

Protocolo estándar para tipificar *Pasteurella multocida* mediante electroforesis de campos pulsantes en minigeles

Standard protocol for typing *Pasteurella multocida* by pulsed field electrophoresis in minigels

Heidi Quintero Alvarez^a (0000-0002-3815-7885)

Karen León Arcia^{a,*} (0000-0001-5143-1642)

^a Centro de Neurociencias de Cuba.

* kla@cneuro.edu.cu

Recibido: 26 de octubre de 2021;

Aceptado: 25 de enero de 2022;

RESUMEN

Pasteurella multocida es una bacteria bacilar, Gram negativa, causante de enfermedades del tracto respiratorio superior de animales de cría intensiva, lo que provoca grandes pérdidas económicas a nivel mundial. La Electroforesis de Campo Pulsante (ECP) es la técnica "estándar de oro" para la tipificación molecular de las cepas involucradas en brotes epidemiológicos. Sin embargo, no se ha reportado un protocolo estándar rápido para la tipificación de *P. multocida*. En el presente trabajo se estandarizaron los parámetros de Tiempo de Pulso y Cantidad de Pulso para separar los fragmentos de restricción del genoma de *P. multocida* en las minicámaras del Sistema Guefast06. Los patrones de bandas se obtuvieron luego de 5h de electroforesis, en contraste con las 20-40h reportadas previamente. Estos patrones obtenidos con el Guefast06 fueron comparables a los reportados en la literatura porque se logró isoresolución de las bandas de ADN. Además, se determinó que diferentes cepas de *P. multocida* se pueden discriminar cuando se usan tanto la enzima Apa I como Asc I para generar dichos patrones de bandas. Estas condiciones experimentales pudieran ser ventajosas para la investigación de brotes infecciosos pues permitirían a los expertos la toma de decisiones oportunas en menor tiempo.

Palabras claves: Electroforesis de Campos Pulsantes, CHEF, Guefast, *Pasteurella multocida*.

ABSTRACT

Pasteurella multocida is a Gram-negative, bacillary bacterium that causes diseases of the upper respiratory tract in intensively farmed animals, causing great economic losses worldwide. Pulsed Field Electrophoresis (PFE) is the "gold standard" technique for molecular typing of strains involved in epidemiological outbreaks. However, a rapid standard protocol for typing *P. multocida* has not been reported. In the present work, the Pulse Time and Pulse Quantity parameters were standardized to separate the restriction fragments of the *P. multocida* genome in the minichambers of the Guefast06 System. Band patterns were obtained after 5h of electrophoresis, in contrast to 20-40h previously reported. These patterns obtained with Guefast06 were comparable to those reported in the literature because isoresolution of the DNA bands was achieved. Furthermore, it was determined that different strains of *P. multocida* can be discriminated when both the enzyme Apa I and Asc I are used to generate such band patterns. These experimental conditions could be advantageous for the investigation of infectious outbreaks since they would allow experts to make timely decisions in less time.

Keywords: Pulsed Field Electrophoresis, CHEF, Guefast, *Pasteurella multocida*.

INTRODUCCIÓN

Pasteurella multocida es una bacteria bacilar, Gram negativa, oxidasa positiva, no motil, no formadora de endospora, y anaerobia facultativa. Se divide en tres subespecies fundamentales: *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *gallicida*, y *P. multocida* subsp. *septica* basado fundamentalmente en su capacidad de fermentar azúcares como dulcitol y sorbitol (Mutters *et al.*, 1985; Orynbayev *et al.*, 2019). Este género bacteriano tiene un amplio rango hospedero que va desde mamíferos como conejos y ganado bobino y porcino hasta aves y reptiles (Pedersen *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2001). *Pasteurella multocida* se considera un patógeno oportunista o secundario y puede encontrarse en el tracto respiratorio superior de animales tanto sanos como enfermos (Stahel *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2019). Hasta la fecha, se han reportado grandes pérdidas económicas debido a infecciones provocadas por esta bacteria en animales de cría. Es el microorganismo patógeno que con más frecuencia se aísla de conejos, y su prevalencia ha sido reportada entre el 7% y cerca del 100% en las infecciones del tracto respiratorio superior de estos animales (Stahel *et al.*, 2009; Jaglic *et al.*, 2006). *P. multocida* es igualmente causante de infecciones en humanos (Liu *et al.*, 2003; Holst *et al.*, 1992). Estas, en la mayoría de los casos, están directamente relacionadas con mordeduras de mascotas o inhalaciones de la bacteria, provocando neumonía o dermatitis (Holst *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2019).

