



DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *M. BOVIS* Y *M. BOVOCULI* EN LA QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA EN URUGUAY

Ana Umpiérrez^a, Sofía Acquistapace^{a,b}, Vanessa Sosa^a,
Patricia Acuña^b, Eduardo Reolón^b, Pablo Zunino^a

^a Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Avenida Italia, 3318. CP: 11600. Montevideo, Uruguay.

^b Departamento de Investigación y Desarrollo. Laboratorios Santa Elena-VIRBAC SA.

Avenida Millán 4175. CP: 12900. Montevideo, Uruguay.

SUMMARY

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is a severe ocular disease that affects cattle and has a significant economic impact. IBK is produced by strains that belong to the genus *Moraxella*: *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi*. Several measures have been performed for the prevention and treatment of the disease. Molecular characterization and genetic diversity between strains is a major challenge for the design of vaccines, most of them so far based on chemically inactivated bacterins. The analysis of local transmitted *Moraxella* spp. clinical strains is crucial for a successful prophylactic program. The main goal of this work was to genetically characterize a group of isolates collected from clinical sources during IBK outbreaks in Uruguay.

RESUMEN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad ocular grave que afecta al ganado y tiene un impacto económico significativo en el mundo. La QIB es producida principalmente por cepas que pertenecen al género *Moraxella*: *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*. En la actualidad, varias estrategias se han generado para la prevención y el tratamiento de la enfermedad, entre ellas el desarrollo de vacunas. La caracterización molecular y los análisis de diversidad genética de las cepas es un reto importante para el diseño de dichas vacunas, ya que la mayoría de ellas son basadas en bacterina inactivada químicamente. El análisis de las cepas clínicas de *Moraxella* spp. localmente transmitidas es un requisito previo para un programa profiláctico exitoso.

INTRODUCCIÓN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una severa enfermedad ocular altamente contagiosa que afecta al ganado bovino en todas sus categorías (Punch, 1985; McConnel et al., 2007). Es raramente fatal, pero las pérdidas económicas asociadas a la reducción de la producción de leche, tratamientos costosos y mayor demanda de mano de obra, son ampliamente conocidas en todo el mundo (Thrift et al., 1974; Slatter et al., 1982). La QIB está ampliamente presente en Uruguay y aunque no existen registros precisos, las pérdidas económicas son significativas.

Los agentes etiológicos más comúnmente asociados a la QIB son *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*. Ambos, cocobacilos Gram negativos, pertenecen al género *Moraxella* y pueden encontrarse formando parte de la microbiota de la conjuntiva y en secreciones nasales (Pugh et al., 1986). Por esta razón, son considerados patógenos oportunistas. En particular, reportes previos han confirmado la presencia de estas especies en casos clínicos de QIB en Uruguay (Sosa et al., 2012).

Una estrategia para la prevención de casos de QIB es la vacunación. Por lo tanto, la identificación y caracterización de antígenos protectores es crucial para el desarrollo de programas profilácticos efectivos.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar genéticamente un grupo de aislamientos obtenidos de fuentes clínicas durante los brotes IBK en Uruguay.

En este trabajo se utilizó una colección de aislamientos clínicos de *Moraxella* spp., obtenidos entre los años 1983 y 2009 en diferentes departamentos de Uruguay.

Se seleccionaron 7 genes que codifican factores de virulencia de *Moraxella* spp., los cuales fueron amplificados parcialmente con primers específicos por PCR a tiempo final (Angelos et al., 2007; Acquistapace, 2014; Sosa et al., 2015). El criterio de selección de dichos genes se basó en que pudieran ser genes conservados y por consiguiente, pudieran estar presentes en todas las cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. bovoculi*. Los genes seleccionados incluyeron *tolC* (proteína de membrana externa (PME)), *omp79* (PME, involucrada en adquisición de hierro), *fur* (proteína de adquisición de hierro), *plb* (lipasa/fosfolipasa), *mbxA* (citotoxina), *pme-CD* (PME) y *fim-I* (subunidad fimbrial) de *M. bovis*.

Debido a que la secuencia del genoma de *M. bovoculi* está siendo anotada, y que se contaba en la bibliografía con secuencias para estos genes seleccionados en *M. bovis*, se utilizaron secuencias de este último patógeno para el diseño de primers.

RESULTADOS

Los análisis de PCR demostraron la presencia de todos los genes de virulencia evaluados en la colección de aislamientos clínicos de QIB. Los genes fueron mayormente amplificados en las cepas de *M. bovis*, mientras que *mbxA* y *pme-CD* amplificaron tanto en cepas de *M. bovis* como de *M. bovoculi*. Estas observaciones podrían deberse a que los primers fueron diseñados a partir de secuencias disponibles de *M. bovis*, y demuestran claras diferencias entre las especies en el caso de los genes *omp79*, *plb*, *tolC*, *fim-I* y *fur*. Por el contrario, y teniendo en cuenta las mismas consideraciones anteriores, *mbxA* y *pme-CD* serían genes más conservados entre ambas especies. Por otra parte, cuando se analizó la diversidad genética del gen *mbxA*, las secuencias nucleotídicas y traducidas analizadas se agruparon de acuerdo a la especie a la cual pertenecían.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo sugieren la ocurrencia de diferencias patogénicas entre las especies de *Moraxella*, respecto a la presencia de los genes de virulencia *omp79*, *plb*, *tolC* y *fim-I*.

