UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE AISLADOS DE Pasteurella multocida OBTENIDOS DE GANADO PORCINO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nerea García Benzaquén

Bajo la dirección de los doctores:

José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández, Joaquín Goyache Goñi y Ana Isabel Vela Alonso

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-2407-3

TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE AISLADOS DE *Pasteurella multocida* OBTENIDOS DE GANADO PORCINO

NEREA GARCÍA BENZAQUÉN

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA

MADRID 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE AISLADOS DE *Pasteurella multocida* OBTENIDOS DE GANADO PORCINO

Dña. Nerea García Benzaquén

2009

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

D. José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández, D. Joaquín Goyache Goñi y Dña. Ana Isabel Vela Alonso, Profesores titulares del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título "**Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino**" ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. Nerea García Benzaquén en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

Y para que así conste, a efectos legales, firman y sellan el presente certificado en Madrid, a 14 de mayo de 2009.

Fdo. J. F. Fernández-Garayzábal Fdo. A. I. Vela Fdo. J. Goyache

Queda prohibido llorar sin aprender,

levantarte un día sin saber qué hacer,

tener miedo a tus recuerdos.

Queda prohibido no sonreír a los problemas,

no luchar por lo que quieres,

abandonarlo todo por miedo,

no convertir en realidad tus sueños.

Pablo Neruda

Todo aquél que piense que la vida es desigual
tiene que saber que no es así
Que la vida es una hermosura, hay que vivirla
Todo aquel que piense que está solo y que está mal
Tiene que saber que no es así
Que en la vida no hay nadie solo, siempre hay alguien

Ay, no hay que llorar
Que la vida es un carnaval y es más bello vivir
cantando……

Celia Cruz

A Mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Y por fin llegó el fin tan ansiado, después de tanto tiempo…¡viva! Cualquiera que me conozca lo más mínimo sabe que lo mío no es la capacidad de síntesis y que soy bastante despistada. A pesar de ello intentaré resumir y no olvidarme de nadie. Si no consigo alguna de las dos cosas pido mil disculpas.

En primer lugar agradecer sinceramente a mis directores de tesis todo el trabajo y el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo. Quisiera dar las gracias a José F. Fernández-Garayzábal por sus revisiones críticas y precisas, siempre con gran prontitud y siempre dispuesto a discutir mis ideas. A Ana Isabel Vela el tiempo y la dedicación que ha destinado a las infinitas correcciones. Y por último a Joaquín Goyache por su esfuerzo y por aportar sus valiosas opiniones e infundir estilo en la escritura de esta tesis. Además, querido Joaco, expresarte mi infinita gratitud por haber depositado tu confianza en mí hace mucho tiempo, sin apenas conocerme, y haberme dado la oportunidad que ha hecho que hoy haya llegado a este punto. Gracias, sinceramente, por animarme y apoyarme siempre, por escucharme, por consolarme en los momentos difíciles y por ser mi amigo.

Gracias a Lucas Domínguez, por haber sacrificado sus ganas en este proyecto para el beneficio del mismo. Además por infundir su entusiasmo y su optimismo día a día, por ayudarme siempre a buscar la mejor solución y por hacerme sentir que puedo contar con él siempre que lo necesito (aunque su agenda lo complique a veces).

Muchas gracias a toda la gente que ha puesto su granito de arena directamente en esta larga tesis. En primer lugar a Almudena, sin la cual hubiera sido imposible no volverme loca con el enrevesado mundo del campo pulsado. Gracias por tu paciencia y ayuda, Almu. Además a todo el grupo de veterinarios de campo sin los cuales hubiera sido imposible conseguir todas las muestras. Gracias a Gema (pequeña pero con gran dosis de valentía y arrojo) y a todo su equipo: Jose Cebolla (sufridor resignado de mi banda sonora en el despacho), Carmen, Fidel y Cristina. Y, por supuesto, gracias a todas las granjas, ganaderos y veterinarios que colaboraron y facilitaron el trabajo a este grupo.

Gracias a todos los que me ayudaron en el laboratorio, porque habéis sido fundamentales para que este trabajo se haya conseguido y por haber logrado que fueran divertidos y amenos los días de mayor rutina. Gracias a mis primeras compañeras, Laura Delgado (quien me enseñó los trucos de laboratorio), Cris, Laura Cuesta y Pilar Vera.

Tengo que dar las gracias a toda la gente que pasó por el grupo de bacteriología con quienes compartí infinitas horas de trabajo y amistad. Nuestra "jefa-madre" Pilar Liébana, siempre con la sonrisa a punto, dispuesta a echar una mano. Quique, gracias por tus momentos geniales, por sacarme una sonrisa hasta debajo del agua y gracias Delia por tu compañerismo y colaboración. También gracias a Ruth y a MariCarmen.

Mención especial se merecen mis últimos y queridísimos compañeros de aquella etapa. Darles las gracias a ambos por mil cosas, por haber compartido horas de duro trabajo, risas, lágrimas, muchos bailes, confesiones, carcajadas, más y más bailes...Maguis, gracias porque las innumerables experiencias juntas (buenas y malas) nos han unido para siempre, y gracias cuidar de mi para que no perdiera el bolso y para que no metiera los dedos en el café. Jose Luis, gracias por entenderme a la perfección, por ser el tío más divertido del mundo mundial y porque casi consigues que aprenda a silbar. Me ha encantado conoceros y os echo muchísimo de menos.

Gracias también a Mateo del Pozo y a Elena Vizcaíno por la aportación de material gráfico y al Dr. Rodríguez-Ferri por el material para las pruebas serológicas.

A todos los compañeros de VISAVET, mi segunda casa, donde he conocido a tanta gente estupenda:

Empezaré por Julito, imprescindible en estos años y espero que en los venideros. Gracias por tu ingenio, por hacerme reir sin descanso, por ayudarme tanto y confiar en mí, por tu brillantez y tesón en el trabajo, por nuestras incansables charlas…y por seguir cantando conmigo dúos imposibles.

A Javichu, gracias por tu humor ácido pero cariñoso, porque sé que puedo contar contar contigo en cualquier momento y porque sin ti no estaría al día de lo que pasa por el mundillo rosa. Gracias a Soni, simplemente por ser más buena que el pan, por enseñarme tantas y tantas cosas con infinita paciencia. Gracias a Laura de las Heras, de las personas más eficientes que

conozco, capaz de desenvolverse con soltura con el intrincado mundo del papeleo y también de conseguir que nos reunamos de vez en cuando todos. Y gracias a ambas por ayudarme a darle forma a esta tesis en los últimos momentos. Gracias a Sergio, por su inestimable amistad, por su ayuda con la informática y el diseño de mis trabajos, incluido este.

A la "topilla" Marta, porque ha sido un placer contar contigo en el trabajo estos últimos años (a pesar de los sustos que me das de vez en cuando). Mil gracias por compartir las responsabilidades conmigo mano a mano. Por ser un ejemplo de perseverancia y constancia, por no negar nunca la ayuda a nadie y por contagiarnos tu entusiasmo. A Mazariegos y a Irene por simpáticas, por hacer del despacho un lugar francamente agradable para trabajar. A las tres muchas gracias porque en momentos de crisis vuestro "no te preocupes, te ayudamos" ha sido mi salvación.

Gracias también a Lucía de Juan, jefa en un breve pero valioso tiempo en el que me sentí muy bien arropada. Gracias a toda la gente que ha compartido conmigo horas de café y de pasillo y que me han alegrado los días como Tania, Bea Tames, Ester, Lucía Palacios, Bea Romero, Sabrina, Elena, Elisa, Leydis, Vero, David, Pedro, Carlos, Susana, Isa, María García, Fanny, Tiru, Mauricio, sevemures varios, el resto del grupo de ZTA y el de micobacterias y un larguísimo etc. Como no, a Marga por ser tan maja y por no enfadarse nunca. También a Laura Torres, a Carmen y a Arancha.

A todos los profesores, becarios, técnicos, etc. que han pasado por mi vida estos años que han colaborado conmigo y que me han sabido aconsejar como Miguel Angel Moreno, Alicia Aranaz, Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno (y sus chicas), Alicia Gibello, Victor Briones, Bruno (y sus chicos), Concha Porrero, Ana Mateos, Mónica Suarez, Mar Blanco, etc.

Agradecer, a pesar de la distancia, a la Dra. Rosario Esperanza Galván y a todo su equipo de la Universidad Autónoma de Méjico por haberme acogido como a una más y portarse tan bien conmigo.

Ya fuera del ámbito profesional agradecer a todos mis amigos el haber compartido innumerables días buenos y que me han soportado y animado en los días malos. Gracias a Martita por mantener nuestra eterna amistad y porque sin ella no hubieran sido llevaderas las interminables horas de estudio en la carrera. A Pilar, que aún en la distancia es capaz de contagiarme su

espíritu de lucha y superación, además de su cariño. Al resto de compañeros de carrera, especialmente a la gente de Vekavel: Sebas, Vane, Ainhoa, Asier, Chara, Jaco, Elías, Teclas, etc.

A las que empezaron siendo "las amigas de mi hermana" y ahora son las mías por derecho propio y con las que he compartido tantos y tantos buenos momentos. Las "supernenas" Rosa, Anita, Ele y Belén, todas diferentes y todas incomparables. Gracias por transmitirme vuestra energía, chicas.

Gracias también a Sergito, Rufino y Mochón. Mis amigos desde el instituto, a pesar de no vernos demasiado, por estar siempre ahí.

Gracias a todos mis amigos escaladores, con los que he compartido todo el tiempo que he podido escaparme del ordenador y airearme en el campito disfrutando de vuestra excelente compañía. Gracias a Nacho (además por mimarme tanto), a Elsa, Carlos, Pepito, Raúl, Susana, Zapata y demás tropa.

A mi familia empezando por "Alala", la abuela más divertida que se pueda tener. Por todas la navidades compartidas, por sus mil y una historietas, y por contagiarnos su vitalidad. A toda mi familia de Bilbao, tíos y primos, y a la familia de Madrid, especialmente a Rebeca y a la abuela Pepita, que a pesar de no estar ya con nosotros, sé que estaría tan orgullosa como ha demostrado siempre.

A mi hermano mayor David. Gracias por ser un ejemplo de responsabilidad, por cuidarme de pequeñita, porque me enseñaste a leer, por inventar juegos cuando estaba enferma y porque sin ti no sabría quien es Bruce Lee ni Bud Spencer.

Qué decir de Leyre, la mejor hermana-amiga. Mi "otra mitad" con la que he compartido casi todo en esta vida. No sé qué haría sin nuestras conversaciones infinitas. Gracias, clon, por haber escuchado mis confidencias y por aguantarme y animarme en mis momentos desesperados. Por ser tan alegre y generosa (incluyendo la lectura minuciosa de esta tesis para ayudarme a buscar típicos fallos), por enseñarme a decir "no" y porque sin tu estilismo iría hecha una espantajo.

Muchas gracias Dani por estar a mi lado, en todos los sentidos, durante todos estos años. Gracias porque he madurado y aprendido contigo. Gracias por compartir las cosas buenas y por luchar en los momentos difíciles. Gracias por tu paciencia, tu cariño, por tu comprensión, por confiar en mí, por transmitirme

tu fuerza, porque tus ánimos y tu ayuda han sido fundamentales, especialmente en estos últimos momentos. Gracias infinitas por hacerme reír, (aunque la mayoría de veces sea yo la víctima)…y por reírte de ti mismo.

Y por último agradecer a mis padres TODO. Gracias por apoyarme y animarme siempre a tomar mis propias decisiones libremente, porque jamás me ha faltado vuestro cariño y comprensión, por ser un inigualable ejemplo para mí en muchos aspectos de la vida. Gracias Sylvia, mi madre, la mejor. Gracias porque desde pequeña me has enseñado a decir "si puedo", por tu infinita generosidad, por ser tan positiva y por tus riquísimos guisos. Gracias Jose Manuel, mi padre, el mejor. Por confiar en mí, por respetarme y por haberme enseñado a disfrutar de la montaña desde bien pequeña (no olvidaré que fuiste el primero en llevarme a la Pedriza).

En fin, que pido disculpas de corazón de nuevo si he olvidado a alguien. Ha sido un verdadero placer compartir con todos vosotros esta etapa de mi vida. Sin la ayuda de todos vosotros no lo hubiera conseguido.

¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!

ÍNDICE

Página

ÍNDICE I

LISTA DE TABLAS V

LISTA DE FIGURAS VII

LISTA DE ABREVIATURAS IX

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Antecedentes históricos 3

1.2. Encuadre taxonómico/filogenético 4

1.3. Características generales de P. *multocida* 8

1.4. Ecología 9

1.5. Identificación de especie 10

1.5.1. Métodos tradicionales 10

1.5.2. Métodos moleculares 10

1.6. Identificación a nivel de subespecie 11

1.7. Caracterización 11

1.7.1. Métodos de tipado fenotípico 11

1.7.1.1. Determinación de biovares 11

1.7.1.2. Determinación de serotipos 14

1.7.1.3. Determinación del tipo capsular 14

1.7.1.4. Otros métodos de tipado fenotípico 15

1.7.2. Métodos de tipado molecular 15

1.8. Aspectos epidemiológicos 18

1.9. Patogenicidad 24

1.9.1. Factores de virulencia 25

1.9.1.1. Cápsula 25

1.9.1.2. PMT (toxina dermonecrótica) 27

1.9.1.3. Proteínas de exterior de membrana 30

1.9.1.4. Factores relacionados con la adquisición de hierro 31

1.9.1.5. Adhesinas 33

1.9.1.6. Neuraminidasas 34

1.9.1.7. Superóxidodismutasas 35

1.9.1.8. Otros factores 35

1.9.2. Patologías en diferentes especies animales 36

1.9.2.1. Aves 36

1.9.2.2. Ganado bovino 38

1.9.2.3. Conejos 39

1.9.2.4. Humanos 39

1.9.2.5. Ganado porcino 40

1.9.2.5.1. Procesos neumónicos 41

1.9.2.5.2. Rinits atrófica progresiva (RAP) 49

1.9.2.5.3. Procesos septicémicos 54

2. OBJETIVOS 57

3. MATERIAL Y MÉTODOS 61

3.1. Aislados de *P. multocida* 63

3.2. Conservación de los aislados 64

3.3. Identificación de especie 65

3.3.1. Identificación morfológica y bioquímica 65

3.3.2. Identificación molecular 65

3.4. Identificación de subespecie 67

3.5. Determinación de biovar 67

3.6. Determinación de tipo capsular 68

3.7. Detección de factores de virulencia 69

3.7.1. PMT (toxina dermonecrótica) 69

3.7.1.1. Detección mediante PCR 69

3.7.1.2. Detección mediante ELISA 70

3.7.1.3. Secuenciación 71

3.7.2. Otros factores de virulencia 77

3.8. Caracterización molecular: PFGE 80

3.9. Análisis estadístico 82

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 83

4.1. Identificación de especie 85

4.1.1. Identificación morfológica y bioquímica 85

4.1.2. Identificación molecular 93

4.2. Identificación de subespecie 94

4.3. Caracterización 95

4.3.1. Biovares 95

4.3.2. Tipo capsular 101

4.3.3. Presencia de la PMT 109

4.3.4. Secuenciación de la PMT 113

4.3.5. Presencia de otros factores de virulencia 116

4.3.6. Caracterización molecular: PFGE 127

5. CONCLUSIONES 141

6. RESUMEN 145

7. SUMMARY 149

8. BIBLIOGRAFÍA 153

LISTA DE TABLAS

Página

1. Especies pertenecientes al género *Pasteurella* 5

2. Subespecies de *P. multocida* 6

3. Biovares de *P. multocida* descritos 13

4. Cepas de referencia de *P. multocida* subsp. *multocida* 64

5. Cebadores de PCR específica de especie 65

6. Volúmenes empleados en la PCR específica de especie 66

7. Condiciones de PCR de especie *P. multocida* 66

8. Cebadores utilizados en las PCR de tipos capsulares de *P. multocida* 68

9. Temperaturas de hibridación y controles positivos utilizados en las PCR de tipos capsulares de *P. multocida* 69

10. Cebadores de la PCR del gen *toxA* 70

11. Condiciones de la PCR de gen *toxA* 70

12. Cebadores utilizados en las PCR de secuenciación del gen *toxA* 75

13. Volúmenes utilizados en las PCR de los segmentos T1, T2 y T4 76

14. Cebadores de PCR de factores de virulencia 78

15. Condiciones de PCR para los factores de virulencia 79

16. Controles positivos y cantidades de la mezcla de PCR para los factores de virulencia 79

17. Relación de las especies identificadas mediante API 20E, niveles de identificación de esta galería comercial y porcentajes de las mismas 86