Debido a la alta prevalencia y gravedad de las infecciones provocadas por esta bacteria en algunos animales, muchos han sido los trabajos encaminados a la caracterización de este microorganismo (Boyce *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2019). La técnica de Electroforesis de Campo Pulsante (ECP), se considera el “estándar de oro” para el estudio molecular de *P. multocida* (Goering, 1993; García, 2010; Deng *et al.*, 2015). Diversos autores han analizado brotes de pasteurelisis tanto en animales como en humanos utilizando esta técnica (Pedersen *et al.*, 2003; Lainson *et al.*, 2002; Kędrak *et al.*, 2007). Aunque presenta ciertas ventajas sobre otros métodos de tipificación molecular, es una técnica que requiere tiempo, personal calificado y gran cantidad de reactivos de laboratorio. La extracción del ADN cromosomal de *P. multocida* toma al menos 20h de trabajo y la separación posterior de los fragmentos de ADN, resultado de la digestión con enzimas de restricción, toma de 20-40h de electroforesis (Gunawardana *et al.*, 2000; Ivana *et al.*, 2010; Kehrenberg *et al.*, 2001). En total, el procedimiento de obtención de la huella digital molecular de este microorganismo requiere entre 40-60h de trabajo.

Si se utiliza el sistema de ECP miniatura Guefast06 (Neuronic, SA; Cuba; Sánchez-Enamorado *et al.*, 2015) el tiempo de electroforesis puede reducirse a 5-7 horas. Este permite obtener resoluciones entre las moléculas de ADN que, una vez estandarizados, son similares a los que se obtienen con los sistemas convencionales (Lopez-Canovas *et al.*, 2009, 2006, 2003). Hasta el momento no se ha reportado un protocolo estándar de ECP en minicámaras que garantice la obtención de patrones de bandas de *P. multocida* comparables a los reportados en la literatura, obtenidos en los sistemas convencionales de ECP.

Tampoco se han llevado a cabo estudios que involucren la selección de la enzima de restricción más efectiva para la discriminación entre los patrones de banda de cepas de *P. multocida* relacionadas entre sí. Este es uno de los parámetros claves en el éxito de los procedimientos de tipificación molecular mediante ECP (Goering, 2010), lo cual sería importante desde el punto de vista epidemiológico, para el análisis de brotes infecciosos provocados por esta bacteria. La obtención de patrones con isoresolución entre los sistemas de ECP convencional y el miniaturizado y la selección de la enzima de restricción que favorezca la discriminación entre patrones de bandas usualmente se realizan mediante ensayos de prueba y error. Esto implica un gasto excesivo de reactivos y enzimas que encarecen el proceso. Los programas computacionales PFGE Simulator (Plasencia *et al.*, 2013) y GuefastScan (Santos *et al.*, 2013), incluidos en el Sistema de ECP Guefast06 (Neuronic SA, Cuba) facilitan el diseño y análisis experimental, a la vez que garantizan el ahorro de reactivos y tiempo en el laboratorio.

Los objetivos del presente trabajo fueron obtener un protocolo estándar para la tipificación de *P. multocida* y determinar las enzimas de restricción que permiten la mejor discriminación entre las diferentes cepas de esta bacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los parámetros de electroforesis tiempos de pulso (tp) y cantidad de pulsos (Np)

El diseño de las condiciones de tiempos de pulso (tp) y cantidad de pulsos (Np) para obtener patrones de bandas del ADN de *P. multocida* en el sistema Guefast06 (Neuronic SA, Cuba) se realizó *in silico* con las herramientas del software PFGE Simulator (Plasencia *et al.*, 2013). El programa, mediante ecuaciones de migración de fragmentos de ADN lineal, predice la posición de cada una de las bandas en un gel virtual (López-Canovas *et al.*, 1998; Riverón *et al.*, 2008; Riverón *et al.*, 2000). Las condiciones iniciales de tp y Np se calcularon a partir de las reportadas por Gunawardana *et al.*, (2000), usando las siguientes ecuaciones:

$$tp(\text{miniCHEF}) = tp(\text{CHEF}) \frac{E(\text{CHEF})}{E(\text{miniCHEF})};$$

$$Np(\text{miniCHEF}) = \frac{te(\text{CHEF})}{8 tp(\text{miniCHEF}) N(\text{rampas})};$$

donde tp (miniCHEF), E (miniCHEF), Np (miniCHEF) y N (rampas) son el tiempo de pulso, el campo eléctrico, la cantidad de pulsos y el total de cambios de tiempo de pulsos o rampas, respectivamente, que se aplicará en el sistema miniatura de ECP Guefast06. Mientras que tp (CHEF), E (CHEF) y te (CHEF) son el tiempo de pulso, el campo eléctrico y el tiempo de electroforesis reportados en la literatura para obtener los patrones de bandas de ADN de *P. multocida* con los sistemas convencionales de ECP (Gunawardana *et al.*, 2000).

Las simulaciones se realizaron asumiendo un campo eléctrico de 10 v/cm, temperatura de 20°C, y tampón TBE 0.5 X (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM) como buffer de corrida. Las condiciones de tp y Np seleccionadas *in silico* para miniCHEF se comprobaron experimentalmente bajo las mismas condiciones de campo eléctrico, temperatura y tampón de corrida utilizando el patrón de peso molecular concatámeros del fago Lambda y se ajustaron mediante ensayos de prueba y error.

