

## EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Moraxella* spp. Y QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA EN URUGUAY

Sosa, Vanessa<sup>1</sup>; Cattaneo, Milton<sup>2</sup>; Durán, Eduardo<sup>2</sup>; Zunino, Pablo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, IIBCE. Avda. Italia 3318, Uruguay

<sup>2</sup>Sector Bacteriología, Laboratorios Santa Elena. Avda. Millán 4175, Uruguay

### Resumen

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una severa enfermedad ocular que afecta a bovinos y tiene gran relevancia en nuestro país. El análisis de la diversidad de cepas de *Moraxella* spp, el agente etiológico de la enfermedad, es necesario para un exitoso programa inmunoproláctico. En este trabajo se evaluó la diversidad molecular por medio de ERIC-PCR y BOX-PCR de una colección de aislamientos clínicos nativos de *Moraxella* spp. obtenidos de casos de QIB. Corroboramos que *Moraxella* spp. presenta una amplia heterogeneidad genética y que no se pudieron establecer correlaciones con el origen geográfico o las fechas de los aislamientos. Sin embargo se observó que la técnica ERIC-PCR permitió establecer agrupamientos de aislamientos en relación a la especie (*M. bovis* y *M. bovoculi*).

### Introducción y Objetivos

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una severa y frecuente enfermedad ocular que afecta a bovinos (1). La enfermedad, causada por *Moraxella* spp., está ampliamente distribuida en el mundo y genera cuantiosas pérdidas económicas al sector productivo y ganadero. Entre las medidas de control más eficientes y comúnmente empleadas se encuentra la vacunación. Sin embargo, la gran diversidad antigénica lleva a que el análisis de la diversidad de cepas clínicas locales de *Moraxella* spp. sea

un requisito para un exitoso programa inmunoproláctico ya que la protección está estrechamente relacionada con las cepas responsables de los casos (2).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la diversidad genética por medio de ERIC-PCR y BOX-PCR de una amplia colección de aislamientos de *Moraxella* spp. recuperados de casos de QIB en nuestro país.

### Materiales y Métodos

Se empleó una colección de 44 aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos a partir de casos clínicos de QIB ocurridos en diferentes zonas geográficas de Uruguay y entre los años 1983 y 2008.

La identidad bacteriana se determinó por medio de la secuenciación del gen que codifica para el rRNA 16S amplificado por PCR usando *primers* bacterianos universales (27f 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 ERIC-PCR y BOX-PCR. Estas técnicas son rápidas, reproducibles y permiten discriminar entre microorganismos cercanamente relacionados en base a pequeñas diferencias en el ADN (3). ERIC-PCR se realizó utilizando los *primers* ERIC-1R y ERIC-2 y para BOX-PCR se empleó el *primer* BOXA1R. A partir de los patrones de bandas se construyó una matriz binomial de 0 (ausencia) y 1 (presencia) y se realizó un análisis estadístico en el programa Statistical usando distancia Euclidiana.

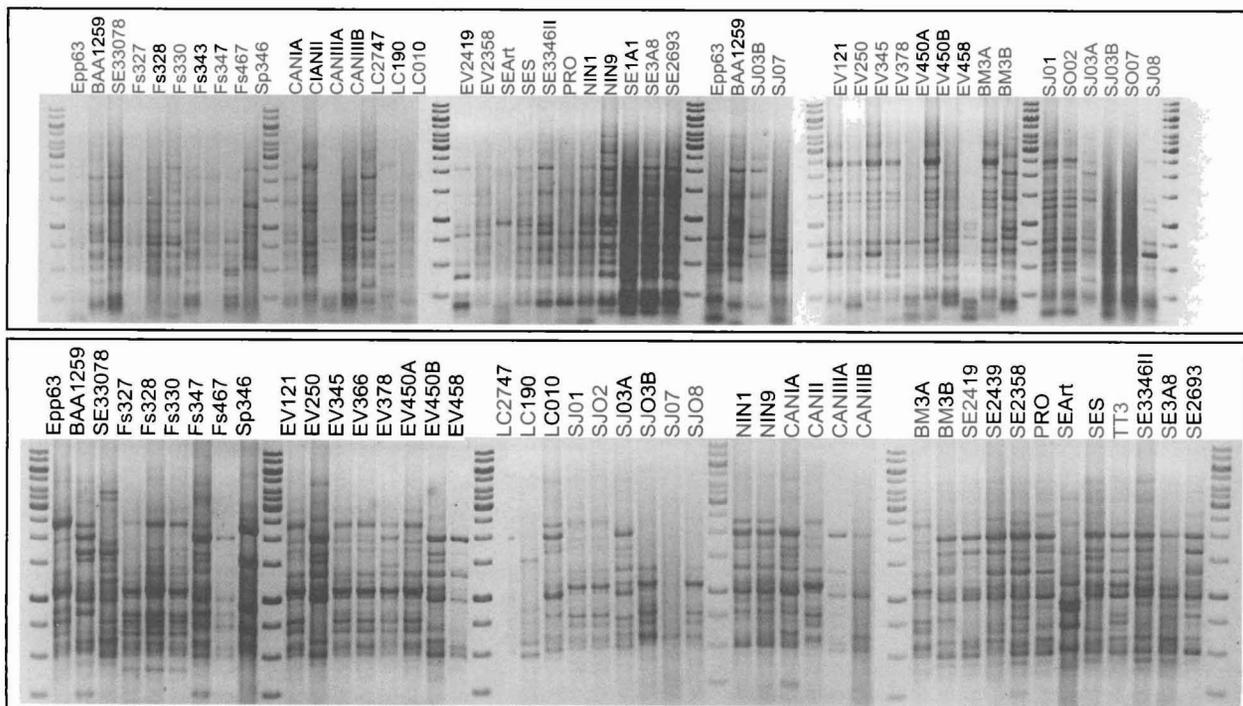


Figura 1. Patrones de bandas obtenidos usando la técnica de ERIC-PCR (figura superior) y BOX-PCR (figura inferior).