18. Relación de todos los perfiles bioquímicos y nivel de identificación obtenidos mediante API 20E 87

19. Resultados obtenidos en las pruebas convencionales en tubo de ensayo y en las pruebas de la galería comercial API 20E de:

a) Ornitina decarboxilasa (ODC) 90

b) Sorbitol (SOR) 90

c) Indol (IND) 90

20. Resultados obtenidos mediante la galería comercial API 20E y la combinación con las pruebas convencionales en tubo de ensayo (nuevos perfiles, identificaciones y niveles de los mismos 91

21. Niveles de identificación de *P. multocida* obtenidos mediante las pruebas convencionales en tubo de ensayo 93

22. Número de aislados de cada biovar en las distintas empresas productivas 99

23. Distribución de aislados de *P. multocida* de los diferentes tipos capsulares en las empresas de producción 105

24. Aislados de *P. multocida* que presentan la PMT 110

25. Variación de nucleótidos y su posición en la secuencia del gen *toxA* 114

26. Variación de aminoácidos y su posición en la secuencia del gen *toxA* 115

27. Técnicas de PCR realizadas para detectar la presencia de genes asociados a virulencia 116

28. Presencia de genes asociados a virulencia en aislados de *P. multocida* 121

29. Presencia del gen *pfhA* en los diferentes biotipos de *P. multocida* aislados 125

30. Presencia del gen *hgbB* en los diferentes biotipos de *P. multocida* aislados 126

31. Prevalencia de la combinación de los genes *hgbB y pfhA* en los diferentes biotipos de *P. multocida* aislados 127

32. Clasificación de los aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* estudiados, según su perfil genético (patrón PFGE), biotipo, tipo capsular, presencia/ausencia de los genes toxA, *pfhA* y *hgbB* 130

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. *P. multocida* en placa de agar sangre	8
2. Pulmón de cerdo consolidado	47
3. Cerdo con RAP	52
4. Atrofia nasal típica de RAP	53
5. Esquema de la amplificación y secuenciación del gen *tox*A de *P. multocida*	71
6. Secuencia del gen *toxA* de la cepa X51512 e iniciadores utilizados para la secuenciación de este gen	72
7. Gel de PCR de especie *P. multocida*	93
8. Distribución de biovares de *P. multocida* aislados	96
9. Distribución de los diferentes biovares en las empresas de producción	99
10. Distribución de los diferentes biovares en los procesos de pasterelosis sistémica y pasterelosis neumónica	100
11. Distribución de los aislados en los tipos capsulares de *P. multocida*	101
12. Gel de PCR de tipo capsular A	103
13. Gel de PCR de tipo capsular D	103
14. Gel de PCR de tipo capsular F	103
15. Gel de PCR de tipo capsular B	104
16. Gel de PCR de tipo capsular E	104
17. Distribución de los tipos capsulares en las empresas de producción	105
18. Distribución de los diferentes tipos capsulares en los procesos de pasterelosis neumónica y de pasterelosis sistémica	106
19. Gel de PCR de toxina dermonecrótica de *P. multocida*	111
20. Gel de PCR de gen *ompH*	117
21. Gel de PCR de gen *psl*	117

22. Gel de PCR de gen *ptfA* 117

23. Gel de PCR de gen *tbpA* 118

24. Gel de PCR de genes *nanH* y *pfhA* 118

25. Gel de PCR de gen *hgbA* y *hgbB* 118

26. Gel de PCR de gen *sodA* y *sodC* 119

27. Gel de PCR de gen *exBD-tonB*, *oma87* y *nanB*. 119

28. Perfiles genéticos obtenidos por PFGE representativos de los aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* tras la digestión del ADN bacteriano con el enzima de restricción *Apa*I 129

29. Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre los 211 aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* realizado en base al análisis de grupos UPGMA de los 69 perfiles genético generados por PFGE obtenidos después de la digestión del ADN bacteriano con el enzima de restricción *Apa*I 134

LISTA DE ABREVIATURAS

Adenina	**A**
Arginina-hidrolasa	**ADH**
Ácido desoxirribonucleico	**ADN**
Amigdalina	**AMY**
Ácido desoxirribonucleico ribosómico	**ANDr**
Amplified Fragment Length Polymorphism	**AFLP**
L-arabinosa	**ARA**
Ácido ribonucleico	**ARN**
Ácido ribonucleico ribosómico	**ARNr**
Brain Heart Infusion	**BHI**
Citosina	**C**
Grados centígrados	**ºC**
Colección Española de Cultivos Tipo	**CECT**
Citrato	**CIT**
Centímetro	**cm**
Complejo respiratorio porcino	**CRP**
Diversidad genética (nº perfiles/ nº aislados)	**DG**
Deoxyribonucleotide triphosphate	**dNTP**
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	**ELISA**
Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR	**ERIC-PCR**
Field Alternation Gel Electrophoresis	**FAGE**
Guanina	**G**
Gramo	**g**
gelatina	**GEL**
Ácido sulfhídrico	**H_2S**
Indol	**IND**

Inositol	**INO**
Hora	**h**
Kilobases	**Kb**
Litro	**L**
Megabase	**Mb**
Miligramo	**mg**
Minuto	**min**
Mililitro	**ml**
Milímetro	**mm**
Melobiosa	**MEL**
Multi Locus Enzyme Electrophoresis	**MLEE**
Multi-locus Sequence Typing	**MLST**
National Collection of Type Cultures	**NCTC**
Ornitina decarboxilasa	**ODC**
Outer Membrane Protein (proteína de exterior de membrana)	**OMP**
β-galactosidasa	**ONPG**
Citocromo-Oxidasa	**OX**
Pares de bases	**Pb**
PFGE Profile (Perfil de PFGE)	**PFP**
Pulsed Field Gel Electrophoresis (electroforesis en campo pulsado)	**PFGE**
Pasteurella Multocida Toxin (toxina dermonecrótica de *P. multocida*)	**PMT**
Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)	**PCR**
Rinitis atrófica progresiva	**RAP**
Random Amplification of Polymorphic DNA	**RAPD**
L-ramnosa	**RHA**
Restriction Enzyme Analysis	**REA**
Repetitive Extragenic Palindromic PCR	**REP-PCR**

Restriction Fragment Length Polymorphism	**RFLP**
Segundo	**s**
Single-enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism	**SE-AFLP**
Subespecie	**Subsp.**
Timina	**T**
Triptófano desaminasa	**TDA**
Unidades	**U**
Ureasa	**URE**
Voltio	**V**
Acetoína	**VP**
Microgramo	**µg**
Microlitro	**µl**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos.

En la literatura existe una cierta controversia sobre quién fue el primer investigador en aislar *Pasteurella multocida*. Según Rosenbusch y Merchant (1939), fue quien aisló este microorganismo a partir de aves que presentaban signos de cólera aviar. Otros autores indican que *P. multocida* fue aislada por primera vez en 1879 por Toussaint (Gray, 1913). No obstante, Louis Pasteur aisló en 1880 esta bacteria a partir de sangre de aves que padecían cólera aviar, caracterizándola morfológica y bioquímicamente (Pasteur, 1880).

Este microorganismo ha tenido distintos nombres a lo largo del tiempo, pudiendo ser *Micrococcus gallicidus* el primero de ellos (Burril, 1883). En 1885, Kit aisló el microorganismo de sangre de ganado vacuno, caballos y cerdos enfermos, denominándolo *Bacterium bipolarmulticidum* (Kitt, 1893). Al año siguiente Hueppe lo renombró como *Bacterium septicaemia haemorrhagica,* calificando como septicemia hemorrágica a la enfermedad que producía esta bacteria en ganado bovino (Hueppe, 1886). El nombre genérico de *Pasteurella* fue propuesto por Trevisan (Trevisan, 1887) en conmemoración al trabajo de Louis Pasteur sobre dicho microorganismo. Lignieres propuso una clasificación de las pasteurelas en función del hospedador (*P. avicida, P. bovicida, P. boviseptica*) (Ligniéres, 1990). Más tarde se agruparon diferentes bacterias que presentaban características morfológicas y bioquímicas similares en *P. séptica* (Topley y Wilson, 1929). El nombre definitivo de *P. multocida* fue asignado por Rosenbusch y Merchant en 1939 (Weber *et al.*, 1984).

1.2. Encuadre taxonómico/filogenético.

P. multocida es una especie bacteriana encuadrada en el orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae* y género *Pasteurella.* La familia *Pasteurellaceae* es una familia muy heterogénea, que se ha sometido a múltiples reclasificaciones y sobre la que, todavía, se continúan cuestionando sus relaciones taxonómicas. Actualmente comprende 13 géneros según la "*Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature*" (http://www.bacterio.cict.fr/): *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Bibersteinia*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Mannheimia*, *Nicoletella*, *Pasteurella*, *Phocoenobacter* y *Volucribacter* (Pohl, 1981; Olsen *et al.*, 2005). *Pasteurella* es el género tipo de esta familia, y *P. multocida* a su vez la especie tipo de este Género (Trevisan, 1887; Lehmann y Neumann, 1899; Rosenbusch y Merchant, 1939; Mannheim y Carter, 1984). La organización de esta familia ha sido establecida por comparaciones fenotípicas (Kilian y Frederiksen, 1981), así como mediante análisis de hibridación ADN-ADN (Mannheim *et al.*, 1980; Svoboda *et al.*, 1981; Mannheim, 1983; Christensen *et al.*, 2000), hibridación ARNr-ADN (De Ley *et al.*, 1990) y análisis de secuencias del gen que codifica el gen del ARNr 16S (Chuba *et al.*, 1988; Dewhirst *et al.*, 1992), entre otros métodos taxonómicos.

En 1985 Mutters *et al.* reclasificaron el género *Pasteurella* Trevisan 1887 en base a estudios de hibridación de ADN-ADN. Se definieron entonces once especies: *P. multocida*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. anatis*, *P. langaa*, *P. gallinarum*, *P. volantinum*, *P. avium*, *Pasteurella sp.* A y *Pasteurella sp.* B. Además *P. multocida* fue subdividida a su vez en tres subespecies: *multocida*, *septica* y *gallicida* (Mutters *et al.*, 1985a). Posteriormente se han ido incluyendo nuevas especies dentro del género *Pasteurella* y reclasificando algunas de las antiguas, comprendiendo actualmente 20 especies, tal y como se representa en la Tabla 1.

Tabla 1. Especies pertenecientes al género *Pasteurella*.

Especie	Referencia	Reclasificación	Referencia
P. aerogenes	(McAllister y Carter, 1974; Skerman *et al.*, 1980; Christensen *et al.*, 2005)		
P. anatis	(Mutters *et al.*, 1985a)	*Gallibacterium anatis*	(Christensen *et al.*, 2003)
P. avium	(Mutters *et al.*, 1985b)	*Avibacterium avium*	(Blackall *et al.*, 2005)
P. bettyae	(Sneath y Stevens, 1990; Sneath, 1992)		
P. caballi	(Schlater *et al.*, 1989)		
P. canis	(Mutters *et al.*, 1985a)		
P. dagmatis	(Mutters *et al.*, 1985a)		
P. gallinarum	(Hall *et al.*, 1955; Skerman *et al.*, 1980)	*Avibacterium gallinarum*	(Blackall *et al.*, 2005)
P. granulomatosis	(Ribeiro *et al.*, 1989)	*Mannheimia granulomatois*	(Angen *et al.*, 1999)
P. haemolytica	(Newsome y Croos, 1932; Skerman *et al.*, 1980)	*Mannheimia haemolytica*	(Angen *et al.*, 1999)
P. langaaensis	(Mutters *et al.*, 1985a; Trüper y De´Clari, 1998)		
P. mairii	(Sneath y Stevens, 1990; Sneath, 1992; Christensen *et al.*, 2005)		
P. multocida	(Lehmann y Neumann, 1899; Rosenbusch y Merchant, 1939; Skerman *et al.*, 1980; Mutters *et al.*, 1985a)		
P. pneumotrpica	(Jawetz, 1950; Skerman *et al.*, 1980)		
P. skyensis	(Birkbeck *et al.*, 2002)		
P. stomatis	(Mutters *et al.*, 1985a)		
P. testudinis	(Snipes y Biberstein, 1982)		
P. trehalosi	(Sneath y Stevens, 1990)	*Bibersteinia trehalosi*	(Blackall *et al.*, 2007)

Especie	Referencia	Reclasificación	Referencia
P. ureae	(Jones, 1962; Skerman *et al.*, 1980)	*Actinobacillus ureae*	(Mutters *et al.*, 1986)
P. volantium	(Mutters *et al.*, 1985a)	*Avibacterium volantium*	(Blackall *et al.*, 2005)

Basándose en la comparación de secuencias del gen que codifica el gen del ARNr 16S, el género se divide, además, en dos grupos filogenéticos que presentan una asociación con el origen animal, básicamente en función de si el hospedador es mamífero o aviar (Dewhirst *et al.*, 1992; Dewhirst *et al.*, 1993).

P. multocida es una especie bacteriana muy heterogénea, en la que se han descrito multitud de variantes fenotípicas en relación a pruebas claves para su clasificación, tales como la ornitina decarboxilasa (ODC), indol, sacarosa, manitol y maltosa (Heddleston, 1976; Petersen *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2004a; Christensen *et al.*, 2005), lo que implica que este organismo no sea fácil de identificar ni clasificar. Además, las cepas encuadradas en esta especie presentan una enorme variación respecto a la morfología de las colonias y especificidad de antígenos (Carter, 1967; Boyce *et al.*, 2004).

La relación y separación de las tres subespecies de *P. multocida* es también un tema de frecuente discusión. Se han utilizado diferentes métodos genotípicos para establecer las relaciones filogenéticas entre las tres subespecies, incluyendo hibridaciones ARNr-ADN, comparación de secuencias del gen que codifica el gen del ARNr 16S y de genes *housekeeping*, como el *atpD, rpoB e infB,* ribotipado etc. Generalmente se indica una gran homología entre ellas (Kuhnert *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2005; Kuhnert y Korczak, 2006). Fenotípicamente las tres subespecies se distinguen, principalmente, en función de diferentes patrones de utilización del sorbitol y del dulcitol (Mutters *et al.*, 1985a) (Tabla 2).

Tabla 2. Subespecies de *P. multocida.*

Subespecie	Dulcitol	Sorbitol
P. multocida. subsp. *multocida*	-	+
P. multocida. subsp. *septica*	-	-
P. multocida. subsp. *gallicida*	+	+

Algunos autores han sugerido diferencias en los nichos ecológicos de las tres subespecies, e incluso que existe correlación entre subespecie y cuadro clínico (Biberstein *et al.*, 1991; Holst *et al.*, 1992). Por ejemplo, la subespecie *multocida se* aisla más frecuentemente a partir de infecciones respiratorias y la subespecie *septica* a partir de infecciones de heridas (tras la mordedura de gatos especialmente), habiendo sido aisladas ambas de casos graves de infección, incluyendo bacteriemia o meningitis en humanos (Holst *et al.*, 1992; Boerlin *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). La subespecie *gallicida* suele presentarse en aves asintomáticas o que presentan sintomatología de cólera aviar (Muhairwa *et al.*, 2000). De ello se deriva la importancia de su correcta identificación, tanto desde un punto de vista epidemiológico como clínico. Además, existen datos que muestran que existe una diferente adaptación a la especie hospedadora según la subespecie, especialmente en las subespecies *septica* y *gallicida* (Bisgaard, 1993).

La subespecie ***multocida*** es la más frecuente en todo tipo de hospedadores, siendo las subespecies *gallicida* y *septica* mucho menos habituales. Así, la subespecie *multocida* es la más común en ganado porcino (Blackall *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000), además de ganado bovino (Bisgaard *et al.*, 1991a), aves y gatos (Snipes *et al.*, 1990; Korbel *et al.*, 1992; Christiansen *et al.*, 1992b; Mohan *et al.*, 1994; Dziva *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2003) y perros (Muhairwa *et al.*, 2001b).

La subespecie ***septica*** es aislada normalmente en aves (especialmente en salvajes), perros y, sobre todo, en gatos (Snipes *et al.*, 1990; Biberstein *et al.*, 1991; Korbel *et al.*, 1992; Dziva *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001; Muhairwa *et al.*, 2001b). Se ha demostrado que en gatos presenta una afinidad especial por el sistema nervioso central (Biberstein *et al.*, 1991). En ganado vacuno los datos de aislamiento de esta subespecie son escasos (Biberstein *et al.*, 1991; Bisgaard *et al.*, 1991a; Bisgaard *et al.*, 1991b), y más aún lo es en el caso del ganado porcino (Varga *et al.*, 2007). En humanos esta subespecie se asocia frecuentemente a infecciones de heridas o mordiscos producidos por perros o gatos, mientras que la subespecie *multocida* se asocia más frecuentemente a procesos respiratorios (Chen *et al.*, 2002).