SELECCIÓN *IN SILICO* DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN QUE MEJOR DISCRIMINA LAS CEPAS DE *P. MULTOCIDA*

Se accedió a la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EUA disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/gene y se descargaron las secuencias del genoma completo de ocho cepas de *P. multocida*. Cada secuencia fue cargada en el programa PFGE Simulator (Plasencia *et al.*, 2013) y cortada de manera virtual, con cada una de las 134 enzimas de restricción de la base de datos del software. Se obtuvo la cantidad y tamaño de los fragmentos de restricción resultantes de la digestión virtual. Se preseleccionaron las enzimas que producían entre 10 y 40 fragmentos. Además, se simularon los patrones de bandas de ADN (pulsotipos) que se generarían con el uso estas enzimas bajo las condiciones de ECP previamente seleccionadas. Los pulsotipos virtuales resultantes se introdujeron en el programa GuefastScan (Santos *et al.*, 2013). Se compararon todos los pulsotipos virtuales generados y se determinó el coeficiente de DICE (Dice, 1945) para cada par de ellos.

CEPAS

Se tomaron siete cepas aisladas de brotes infecciosos del sistema respiratorio superior en cerdos (PM Granma, PM Thelma, PM 129, PM 248, PM I, PM II, PM III). Estas fueron previamente identificadas mediante métodos convencionales como *P. multocida* en el cepario de la empresa cubana LABIOFAM. Dichas cepas se sembraron en placas con agar y 5% de sangre de carnero desfibrinada y se incubaron 24h a 37°C. Se seleccionó una colonia única, se sembró en Caldo Triptona Soya (Merck) y se incubó igualmente a 37°C, con régimen de aireación 1/10 y una agitación de 200rpm, hasta pasar la fase exponencial del crecimiento.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ADN PARA ECP

La suspensión celular obtenida, luego del crecimiento en medio líquido de las siete cepas de *P. multocida*, se centrifugó 10min a 4°C, 2500rpm. Las células se lavaron dos veces con 1mL NaCl 0,15M. Posteriormente, 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) se mezclaron con 1 mL de 1,5% agarosa de bajo punto de fusión (Sigma, EEUU). Los bloques se formaron al añadir la mezcla en los moldes del

Sistema de ECP Guefast06 (Neuronic SA, Cuba) y se transfirieron a 1 mL de tampón de lisis (0,01M Tris, 0,1M EDTA), 1% w:v Sarcosyl, 1% v:v Nonidet P-40, 4M urea, pH 9,5) por 2h a 45°C. Los bloques se lavaron 2 veces a 45°C con agua destilada por 1 minuto y 6 veces con tampón TE (10 M Tris and 0,5mM EDTA pH=8,0) a 45°C por 15min cada uno. Se almacenaron hasta su uso en TE a 4°C.

DIGESTIÓN DE LOS MINIBLOQUES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Cada bloque se lavó tres veces con tampón TE-0,5X por 15min y se equilibró con 100µL del tampón de restricción de cada enzima (New England Biolabs, MA, USA). Cada minibloque se incubó con 10U de cada una de las endonucleasas de restricción seleccionadas previamente *in silico*, a la temperatura recomendada por el fabricante durante 2h. La reacción de digestión se detuvo añadiendo 1mL de TE a cada minibloque.

SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN MINI-ECP

Los fragmentos de restricción de las siete cepas de *P. multocida* se separaron mediante ECP, usando la minicámara CHEF del Sistema Guefast06 (a 10 v/cm, con agarosa al 1,5% y bajo las condiciones electroforéticas de tp y Np seleccionadas previamente. El tampón de corrida empleado fue TBE 0,5X (44,5mM Tris, 44,5mM ácido bórico y 1mM EDTA, pH=8,3) y la temperatura se mantuvo a 20°C.

La tinción de las moléculas de ADN se realizó mediante la incubación de los minigeles en una solución de bromuro de etidio 0,5µg/mL durante 30min. Posteriormente, se destiñeron por 30min en agua y se fotografiaron al iluminarlos con luz ultravioleta.

Para determinar cuál enzima tuvo mejor poder discriminativo para la comparación de estas cepas, se escanearon las imágenes de los patrones de banda resultantes con ayuda de las herramientas del programa GuefastScan (Santos *et al.*, 2013) y se calculó el coeficiente de DICE para cada par de patrones.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las condiciones de tp y Np que permitieran obtener pulsotipos en miniCHEF, en comparación con los sistemas convencionales, se realizó una corrección geométrica de las imágenes experimentales. La corrección se aplicó de manera que coincidieran la mayor cantidad de bandas posibles, tomando como referencia a los patrones de peso molecular (concatámeros de fago Lambda) con respecto a los reportados en la literatura por Gunawardana *et al.*, 2000 y Jaglic *et al.*, 2006. Mediante el empleo del programa GuefastScan (Santos *et al.*, 2013) se calculó la resolución entre cada par de bandas de las 9 bandas más pequeñas del patrón de peso molecular concatámeros de fago Lambda como la diferencia entre las distancias de migración de cada par de bandas en el patrón, dividido entre el ancho de bandas (0.07cm). Se compararon los valores de resoluciones obtenidas en la cámara de miniCHEF con los valores de resolución calculados a partir de las imágenes reportadas en la literatura (Gunawardana *et al.*, 2000; Jaglic *et al.*, 2006), a través de las pruebas estadísticas t-student y T² de Hotelling. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con nivel de significación de 0.05 en el programa Statistica 10.0 Software Package (StatSoft, Sudáfrica).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de condiciones electroforéticas de tp y Np para *P. multocida* en miniCHEF