**Resultados y Discusión**

A partir de los resultados de la secuenciación del rDNA 16S se corroboró que los aislamientos correspondían al género *Moraxella*, exhibiendo 21 de ellos alta homología con *Moraxella bovis* y 23 de ellos con *Moraxella bovoculi*. No se observó correlación entre la presencia de ambas especies con la zona geográfica ni con la fecha de obtención. Hasta el momento no se han obtenido aislamientos correspondientes a *Moraxella ovis*, un patógeno también descrito como asociado a casos de QIB.

Los perfiles de bandas obtenidos usando las técnicas de ERIC-PCR y BOX-PCR correspondientes a los diferentes aislamientos de *Moraxella* spp. se presentan en la Figura 1.

En el estudio de diversidad molecular de los aislamientos llevada a cabo por ERIC-PCR y BOX-PCR se obtuvieron diferentes patrones que fueron de 3 a 17 y de 1 a 17 bandas respectivamente.

El elevado número de patrones de bandas obtenidos por ERIC-PCR y BOX-PCR indican que existe una elevada heterogeneidad genética entre las cepas de *Moraxella* spp. circulantes en nuestro país (Figura 1).

En base al análisis de los patrones de bandas se construyeron los dendogramas, representaciones gráficas que ayudan a interpretar los patrones de bandas (Figura 2).

Los resultados obtenidos con las técnicas de ERIC y BOX-PCR no permitieron correlacionar los diferentes patrones de banda con zonas geográficas ni fecha de aislamiento. El dendograma generado a partir de la utilización de BOX-PCR tampoco permitió agrupar los diferentes patrones de bandas de acuerdo a las diferentes especies de *Moraxella* spp. involucradas en los casos de QIB. Sin embargo la técnica de ERIC-PCR permitió obtener dos conglomerados de patrones de bandas formados únicamente por aislamientos de *M. bovoculi* y otros dos integrados por aislamientos de *M. bovis*. En consecuencia, estos resultados indican una correlación entre los patrones de bandas obtenidos por ERIC-PCR y las dos especies consideradas de *Moraxella* spp.

**Conclusiones**

Se puede afirmar que las cepas clínicas de *Moraxella* spp. en nuestro medio presentan una elevada heterogeneidad genética, probablemente asociada a la facilidad de intercambio o rearrreglo genéticos de estas bacterias. Sin embargo, la técnica de ERIC-PCR parece ser la más promisoría hasta el momento, para estudios de epidemiología molecular en *Moraxella* spp. causantes de QIB en el país (4). Estos resultados ratifican la necesidad de realizar monitoreos para evaluar la situación en forma periódica y optimizar las estrategias de elaboración de vacunas e inmunización contra la QIB.

**Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y Laboratorios Santa Elena.

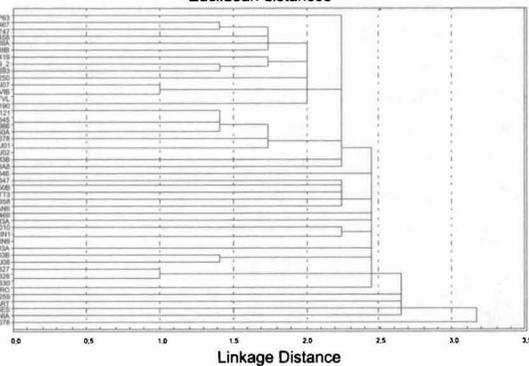
**Summary**

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is a severe ocular disease that affects cattle. The analysis of the diversity of clinical strains of *Moraxella* spp, the etiological agent responsible of IBK, is a prerequisite for a successful prophylactic program. In this study, the molecular diversity of native *Moraxella* spp. isolates was assessed by ERIC-PCR and PCR-BOX. Different bands patterns were obtained by both techniques corresponding to *Moraxella* spp. diverse genotypes. *Moraxella* spp. strains exhibited a marked genetic heterogeneity. However, it could be observed that ERIC-PCR allowed the grouping of *M. bovis* and *M. bovoculi* isolates.

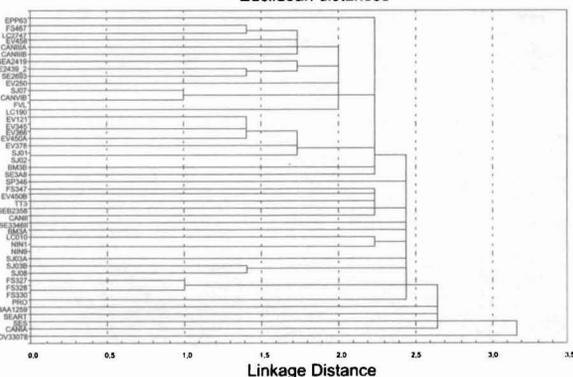
**Bibliografía**

1. Baptista PJ. 1979. Br. Vet. J. 135:225-242.
2. Lepper AWD, Hermans LR. 1986. Aust. Vet. J. 63: 401-405.
3. Johnsen K, Nielsen P. 1999. Microbiol. Lett. 173:155-162.
4. Sosa V, Zunino P. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. 2008.

BOX-PCR aislamientos *Moraxella* spp.  
Single Linkage  
Euclidean distances



BOX-PCR aislamientos *Moraxella* spp.  
Single Linkage  
Euclidean distances



**Figura 2.** Dendogramas obtenidos a partir del análisis de bandas de BOX-PCR (figura izquierda) y ERIC-PCR (figura derecha).