Por último, la subespecie ***gallicida*** es la menos común de las tres, y es típica de muestras procedentes de aves, especialmente acuáticas y salvajes

(Hirsh *et al.*, 1990; Snipes *et al.*, 1990; Fegan *et al.*, 1995; Muhairwa *et al.*, 2001b). Ocasionalmente se ha aislado en otras especies como, por ejemplo, gatos y ciervos (Biberstein *et al.*, 1991). En el caso del ganado porcino se trata de un hallazgo poco frecuente (Cameron *et al.*, 1996; Blackall *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2001; Jamaludin *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2007). Además, en la mayoría de las ocasiones en las que se ha detectado esta subespecie en ganado porcino se ha considerado la posibilidad de la transmisión desde las aves a los cerdos (Cameron *et al.*, 1996).

1.3. Características generales de *P. multocida*.

P. multocida es una bacteria Gram negativa, con forma de coco o bacilo corto, que presenta una tinción bipolar típica. Es un organismo anaerobio facultativo, inmóvil, capsulado y que no forma esporos. En agar sangre las colonias se observan pequeñas, circulares, convexas y de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente de aspecto mucoso, grisáceo o blanquecino (Figura 1), y de olor característico (debido a la gran producción de indol) (Rimler y Glisson, 1997; Koneman *et al.*, 1999).

Figura 1. *P. multocida* en placa de agar sangre.

Las reacciones bioquímicas que se consideran constantes, y que caracterizan a *P. multocida* son: metabolismo fermentativo, ausencia de crecimiento en agar MacConkey, reacción positiva para el indol, negativa para la ureasa y producción de ácido a partir de hexosas (Rimler y Glisson, 1997). Además, se trata de una bacteria oxidasa positiva, no hemolítica y que, salvo

excepciones, no requiere factor V de crecimiento (Krause *et al.*, 1987; Sneath y Stevens, 1990).

Por otra parte, los aislados de *P. multocida* se pueden diferenciar en función de diversas características. Así, se distinguen cinco tipos capsulares (A, B, D, E y F) en base a los antígenos de la cápsula (Carter, 1955; Rimler y Rhoades, 1987; Snipes *et al.*, 1988a; Rimler y Rhoades, 1989b); 16 serotipos (1-16), basándose en los antígenos lipopolisacáridos (Namioka y Murata, 1961a; Namioka y Murata, 1961b; Heddleston *et al.*, 1972) y 13 biovares (1-10 y 12-14), según el patrón de utilización de diferentes azúcares y enzimas (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997).

En ocasiones se encuentran aislados acapsulados y/o no clasificables en serotipo alguno, especialmente en aves (Rhoades y Rimler, 1987; Wilson *et al.*, 1993).

1.4. Ecología.

Los miembros del género *Pasteurella* se encuentran habitualmente como comensales de las mucosas del tracto digestivo y respiratorio superior de mamíferos y aves aparentemente sanos de todo el mundo. *P. multocida* ha sido aislada de muchas especies animales (vacas, búfalos, cerdos, cabras, pavos, pollos, patos, gansos, gatos, perros, etc.), tanto domésticas como salvajes, a partir de animales aparentemente sanos y enfermos (Snipes *et al.*, 1988a; Rimler y Rhoades, 1989b).

Este microorganismo no persiste mucho tiempo en el medio ambiente, dependiendo su viabilidad de las condiciones de temperatura y humedad (Rosen, 1975; Backstrand y Botzler, 1986). Puede permanecer viable en agua de 7 a 25 días y en suelo durante más de 21 días, pero se inactiva tras la exposición directa al sol durante 10 minutos (Olson y Bond, 1968; Rosen, 1975; Backstrand y Botzler, 1986; Bredy y Botzler, 1989). Además puede sobrevivir durante largos periodos en materia orgánica (Bredy y Botzler, 1989). Se inactiva a 60º C en 1 min o en fenol al 0,5% en 15 min (Smith y Philips, 1990).

El hábitat ideal de esta bacteria es el tracto respiratorio de aves y mamíferos, produciéndose la transmisión, fundamentalmente, mediante contacto directo, aerosoles o ruta fecal-oral (Rosen, 1975).

1.5. Identificación de especie.

1.5.1. Métodos tradicionales.

Debido a la gran heterogenicidad que presenta *P. multocida*, y a que las condiciones de cultivo pueden influir en la expresión de ciertos caracteres fenotípicos disminuyendo, por lo tanto, la repetibilidad y fiabilidad de estos métodos para la identificación (Matsumoto y Strain, 1993; Jacques *et al.*, 1994), la utilización de pruebas bioquímicas no se considera un método preciso para la identificación de esta especie bacteriana (Dziva *et al.*, 2008). Además, existen otras especies con un aspecto macroscópico o microscópico similar, y que, afectando a los mismos animales, pueden tener características bioquímicas muy similares, como por ejemplo *Manheimmia haemolytica* o *Pasteurella pneumotropica* (Quinn *et al.*, 1999). Aún así, es un sistema fundamental para una identificación básica y para clasificar los aislados en los diferentes biovares y subespecies.

El método convencional de identificación de *P. multocida* implica la utilización de una serie de pruebas bioquímicas (Rimler y Rhoades, 1989a; Quinn *et al.*, 1999), que pueden realizarse de manera tradicional o mediante algún sistema comercial, como pueden ser las galerías multisustrato API 20NE y API20E (Biomerieux).

1.5.2. Métodos moleculares.

Se han descrito varias técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar *P. multocida*. Se describió, por ejemplo, una PCR que detectaba el gen *psl* que codifica para una proteína similar a P6 de *Haemophilus influenzae* (Kasten *et al.*, 1997), o bien otra basada en el gen del gen del ARNr 23S (Miflin y Blackall, 2001). No obstante, la más utilizada es la PCR descrita por Townsend *et al.* (1998a) que detecta una secuencia de ADN única en *P. multocida* y que ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (Townsend *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000). Recientemente se ha desarrollado una PCR en la que se detecta el gen que codifica el gen del ARNr 16S y que utiliza una sonda tipo Taqman con la que se han obtenido buenos resultados en muestras de campo (Corney *et al.*, 2007).

1.6. Identificación a nivel de subespecie.

Las tres subespecies de *P. multocida* (*multocida, septica* y *gallicida*) presentan perfiles bioquímicos muy similares que, generalmente, se distinguen únicamente mediante las diferencias en la utilización del sorbitol y del dulcitol (Mutters *et al.*, 1985a), pruebas que actualmente se incluyen en el Manual Bergey´s de Bacteriología Sistemática (2005) (Olsen *et al.*, 2005) y que son las más utilizadas. Se considera que *P. multocida* subespecie *multocida*, incluye las cepas dulcitol-negativo, sorbitol positivo; *P. multocida* subespecie *septica*, cepas dulcitol y sorbitol negativo y *P. multocida* subespecie *gallicida*, cepas dulcitol positivo y sorbitol negativo (Tabla 2, Apartado 1.2).

Esta clasificación fenotípica mediante el empleo exclusivo de dos azúcares ha sido cuestionada en diferentes estudios, ya que los patrones de utilización de los mismos no son siempre consistentes con la determinación de la subespecie (Petersen *et al.*, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2001; Muhairwa *et al.*, 2001b). Por ello se han propuesto diferentes alternativas para diferenciar las tres subespecies. Por ejemplo, la secuenciación de determinados genes *housekeeping* (Christensen *et al.*, 2004b), la actividad alfa-glucosidasa (Hunt *et al.*, 2001a), o la prueba de utilización de la trehalosa y la secuenciación del gen que codifica para el gen del ARNr 16S (Kuhnert *et al.*, 2000). No obstante, ninguna de las alternativas es totalmente fiable. Tampoco existe, por el momento, ninguna técnica de PCR que identifique las tres subespecies de forma precisa. Por todo ello, para su empleo rutinario se utilizan generalmente las mencionadas pruebas de la utilización del sorbitol y del dulcitol (Mutters *et al.*, 1985a) y, si es posible, se debe combinar con otras pruebas bioquímicas y/o alguna técnica de genotipado para, con ello, identificar estas subespecies con mayor precisión.

1.7. Caracterización.

1.7.1. Métodos de tipado fenotípico.

1.7.1.1. Determinación de biovares.

La determinación de los biovares se realiza mediante las pruebas bioquímicas descritas por Fegan *et al.* (1995) y Blackall *et al.* (1997) que

incluyen una batería de 7 azúcares: glucosa, trehalosa, xilosa, dulcitol, sorbitol, lactosa, y manitol, además de la prueba de la ODC y la producción de ureasa. Mediante el patrón bioquímico derivado de estas pruebas se clasifica, si es posible, cada aislado en uno de los biovares descritos (Tabla 3).

Tabla 3. Biovares descritos de *P. multocida* (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997).

Propiedades	**Biovar**												
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**12**	**13**	**14**
Producción de:													
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Utilización de:													
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Trehalosa	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Xylosa	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
IDENTIFICACIÓN (Subespecies de *P. multocida*)	*multocida*	*multocida*	*multocida*	*multocida*	*septica*	*septica*	*septica*	*gallicida*	*multocida*, ODC negativo	*septica*, maltosa positivo	*multocida*, lactosa positivo	*multocida*, ODC negativo	*multocida*, lactosa positivo; ODC negativo

Cada subespecie, a su vez, tiene definidos ciertos biovares. Así la subespecie *multocida* comprende actualmente los biovares 1, 2, 3, 4, 9, 12, 13 y 14, la subespecie *septica* los biovares 5, 6, 7 y 10 y la subespecie *gallicida* únicamente el biovar 8 (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997) (Tabla 3).

1.7.1.2. Determinación de serotipos.

Basándose en los antígenos lipopolisacáridos y utilizando el esquema de Heddleston (Carter, 1955; Heddleston *et al.*, 1972; Carter y Chengappa, 1981) se distinguen, como ya citamos anteriormente, 16 serotipos (1-16).

La determinación de los antígenos somáticos de los aislados de *P. multocida* no es una técnica muy utilizada en la actualidad, ya que presenta serias dificultades. Así, dicha serotipificación en ocasiones se ve influida por la presencia o no de cápsula y del tipo de la misma ya que su composición puede dificultar la reacción con el antisuero (Rimler y Rhoades, 1987; Rimler y Rhoades, 1989b; Wilson *et al.*, 1993). Además, en ocasiones se producen reacciones cruzadas y muchos aislados no son tipables mediante este método (Namioka y Bruner, 1963; Manning, 1982; Jones *et al.*, 1988). Asimismo, se ha demostrado que la determinación de los serotipos puede variar dependiendo de los diferentes métodos utilizados a tal efecto (Brogden y Packer, 1979). Por otra parte, la mayoría de los autores señalan que los métodos serológicos proporcionan una caracterización limitada de los aislados, y presentan un escaso valor epidemiológico (Snipes *et al.*, 1988a; Snipes *et al.*, 1988b; Wilson *et al.*, 1992; Blackall *et al.*, 1998; Muhairwa *et al.*, 2001a).

1.7.1.3. Determinación del tipo capsular.

El antiguo sistema para determinar el tipo capsular estaba basado en la hemaglutinación pasiva de eritrocitos sensibilizados frente a los antígenos capsulares (Carter, 1955). Más tarde se describieron nuevos métodos rápidos y sensibles para identificar el tipo capsular A mediante la prueba de la hialuronidasa estafilocócica (Carter y Rundell, 1975) y el tipo capsular D mediante la prueba de la acriflavina (Carter y Subronto, 1973). Los tipos capsulares B y E han sido identificados también mediante diferentes métodos, como son la prueba de la inmunización pasiva en ratones (Roberts, 1947) y la prueba de coaglutinación (Rimler, 1978).

Actualmente se utilizan técnicas moleculares para la diferenciación de los 5 tipos capsulares. Se han descrito técnicas de PCR simples y específicas para la detección de un determinado tipo capsular, como, por ejemplo, para el tipo capsular A (Gautam *et al.*, 2004), y el B, causante de la septicemia hemorrágica (Brickell *et al.*, 1998; Townsend *et al.*, 2000). No obstante, se ha diseñado una PCR múltiple (Townsend *et al.*, 2001) que es capaz de identificar todos los tipos capsulares en la misma reacción, además de poseer una alta especificidad y sensibilidad, por lo que se considera la mejor opción para detectar los distintos tipos capsulares de *P. multocida*.

1.7.1.4. Otros métodos de tipado fenotípico.

-**Perfil de OMPs** (*Outer Membrane Protein Profile*). Técnica basada en la separación de proteínas externas de membrana y utilizada en estudios sobre *P. multocida* en diversas especies animales (Lugtenberg *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 2003b; Davies *et al.*, 2004).

-**MLEE** (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis*) detecta diferencias en la movilidad electroforética de enzimas metabólicas hidrosolubles. Técnica utilizada para establecer la diversidad poblacional de *P. multocida* (Blackall *et al.*, 1998).

1.7.2. Métodos de tipado molecular.

Cada vez es más frecuente la utilización de métodos de tipado molecular para caracterizar los aislados bacterianos debido, principalmente, a que presentan un mayor poder discriminatorio que las técnicas de tipificación basadas en características fenotípicas, que suelen presentar, además, problemas de reproducibilidad (Heddleston, 1976; Hunt *et al.*, 2000; Blackall y Miflin, 2000). A esto se ha de añadir que actualmente existen mejores medios técnicos en los laboratorios, se cuenta con sistemas informatizados, se han disminuido considerablemente los costes y se dispone de personal especializado.

Cada uno de los métodos de tipado molecular posee un diferente grado de tipabilidad, reproducibilidad, poder discriminatorio y facilidad de utilización,

factores que hay que tener en cuenta en los estudios epidemiológicos (Arbeit, 1995).

Para caracterizar *P. multocida* se han utilizado diferentes técnicas. Entre las más utilizadas están:

-**Análisis de restricción de plásmidos.** Utilizado en cepas aisladas de ganado porcino (Gardner *et al.*, 1994; Fussing *et al.*, 1999) y aves (Diallo *et al.*, 1995). Técnica basada en la purificación y separación de plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa. Es sencillo y económico pero tiene una aplicación limitada en estudios epidemiológicos, ya que no todos los aislados de *P. multocida* poseen plásmidos y, además, algunos los pueden perder en los sucesivos pases de cultivo (Fussing *et al.*, 1999).

-**AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Este método está basado en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN generados mediante digestión con enzimas de restricción. Se ha utilizado para subtipificar cepas de *P. multocida* relacionadas epidemiológicamente (Amonsin *et al.*, 2002; Shivachandra *et al.*, 2006), aunque no se ha determinado su reproducibilidad entre laboratorios.

-**RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta es una técnica altamente reproducible en la que se generan bandas de restricción de ADN, dependiendo de la localización dentro del genoma de dianas de reconocimiento para endonucleasas de restricción específicas (Diallo *et al.*, 1995). Utilizada principalmente en estudios epidemiológicos en casos de cólera aviar (Kim y Nagaraja, 1990; Carpenter *et al.*, 1991).

-**MLST** (*Multi-locus Sequence Typing*). Con este método se detectan las variaciones de las secuencias aminoacídicas de diferentes enzimas mediante la secuenciación de ADN en genes seleccionados (generalmente *housekeeping*) (Spratt, 1999). Es un método altamente reproducible y de alto poder discriminatorio (Spratt, 1999).

-**FAGE** (*Field Alternation Gel Electrophoresis*). En este procedimiento se separan fragmentos grandes de ADN (de hasta 10 megabases) y se someten a electroforesis en gel. Discrimina entre diferentes serotipos, habiéndose utilizado en pocos estudios (Townsend y Dawkins, 1993).

-**RAPD** (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). Mediante esta técnica se reconocen y amplifican secuencias al azar dentro del ADN genómico,

obteniéndose patrones de bandas característicos. Esta técnica posee una baja reproducibilidad y falta de estandarización (Blackall y Miflin, 2000).

-**Fingerprinting**. También basada en la digestión del ADN mediante enzimas de restricción en la que se generan fragmentos que, posteriormente, se someten en un gel al paso de una corriente eléctrica. Ha demostrado su utilidad para discriminar entre aislados de aves de serotipos iguales (Carpenter *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1993).