Las condiciones de tp y Np, calculadas a partir de las reportadas por Gunawardana *et al.*, (2000), se relacionan en la Tabla 1 (RAMPA #1). Esta primera condición experimental generó un patrón virtual diferente al obtenido en el sistema de ECP convencional (resultados no mostrados). Después de ajustar de manera virtual dichas condiciones electroforéticas, mediante ensayos de prueba y error, se obtuvo la RAMPA #2 que se relaciona en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones electroforéticas ensayadas en miniCHEF para obtener patrones de bandas del ADN de *P. multocida* comparables a los reportados en la literatura

No	RAMPA # 1		RAMPA # 2		RAMPA # 3	
	tp(s)	Np	tp(s)	Np	tp(s)	Np
1	0.6	550	9	360	0.83	547
2	1.2	275	9.6	34	1.66	276
3	1.8	183	10.2	32	2.49	185
4	2.4	137	10.8	30	3.32	140
5	3	110	11.4	28	4.15	113
6	3.6	91	12	27	4.98	95
7	4.2	78	12.6	27	5.81	82
8	4.8	68	13.2	25	6.64	72
9	5.4	61	13.8	23	7.47	65
10	6	55	14.4	22	8.3	59
11	6.6	50	15	22	9.13	54
12	7.2	45	15.6	21	9.96	50
13	7.8	42	16.2	20	10.79	46
14	8.4	39	16.8	19	11.62	43
15	9	36	17.4	18	12.45	41
16	9.6	34	18	18	13.28	38
17	10.2	32	18.6	17	14.11	36
18	10.8	30	19.2	17	14.49	35
19	11.4	28	19.8	16	15.77	33
20	12	27	20.4	16	16.6	32
21	12.6	26	21	15	17.43	30
22	13.2	25	21.6	15		
23	13.8	23				
24	14.4	22				
25	15	22				
26	15.6	21				
27	16.2	20				
28	16.2	19				
29	17.4	18				
30	18	18				

Con el empleo de la RAMPA #2 (tabla 1) se obtuvo de manera virtual, un patrón de bandas del concatámero del fago Lambda similar al obtenido experimentalmente por Gunawardana *et al.*, (2000) (Fig 1A y D, respectivamente). Sin embargo, el ensayo experimental de estas condiciones no brindó patrones similares a los referentes de la literatura (Fig 1B y D, respectivamente). Esta diferencia entre las resoluciones obtenidas *in silico* y las reales, podría explicarse por el tipo de agarosa utilizada. Las ecuaciones que describen la migración del ADN lineal en el programa PFGE Simulator están diseñadas para agarosa de alta electroendosmosis (López-Cánovas *et al.*, 1998), mientras que la utilizada en el presente trabajo experimental fue agarosa de baja electroendosmosis. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la influencia directa que tienen los distintos tipos de agarosa empleadas en los experimentos de electroforesis sobre la migración de las moléculas de ADN en los geles (Johnson *et al.*, 1980).

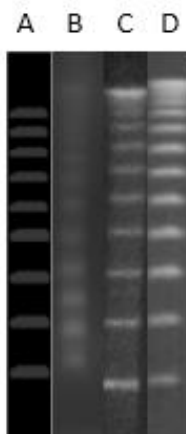


Fig.1: Patrones de bandas de concátameros del fago lambda obtenidos en minicámara CHEF, a 10v/cm, en agarosa 1.5%, TBE 0.5X a 20°C mediante simulación (A), de manera experimental con la RAMPA #2 (B) y la RAMPA #3 (C), o con el sistema convencional de ECP (D).

La RAMPA #3 (tabla 1) resultó del ajuste de los parámetros experimentalmente mediante ensayos de prueba y error. Esta permitió obtener patrones de bandas del concatámero de fago Lambda similares a los reportados por otros autores en ECP convencional como Gunawardana *et al.*, 2000, y Jaglic *et al.*, 2006 (Fig 1C y D). Al comprar la resolución de todas las bandas en los patrones experimentales, no se encontraron diferencias significativas, ni en el análisis estadístico banda a banda usando la prueba T-student (Tabla 2 A), ni con la prueba multivariada T² de Hotelling (Tabla 2 B).

López Cánovas *et al.*, (2009) habían logrado previamente la isorresolución del ADN de *Salmonella* serotipo Braenderoup con las minicámaras CHEF y el sistema convencional de ECP. Sin embargo, estos autores necesitaron combinar los resultados de diferentes experimentos en miniCHEF para lograr patrones de bandas que fueran comparables a los que se obtienen con la ECP convencional. En contraste, en el presente trabajo se logró obtener isorresolución entre los sistemas miniatura y convencional de ECP, en una única condición experimental, tomando como referencia el patrón de peso molecular del concatámero del fago Lambda. De esta manera, se redujo el tiempo para obtener los resultados electroforéticos a solo 5h.

