



Primera detección de *Moraxella bovoculi* vinculada a casos de queratoconjuntivitis infecciosa bovina en Uruguay

Sosa V.; Zunino P.

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Av. Italia 3318, C.P. 11600, Montevideo, Uruguay

Resumen

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es la enfermedad ocular más frecuente en bovinos y constituye un serio problema económico y sanitario que afecta al sector productivo. Hasta hace poco tiempo se consideraba que el principal agente etiológico responsable de la QIB era *Moraxella bovis*. Sin embargo, recientemente fue descrita una nueva especie bacteriana, *Moraxella bovoculi*, que también estaría involucrada en la etiología de la enfermedad. En este trabajo se identificó y caracterizó fenotípica y genotípicamente una colección de aislamientos obtenidos a partir de casos de QIB en Uruguay. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron constatar por primera vez la presencia de aislamientos de *M. bovoculi* asociados a casos de QIB en Uruguay.

Introducción y Objetivos

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es la enfermedad ocular más frecuente en bovinos. Es altamente contagiosa y si bien afecta animales jóvenes puede manifestarse en todas las categorías de bovinos. Clínicamente, se caracteriza por presentar una evolución rápida, observándose inicialmente lagrimeo intenso, seguido de opacidad corneal (queratitis), queratocono y eventualmente ruptura de la córnea (Baptista, 1979). Esta enfermedad está distribuida mundialmente y se ha convertido en un grave problema económico y sanitario que afecta al sector productivo. Tradicionalmente se ha considerado que el principal agente etiológico de la QIB es la bacteria Gram negativa *Moraxella bovis*. Sin embargo, recientemente fue descrita una nueva especie bacteriana, *Moraxella bovoculi*, que también estaría involucrada en la etiología de la enfermedad (Angelos *et al.*, 2007). *M. bovoculi* se describió como un nuevo miembro del género *Moraxella* en base a la secuencia nucleotídica de seis genes *housekeeping*, de los genes que codifican para las subunidades de rRNA 16S y 23S y de la región espaciadora ubicada entre ambos genes (ITS). A su vez, también se encontró que *M. bovoculi* podía ser diferenciada bioquímicamente de *M. bovis* en base a la actividad fenilalanina desaminasa positiva y a la incapacidad de expresar gelatinasa (Angelos *et al.*, 2007). No obstante, recientemente se identificaron aislamientos cuya secuencia de ADN presentaban alta homología con *M. bovoculi*, pero que resultaron fenilalanina desaminasa negativos (Angelos & Ball, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar tanto fenotípica como genotípicamente agentes bacterianos vinculados a la etiología de la QIB en Uruguay.

Materiales y Métodos

Colección de aislamientos. Se analizó una colección de 27 aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos de

QIB ocurridos en distintas zonas geográficas de nuestro país.

Caracterización fenotípica. Inicialmente se realizó una caracterización macroscópica (forma, borde, color y tamaño de la colonia) y microscópica (características tintoriales, forma bacteriana y patrón de agrupación celular). Posteriormente, los aislamientos se caracterizaron de acuerdo a propiedades bioquímicas de acuerdo a una amplia variedad de pruebas incluyendo movilidad bacteriana, producción de oxidasas y catalasas que son enzimas vinculadas con la respiración, la producción de ácido o ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa (TSI), la desaminación del triptofano y de la fenilalanina para formar indol y ácido fenilpirúvico, respectivamente, la producción de ureasa y consiguiente hidrólisis de la urea, la fermentación de lactosa y de exoenzimas tal como gelatinasa y hemolisina.

Identificación molecular. La confirmación de la identidad bacteriana se llevó a cabo por secuenciación del gen completo rDNA 16S amplificado por PCR usando *primers* bacterianos universales (11f y 1492r) y por secuenciación de un segmento de la subunidad del 16S y el 23S del ARN ribosomal y el ITS con los *primers* MorNeissDn5 y MorRRL1R (Angelos *et al.*, 2007). Posteriormente las secuencias obtenidas se compararon con las publicadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology* (NCBI) por medio de la herramienta informática BLASTn para determinar la identidad de los aislamientos.

Resultados y Conclusión

La caracterización macroscópica demostró que todos los aislamientos crecían en agar sangre formando colonias circulares, grisáceas-blancuzcas, lisas o rugosas, de aproximadamente 1 a 3 mm, de consistencia friable y presentando una zona de hidrólisis de agar (b-hemólisis) a su alrededor. Por otro lado, la caracterización microscópica indicó que los aislamientos pertenecieron al grupo de bacterias Gram negativas, su morfología varió de cocos a cocobacilos y bacilos y usualmente se encontraron de a pares o en cortas cadenas. Finalmente, la caracterización bioquímica reveló que ninguno de los aislamientos presentó movilidad, produjo ácido y/o gas, desaminó el triptófano y la fenilalanina, fermentó la lactosa y tampoco hidrolizó la urea. Con respecto a la producción de oxidasa y catalasa se observó que expresión de estas enzimas en todos los casos con la excepción de dos aislamientos. Por último, con respecto a la producción de gelatinasa, sólo tres de los aislamientos resultaron incapaces de licuar la gelatina, a diferencia del resto.

Por otro lado, la secuenciación del rDNA 16S permitió observar que los aislamientos presentaban una alta homología (97-99%) con secuencias publicadas del rDNA 16S de *M. bovis* (13 aislamientos) y *M. bovoculi* (14 aislamientos). Estos datos nos permitieron constatar por primera vez la



presencia tanto de *M. bovis* como de *M. bovoculi* en aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos de casos de QIB en Uruguay.

Finalmente, con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos con respecto a la homología de las secuencias del rDNA 16S de *M. bovoculi*, se amplificó el gen que codifica para la subunidad rDNA 23S y el espaciador intergénico (ITS). Las secuencias obtenidas en esta etapa confirmaron la alta homología de las secuencias de la colección de cepas con otras publicadas de *M. bovoculi*.

En este trabajo se describe la primera detección de cepas de *M. bovoculi* vinculadas a casos clínicos de QIB en nuestro país. Este conjunto de cepas fue aislado en diversas localizaciones geográficas de Uruguay, incluyendo los departamentos de Artigas, Salto, Soriano, Cerro Largo, Treinta y Tres, Flores, San José, Tacuarembó y Canelones.

Estos resultados contribuirán con la comprensión de diversos aspectos vinculados a la etiología y la patogenia de la QIB así como con el diseño de estrategias dirigidas a su prevención.

Summary

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is the most common ocular disease of cattle and is a serious health problem with a severe economic impact. So far it had been considered that the etiologic agent responsible of IBK was *Moraxella bovis*. However, *Moraxella bovoculi* has been

proposed as a recently characterized *Moraxella* isolated from ulcerated eyes of calves with IBK, that could be differentiated from *M. bovis* as well as other moraxellaceae isolated from animals. In this paper a collection of isolates obtained from cases of IBK in Uruguay was thoroughly characterized. The results obtained in the present study led to identify for the first time the presence of *M. bovoculi* associated with cases of IBK in Uruguay.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Programa Jóvenes en el Sector Productivo (DICYT, MEC) y Laboratorios Santa Elena.

Los autores agradecen la colaboración de los profesionales del Sector de Bacteriología de Laboratorios Santa Elena, Drs. Eduardo Durán y Milton Cattaneo.

Bibliografía

Angelos JA, Spinks PQ, Ball LM, George LW. 2007. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:789-95.

Angelos JA, Ball LM. 2007. J. Vet. Diagn. Invest. 19(5):532-4.

Baptista PJ. 1979. Br. Vet. J. 135:225-242.