-**REA** (*Restriction Enzyme Analysis*). En ella se comparan el número y el tamaño de los fragmentos producidos por la digestión de ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción. Es una técnica que se ha utilizado con bastante frecuencia en estudios epidemiológicos, principalmente en casos de rinitis atrófica progresiva (RAP) (Harel *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 1994; Djordjevic *et al.*, 1998) y otros procesos producidos por *P. multocida* (Olson y Wilson, 2001; Pedersen *et al.*, 2003; Samuel *et al.*, 2003). Presenta una buena reproducibilidad (Snipes *et al.*, 1989), a pesar de que a veces produce patrones de bandas complicados y es necesario un software para su interpretación definitiva (Wilson *et al.*, 1993; Goering, 1993; Kristjansson *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 2003). El poder de discriminación de esta técnica depende de la enzima utilizada (Wilson *et al.*, 1993; Rimler, 2000).

-**Ribotipado.** Los fragmentos de ADN obtenidos por REA son transferidos a una membrana e hibridados con una sonda de ADN, correspondiente a la molécula de gen del ARNr 16S o del ARNr 23S (Grimont y Grimont, 1986). Técnica muy utilizada para tipar *P. multocida* (Zhao *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1994; Djordjevic *et al.*, 1998; Fussing *et al.*, 1999; Bowles *et al.*, 2000; Muhairwa *et al.*, 2001a; Muhairwa *et al.*, 2001b; Rubies *et al.*, 2002), pero, según algunos autores, de escaso poder discriminatorio (Dziva *et al.*, 2004) y poco valor en estudios epidemiológicos (Saxena *et al.*, 2005).

-**REP-PCR** (*Repetitive Extragenic Palindromic* PCR). Esta técnica está basada en la amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos dentro del genoma bacteriano. Posee mejor poder discriminatorio que ERIC-PCR, ribotipado, RAPD-PCR y REA utilizando la enzima *HindII* (Townsend *et al.*, 1997b; Townsend *et al.*, 1998a; Gunawardana *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

-**ERIC-PCR** (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*). Mediante este procedimiento se obtiene un patrón de bandas, tras amplificar secuencias

repetitivas intergénicas de consenso. Se ha utilizado en ocasiones, aunque no muestra un adecuado poder de discriminación (Loubinoux *et al.*, 1999; Biswas *et al.*, 2004).

-**SE-AFLP** (*Single-enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism*). Se basa en la amplificación selectiva de un subgrupo de fragmentos de ADN generados por digestión con enzimas de restricción. Ha sido utilizada en ocasiones para tipificar *P. multocida* (Amonsin *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003). A pesar de ser una técnica laboriosa y complicada (Shivachandra *et al.*, 2007) tiene mejor resolución que RAPD (Huber *et al.*, 2002) y mayor poder discriminatorio que REA (Shivachandra *et al.*, 2006).

-**PFGE** (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Técnica que se basa en la comparación de patrones de bandas generadas después de la digestión enzimática de todo el genoma bacteriano tras someterlo a una electroforesis multidireccional. De todas las técnicas moleculares PFGE es, hoy por hoy, la técnica considerada como el *gold standard* para el estudio molecular de *P. multocida* (Goering, 1993). Es una técnica que presenta una elevada reproducibilidad (Arbeit, 1995), además de demostrar un gran poder discriminatorio en la caracterización de *P. multocida* (Townsend *et al.*, 1997a; Pedersen *et al.*, 2003), diferenciando claramente aislados que son indistinguibles mediante serotipado o perfil de proteínas, por ejemplo (Johnson *et al.*, 1991; Townsend *et al.*, 1997a; Hunt *et al.*, 2000). Posee mayor poder discriminatorio que el ribotipado (Kristjansson *et al.*, 1994; Townsend *et al.*, 1997a; Christensen *et al.*, 1998; Gunawardana *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003) y la técnica de REP-PCR (Gunawardana *et al.*, 2000) para caracterizar aislados de *P. multocida*. También se ha demostrado que la técnica de PFGE, utilizando la enzima *ApaI,* presenta mayor poder discriminatorio que ERIC-PCR (Leotta *et al.*, 2006a), RAPD (Lainson *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2007) y que REA (Christensen *et al.*, 1998; Gunawardana *et al.*, 2000). Las principales desventajas que presenta esta técnica son el tiempo empleado, su laboriosidad, y que se requiere un equipo especial, lo que supone una elevada inversión.

1.8. Aspectos epidemiológicos.

Generalmente se combinan los métodos de fenotipado (en los que se determinan el serotipo, tipo capsular, subespecie y biovar), junto con métodos

de genotipado, que poseen un mayor poder de discriminación (Hunt *et al.*, 2000; Blackall y Miflin, 2000). La combinación de estas técnicas ha evidenciado ser muy útil en estudios epidemiológicos, pudiéndose investigar, por ejemplo, el origen de un brote. Así, se ha utilizando la técnica de PFGE y ERIC-PCR para determinar las posibles fuentes de infección en casos de cólera aviar (Kardos y Kiss, 2005) y septicemia hemorrágica (Aalbaek *et al.*, 1999). También mediante PFGE se demostró una fuente de infección común asociada a la importación de cerdos para cría en un caso de RAP en Australia (Gardner *et al.*, 1994) y, más tarde, en ese mismo país, utilizando la técnica de REA, que una cepa toxigénica de tipo capsular D fue la que inició los brotes en 1985 (previamente este país estaba libre de esta enfermedad) (Djordjevic *et al.*, 1998). Otro estudio realizado en Dinamarca revelaba la posibilidad de que el comercio y la introducción de nuevos animales en las granjas fuesen la fuente de infección, ya que encontraron un cepa de *P. multocida* subsp. *multocida* toxigénica epidémica prevalente en los animales introducidos (las cepas se caracterizaron mediante ribotipado y fagotipado) (Fussing *et al.*, 1999). En conejos se demostró, utilizando la técnica de REP-PCR, que el origen de un brote de pasterelosis se debía a la introducción de nuevos animales, ya que las cepas eran genotípicamente diferentes a las de los animales que ya estaban en la granja (Virag *et al.*, 2008).

Las diferentes técnicas de tipado también son útiles para determinar la transmisión de *P. multocida* entre diferentes especies animales, incluido el hombre. Así, Donnio *et al.* (1999), utilizando la técnica de PFGE, sugirieron que se podía producir la transmisión de aislados toxigénicos desde los cerdos a los humanos ya que observaron que existían patrones indistinguibles entre ambos (Donnio *et al.*, 1999). También en humanos se determinó mediante PFGE que la fuente de contagio en un caso de un bebé con meningitis por *P. multocida* subsp. *septica* era un gato (Boerlin *et al.*, 2000), al igual que en un paciente que presentaba un abceso pulmonar (Grangeon *et al.*, 2000). En otra ocasión se dio el caso contrario, demostrándose que las cepas de un bebé y de un gato no eran las mismas, descartando, por lo tanto, el contagio a partir de este animal (Blackwood *et al.*, 1996). La combinación de REP-PCR y fenotipado ha permitido también establecer que es posible la transmisión de esta bacteria desde ganado bovino y aves a cerdos (Townsend *et al.*, 1998b). Asimismo y combinando el fenotipado clásico con los perfiles de OMPs, se describieron cepas de *P. multocida* compartidas entre distintas especies animales, tales como vacas,

cerdos y aves domésticas, lo que sugeriría, de nuevo, una posible transmisión entre las diferentes especies (Davies *et al.*, 2004). En una granja en Dinamarca se aisló en una rata una cepa epidémica (determinada mediante ribotipado y fagotipado) de *P. multocida* subsp. *multocida* toxigénica, que predominaba en poblaciones de cerdos, indicando que estos animales también podrían ser posibles reservorios de este microorganismo (Fussing *et al.*, 1999). Respecto de las aves, algunos autores consideran que las aves salvajes pueden ser transmisoras del cólera aviar a las domésticas, ya que en éstas se encontraron patrones genéticos (PFGE y REA) que eran los más comunes y frecuentes en las aves domésticas (Christensen *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 2003). Sin embargo, otros autores opinan que las aves salvajes no son una fuente de contagio importante, aunque para llegar a esta conclusión se basaron en métodos fenotípicos y no utilizaron métodos moleculares, que tienen mayor poder discriminatorio (Hirsh *et al.*, 1990; Snipes *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1993).

También se han investigado las posibles rutas de transmisión intraespecíficas. Zhao *et al.* (1992) determinaron el tipo capsular, la presencia del gen *toxA* y aplicaron la técnica de REA y ribotipado en aislados de *P. multocida* en una granja de cerdos. Sugirieron que la transmisión de aislados responsables de neumonía en cerdos se producía de manera horizontal y no vertical, ya que hallaron patrones REA prevalentes en diferentes animales dentro de las fases de engorde y en pulmones de matadero pero que eran diferentes a los patrones hallados fases de producción, como en las parideras y en la fase de cría (Zhao *et al.*, 1992).

Mediante la tipificación de los aislados es posible, además, determinar las relaciones genéticas entre los aislados, así como el grado de diversidad genética que presenta este microorganismo (Hunt *et al.*, 2000). Mediante PFGE, por ejemplo, se ha podido discriminar entre aislados de serotipo similar causantes de septicemia hemorrágica, distinguiendo claramente las cepas de tipo capsular B en Asia, muy homogéneas genéticamente, de las de Norte América (Townsend *et al.*, 1997a). En brotes de pasterelosis neumónica y sistémica en cerdos se ha utilizado REA y ribotipado para determinar la relación genética entre los aislados (Blackall *et al.*, 2000), demostrando que en cada proceso pueden estar implicadas una o varias cepas de *P. multocida.* La combinación de la técnica FAGE y el ribotipado constataron, de nuevo, la homogeneidad que presentaban los aislados que producían septicemia hemorrágica en ganado bovino, además

de demostrar una asociación entre ciertas cepas y la localización geográfica (Townsend *et al.*, 1997a). En el caso de las aves, generalmente, se ha descrito una elevada heterogenicidad genética, utilizando diversas técnicas como son el ribotipado (Carpenter *et al.*, 1991), además de destacarse que forman una población clonal (Wilson *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 1998).

Este tipo de estudios también pueden ser útiles para determinar la existencia de determinadas subpoblaciones y su asociación o no a determinados procesos clínicos. De este modo es posible, por ejemplo, desarrollar vacunas eficaces y específicas frente a ellas. Davies *et al.* (2003) caracterizaron aislados de *P. multocida* obtenidos de cerdos que presentaban diferentes procesos clínicos en función de su tipo capsular, presencia de PMT y perfil de proteínas externas de membrana (OmpH y OmpA). Estos autores observaron que la mayoría de los casos de neumonía en cerdos estaban asociados a los aislados no toxigénicos, de tipo capsular A fundamentalmente, de unos pocos tipos Omp específicos, y que eran diferentes a los aislados obtenidos de RAP, que eran además generalmente de tipo capsular D y poseían la PMT. Determinaron, por lo tanto, que unos pocos clones con características concretas eran los responsables de la mayoría de casos de enfermedad. Es decir, que distintas subpoblaciones causan diferentes procesos clínicos y pueden ser diferenciados por el perfil de Omps (Davies *et al.*, 2003a). En Argentina se demostró que las cepas se agrupaban según su origen, subespecie, tipo capsular y serotipo somático, utilizando las técnicas de ERIC-PCR Y PFGE (Leotta *et al.*, 2006a).

También se han encontrado asociaciones epidemiológicas entre determinados hospedadores con el tipo capsular y ciertos factores de virulencia, como, por ejemplo, entre el gen *tbpA* asociado a bovinos que presentaban septicemia hemorrágica o el gen *toxA* asociado el tipo capsular D y a procesos de RAP en cerdos (Ewers *et al.*, 2006). Incluso se ha reseñado que puedan existir cepas que presentan especificidad respecto al hospedador, ya que se han hallado patrones REP-PCR y AFLP únicos en determinadas especies de aves (Amonsin *et al.*, 2002).

Otro aspecto a tener en cuenta es el estudio y caracterización de las poblaciones aisladas en individuos aparentemente sanos para, de este modo, poder compararlas con las halladas en los casos clínicos determinando si existen características diferenciales entre ambas. Desafortunadamente son

pocos los estudios que existen a tal respecto. Muhairwa *et al.* (2001) estudiaron las distintas subespecies de *P. multocida* presentes en aves sanas y en las afectadas por cólera aviar y reseñaron que las subespecies *multocida* y *septica* se encontraba en animales tanto sanos como enfermos, mientras que la subespecie *gallicida* sólo se presentaba en individuos sanos. En ganado porcino se caracterizaron aislados obtenidos a partir de tonsilas de cerdos aparentemente sanos en Vietnam. La determinación del tipo capsular, biovar y presencia de PMT, combinados con la técnica de REP demostraron que existían poblaciones similares a las encontradas en animales enfermos, tanto en un brote de pasterelosis aguda en cerdos en Australia y en uno de cólera aviar en aves en Vietnam (Townsend *et al.*, 2000). En ganado porcino se caracterizaron aislados de *P. multocida* obtenidos de cerdos aparentemente sanos, determinándose que no eran ninguno del tipo capsular B ni presentaban la PMT, además de ser la mayoría del biovar 3 (Jamaludin *et al.*, 2005). Otro trabajo indicaba que establecer la diversidad genética que presentaban las poblaciones de *P. multocida* en cerdos asintomáticos y compararla con la de animales enfermos era de gran utilidad para determinar el papel primario o secundario de este agente (Davies *et al.*, 2004).

La evolución de las poblaciones a lo largo del tiempo es, también, objetivo de los estudios epidemiológicos. Por ejemplo, se ha observado que en ciertos países ha ido aumentando el porcentaje de aislados de tipo capsular D frente a los de tipo capsular A en casos de neumonía en cerdos. Así, un estudio indicaba que menos del 2% de aislados de neumonía eran de tipo capsular D en 1996 y sin embargo, eran de más del 33% en el año 2006 (Ross, 2006). También se han descrito casos de cepas persistentes en el tiempo. Así, en Dinamarca se realizó un estudio en aves que sugería que una cepa de *P. multocida* subsp. *multocida* afectaba a aves salvajes independientemente de la especie, origen geográfico, e incluso del año de aislamiento, habiendo permanecido, al menos, durante más de 7 años implicada en diferentes brotes (Pedersen *et al.*, 2003). Por otra parte, Christensen *et al.* (1998) señalaron la presencia de un mismo clon en dos brotes consecutivos en de *P. multocida* subsp. *multocida* en aves.

Asimismo se ha observado una importante evolución de las resistencias a antimicrobianos caracterizando los perfiles y genes de resistencia. Por ejemplo, en el estudio de Vera-Lizarazo *et al.* (2006) se determinó un incremento a lo

largo del tiempo de los patrones multirresistentes en *P. multocida* aislada de cerdos en España.

Los estudios de caracterización pueden ser útiles, además, para determinar diferencias o semejanzas entre las poblaciones según su origen geográfico. Gunardawana *et al.* (2000) encontraron una relación entre el origen geográfico y el perfil PFGE en aislados de *P. multocida* de aves en Australia y Townsend *et al.* (1997), combinando la técnica FAGE y el ribotipado, constataron la asociación entre ciertas cepas obtenidas a partir de ganado bovino y la localización geográfica. En Hungría, por ejemplo, se observó una especial prevalencia de *P. multocida* de tipo capsular A toxigénico en determinadas regiones (Varga *et al.*, 2007). Sin embargo, en otros trabajos no se ha encontrado correlación entre los perfiles genéticos y los hospedadores aviares con el área geográfica de origen utilizando AFLP, RAPD y REP-PCR, combinadas con la caracterización fenotípica (Huber *et al.*, 2002; Shivachandra *et al.*, 2007). Utilizando la técnica de REA, Kim y Nagaraja (1990) pudieron establecer similitudes y diferencias entre los hospedadores, fenotipo, ribotipo y localización geográfica, además de ser capaces de diferenciar aislados de campo frente a los vacunales (frente a cólera aviar).

En España, y según nuestros datos, únicamente existen dos estudios sobre caracterización molecular de *P. multocida*. En ganado porcino en el año 2002, Rubies *et al.* realizaron un trabajo en pulmones de cerdos obtenidos en matadero. Los aislados se caracterizaron en función de la presencia/ausencia de la PMT, determinación de tipo capsular, perfil de plásmidos y REA. Básicamente se clasificaron todos los aislados (n=218) como no toxigénicos, la mayoría de tipo capsular A (98%) y se obtuvieron 17 patrones REA diferentes y 6 perfiles de plásmidos (en los 81 aislados que los poseían). Estos autores reseñaron, además, que en el 75% de las granjas únicamente se detectaron 2-3 patrones REA, predominando claramente un patrón (Rubies *et al.*, 2002). Por otro lado, Vera-Lizarazo (2008) caracterizó aislados de pulmones neumónicos de cerdos procedentes de diferentes regiones geográficas. En esta ocasión se clasificó casi la totalidad de los aislados como tipo capsular A, presentando un 19% la PMT, además de distinguirse 3 biovares (2, 3 y 13) y diferentes patrones de resistencia antimicrobiana. Respecto a la caracterización molecular se utilizó la técnica de PFGE mediante la que se obtuvo un grado de diversidad genética

de 0,31, encontrando, también, patrones genéticos prevalentes (Vera-Lizarazo, 2008).