Tabla 2: Comparación de las resoluciones entre las bandas de ADN de los patrones experimentales obtenidos con la RAMPA #3, con los patrones reportados previamente mediante la prueba T-student (A) y el análisis multivariado T² de Hotelling

A

Bandas	1y2	2y3	3y4	4y5	5y6	6y7	7y8	8y9
T test								
p	1	0.90	0.55	0.97	0.86	0.45	0.55	0.46

B

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet12)								
T ² (casewise MD)=102.806 F(8,10)=7.5593 p<.00221								
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference Constant	t-value	df	p
Var18	-0.000000	0.339479	18	0.080016	0.00	-0.00000	17	1.000000
Var19	-0.023810	0.407758	18	0.096109	0.00	-0.24773	17	0.807308
Var20	-0.087302	0.335527	18	0.079084	0.00	-1.10390	17	0.285016
Var21	-0.007937	0.398493	18	0.093926	0.00	-0.08450	17	0.933648
Var22	-0.031746	0.411341	18	0.096954	0.00	-0.32743	17	0.747337
Var23	0.166667	0.469988	18	0.110777	0.00	1.50452	17	0.150799
Var24	0.119048	0.438266	18	0.103300	0.00	1.15244	17	0.265088
Var25	0.222222	0.614398	18	0.144815	0.00	1.53453	17	0.143301

(B)

Selección de la enzima de restricción que mejor discrimina las cepas de *P. multocida*

Apa I, Bsp 120 I, Eag I, Asc I y Eco 0109 I fueron las enzimas que produjeron virtualmente entre 10 y 40 fragmentos (Fig 2). Este rango de fragmentos pudiera ser adecuado para ser resuelto en un minigel (5 x 7 x 0.5 cm; largo x ancho x alto), y suficiente para establecer comparaciones entre pulsotipos diferentes (López Cánovas *et al.*, 2009). De estas, Apa I y Bsp 120 I son isoesquizómeros, por lo que solo se tomó en consideración Apa I para los análisis subsiguientes.

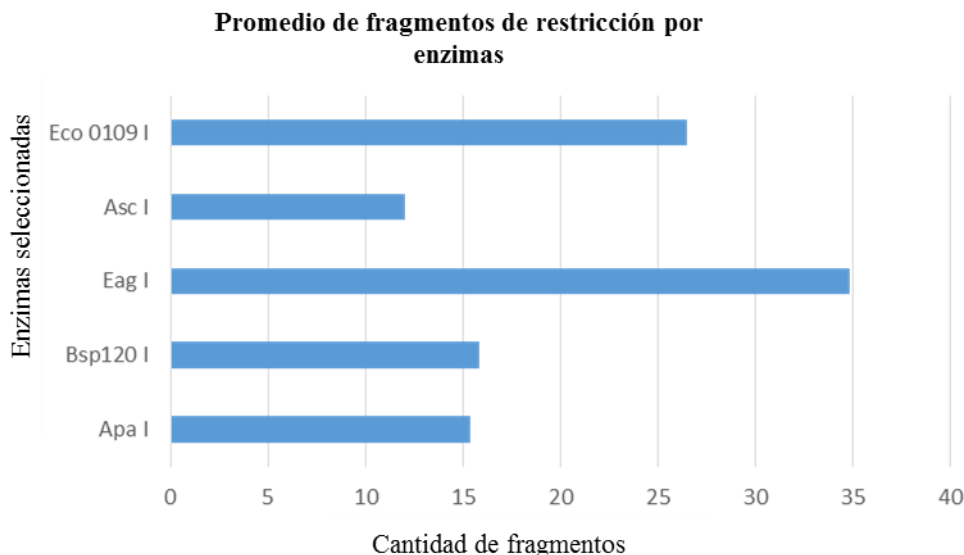


Fig.2. Promedio cantidad de fragmentos de restricción que generan las enzimas a partir de la digestión virtual de los ocho genomas disponibles de *P. multocida*.

Los pulsotipos obtenidos como resultado de la digestión virtual con Eag I y simulación de la separación de los fragmentos de restricción utilizando la RAMPA #3, presentaron las menores diferencias entre las ocho cepas estudiadas (mayor coeficiente de DICE, Figura 3). Mientras que, los pulsotipos con mayores diferencias se obtuvieron usando la enzima Asc I, de manera que esta última permitió discriminar mejor las cepas utilizadas en el análisis *in silico*. Estos resultados contrastan con la literatura pues la enzima Apa I es la que se ha usado con mayor frecuencia para la diferenciación de cepas de *P. multocida* (Sanchez-Enamorado *et al.*, 2015; Marois *et al.*, 2009; Donnio *et al.*, 1999, Pedersen *et al.*, 2003).

