

## Diversidad molecular evaluada por RAPD-PCR y BOX-PCR de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos a partir de 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 una severa enfermedad ocular que afecta a bovinos de diversas categorías y es de gran relevancia en nuestro país. La principal medida de prevención de la QIB es la vacunación. Sin embargo, existe una gran diversidad antigénica así como mecanismos de variación de fase, lo que lleva a que el análisis de la diversidad de cepas circulantes sea necesaria para un exitoso programa inmunoproláctico. En este trabajo se evaluó la diversidad molecular por medio de RAPD-PCR y BOX-PCR empleando una colección de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos de casos de QIB en nuestro país.

Estas técnicas permitieron establecer la existencia de distintos genotipos correspondientes a cepas de *Moraxella* spp. causantes de QIB en Uruguay. Es importante señalar que incluso se observaron diferentes patrones de bandas correspondientes a distintos aislamientos recuperados de un mismo brote de la enfermedad. Los resultados obtenidos indican que estas técnicas son útiles para analizar la diversidad molecular de *Moraxella* spp. y contribuir de esta forma con el diseño de estrategias de prevención eficaces para el control de la enfermedad.

### Introducción y Objetivos

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una frecuente y severa enfermedad ocular que afecta a diversas categorías de bovinos (Baptista, 1979). Tradicionalmente se ha considerado que su principal agente etiológico es la bacteria Gram negativa *Moraxella bovis*. Sin embargo, recientemente fue descrita una nueva especie bacteriana, *Moraxella bovoculi*, que también sería responsable de la patología (Angelos *et al.*, 2007). Esta enfermedad está distribuida mundialmente y constituye un grave problema económico y sanitario que afecta a la producción bovina en nuestro país.

La principal medida de prevención de la QIB, como en el caso de otras enfermedades infecciosas animales, es la vacunación. Las vacunas más frecuentemente empleadas en nuestro país están formuladas en base a bacterias inactivadas (bacterinas) conteniendo cepas fuertemente fimbriadas. Las fimbrias son organelos bacterianos de superficie vinculados a la adhesión a las células epiteliales del hospedero y constituyen importantes factores de virulencia así como potentes inmunógenos. Sin embargo, existe una gran diversidad antigénica fimbrial (Lepper y Hermans, 1986) así como mecanismos de variación de fase por medio del cual la bacteria modifica la expresión de antígenos de superficie. En consecuencia, el análisis de la diversidad de las cepas nativas de *Moraxella* spp. es un requisito para un exitoso programa inmunoproláctico debido a que la protección está estrechamente relacionada

con la cepa responsables de los brotes. A pesar de que la QIB causa serias pérdidas económicas en Uruguay, existen pocos datos disponibles acerca de la diversidad de cepas en el país.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la diversidad genética por medio de RAPD-PCR y BOX-PCR de aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos de casos de QIB en nuestro país.

### Materiales y Métodos

Se empleó una colección de 36 aislamientos de *Moraxella* spp. generada entre los años 1983 y 2008, provenientes de diversas localizaciones geográficas del país.

Como primer paso se confirmó la identidad bacteriana de los aislamientos por medio de la secuenciación del gen que codifica para el rRNA 16S amplificado por PCR usando *primers* bacterianos universales (11f y 1492r) y la comparación de las secuencias obtenidas con las publicadas en la base de datos de secuencias del *National Center for Biotechnology* (NCBI).

El estudio de diversidad genética se realizó mediante RAPD-PCR y BOX-PCR. Estas son técnicas rápidas basadas en la amplificación de segmentos de ADN genómico de diverso tamaño por PCR y que permiten discriminar entre microorganismos cercanamente relacionados sobre la base de pequeñas diferencias en el ADN (Johnsen y Nielsen, 1999). RAPD-PCR se realizó utilizando diferentes *primers* (JWP1, JWOPA7, JWOPA12 y JWOPA17) y para BOX-PCR se empleó el *primer* BOXA1R. Para la amplificación se empleó ADN genómico de los diferentes aislamientos y los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio.

### Resultados y Conclusión

Los resultados de la secuenciación del rDNA 16S permitieron corroborar que los aislamientos correspondían al género *Moraxella*, exhibiendo alta homología con las especies *M. bovis* y *M. bovoculi*.

En el estudio de diversidad molecular de los aislamientos llevada a cabo por RAPD-PCR empleando los *primers* JWP1, JWOPA7, JWOPA12 y JWOPA17 se obtuvo una alta heterogeneidad de patrones de bandas que corresponderían a diferentes genotipos. Es interesante señalar que incluso se detectaron distintos genotipos correspondientes a aislamientos recuperados de casos de un mismo brote.

En cambio, cuando la diversidad genética se evaluó por BOX-PCR, se pudieron observar tres patrones de bandas en los que se agruparían los diferentes genotipos. También en esta caso se observaron diferentes patrones de bandas correspondientes a distintos aislamientos recuperados de un mismo brote.



Estas técnicas de evaluación de diversidad genética permitieron establecer la existencia de distintos genotipos correspondientes a cepas de *Moraxella* spp. causantes de QIB en nuestro país. Si bien ambas técnicas difirieron en la heterogeneidad de genotipos en los cuales se agruparían los aislamientos nativos de *Moraxella* spp., en ninguno de los casos fue posible correlacionar los patrones de banda con zonas geográficas ni fecha de aislamiento.

Si bien hasta el momento no fue posible establecer relaciones entre los aislamientos y sus características epidemiológicas, los resultados obtenidos indican que estas técnicas son capaces de discriminar diferencias genéticas entre los mismos, analizar la diversidad molecular de *Moraxella* spp. y contribuir de esta forma con el diseño de estrategias de prevención eficaces para el control de la enfermedad. Por otra parte, los resultados obtenidos ratifican la necesidad de realizar monitoreos periódicos para evaluar la situación epidemiológica de la QIB en nuestro país.

---

### Summary

---

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is a frequent and severe ocular disease that affects cattle. The main preventive measure of the IBK is vaccination. However, there is a great antigenic diversity and phase variation that make the analysis of the diversity of circulating strains a prerequisite for a successful prophylactic program. In this study, the molecular diversity of native *Moraxella* spp. isolates was

assessed by RAPD-PCR and PCR-BOX.

Different bands patterns were obtained by both techniques corresponding to *Moraxella* spp. diverse genotypes. Even different strains recovered in a same outbreak exhibited diverse band patterns. These approaches were useful to determine the presence of different genotypes of native *Moraxella* spp. and can contribute to the elucidation of different aspects of the IBK epidemiology in our country.

---

### 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.

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

Johnsen K, Nielsen P. 1999. Microbiol. Lett. 173:155-162.

Lepper AWD, Hermans LR. 1986. Aust. Vet. J. 63: 401-405.