Como se puede observar, son muchos los ejemplos que existen sobre la utilidad de la caracterización de *P. multocida*, suministrando una valiosa información que puede ser empleada para ampliar el conocimiento sobre este agente y generar estrategias que permitan controlar las distintas enfermedades producidas por las diferentes variedades de esta bacteria.

Por otro lado, siempre es importante tener en cuenta los métodos fenotípicos y moleculares utilizados para dicha caracterización, así como el número de aislados analizados y el del tipo de muestreo utilizado, ya que los resultados comparados pueden resultar sesgados (Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Rubies *et al.*, 2002).

1.9. Patogenicidad.

P. multocida produce numerosas enfermedades en un amplio rango de especies animales, afectando a mamíferos y aves (tanto domésticos como salvajes) en todo el mundo, provocando en muchos casos importantes pérdidas económicas (Rhoades y Rimler, 1987; De Alwis, 1992; Brickell *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003c; Woo y Kim, 2006). Como ya se indicó anteriormente, se trata de una especie bacteriana muy heterogénea, con una enorme variación respecto al hospedador al que afecta, patogenicidad y especificidad de antígenos (Carter y Chengappa, 1981).

Se considera que *P. multocida* tiene un papel primario en los procesos de septicemia hemorrágica en ganado bovino y búfalo (Carter y De Alwis, 1989) y en RAP en cerdos (Chanter y Rutter, 1989). En el caso de las aves, esta bacteria es la responsable del cólera aviar (Carter, 1984; Rimler y Glisson, 1997; Petersen *et al.*, 2001), aunque algunos autores sugieren que su papel es meramente secundario (Rhoades y Rimler, 1990a; Davies *et al.*, 2003b). En el caso del desarrollo de afecciones respiratorias sí parece claro su papel como patógeno oportunista, provocando, por ejemplo, neumonía en cerdos (Pijoan *et al.*, 1984; Pijoan, 2006), en bovinos y ovinos (Gilmour, 1978; Biberstein, 1990) y en conejos (DeLong y Manning, 1994).

Además, *P. multocida* es la mayor causa de infecciones de etiología bacteriana producidas por mordedura de animales en humanos (Arons *et al.*, 1982; Westling *et al.*, 2006).

A continuación se detallan tanto los posibles factores asociados a virulencia, como los diferentes procesos patológicos que este microorganismo puede producir.

1.9.1. Factores de virulencia.

Son muchos los factores estudiados que pueden estar implicados en la virulencia de *P. multocida* (Adler *et al.*, 1999; Harper *et al.*, 2006; Al-Hasani *et al.*, 2007). En algunos casos como, por ejemplo, el de la toxina dermonecrótica (PMT, *Pasteurella multocida toxin*), está completamente demostrada su implicación en el desarrollo de enfermedad (RAP), mientras que en otros muchos factores no está clara la función que éstos cumplen en el desarrollo de las diferentes patologías que puede producir *P. multocida*. Se ha tratado de elucidar la asociación de alguno de los factores de virulencia con una población determinada de *P. multocida*, es decir, con un determinado tipo capsular, biovar, serotipo, con un tipo concreto de cuadro clínico, etc. Por el momento, y como se detallará más adelante, sólo parece demostrarse una asociación entre la PMT con el tipo capsular D y los procesos de RAP en el cerdo, así como la presencia del gen *tbpA,* que codifica la proteína de unión a la transferrina TbpA, y los procesos de septicemia hemorrágica en ganado bovino causados por los tipos capsulares B y E (Ewers *et al.*, 2006).

A continuación se describirán algunos de los factores que parecen estar implicados en la virulencia de este microorganismo, a pesar de que en la mayoría de los casos no se ha demostrado claramente su función.

1.9.1.1. Cápsula

La cápsula de *P. multocida* parece ser un factor de virulencia importante. En términos generales en las bacterias las cepas que tienen cápsula son más virulentas que las variantes acapsuladas (Snipes *et al.*, 1987; Tsuji y Matsumoto, 1989; Jacques *et al.*, 1993), como se ha demostrado, por ejemplo, en *H. influenzae* (Moxon *et al.*, 1984; Roche y Moxon, 1995) o en *Staphylococcus*

aureus (Lee *et al.*, 1987a; Lee *et al.*, 1987b; O'Riordan y Lee, 2004). En *P. multocida* este hecho se ha evidenciado mediante diferentes estudios en los que se ha observado que los aislados acapsulados pierden virulencia (Rosenbusch y Merchant, 1939; Penn y Nagy, 1974; Donham, 1991). Así, se ha demostrado que mutantes acapsulados de los tipos capsulares A y B muestran una menor virulencia una vez inoculados en ratones y en pollos (Boyce *et al.*, 2000; Boyce y Adler, 2000; Chung *et al.*, 2001). Además, ensayos realizados con aislados de tipo capsular D toxigénicos han demostrado que las variantes no capsuladas son menos virulentas para ratones (Jacques *et al.*, 1993). Sin embargo, también se ha demostrado que cepas capsuladas pueden ser poco virulentas (Brogden *et al.*, 1978; Matsumoto y Strain, 1993) y que cepas sin cápsula pueden presentar una virulencia considerable (Matsumoto y Strain, 1993), indicando que existen más factores, además de la cápsula, implicados en la virulencia de esta bacteria.

Como ya se indicó anteriormente (Apartado 1.3.), existen 5 variedades capsulares de *P. multocida* (A, B, D, E y F), que se diferencian en su composición y, en algunos casos, en su especificidad enfermedad/hospedador. En general, la cápsula de *P. multocida* está compuesta por carbohidratos y, a pesar de que se desconoce con exactitud la composición de la cápsula de cada uno de los distintos tipos, sí se han puesto en evidencia algunas características diferenciales entre ellos. La cápsula de tipo A está formada en gran parte por ácido hialurónico, responsable del aspecto mucoso de las colonias (Maheswaran y Thies, 1979; Rosner *et al.*, 1992). La cápsula de tipo D parece contener heparina y la de tipo F condroitin sulfato (Pandit y Smith, 1993; Rimler, 1994; DeAngelis y Padgett-McCue, 2000). El tipo capsular B contiene arabinosa, manosa y galactosa, entre otros monosacáridos, pero se desconoce su estructura (Muniandy *et al.*, 1992; Townsend *et al.*, 2001), mientras que aún se desconoce la composición de la cápsula de tipo E.

La cápsula tiene un papel importante en la resistencia de los microorganismos a la fagocitosis (Harmon *et al.*, 1991; Rimler *et al.*, 1995; Boyce y Adler, 2000). Esta actividad se ha puesto en evidencia especialmente en el tipo capsular A, en el que se ha demostrado que inhibe la actividad fagocítica de los neutrófilos y de los leucocitos polimorfonucleares bovinos, y que, probablemente, sea el ácido hialurónico el responsable de ello (Heddleston *et al.*, 1975; Maheswaran y Thies, 1979; Zhao *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 2001). También se ha comprobado que al eliminar la cápsula de los tipos D y F se

aumenta la fagocitosis de las bacterias por neutrófilos porcinos (Rimler *et al.*, 1995). Además, experimentos con aislados de tipo capsular A demostraron que la resistencia al suero (concretamente a la lisis mediada por el complemento) se relacionaba con la posesión de cápsula (Snipes y Hirsh, 1986; Hansen y Hirsh, 1989; Chung *et al.*, 2001), al igual que ocurre en otras bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* (Hansen y Hirsh, 1989; DeAngelis y Padgett-McCue, 2000), a pesar de que hay autores que no encuentran diferencias en variantes con y sin cápsula (Boyce y Adler, 2000).

Además, la cápsula de *P. multocida* cumple otras muchas funciones. Una de ellas es la de favorecer la supervivencia del microorganismo en el medio ambiente y su transmisión al hospedador, entre otras razones porque confiere resistencia a la desecación (Boyce *et al.*, 2000).

La adherencia a la célula hospedadora parece variar en función del tipo capsular y del tipo de células, aunque la información encontrada en la literatura es contradictoria. Así, hay autores que indican que la adherencia del tipo A puede disminuir si se elimina la cápsula (Esslinger *et al.*, 1994; Pruimboom *et al.*, 1996), mientras que otros, sin embargo, destacan que se incrementa (Glorioso *et al.*, 1982), al igual que en el tipo D (Glorioso *et al.*, 1982; Jacques *et al.*, 1993; Jacques *et al.*, 1994).

En cuanto a la capacidad de inducción de una respuesta inmunoprotectora que puede conferir la cápsula, es un tema que continúa en estudio (Boyce *et al.*, 2000). Por el momento se ha demostrado que la vacunación de pollos con altas dosis de mutantes acapsulados estimulan la inmunidad protectora y que cepas acapsuladas son capaces de producir protección frente a cepas capsuladas (Chung *et al.*, 2005).

1.9.1.2. Toxina dermonecrótica (PMT).

Se han realizado muchos estudios sobre la PMT de *P. multocida.* Esto es, sin duda, debido a que se ha demostrado que se trata del factor de virulencia que juega un papel fundamental en el desarrollo de la RAP en el cerdo, ya que únicamente las cepas toxigénicas de *P. multocida* están implicadas en el desarrollo de dicha enfermedad (Rutter, 1985). Así, se ha puesto de manifiesto experimentalmente que la inoculación intranasal con sobrenadante de cultivo de *P. multocida* toxigénica libres de células da lugar a una atrofia de los

cornetes nasales en conejos y cerdos (Rutter y Mackenzie, 1984; Dominick y Rimler, 1986).

Además de en ganado porcino, se han aislado cepas toxigénicas de *P. multocida* en otras especies animales como vacas, cabras, conejos, gatos, hombres, perros, pavos, etc., tanto en individuos asintomáticos como con diferentes patologías (de Jong, 1980; Kielstein, 1986; Nielsen *et al.*, 1986; Rimler y Brogden, 1986).

Esta toxina la producen, principalmente, los aislados de *P. multocida* de tipo capsular D, con menor frecuencia los aislados de tipo capsular A, y en raras ocasiones se ha evidenciado la presencia de la misma en aislados acapsulados (Chanter *et al.*, 1986; Rimler y Brogden, 1986; de Jong, 2006). Algunos estudios indican un cambio en la relevancia de cepas toxigénicas de tipo capsular A, siendo éstas cada vez más frecuentes (Lariviere *et al.*, 1992; Sakano *et al.*, 1992b; Fussing *et al.*, 1999; Choi y Chae, 2001). Sin embargo, no se ha demostrado una relación entre la producción de dicha toxina y el serotipo (Rimler y Brogden, 1986), ni con el biovar (Jamaludin *et al.*, 2005).

El gen que codifica la PMT fue aislado y caracterizado por Petersen y Fodged (1989), siendo denominado *toxA* (Cheville y Rimler, 1989). Ha sido secuenciado, clonado y expresado en *E. coli* (Chanter *et al.*, 1986; Chanter *et al.*, 1989; Kamps *et al.*, 1990; Lax *et al.*, 1990; Lax y Chanter, 1990). Se ha demostrado que su contenido en C + G es bajo comparado con el del genoma de *P. multocida* lo que, entre otras razones, sugiere una transferencia horizontal del mismo (Lax *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 1994; May *et al.*, 2001). Además, se ha puesto de manifiesto que se transporta por medio de un fago lisogénico (Pullinger *et al.*, 2004).

Se evidenció que esta toxina era de naturaleza proteica, tenía un peso molecular de 112-160 KDa y contenía 2-8% de carbohidratos (Nakai *et al.*, 1984; Kamp *et al.*, 1987). Dicha toxina es producida en la fase estacionaria de cultivo y parece que es liberada en la lisis celular, situándose en el citoplasma de la célula hospedadora (Nakai *et al.*, 1985; iDali *et al.*, 1991).

No se conocen bien los dominios funcionales y mecanismos de acción de la PMT, aunque se han realizado algunos estudios tratando de identificarlos y caracterizarlos (Petersen, 1990; Pullinger *et al.*, 2001; Busch *et al.*, 2001; Lax y Grigoriadis, 2001). Así, por ejemplo, se ha podido demostrar que existe una

cisteína en el residuo C-terminal que es fundamental para la actividad toxigénica, ya que si ésta muta se pierde la toxicidad (Abdullahi *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1998b; Busch *et al.*, 2001).

Los efectos que produce la PMT sí son sobradamente conocidos. Así, se ha demostrado que es un potente mitógeno para diferentes tipos celulares, incluidos fibroblastos y osteoblastos (Abdullahi *et al.*, 1989; Rozengurt *et al.*, 1990; Dudet *et al.*, 1996; Mullan y Lax, 1996; Ward *et al.*, 1998b; Busch *et al.*, 2001), que estimula la resorción del hueso, activando a los osteoblastos y que, finalmente, produce su rotura por los osteoclastos (Kimman *et al.*, 1987; Felix *et al.*, 1992; Sterner-Kock *et al.*, 1995; Mullan y Lax, 1996; Gwaltney *et al.*, 1997). Por lo tanto, en los procesos de RAP es el factor responsable de la pérdida de hueso en los cornetes nasales, y del acortamiento y ladeado de la jeta (Switzer y Farrington, 1975; Rutter y Mackenzie, 1984; Chanter *et al.*, 1986). Cuando se reproducen de forma experimental infecciones con y sin cepas toxigénicas la importancia de esta toxina para el desarrollo de esta patología se manifiesta claramente (Elling y Pedersen, 1985; Rutter, 1985).

Considerando otros aspectos importantes, PMT es muy tóxica para todo tipo de animales, letal para ratón, rata, cobaya, pavo y cerdo, y causante de lesiones dermonecróticas en piel de ratón y cobaya cuando se realiza su inoculación por vía intradérmica (Nakai *et al.*, 1984; Lax y Grigoriadis, 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que dicha toxina es un inmunógeno efectivo, realizando inoculaciones experimentales en ratones (Petersen *et al.*, 1991). Además, la PMT genéticamente modificada, produce protección en cerdos (Petersen *et al.*, 1991; To *et al.*, 2005), siendo el toxoide generalmente incluido en las vacunas frente a la RAP en producción porcina, demostrando ser efectivas en el control de esta enfermedad.

Respecto a la prevalencia de cepas toxigénicas ésta varía mucho dependiendo del tipo capsular de *P. multocida*, de la especie hospedadora, el sistema productivo, el estado vacunal, la localización geográfica, etc. (Kielstein, 1986; Nielsen *et al.*, 1986; Iwamatsu y Sawada, 1988; Rhoades y Rimler, 1990c; Fussing *et al.*, 1999). Así, por ejemplo, en Australia su prevalencia es muy baja (2%) (Gardner *et al.*, 1989), mientras que en otros países como Canadá, la frecuencia de aislados toxigénicos puede variar en cada granja, oscilando desde un 18% a un 100% (Lariviere *et al.*, 1992). En España la prevalencia de estas cepas suele ser muy baja debido, probablemente, al control de la RAP mediante

vacunaciones y eutanasia, aunque de vez en cuando aparecen brotes agudos que deben ser notificados, ya que es una enfermedad de declaración obligatoria (OIE, 2007).

1.9.1.3. Proteínas de exterior de membrana.

Las proteínas de exterior de membrana (OMPs, *Outer Membran Proteins*) están presentes en muchas bacterias Gram negativas, desarrollando una función primordial en las interacciones patógeno-hospedador (Hancock *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2002). Muchas de ellas poseen actividad porina, formando canales transmembrana, controlando el paso dentro de la bacteria de pequeñas moléculas hidrofílicas, y sirviendo también de receptores para bacteriófagos y bacteriocinas (Jap y Walian, 1990; Jap y Walian, 1996; Klebba y Newton, 1998). Las porinas son muy inmunogénicas, exponen sus epítopos en la superficie celular y, generalmente, están conservadas en las especies y familias bacterianas (Jeanteur *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 1994). Además, están implicadas en la adhesión inespecífica, inmunomodulación, secreción de citoquinas, cambios en el citoesqueleto y en la quimiotaxis de neutrófilos (Lubke *et al.*, 1994; Ruffolo y Adler, 1996; Galdiero *et al.*, 1998; Iovane *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1999; Ewers *et al.*, 2004).