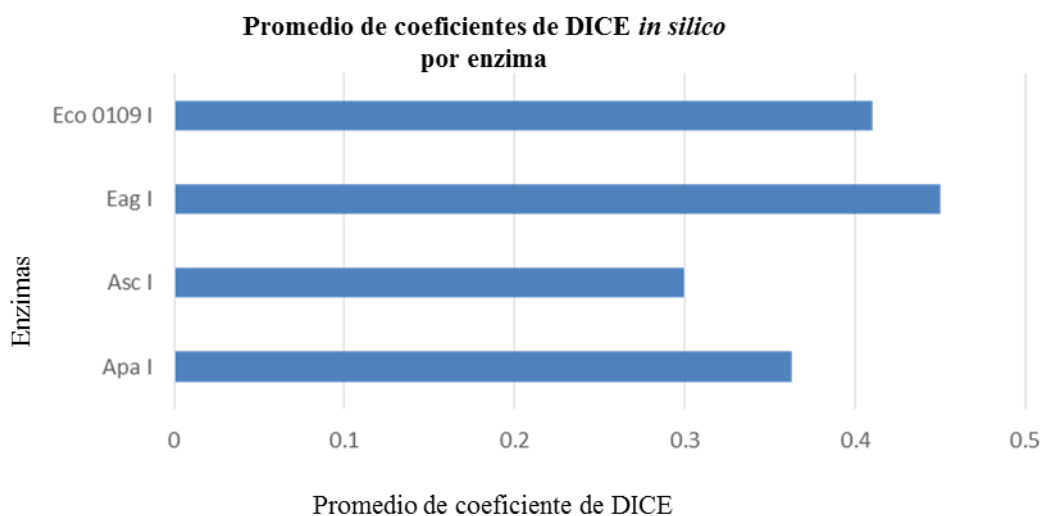


Fig. 3. Promedio de coeficientes de DICE calculado a partir de la comparación de los patrones virtuales de las ocho cepas de *P. multocida*

Los pulsotipos obtenidos experimentalmente, luego de la restricción del genoma de siete aislados de *P. multocida* con las enzimas Apa I, Asc I y Eag I y aplicando en miniCHEF las condiciones de tp y Np de la RAMPA #3, presentaron entre 8 y 16 bandas bien resueltas para las dos primeras enzimas (Fig 4). Los pulsotipos generados por Apa I tuvieron como promedio 12 bandas bien resueltas (Fig 4A), los generados por Asc I, 8 bandas (Fig 4B); sin embargo, no se obtuvieron patrones con digestión completa de 6 de las 7 cepas estudiadas con la enzima Eag I (Fig 4C). Este comportamiento ha sido reportado en la literatura para cepas que se consideran no tipificables bajo ciertas condiciones; por ejemplo, cuando el ADN bacteriano se encuentra metilado que impide la digestión eficiente de determinadas enzimas sensibles a estas modificaciones (Goering, 2010). Además, la enzima Apa I, permitió diferenciar cepas que Asc I no discriminó (Figura 4 A y B, señaladas en rectángulos rojos).

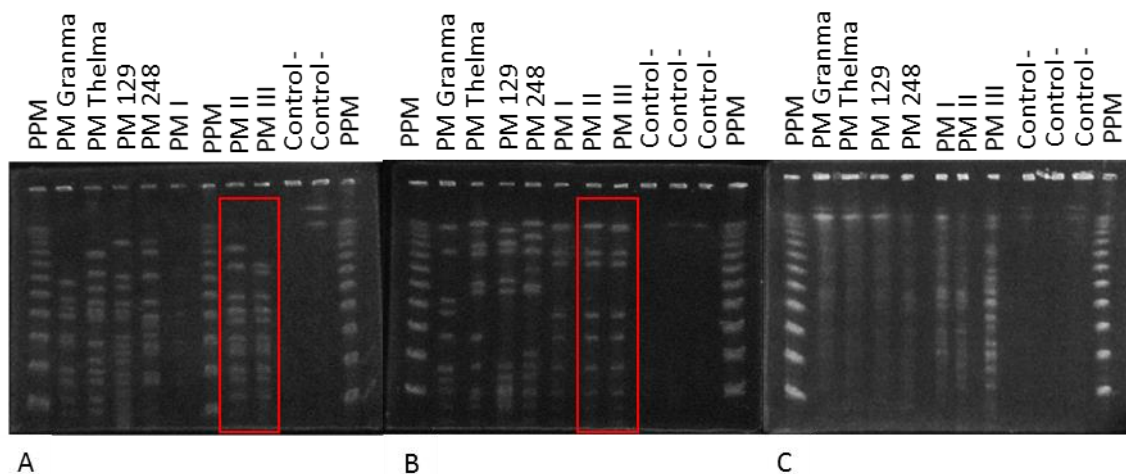


Fig. 4: Patrones de bandas del ADN de siete aislados de *P. multocida* obtenidos en miniCHEF con la RAMPA #3, luego de la digestión enzimática con Apa I (A), Asc I (B) o Eag I (C). El rectángulo rojo señala las cepas que se pudieron diferenciar con Apa I y no con Asc I.