En particular, los resultados de amplificación del gen *fim-I* concuerdan con lo planteado por Calcutt y colaboradoras en el artículo publicado recientemente (Calcutt et al., 2014) con la secuenciación del genoma de *M. bovoculi* BAA1259. En dicho artículo se expone que *M. bovoculi* presenta un tipo de fimbria (tipo IV) que carece del mecanismo de cambio de fase a diferencia de *M. bovis* con la fimbria Q y la fimbria I, lo que explicaría las diferencias de amplificación observadas en nuestra colección. Las fimbrias tienen un rol fundamental en la adhesión del patógeno al epitelio corneal, favoreciendo el proceso infectivo (Postma et al., 2008) y por ello pueden ser consideradas importantes blanco para vacunas. Asimismo, y teniendo en cuenta su amplia variabilidad, sería interesante complementar su uso con otros antígenos más conservados en el género *Moraxella*.

Para avanzar hacia la prevención y tratamiento de la QIB es importante definir la distribución y la variabilidad genómica de los potenciales factores de virulencia presentes en *M. bovis* y *M. bovoculi*. Las diferencias genotípicas observadas en nuestra colección resaltan la importancia de continuar evaluando las cepas localmente transmitidas para el desarrollo de vacunas efectivas. En particular, la secuenciación de los genomas de *M. bovis* y *M. bovoculi* permitirá comprender mejor la diversidad genética observada entre ambas especies causantes de QIB.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquistapace S (2014). Proteínas de membrana externa de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* como componentes de vacunas contra la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. Tesina de Grado en Bioquímica de la UdelaR. Tutor: Pablo Zunino.
- Angelos JA, Ball LM, Hess JF (2007b) Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet Microbiol.* 125:73-79.
- Calcutt MJ, Foecking MF, Martin NT, Mhlanga-Mutangadura T, Reilly TJ (2014) Draft Genome Sequence of *Moraxella bovoculi* Strain 237T (ATCC BAA-1259T) isolated from a calf with Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Genome Announc* 26: 1-2.
- McConnel CS, Shum L, House JK (2007) Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. *Aust Vet J* 85: 65-69.
- Thrift FA, Overfield JR (1974) Impact of pinkeye (infectious bovine keratoconjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. *J Anim Sci* 38: 1179-1184.
- Pugh GW, McDonald TJ (1986) Identification





of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res.* 47:2343-2345.

▪ Punch N (1985) Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res Vet Sci.* 39:179-187.

▪ Slatter DH, Edwards ME, Hawkins CD, Wilcox GE (1982) A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Aust Vet J* 59: 65-68.

▪ Sosa V, Zunino P (2012) Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated to infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet J* 193: 595-597.

▪ Sosa V, Umpiérrez A, Acquistapace S, Zunino P (2015) Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from Infectious Bovine Keratoconjunctivitis cases. *J Infect Dev Ctries.* Aceptado.

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MANNHEIMIA HAEMOLYTICA PARA LA FORMULACIÓN DE VACUNAS ALTAMENTE EFECTIVAS CONTRA EL SÍNDROME RESPIRATORIO BOVINO

Paula Tucci, Verónica Estevez¹, Lorena Becco¹, Florencia Cabrera, Germán Grotiuz, Mónica Marin², Eduardo Reolon³

¹ División Biotecnología de Laboratorios Celsius S.A. Avenida Italia 6201, Montevideo, Uruguay. - ² Bioquímica, Facultad de Ciencias (UDELAR). Igua 4225, Montevideo, Uruguay. - ³ Santa Elena - Virbac. Avda. Millán 4175, Montevideo, Uruguay.

Este proyecto es financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (ALI_2_2013_1_4783) y por Santa Elena - Virbac.

RESUMEN

El complejo respiratorio bovino, es una afección importante y costosa que afecta a los sistemas de producción de bovinos de carne en Uruguay. Debido a sus causas multifactoriales ha sido difícil desarrollar estrategias eficaces para su control. Las vacunas que se comercializan actualmente para esta enfermedad en nuestro país se basan en cultivos inactivados de los principales patógenos virales y bacterianos asociados con el complejo. Se identificaron los principales componentes antigénicos de *Mannheimia haemolytica*, la principal causa bacteriana de esta patología, centrándose en Leucotoxina A, su principal factor de virulencia. Se verificó la presencia de esta toxina en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* así como otras diez proteínas por espectrometría de masas, algunas de las cuales son los principales antígenos protectores.

SUMMARY

Bovine Respiratory Disease is an important and costly disease that affects beef cattle industry in Uruguay. Effective control strategies have been difficult to develop due to its multifactorial causes. The vaccines currently marketed for this disease are based on inactivated cultures of the main viral and bacterial pathogens involved

in this disease. In order to characterize these vaccines we aimed to identify the main antigenic components of *Mannheimia haemolytica*, the leading cause of Bovine Respiratory Disease, focusing on Leukotoxin A, its main virulence factor. We verified the presence of Leukotoxin A in *Mannheimia haemolytica* culture supernatants as well as we identified, by mass spectrometry, other ten proteins, some of which are major protective antigens.

INTRODUCCIÓN

El Complejo Respiratorio Bovino (CRB) constituye una de las principales patologías que afectan al ganado bovino y causa importantes pérdidas económicas en la producción en nuestro país. Se desarrolla por la existencia de factores de predisposición (estrés, transporte, cambios en la alimentación, entre otros), que desencadenan, generalmente, una infección viral primaria. Esto facilita el establecimiento de una infección bacteriana secundaria, la que es causa de las elevadas tasas de morbi-mortalidad asociadas al CRB. *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) es reconocida como el principal agente etiológico de esta enfermedad, causante de más de un 50% de la mortalidad asociada (1).

Al tratarse de una enfermedad multifactorial ha resultado difícil el desarrollo de estrategias de control efectivas. Para mejorar la eficacia de las