No se conoce bien el papel que desarrollan las OMPs de *P. multocida* en la patogenicidad. Probablemente esté asociado con la virulencia, interactuando con el sistema inmune del hospedador (Rimler y Rhoades, 1989b; Hunt *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2000).

Existen indicios que sugieren que la expresión de muchas de estas proteínas se produce únicamente *in vivo* (Ikeda y Hirsh, 1988; Choi *et al.*, 1989) y que ésta está influenciada por la presencia de hierro (Snipes *et al.*, 1988b; Zhao *et al.*, 1995; Bosch *et al.*, 2004).

Actualmente la caracterización de estas proteínas se considera muy útil en investigaciones epidemiológicas. Se han identificado y caracterizado diferentes Omps de *P. multocida* de distintos tipos capsulares y serotipos, como, por ejemplo, en los tipos capsulares A, D, B y E (Johnson *et al.*, 1991; Ireland *et al.*, 1991; Vasfi *et al.*, 1996; Vasfi *et al.*, 1997).

Algunas de las OMPs más estudiadas son:

-**OmpH**, proteína principal porina de 37,5 kDa (Lugtenberg *et al.*, 1984; Vasfi *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997; Vasfi y Mittal, 1997; Luo *et al.*, 1999). La proteína OmpH se ha purificado y caracterizado, evidenciando ser muy parecida a las porinas de otras bacterias Gram negativas (Lugtenberg *et al.*, 1986; Chevalier *et al.*, 1993). El gen que codifica esta proteína se denominó *ompH,* y fue clonado y secuenciado por Luo *et al.* (1997). Se ha demostrado que la proteína OmpH está muy conservada en los distintos serotipos de *P. multocida* (Luo *et al.*, 1999).

-**Oma87**, esta proteína de 87kDa fue expresada en *E. coli* y secuenciada en 1996 (Ruffolo y Adler, 1996). Está localizada en la superficie celular, se expresa *in vivo* y está presente en todos los serotipos de *P. multocida* (Ruffolo y Adler, 1996). Es homóloga a la proteína D15, antígeno protector de superficie de *H. influenzae* (Lugtenberg *et al.*, 1986; Ruffolo y Adler, 1996; Loosmore *et al.*, 1997).

-**Psl (P6)**, es una porina de exterior de membrana de 16-kD muy similar a la proteína P6 de *H. influenzae* (Kasten *et al.*, 1995). El gen que la codifica fue clonado y caracterizado por Kasten *et al.* (1997) y se le denominó *psl.* La proteína Psl está conservada y está presente en todos los serotipos de *P. multocida* (Kasten *et al.*, 1995). Se sabe que la proteína P6 de *H. influenzae* produce una respuesta inmunitaria en modelos animales de diferentes enfermedades (meningitis, otitis media) de humanos (Munson, Jr. y Granoff, 1985; Green *et al.*, 1993).

1.9.1.4. Factores relacionados con la adquisición de hierro.

Normalmente el hierro no está disponible en su forma libre en el hospedador, ya que al poseer toxicidad inherente suele estar unido a diferentes proteínas (lactoferrina, transferrina, compuestos hemo, etc.). Por otra parte, el hierro es un factor esencial para el crecimiento de *P. multocida,* por lo que este microorganismo debe contar con mecanismos eficaces para capturar y utilizar este elemento mediante diferentes estrategias, al igual que hacen otras bacterias patógenas que secuestran el hierro. La secuenciación del genoma completo de un aislado de *P. multocida* ha demostrado que una gran parte del genoma (más del 2,5%) codificaba para, al menos, 53 proteínas que presentaban similaridad con proteínas implicadas en la adquisición y absorción de hierro (May *et al.*, 2001). Se ha demostrado que bajo restricción de hierro

libre, *P. multocida* es capaz de sintetizar componentes para adquirir este elemento de una manera eficiente (Flossmann *et al.*, 1985). Uno de ellos es un sideróforo, molécula de bajo peso molecular, quelante de hierro denominada "multocidina" (Flossmann *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1986). Otro método de captación de hierro es el realizado a través de las proteínas de exterior de membrana, que se unen a glicoproteínas, como la transferrina o la lactoferrina, logrando de esta manera internalizar el hierro (Cox *et al.*, 2003). Además, existen ciertas proteínas bacterianas que se unen a la hemoglobina y a complejos de la misma, utilizando el grupo hemo como fuente de hierro (Cox *et al.*, 2003). Los tipos capsulares B y E de *P. multocida* que afectan a ganado bovino son capaces de unirse a la transferrina y a la hemoglobina (Veken *et al.*, 1994), pero los de tipo A (aviares) únicamente a hemoglobina (Ogunnariwo *et al.*, 1991; Cox *et al.*, 2003). El grupo hemo y la hemoglobina son, por lo tanto, la mayor fuente de hierro para la multiplicación de *P. multocida in vivo* (Cox *et al.*, 2003).

La captación y el transporte del hierro están mediados por el **sistema TonB**, en el que se requiere los productos que codifican los genes ***exbB***, ***exbD*** y ***tonB***, que aporta energía para la translocación del hierro a través de la membrana (Braun, 1995; Wandersman y Stojiljkovic, 2000; Bosch *et al.*, 2002a). Al unirse moléculas que contienen hierro se produce un cambio conformacional en receptores externos de membrana permitiendo la internalización de las mismas (Ratledge y Dover, 2000). Los genes *exbB, exbD* y *tonB* contribuyen a la infección por *P. multocida*, transcribiéndose cada uno de forma independiente, estando su expresión regulada a través de los niveles de hierro (Braun, 1995; Bosch *et al.*, 2002a). Se han determinado diferencias en la adquisición de hierro dependiendo del serotipo (Fuller *et al.*, 2000) e incluso diferencias dentro del mismo serotipo (Veken *et al.*, 1994; Veken *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha demostrado que en *P. multocida* los mutantes en los genes del sistema TonB son menos virulentos (Bosch *et al.*, 2002a), al igual que ocurre en otras especies bacterianas (Jarosik *et al.*, 1994; Pradel *et al.*, 2000).

Las **proteínas de unión a la hemoglobina** son las denominadas HgbA y HgbB, codificadas por los genes ***hgbA*** y ***hgbB***, respectivamente, y cuya expresión está regulada por el hierro (Bosch *et al.*, 2002b). Ninguna de ellas juega, aparentemente, papel alguno en la virulencia, pero sí en la supervivencia y en el crecimiento de *P. multocida* (Bosch *et al.*, 2002b; Cox *et al.*, 2003). La

proteína HgbA está ampliamente distribuida en aislados de diversas especies animales, y está presente en todos los serotipos (Bosch *et al.*, 2002b), por lo que también se ha sugerido su determinación como método de diagnóstico para la detección de este microorganismo. La proteína HgbB es una proteína de membrana externa dependiente del sistema TonB, homóloga a una proteína de *H. influenzae* que presenta actividad de unión a hemoglobina y al complejo hemoglobina-haptoglobina (Jin *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 1999; May *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2003). Dicha proteína fue clonada y caracterizada en *P. multocida* de tipo capsular A de origen aviar (Cox *et al.*, 2003). Se ha observado que el gen *hgbB* está conservado en muchas cepas aviares y bovinas (Cox *et al.*, 2003).

En cuanto a la existencia de **proteínas de unión a la transferrina** en esta especie bacteriana sólo se ha descrito hasta ahora una, denominda **TbpA**, cuando normalmente son dos (Tbp1 y Tbp2) en los miembros de las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae*. Además no posee una gran homología con ninguna de ellas (Gray-Owen y Schryvers, 1996; Ogunnariwo y Schryvers, 2001). Se trata de una proteína transmembrana, homóloga a proteínas receptoras de sideróforos que median el transporte de hierro a través de la membrana externa, dependiente de la energía que proporciona el sistema TonB (Gray-Owen *et al.*, 1995; Ogunnariwo y Schryvers, 2001). La proteína TbpA no está presente en todas las cepas de *P. multocida,* sólo se ha detectado en algunos aislados de muestras clínicas de bovinos, búfalos, ovinos y caprinos (Ewers *et al.*, 2006). Se ha especulado que el gen *tbpA* pueda ser un factor de virulencia importante en procesos respiratorios de ovinos y bovinos (Ogunnariwo y Schryvers, 2001) y en especial en la patogénesis de la septicemia hemorrágica (Ewers *et al.*, 2006).

1.9.1.5. Adhesinas.

La colonización de los tejidos del hospedador por las bacterias Gram negativas es facilitada por varios tipos de adhesinas, una de las cuales es la **fimbria tipo 4** (pili), de naturaleza proteica (Heckels, 1989; Strom y Lory, 1993). Las fimbrias son apéndices largos y filamentosos clásicamente asociadas a la patogenicidad y a la colonización de superficies epiteliales del hospedador (Heckels, 1989; Virji *et al.*, 1992; Virji *et al.*, 1993; Tennent y Mattick, 1994). La expresión de este tipo de fimbrias se ve incrementada en condiciones de

microaerofilia, lo que podría significar que facilitaría el acoplamiento a superficies mucosas del hospedador *in vivo* (Ruffolo *et al.*, 1997). En *P. multocida* la fimbria tipo 4, codificada por el gen ***ptfA*** (Doughty *et al.*, 2000), es un factor importante en la adhesión a células del epitelio del tracto respiratorio superior (Glorioso *et al.*, 1982). En un principio su presencia fue demostrada únicamente en algunas cepas aisladas de cerdos con RAP (Isaacson y Trigo, 1995). Más tarde, PtfA fue identificada, purificada y caracterizada por Ruffolo *et al.* (1997) en diferentes tipos capsulares (A, B y D). Asimismo se ha demostrado su presencia en variantes capsuladas y acapsuladas (Rebers *et al.*, 1988; Isaacson y Trigo, 1995).

Otro tipo de adhesina es la **hemaglutinina filamentosa PfhA,** codificada por el gen *pfhA.* Posee una estructura similar a la hemaglutinina de *Bordetella pertussis,* que desarrolla una función importante en la colonización del tracto respiratorio, favoreciendo la adhesión a su epitelio (Kimura *et al.*, 1990; Mooi *et al.*, 1992), hecho que también se ha sugerido en el caso de *P. multocida* (Tatum y Briggs, 2005). Mutaciones del gen *pfhA* en *P. multocida* ocasionan una disminución significativa en la virulencia (Fuller *et al.*, 2000). Se ha indicado que *pfhA* podría conferir resistencia al suero al ser similar a la proteína P76 de *Haemophilus somnus*, en el que ha sido demostrado dicho efecto (Cole *et al.*, 1993), aunque no todos los autores están de acuerdo (Tatum y Briggs, 2005). Ewers *et al.* (2006) demostraron que el gen *pfhA* estaba presente en el 100% de los aislados de tipo capsular B y E, aproximadamente en la mitad de los aislados de tipo capsular A y F, y en raras ocasiones en el tipo capsular D (4,8%). Además, estos autores destacaron una asociación significativa entre el cuadro clínico (septicemia hemorrágica) y la posesión de este gen en bóvidos.

1.9.1.6. Neuraminidasas.

Los genes ***nanH y nanB*** codifican para dos sialidasas (NanH y NanB, respectivamente), cuya función es liberar el ácido siálico de diferentes compuestos del hospedador como, por ejemplo, glicoproteínas y glicolípidos para, de este modo, utilizarlos como fuente de carbono (Mizan *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 2006). Además participan en la virulencia ya que descubren receptores de las células de las membranas mucosas del hospedador y/o reducen las defensas del mismo (Corfield, 1992; Sanchez *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2006). La presencia de ambas sialidasas puede aumentar la capacidad

infectiva de *P. multocida*, ya que tienen diferencias en especificidad hacia el sustrato y distinto rango de pH, lo que les permite adherirse e invadir diferentes hospedadores (que poseen distintos tipos de mucosa) y tejidos con gran eficacia (Mizan *et al.*, 2000). La mayoría de los aislados de *P. multocida* producen ambas sialidasas, estando conservadas y ampliamente distribuidas en todos los serotipos (Scharmann *et al.*, 1970; Drzeniek *et al.*, 1972; White *et al.*, 1995; Mizan *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2004). Se ha evidenciado su presencia en los tipos capsulares A, B, D y E (Schimmel y Sachse, 1993). En otros organismos las neuraminidasas se han asociado a la virulencia (Drzeniek *et al.*, 1972), pero esta función no está clara en *P. multocida* (Muller y Krasemann, 1974; Rimler y Glisson, 1997; Mizan *et al.*, 2000).

1.9.1.7. Superoxidodismutasas.

Los genes ***sodA*** y ***sodC*** codifican para dos proteínas superoxido-dismutasas de exterior de membrana, SodA y SodC, respectivamente. Existen indicios de que éstas juegan un papel en la interacción de la bacteria con el hospedador, protegiéndola de los radicales libres de oxígeno y contribuyendo, por lo tanto, al desarrollo de enfermedad (Kroll *et al.*, 1995). Las secuencias del gen *sodA* presentan una mayor divergencia que los genes del ARNr 16S correspondientes entre especies, por lo que su utilización como diana puede ser un buen método de diagnóstico para diferenciar especies relacionadas (Gautier *et al.*, 2005).

1.9.1.8. Otros factores.

Otros factores asociados a la virulencia son: hialuronidasas, presentes en aislados de tipo capsular B de septicemia hemorrágica en ganado bovino (Carter y Chengappa, 1980); plásmidos, algunos de los cuales están relacionados con la resistencia a antimicrobianos (Hirsh *et al.*, 1985; Cote *et al.*, 1991; Rosenau *et al.*, 1991; Chaslus-Dancla *et al.*, 1995) y lipopolisacáridos, implicados en la inflamación y posterior shock endotóxico (Ferri *et al.*, 2002).

1.9.2. Patologías en diferentes especies animales.

1.9.2.1. Aves.

En aves *P. multocida* produce **cólera aviar**, enfermedad muy frecuente, que afecta a aves salvajes y domésticas y que tiene una importancia económica mundial (Rimler y Glisson, 1997; Christensen y Bisgaard, 2000). Esta enfermedad ha sido reconocida y asociada a las aves desde hace más de 200 años (Samuel *et al.*, 2006). Desde entonces se han reseñado brotes en una gran variedad de especies aviares y en distintos lugares del mundo (Gray, 1913; Friend, 1999; OIE, 2004; Samuel *et al.*, 2006). Se trata de la enfermedad infecciosa más importante en aves acuáticas en Norte América (Friend, 1999), causando la muerte de miles de animales cuando se producen brotes importantes (Price y Brand, 1984; Friend, 1999; Samuel *et al.*, 2006). En España esta enfermedad no supone un problema grave, ya que ha sido desplazada por la implantación de medidas higiénico-sanitarias y terapéuticas, aunque de vez en cuando aparezcan brotes agudos (Perea, 2005).

El cólera aviar es causado por diferentes tipos capsulares y somáticos de *P. multocida* (Rhoades y Rimler, 1990b), aunque en la mayoría de los casos agudos de enfermedad están implicados aislados de tipo capsular A y serotipo 1 (Wilson *et al.*, 1993; Rimler y Glisson, 1997; Shivachandra *et al.*, 2005). Tampoco es inusual hallar aislados de tipo capsular F y, en ocasiones, de tipo capsular D (en algunos casos toxigénicos), tipo capsular B y aislados no tipables (Carter, 1967; Rhoades y Rimler, 1987; Rhoades *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 2003b; Shivachandra *et al.*, 2005). Además, también es frecuente aislar los serotipos 3, 4 y 3,4 (Ireland *et al.*, 1989; Blackall *et al.*, 1998; Gunawardana *et al.*, 2000). Respecto a los biovares en los que se han clasificado los aislados aviares de *P. multocida,* únicamente se han realizado estudios en Australia, siendo el biovar 3 el más frecuente y estando implicados muchos otros con menor frecuencia (1, 2, 5, 8, etc.), lo que determina una elevada diversidad (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1998).

La subespecie *multocida* es la más prevalente de las tres subespecies descritas en los aislados de aves, mientras que las subespecies *septica* y *gallicida* se aislan con mucha menor frecuencia (Snipes *et al.*, 1990; Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1995).

La mayoría de autores destacan una elevada heterogenicidad genética en los aislados obtenidos de aves (Blackall *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2001; Muhairwa *et al.*, 2001b; Amonsin *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2004; Shivachandra *et al.*, 2007), aunque se ha especulado que, en ocasiones, sólo unos pocos clones son los causantes de la mayoría de los casos de enfermedad (Pedersen *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2003b; Davies *et al.*, 2004), e incluso que hay ciertos clones que presentan especificidad hacia una especie hospedadora (Amonsin *et al.*, 2002).