Los coeficientes de DICE, calculados al comparar los patrones de bandas obtenidos experimentalmente para las siete cepas estudiadas; evidenciaron que la enzima Apa I mostró como promedio, las mayores diferencias entre las siete cepas (menor coeficiente de DICE, Fig 5). Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente en el análisis *in silico*, en el que la enzima más discriminativa resultó ser Asc I (Fig 3). La diferencia podría explicarse porque las cepas usadas en ambos análisis (experimental e *in silico*) fueron diferentes. Sin embargo, Apa I es la enzima que con más frecuencia se ha utilizado para la tipificación de *P. multocida*, según los reportes de la literatura (Sanchez-Enamorado *et al.*, 2015; Marois *et al.*, 2009; Donnio *et al.*, 1999; García, 2010).

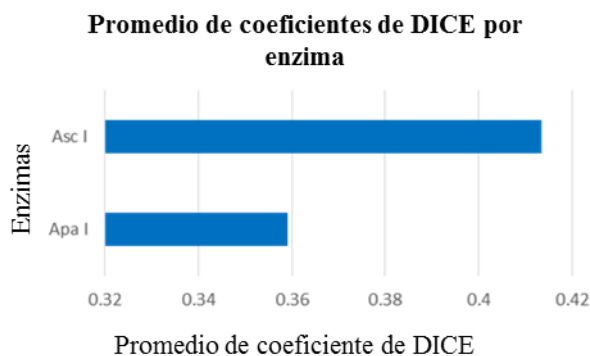


Fig. 5: Promedio de coeficientes de DICE de los patrones de bandas de ADN de los siete aislados de *P. multocida* obtenidos en miniCHEF con el empleo de la RAMPA #3.

CONCLUSIONES

En este estudio se reportó por primera vez las condiciones experimentales para la tipificación de *P. multocida* utilizando la tecnología miniaturizada de ECP con las que se obtuvieron patrones de bandas de ADN homólogos y comparables a los reportados en la literatura. De esta manera el tiempo de electroforesis se redujo a 5h. Adicionalmente, se determinó que las enzimas Apa I y Asc I son las que mejor discriminan diferentes cepas de *P. multocida*. La rapidez del análisis genómico sería determinante en el contexto de brotes infecciosos producidos por esta bacteria para el tratamiento oportuno de los pacientes (animales y humanos). Al mismo tiempo, las condiciones experimentales reportadas en el presente trabajo permitirían compartir la información genética de los brotes entre diferentes laboratorios, sin importar el sistema de ECP del que dispongan, lo que permitiría establecer estrategias de vigilancia epidemiológica regionales o globales más eficientes. Sin embargo, el análisis de un mayor número de cepas se haría necesario para corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Boyce John D, Ian Wilkie, Marina Harper, Mike L. Paustian, Vivek Kapur, and Ben Adler (2002). Genomic Scale Analysis of *Pasteurella multocida* Gene Expression during Growth within the Natural Chicken Host. *Infection and Immunity*, 70 (12): 6871–6879.
- Deng Xiangyu, Nikki Shariat, Elizabeth M. Driebe, Chandler C. Roe, Beth Tolar, Eija Trees, Paul Keim, Wei Zhang, Edward G. Dudley, Patricia I. Fields, David M. Engelthaler (2015). Comparative Analysis of Subtyping Methods against a Whole-Genome-Sequencing Standard for *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (1): 212–218.
- Dice LR (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3):297–302.
- Donnio PY, C Le Goff, JL Avril, P Pouedras, S Gras-Rouzet (1994). *Pasteurella multocida*: oropharyngeal carriage and antibody response in breeders. *Vet Res*, (25) 8-15.
- Donnio, P. Y., Iardet-Servent, A., Perrin, M., Escande, F., y Avril, J. L (1999). Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. *J.Med.Microbiol*, 48: 125-131.
- Ewers Christa, Antina Lübke-Becker, Astrid Bethe, Sabine Kießling, Matthias Filter, Lothar H. Wielera (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*, 114 (3-4): 304-317.
- García Benzaquén Nerea (2010). Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. Memoria para optar al grado de doctor, ISBN: 978-84-693-2407-3
- Goering R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*. 10, 866–875. doi:10.1016/j.meegid.2010.07.023.
- Goering, R. V. (1993) Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis *Infect.Control Hosp.Epidemiol*, 14: 595-600.
- Gunawardana Gnana A., Kirsty M. Townsend, Alan J. Frost (2000). Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. *Veterinary Microbiology*, 72: 97-109.
- Holst E., Jan Rollof, Lennart Larsson, Jens Peter Nielsen (1992). Characterization and Distribution of *Pasteurella* Species Recovered from Infected Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (11): 2984-2987.
- Ivana Simona, Gheorghe Câmpeanu, Alexandru T. Bogdan, Nicolae Manolescu, Ionita Lucian, Emilia Balint, Carmen Ionita, Iudith, Alexandru Nicolae Popescu (2010). Characterization of *Pasteurella* sp. strains by macrorestriction profiles of PFGE bands from oral swab samples. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (1): 5034-5041.
- Jaglic Z., Z. Kucerova, K. Nedbalcova, P. Kulich, P. Alexa (2006). Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 51 (5): 278–287.

