MA, Morgan MJ, Barger GE. 1993.** Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 255-259.
- **Yates WD. 1982.** A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Compo Med.* 46:225-263

## **VIII. ANEXO**

**Anexo 1.** Cuadro de análisis de cepas *Pasteurella multocida* de alpacas y cepas control de ovino

<b>N°</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Tipo Capsular</b>	<b>Genotipo LPS</b>	<b>Gen de virulencia</b>
<b>C1</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>C2</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>C3</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>C4</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V5</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V6</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V7</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V8</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V9</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V10</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V11</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V12</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V13</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V14</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V15</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V16</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V17</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V18</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V19</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V20</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V21</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V22</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V23</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V24</b>	Alpaca	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>toxA, tbpA</i>
<b>V25</b>	Ovino	<i>P. multocida</i>	A	6	<i>HgbB</i>
<b>V26</b>	Ovino	<i>P. multocida</i>	D	3	<i>PfhA</i>