La epidemiología de la enfermedad es bastante compleja, dependiendo la gravedad de la misma de numerosos factores como la especie de ave hospedadora, su edad y línea genética, estado sanitario (estrés, otras enfermedades concomitantes, inmunosupresión), factores de manejo (densidad animal, cambios bruscos de temperatura, etc.), además de la cepa bacteriana y factores ambientales (Christensen y Bisgaard, 1997; Muhairwa *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2003).

Se presenta generalmente como una enfermedad hiperaguda que cursa con bacteriemia generalizada, de alta morbilidad y mortalidad, pero, también, con forma crónica y síntomas clínicos y lesiones relacionadas con infecciones localizadas (OIE, 2004). Al parecer, las aves portadoras (domésticas y salvajes) juegan un papel fundamental en la transmisión y en el mantenimiento de esta enfermedad, habiéndose demostrado que *P. multocida* se encuentra en la mucosa de faringe, tráquea y cloaca de animales asintomáticos (Curtis y Ollerhead, 1981; Samuel *et al.*, 1997; Muhairwa *et al.*, 2000; Glisson *et al.*, 2003). Además, parece ser que las aves migratorias pueden extender la enfermedad, transmitiendo la bacteria a las aves domésticas (Christensen *et al.*, 1998). Se pueden afectar todas las especies de aves, aunque los pavos son especialmente susceptibles (Rhoades y Rimler, 1990b; Matsumoto *et al.*, 1991).

La forma de transmisión más frecuente es mediante el contacto directo ave-ave, aunque el agente puede distribuirse, además, por medio de jaulas, sacos de comida, zapatos y equipo, por ejemplo (Rhoades y Rimler, 1993). Esta enfermedad parece que no se transmite, sin embargo, a través del huevo (Boyce *et al.*, 2004). El canibalismo es también, una importante vía de transmisión, ya que esta bacteria puede estar presente en muchos tejidos de las aves muertas (Friend, 1999; Samuel *et al.*, 2006). Cuando se presenta un brote, el medioambiente, especialmente el agua, actúa como fuente de contaminación, sobre todo en poblaciones densas (Wobeser, 1992; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996;

Botzler, 2002). Además, en condiciones favorables, *P. multocida* sobrevive durante largos periodos de tiempo en sedimentos, especialmente pantanosos (Price y Brand, 1984; Backstrand y Botzler, 1986; Botzler, 1991).

1.9.2.2. Ganado bovino.

La **septicemia hemorrágica** producida por *P. multocida* es una enfermedad grave que afecta principalmente al ganado bovino y al búfalo (Bain *et al.*, 1982). Se trata de un proceso endémico en muchos lugares de Asia, siendo considerada como una de las patologías económicamente más importantes en la producción animal en el sudeste asiático (Townsend *et al.*, 1997a). También está presente en muchas regiones de África (Carter y De Alwis, 1989). En Europa se han descrito algunos brotes pero, excepto en Italia, no hay notificación oficial que lo confirme (OIE, 2005). En España no hay datos sobre la existencia de esta enfermedad.

La septicemia hemorrágica fue descrita por primera vez por Bollinger en 1878. En esta enfermedad están implicados únicamente los tipos capsulares B y E, serotipo 2 en ambos casos, de *P. multocida subsp. multocida,* aunque, en ocasiones, han sido asociados otros serotipos (Carter y De Alwis, 1989; Rhoades y Rimler, 1992; Rimler y Wilson, 1994; Rimler, 1996). Se han aislado cepas de tipo capsular B en Asia, África, Europa y, en raras ocasiones, en Norteamérica, mientras que el tipo capsular E se encuentra, únicamente, implicado en brotes en África central (Rimler, 1978). En Egipto se han podido encontrar ambos serotipos (Shigidi y Mustafa, 1979). En general, se ha destacado la existencia de una marcada homogeneidad genética en los aislados de casos de septicemia hemorrágica (Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; Townsend *et al.*, 1997a; Townsend *et al.*, 1997b; Dabo *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2004).

Se han encontrado diferencias en la susceptibilidad entre distintas especies animales, siendo los búfalos los más susceptibles (De Alwis y Vipulasiri, 1980; De Alwis *et al.*, 1990; De Alwis, 1992). En otras especies animales, como el cerdo, se han descrito ocasionalmente brotes en diferentes países (Bain, 1963; Murty y Kaushik, 1965; Bain *et al.*, 1982; Verma y Saxena, 1987; OIE, 2005). Además existen menciones de esta enfermedad en cabras (De Alwis, 1992), elefantes (De Alwis y Thambithurai, 1965; De Alwis, 1982; Wickremasuriya y Kenderagama, 1982), bisontes (Carter, 1982), caballos y

burros (Pavri y Apte, 1967) mientras que los perros, pollos y patos parecen ser resistentes (Bain *et al.*, 1982).

En esta enfermedad *P. multocida* actúa como patógeno primario (De Alwis, 1992), produciendo bacteriemia aguda (Roberts, 1947; Bain, 1963). Se considera que la principal vía de transmisión es el contacto directo entre animales (OIE, 2005). En regiones endémicas los animales portadores suelen ser la fuente de infección al ser introducidos en un rebaño libre de esta enfermedad (Mohan *et al.*, 1968; Wijewanta y Karunaratne, 1968; Carter y De Alwis, 1989; De Alwis *et al.*, 1990). Las condiciones de elevada temperatura y humedad que se producen durante los monzones en Asia son óptimas para la supervivencia de este microorganismo, siendo por ello frecuentes los brotes en estas épocas (De Alwis, 1992).

1.9.2.3. Conejos.

P. multocida afecta también a los conejos, produciendo abcesos y mastitis (Rideau *et al.*, 1992), y representando el patógeno respiratorio más importante en aquellos animales empleados en laboratorio (Manning, 1982). La pasterelosis que se produce en estos animales es muy contagiosa, afectando principalmente, al tracto respiratorio superior, pudiendo causar la muerte del animal (DeLong y Manning, 1994). En la mayoría de las ocasiones se aislan cepas de tipo capsular A o D (DeLong y Manning, 1994) y, a veces, de tipo capsular F (Jaglic *et al.*, 2008).

1.9.2.4. Humanos.

La pasterelosis es considerada como una enfermedad zoonótica, aunque generalmente las consecuencias no son graves para el hombre (Weber *et al.*, 1984; Felix *et al.*, 2003; O'Neill *et al.*, 2005; Iaria y Cascio, 2007). No se ha demostrado que la infección pueda transmitirse de un humano a otro, ni que el agua y/o alimentos puedan ser fuentes de infección (Weber *et al.*, 1984). Lo más frecuente es que las infecciones se produzcan a consecuencia de mordiscos y/o arañazos de perros y, sobre todo, de gatos, pero también de otros animales como ratas, leones, panteras, conejos, etc. (Hubbert y Rosen, 1970; Weber *et al.*, 1984). También se ha descrito la infección mediante el mero lamido de mascotas en piel dañada o aparentemente intacta (Raffi *et al.*, 1987; Rollof *et*

al., 1992), inhalación del agente o, incluso, sin contacto aparente con animales (Johnson y Rumans, 1977; Weber *et al.*, 1984; Kumar *et al.*, 1990). Estos procesos son causados por las subespecies *multocida* y *septica,* ya que son las que se encuentran con mayor frecuencia en mucosas de perros y gatos (Hirsh *et al.*, 1990; Ganiere *et al.*, 1993; Mohan *et al.*, 1997; Muhairwa *et al.*, 2001b). Se ha estimado que el 66% de los perros y el 90% de los gatos son portadores de este microorganismo, por lo que no es de extrañar que tras un mordisco/arañazo de estos animales se produzca la infección de la herida y, normalmente, la formación de abcesos que se pueden llegar a complicar, dando lugar a tenosinovitis, artritis, osteomielitis, celulitis, etc. (Weber *et al.*, 1984). En pacientes inmunodeprimidos, *P. multocida* actúa como patógeno oportunista y puede llegar a producir infecciones graves. En pacientes con alteraciones respiratorias, el microorganismo coloniza el pulmón, pudiendo producir neumonía, empiema y abcesos pulmonares (Weber *et al.*, 1984). En último caso se pueden producir septicemias graves, normalmente en pacientes que presentan disfunción hepática y, en general, inmunodeprimidos (recién nacidos, ancianos, enfermos de SIDA…), dando lugar, entre otros procesos, a peritonitis, endocarditis, abcesos en cerebro y meningitis (Weber *et al.*, 1984).

Por otra parte, se ha sugerido que la colonización y/o infección del tracto respiratorio en el hombre por *P. multocida* pueda ser debida a la exposición al ganado porcino (Avril *et al.*, 1990; Donnio *et al.*, 1991; Donnio *et al.*, 1999), siendo habitual encontrar portadores de *P. multocida* entre personas en contacto con cerdos con y sin PMT (Avril *et al.*, 1990). Por lo tanto, las personas en contacto con estos animales (operarios, veterinarios, ganaderos, etc.) y, especialmente, las que tienen alguna enfermedad pulmonar o inmunosupresión de algún tipo, son las más susceptibles a padecer algún tipo de pasterelosis. Además, los aislados toxigénicos rara vez son aislados de las complicaciones de mordiscos y arañazos (Donnio *et al.*, 1991; Holst *et al.*, 1992).

1.9.2.5. Ganado porcino.

P. multocida afecta al sector ganadero porcino de cría intensiva industrial, estando ampliamente distribuida por todo el mundo y siendo responsable de significativas pérdidas económicas (Blackall *et al.*, 2000; Pijoan, 2006; Fuentes, 2009).

Este microorganismo está implicado como agente etiológico en dos importantes patologías porcinas, la RAP y los procesos neumónicos, produciendo ocasionalmente cuadros clínicos sistémicos (Chanter y Rutter, 1989; Zhao *et al.*, 1992; Townsend *et al.*, 1998b; Rubies *et al.*, 2002; Pijoan, 2006).

1.9.2.5.1. Procesos neumónicos.

Las enfermedades respiratorias son los problemas sanitarios más comúnmente observados en cualquier parte del mundo donde se explote el cerdo, especialmente en las áreas de finalización en los sistemas de producción intensivos (Bochev, 2007; Ramis *et al.*, 2009; Fuentes, 2009). *P. multocida* parece cumplir un papel destacado en el desarrollo de neumonías, a pesar de que la mayoría de autores indica que actúa de manera oportunista (Pijoan *et al.*, 1983; Pijoan *et al.*, 1984; Zhao *et al.*, 1992; Pijoan, 2006; Ross, 2006). La pasterelosis neumónica es, de hecho, una de las enfermedades más comunes y que generan más pérdidas económicas en la cría intensiva del ganado porcino (Pijoan, 2006). Estas pérdidas económicas vendrían ocasionadas por una elevada mortalidad, deficiente ganancia de peso, mala conversión alimenticia, aumento en el número de días en los que los cerdos llegan a matadero, excesivo gasto en medicamentos y alto número de decomisos en matadero (Fuentes, 2009).

- **Epidemiología**

La epidemiología de *P. multocida* aún no está totalmente definida. Este organismo está presente en prácticamente todas las piaras, pudiendo ser aislado de las fosas nasales y de las tonsilas de individuos sanos (Townsend *et al.*, 2000; Palzer *et al.*, 2008). Además, dicha bacteria se aisla frecuentemente de pulmones neumónicos (Morrison *et al.*, 1985; Pijoan y Fuentes, 1987; Hoie *et al.*, 1991) y de sanos (Hoie *et al.*, 1991). Debido a que pueden existir diferencias entre las cepas de *Pasteurella* se considera necesario realizar una caracterización de las mismas, para, de este modo, discriminar las cepas individualmente y así poder dilucidar si existen diferencias entre las mismas y en su virulencia (Rubies *et al.*, 2002).

Pese a que la ruta más probable de infección es la vía directa oronasal (Baekbo y Nielsen, 1988; Zhao *et al.*, 1993; Pijoan, 2006), también se ha

descrito la transmisión de *P. multocida* mediante aerosoles, aunque su importancia parece ser relativa (Thomson *et al.*, 1992). Además, la transmisión también puede producirse de forma vertical (Pijoan, 2006). Las fuentes externas del organismo incluyen ratones y roedores (Rosen, 1975). Los pollos también han sido descritos como posibles reservorios, aunque, actualmente, el contacto entre ambas especies animales no es muy probable debido a los modernos sistemas de producción, al menos en los países desarrollados (Rosen, 1975; Pijoan, 2006).

P. multocida raramente se aisla en pureza de pulmones que presentan neumonía, siendo frecuente el que se combine con otros agentes bacterianos y/o víricos formando parte del denominado complejo respiratorio porcino (CRP) (Gois *et al.*, 1975; Morrison *et al.*, 1985; Straw, 1986; Halbur, 1996; Marco, 2009). Este complejo es el resultado no sólo de la acción de una variedad de agentes infecciosos, sino que incluye también otros factores, como son el medio ambiente, manejo, factores genéticos, etc. (Thacker, 1997; Bochev, 2007; Marco, 2009). Por ejemplo, la elevada densidad de población porcina en un ambiente cerrado facilita la transmisión aérea de patógenos entre distintas naves de las granjas (Donham, 1991) y dentro de las mismas (Flori *et al.*, 1995). Además, los cerdos en las granjas de cría intensiva generalmente son reagrupados y mezclados, sufriendo altos niveles de estrés y, por ello, desarrollando un estado de inmunosupresión temporal, lo que facilita también la adquisición y propagación de enfermedades (Sørenson *et al.*, 2006; Fuentes, 2009). Las condiciones inadecuadas de higiene, manejo y ambientales pueden afectar en gran medida al estado sanitario de los animales, hecho que también predispone a los cerdos al desarrollo de problemas respiratorios (Thacker y Thanawongnuwech, 2002; Bochev, 2007). A pesar de ser considerado un patógeno secundario, *P. multocida* es uno de los agentes implicados en el CRP que se aisla con más frecuencia, siendo en muchas ocasiones la bacteria mayoritaria (Buttenschon y Rosendal, 1990; Von Altrock A., 1998).

En la mayoría de los casos se ven implicadas cepas de tipo capsular A (Pijoan *et al.*, 1984; Buttenschon y Rosendal, 1990; Vena *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2001), lo que podría explicarse debido a que la cápsula de ácido hialurónico presente en los aislados de este tipo dificulta la fagocitosis por macrófagos alveolares (Maheswaran y Thies, 1979; Pijoan y Trigo, 1990; Zhao *et al.*, 1992). Además existen estudios, realizados mediante técnicas de adherencia *in vitro*,

que señalan una mayor afinidad del tipo capsular A por células pulmonares porcinas que el tipo capsular D (Vena *et al.*, 1991). A pesar de ello, no es infrecuente encontrar cepas de tipo capsular D implicadas en este tipo de procesos (Schimmel y Erler, 1991), existiendo indicios de que dicho tipo capsular puede colonizar el tracto respiratorio superior, pero no puede sobrevivir en pulmón y causar daño en este órgano (Pijoan y Trigo, 1990). Así, a pesar de que, de manera general, exista una mayor proporción de aislados de tipo capsular A frente a los de tipo capsular D, obtenidos de casos de neumonía, existen variaciones según el país y el estudio. Por ejemplo, en Dinamarca todos los aislados de pulmones neumónicos fueron clasificados dentro del tipo capsular A (Fussing *et al.*, 1999); en Brasil el 92% de las cepas de pulmón fueron asignadas al tipo capsular A y el resto al tipo capsular D (Moreno *et al.*, 2003); en Corea el 87% de los aislados de neumonía en cerdos se clasificaron en el tipo capsular A, 4% en el tipo capsular D y el resto fueron no tipables (Choi *et al.*, 2001); en USA Zhao *et al.* (1992) destacaron que el 97,2% de los aislados neumónicos eran de tipo capsular A y en otro trabajo el grupo de Pijoan (1984), indicó que este porcentaje era del 87,5%, siendo el resto de aislados de tipo capsular D en ambos casos; en Inglaterra y Gales se encontró un 75% de los aislados de tipo capsular A, un 23% de tipo capsular D, un 1% de tipo F y un 1% de aislados no tipables (Davies *et al.*, 2003a); en Alemania, sin embargo, llamó la atención una proporción similar de ambos tipos capsulares en los casos de neumonía (Ewers *et al.*, 2006). Por último, en España, Rubies *et al.* (2002) destacaron que en pulmones con lesiones neumónicas obtenidos en matadero casi la totalidad de los aislados pertenecían al tipo capsular A, siendo únicamente un 2% del tipo capsular D, al igual que en el estudio de Vera-Lizarazo (2008), en el que el 99% de los aislados también neumónicos eran de tipo capsular A.

En casos agudos de neumonía raramente está implicado el tipo capsular B (Pijoan, 2006) ni el tipo capsular F (Davies *et al.*, 2003a).