- Johnson P. H., Miller M. J., Grossman L. I. (1980). Electrophoresis of DNA in agarose gels: II. Effects of loading mass and electroendosmosis on electrophoretic mobilities. , 102(1), 159–162. doi:10.1016/0003-2697(80)90332-2
- Kędrak-Jabłońska Agnieszka, Borkowska-Opacka Bogna (2007). Analysis of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle with haemorrhagic septicaemia by the use of PFGE. Bull Vet Inst Pulawy, 51: 515-517.
- Kehrenberg Corinna, Jürgen Wallmann, Stefan Schwarz (2008). Molecular analysis of florfenicol-resistant *Pasteurella multocida* isolates in Germany. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62: 951–955.
- Kim J., Kim J.W., Oh S.I., So B., Kim W., Kim H. Y (2019). Characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia in Korea. BMC Vet Res, 15, 119. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1861-5>
- Lainson F. A., K. D. Aitchison, W. Donachie, J. R. Thomson (2002). Typing of *Pasteurella multocida* Isolated from Pigs with and without Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome. Journal of Clinical Microbiology, 40 (2): 588–593.
- Liu Wendy, Roy F. Chemaly, Marion J. Tuohy, Margaret M. LaSalvia, and Gary W. Procop (2003). *Pasteurella multocida* Urinary Tract Infection with Molecular Evidence of Zoonotic Transmission. Clinical Infectious Diseases, 36:58–60.
- López-Cánovas L, Bravo L, Herrera J (2006). DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. Electrophoresis, 27 (14): 2857-2864
- López-Cánovas L, Galán L, Orozco E, Riverón A (1998). “Kinetic properties of DNA migration under clamped homogeneous electric field conditions DNA size, migration velocities and reorientation time determined in a single clamped homogeneous electric field run”, J Chromatogr, 806: 123-139.
- López-Cánovas L, Riverón A M, Garrido Y, Corrales F, Aguila A, Cardenas Y (2009). Adapting to contour-clamped homogeneous electric field minichamber technology the PulseNet protocols to resolve XbaI-DNA fragments of *Salmonella* serotype Braenderup. Analytical Biochemistry, 388: 339-341.
- López-Cánovas L, Sanchez-Alonso A, Higginson D, Ariosa C, Clark H, Riverón A M (2003). Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis. Electrophoresis, 24 (7-8): 1152- 1158.
- Marois C., C. Fablet², O. Gaillot³, H. Morvan⁴, F. Madec² and M. Kobisch (2009). Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. Journal of Applied Microbiology, (107): 1830–1836.
- Mutters R., P. Ihm, S. Pohl, W. Frederiksen, W. Mannheim. (1985) Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposal for the new species *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. International Journal of Systematic Bacteriology, 35: 309–322.
- Orynbayev M., Sultankulova K., Sansyzbay A., Rystayeva R., Shorayeva K., Namet A., Fereidouni S., Ilgekbayeva G., Barakbayev K., Kopeyev S., Kock R (2019). Biological characterization of *Pasteurella multocida* present in the Saiga population. BMC Microbiol 19, 37. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1407-9>.
- Pedersen K., H. H. Dietz, J. C. Jørgensen, T. K. Christensen, T (2003). Bregnballe. *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. Journal of Wildlife Diseases, 39(4): pp. 808–816.
- Peng Z., Wang X., Zhou R., Chen H., Wilson B.A., Wua B (2019). *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 83: 4 e00014-19. 9. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-19>.
- Petersen K. D., J. P. Christensen, A. Permin, and M. Bisgaard (2001). Virulence of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from outbreaks of fowl cholera in wild birds for domestic poultry and game birds. Avian Pathology, 30: 27–31.
- Plasencia E., Cárdenas Y., López-Cánovas L., Riverón A. M. (2013) Sistema automatizado para simular la electroforesis de campos pulsantes y almacenar los pulsotipos virtuales del genoma

- bacteriano. J. Folgueras Méndez et al. (Eds.): CLAIB 2011, IFMBE Proceedings, 33, DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-642-21198-0_21
- Riverón-Rojas A. M, López-Cánovas L (2000). Algorithm to predict MiniCHEF Electrophoresis. Patterns to *Entamoeba histolytica* DNA. Archives of Medical Research, 31: 279–281.
- Riverón-Rojas A. M, López-Cánovas L (2008). Software for obtaining virtual electrophoretic karyotypes and pulsetypes of microorganisms. 16th International Symposium on Capillary Electrophoresis Techniques. Catania, Italia, 31 de agosto al 4 de septiembre 2008.
- Santos Y. M., León K., López L., Riverón A. M. (2013) System for image processing of DNA band patterns obtained by Pulsed Field Gel Electrophoresis. J. Folgueras Méndez et al. (Eds.): CLAIB 2011, IFMBE Proceedings, 33 DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-642-21198-0_22
- Sánchez-Enamorado Y, Osney Leiva-Peláez, María Belsis Cordero-Ramírez, Magdalena Oliva-López, Karen León-Arcia (2015). Caracterización molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas del ganado bovino. VaccinMonitor, 24(2):79-85.
- Stahel A. B. J, Hoop R. K., Kuhnert P, Korczak B. M. (2009). Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. J Vet Diagn Invest, 21:793–802.

Este artículo no presenta conflicto de intereses