Por otra parte, las cepas de *P. multocida* implicadas en procesos neumónicos generalmente carecen de la PMT (Pijoan *et al.*, 1983; Pijoan *et al.*, 1984; Zhao *et al.*, 1992; Rubies *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003a). A pesar de ello, no es extraño encontrar en estos procesos la presencia de cepas toxigénicas, tanto del tipo A como del tipo D (Lariviere *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1993; Djordjevic *et al.*, 1998; Rubies *et al.*, 2002). Pijoan *et al.*

(1984), describieron esta tendencia general, ya que de los aislados de pulmones neumónicos sólo un 26% presentaban la PMT (la mayoría de tipo capsular D). En Corea se demostró que más del 85% de los aislados implicados en neumonía carecían de la PMT (Choi *et al.*, 2001). Zhao *et al.* (1992), encontraron en USA un porcentaje muy escaso de cepas toxigénicas (13%) en neumonía en cerdos (todas de tipo capsular D). En Brasil, Moreno *et al.* (2003), encontraron sólo un aislado toxigénico de las 59 cepas de pulmón estudiadas. En España, Rubies *et al.* (2002), describieron que de 218 aislados obtenidos de pulmones, ninguno presentó la PMT, mientras que Vera-Lizarazo (2008) halló un porcentaje del 20% de aislados toxigénicos.

Los estudios publicados sobre las subespecies y los biovares de *P. multocida* asociadas a ganado porcino son muy escasos. Además, en muchos de estos trabajos no se especifica si los aislados de *P. multocida* se han obtenido de animales sanos o enfermos, o no diferencian los que provienen de casos de neumonía y/o de RAP. A pesar de ello, se pueden extraer algunas conclusiones de estos trabajos. La subespecie que se aisla con mayor frecuencia, al igual que en las demás especies animales, es *multocida*, en ocasiones *gallicida* y rara vez *septica* (Blackall *et al.*, 1997; Jamaludin *et al.*, 2005; Leotta *et al.*, 2006b). También, al igual que ocurre en las demás especies animales, el biovar 3 es el que tiene mayor representación en cerdos, seguido del 2 y, en ocasiones, del 8 y el 12, siendo el resto de los biovares aislados de manera mucho menos frecuente (Blackall *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Jamaludin *et al.*, 2005; Leotta *et al.*, 2006b). Como ejemplo se puede destacar un trabajo realizado en 150 aislados de *P. multocida* obtenidos de cerdos en Australia, en el que la gran mayoría de las cepas fueron clasificadas en la subespecie *multocida* (91%) y el 9% restante en la subespecie *gallicida*. Además, estos aislados se clasificaron en 7 biovares diferentes, representando el biovar 3 la gran mayoría (67%) (Blackall *et al.*, 1997).

Los escasos estudios de tipado genético que incluyen aislados procedentes de cerdos con neumonía señalan una elevada heterogenicidad genética (Djordjevic *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2003), aunque, en ocasiones en poblaciones cerradas, estos procesos son causados por una cepa epidémica (Zhao *et al.*, 1992; Blackall *et al.*, 2000).

- **Patogénesis**

El papel primario de *P. multocida* como agente etiológico de este tipo de procesos es ampliamente discutido. La mayoría de los autores señalan que *P. multocida* necesitaría una infección primaria causada por otros microorganismos (Pijoan y Ochoa, 1978; Pijoan y Fuentes, 1986; Fuentes y Pijoan, 1987; Ciprian *et al.*, 1988). Parece que en condiciones normales las defensas del animal (aparato mucociliar y macrófagos alveolares, principalmente) son capaces de controlar la invasión por *P. multocida* (Thacker, 1997). Sólo cuando se produce una alteración del sistema respiratorio se puede producir una invasión activa por este microorganismo (Thacker, 1997; Boyce *et al.*, 2004). La combinación de infecciones víricas y bacterianas, inmunodepresión (estrés) y otros factores ambientales (Collier, 1968; Carter, 1973), predisponen, por lo tanto, al desarrollo de la pasterelosis neumónica. El daño previo del pulmón puede deberse a agentes químicos como, por ejemplo, elevados niveles de amoniaco (Neumann *et al.*, 1987a; Neumann *et al.*, 1987b) y/o a la invasión previa por otros microorganismos, como ya se indicó anteriormente (Pijoan y Fuentes, 1986; Fuentes y Pijoan, 1987; Ciprian *et al.*, 1988). Entre estos agentes destaca *Mycoplasma hyopneumoniae* (Ciprian *et al.*, 1988; Amass *et al.*, 1994; Brockmeier *et al.*, 2001; Palzer *et al.*, 2008), virus de la *Pseudorrabia* (Fuentes y Pijoan, 1986; Fuentes y Pijoan, 1987; Carvalho *et al.*, 1997), virus de la *Influenza Porcina* (Sørenson *et al.*, 2006), virus de la *Peste Porcina Clásica* (Pijoan y Ochoa, 1978; Pijoan *et al.*, 1980), adenovirus (Kasza *et al.*, 1969), virus de *Aujeszky* (Ciprian *et al.*, 1988) y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Palzer *et al.*, 2008). En el caso de *M. hyopneumoniae* se ha demostrado que este agente produce necrosis de cilios (Zielinski y Ross, 1993) y que este daño es el que facilita la invasión posterior por *P. multocida* (Ross, 1999). En el caso de la infección por el virus del *Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino* existe controversia, ya que no se ha determinado claramente que dicho virus predisponga a la infección por *P. multocida* (Carvalho *et al.*, 1997; Brockmeier *et al.*, 2001).

- **Signos clínicos**

La sintomatología producida en por *P. multocida* es variable, dependiendo, fundamentalmente, del tipo capsular que lo produce y del estado sanitario del animal. Así, la forma clínica aguda está principalmente asociada a las cepas de tipo capsular B, es poco frecuente, y nunca se ha descrito en

Europa ni Norteamérica (Murty y Kaushik, 1965; De Alwis, 1992; Townsend *et al.*, 1998b). Los animales presentan disnea, respiración dificultosa, contracciones repentinas del abdomen, postración y fiebre alta (más de 42,2º C), oscilando la mortalidad entre el 5% y el 40% (Pijoan, 2006). La forma subaguda está asociada con las cepas que producen pleuritis, que generalmente son de tipo capsular A no toxigénicas (Djordjevic *et al.*, 1998). Clínicamente esta forma de enfermedad es muy similar a la pleuroneumonía causada por *A. pleuropneumoniae*, aunque raramente desemboca en muerte repentina (Pijoan, 2006). Sin embargo, la forma crónica es la más común, formando parte de síndrome del CRP. Afecta normalmente a los animales en las últimas etapas de cría o en la entrada a cebo (16 a 22 semanas) (Pijoan, 2006). Se caracteriza por tos ocasional, disnea, pedaleo, retraso en el crecimiento, malabsorción y fiebre baja o inexistente, aunque muchas veces cursa de forma asintomática (Thacker *et al.*, 2001). La muerte es muy poco común y, cuando sucede, es consecuencia de un choque endotóxico y de un fallo respiratorio (Pijoan, 2006). Sin embargo, se pueden observar con cierta frecuencia alteraciones en los índices productivos (disminución en la ganancia diaria media de peso, aumento en los índices de conversión, desigualdad en el tamaño y peso de los animales, etc.) (Pijoan, 2006; Bochev, 2007).

- **Lesiones**

Las lesiones provocadas se limitan a la cavidad torácica y son similares a la mayoría de neumonías de origen bacteriano. En muchas ocasiones las lesiones están superpuestas a aquellas producidas por *M. hyopneumoniae* (neumonía enzoótica) (Pijoan, 2006; Bochev, 2007).

Por regla general se observa una consolidación anteroventral del pulmón (Figura 2), con espuma en la tráquea, y en ocasiones se producen adhesiones, abcesos y pericarditis (Chanter y Rutter, 1989; Pijoan, 2006). Existe una clara línea de demarcación entre el tejido sano y el tejido afectado, que presenta una decoloración que va desde el rojo al verde grisáceo, dependiendo del curso de la infección (Ross, 1999; Pijoan, 2006).

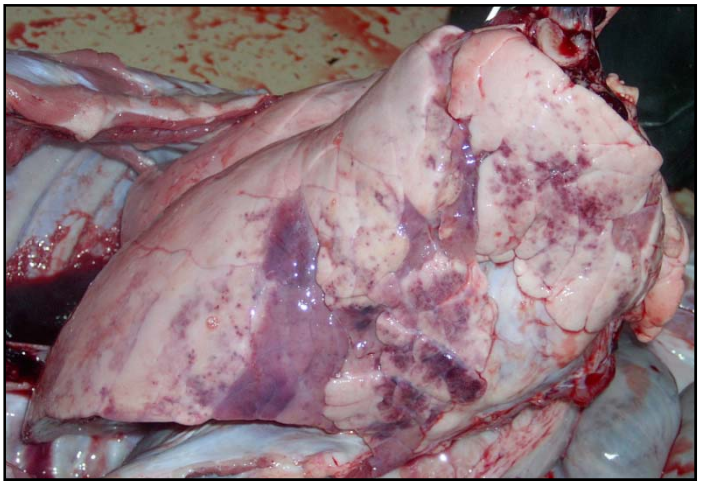

Figura 2. Pulmón de cerdo consolidado.

Las adherencias pleurales a la pared torácica son muy comunes y la pleura presenta un aspecto translúcido y seco. La observación de esta lesión es útil para distinguir la pasterelosis de la pleuroneumonía causada por *A. pleuropneumoniae* en la que la pleura presenta un aspecto húmedo, con adherencias amarillentas e infiltrados masivos de fibrina (Pijoan, 2006; Taylor, 2006).

Histológicamente se observa una bronconeumonía exudativa lobular, con infiltración de neutrófilos polimorfonucleares en bronquios, bronquiolos y alveolos, además de acompañarse de pérdida de epitelio y establecimiento de fibrina (Pijoan, 2006).

- **Diagnóstico**

Al no ser las lesiones causadas por *P. multocida* patognomónicas no se pueden utilizar como único criterio para establecer un diagnóstico. Por lo tanto, se debe tener en cuenta la sintomatología, la historia clínica (brotes, compra de animales, alteraciones en el manejo, etc.) y confirmar el diagnóstico mediante el aislamiento del organismo (Pijoan, 2006; Taylor, 2006; Bochev, 2008).

El diagnóstico diferencial ha de incluir: *virus Influenza*, *A. pleuropneumoniae, B. bronchiseptica, Salmonella cholerasuis* e infecciones por *M. hyopneumoniae,* entre otros.

- **Tratamiento**

El tratamiento de las infecciones por *P. multocida* con antimicrobianos es normalmente dificultoso o infructuoso. Esto es debido, por un lado, a la dificultad para alcanzar una concentración adecuada de antimicrobiano en un pulmón con consolidación y, por otro, a la distribución y diseminación de resistencias bacterianas, que han condicionado la prohibición del uso de ciertos compuestos en la cría del cerdo (Pijoan, 2006; Ferri *et al.*, 2002).

P. multocida es susceptible *in vitro* a muchos antimicrobianos (Gutiérrez-Martín y Rodríguez-Ferri, 1993), aunque, se citó anteriormente, cada vez con más frecuencia aparece un mayor número de resistencias, estando incluso bien documentada la existencia de cepas multirresistentes (Chang y Carter, 1976; Yamamoto *et al.*, 1990; Vera-Lizarazo *et al.*, 2006). En España, por ejemplo, se han incrementado las resistencias a ciertos tipos de sulfamidas y oxitetraciclina (Vera-Lizarazo *et al.*, 2006), siendo recomendado el uso de ceftiofur, florfenicol, y enrofloxacina para el tratamiento de infecciones causadas por *P. multocida* subsp. *multocida* en ganado porcino (Gutiérrez-Martín y Rodríguez-Ferri, 1993). Además, los beta-lactámicos (penicilina y ampicilina) suelen demostrar también buena actividad frente a *P. multocida* en diferentes países (Raemdonck *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1995). En la práctica se suelen formular combinaciones de distintos antimicrobianos que son administrados de forma parenteral o con el alimento (Bousquet *et al.*, 1998; Ferri *et al.*, 2002).

- **Prevención**

La gran complejidad de los problemas respiratorios en el ganado porcino de cría intensiva complica la lucha frente a esta patología. La prevención es fundamental, ya que la terapia antimicrobiana es, normalmente, inefectiva y cuando es efectiva puede no resultar rentable. Normalmente lo más eficaz es aplicar cambios en el manejo, que suelen ir dirigidos a reducir los problemas respiratorios en general, sin atender a las diferentes etiologías (Pijoan, 2006; Sørenson *et al.*, 2006; Taylor, 2006; Bochev, 2008; Fuentes, 2009). Estos cambios deben dirigirse a modificar el ambiente que rodea a los cerdos y a reducir la posibilidad de propagación de las bacterias. Por lo tanto, se ha de mejorar la ventilación, controlar la emisión de gases (oxígeno, dióxido de carbono, amoniaco -orina y heces-, monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno -agitación de purines-, controlar la temperatura y la humedad (50-70%), reducir en lo posible el polvo (pienso y animales) y aplicar una adecuada limpieza y

desinfección (Pijoan, 2006; Sørenson *et al.*, 2006; Taylor, 2006; Bochev, 2008; Fuentes, 2009). La mayoría de los desinfectantes comunes son eficaces) (Straw, 1986; Thacker, 1997; Pijoan, 2006). Otras medidas adecuadas para el control de los procesos respiratorios son: destete precoz segregado (muy eficaz, probablemente porque consigue controlar las infecciones producidas por *M. hyopneumoniae,* impidiendo la transmisión vertical de madre a lechón, sistema todo dentro-todo fuera, producción en ciclo cerrado (en la que se minimiza la compra de animales), evaluación del estado sanitario de los cerdos antes de introducirlos en una nueva granja y someterlos a cuarentena, reducción de la mezcla y de la densidad de animales (disminuyendo, de esta manera, el estrés y la probabilidad de transmisión de la enfermedad), reducción del tamaño de los recintos y naves, etc. (Straw, 1986; Thacker, 1997; Pijoan, 2006).

Además de todas las medidas citadas anteriormente, se deben controlar también otros patógenos mediante vacunaciones y/o tratamientos profilácticos (Martínez y Prieto, 2007).

Debido a los problemas que tienen las vacunas existentes frente a la pasterelosis, el uso de vacunas comerciales no es muy efectiva (Pijoan, 2006). Por ejemplo, las fabricadas a partir de bacterinas sólo producen protección limitada frente a serotipos homólogos y las vacunas vivas atenuadas pueden resultar peligrosas, ya que en ocasiones revierte su virulencia (Heddleston y Rebers, 1968; Heddleston y Rebers, 1972; Heddleston y Rebers, 1974; Thurston *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 2003). Los estudios genéticos de identificación de nuevos inmunógenos y estudios de expresión de factores de virulencia *in vivo* en *P. multocida,* además de caracterizar los aislados de *P. multocida* tienen importancia en el desarrollo de vacunas eficaces (Adler *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 2000; Hunt *et al.*, 2001b; Al-Hasani *et al.*, 2007).

Por otro lado, debido a la gran diversidad genética que presenta esta bacteria, la aplicación de autovacunas (vacunas inactivadas elaboradas a partir de cepas aisladas de cada explotación) supone una alternativa razonable.

1.9.2.5.2. Rinitis atrófica progresiva (RAP).

- **Epidemiología**

Descrita inicialmente en Alemania (Franque, 1830), la RAP es una enfermedad muy importante en la cabaña ganadera porcina en todos los países

con cría intensiva (Jordan *et al.*, 2003; OIE, 2007). Esta patología rara vez produce la muerte, pero tiene un elevado impacto económico, ya que reduce significativamente el índice de crecimiento en los cerdos afectados (Switzer y Farrington, 1975; Runnels, 1982; Rutter, 1985; OIE, 2007).

Se trata de una enfermedad altamente contagiosa y de etiología multifactorial, comprendiendo componentes hereditarios nutricionales, medio ambientales y agentes infecciosos (*B. bronchiseptica* y *P. multocida*) (Switzer, 1956; Elias y Hamori, 1976; Giles *et al.*, 1980; Rutter, 1981; Runnels, 1982; Backstrom y Hoefling, 1982; Voets, 1982; Nielsen *et al.*, 1986). La forma más grave de la enfermedad la causan las cepas toxigénicas de *P. multocida*, combinadas o no con *B. bronchiseptica*, denominándose Rinitis Atrófica Progresiva (RAP), mientras que cuando *B. bronchiseptica* actúa sola, la enfermedad se denomina Rinitis Atrófica No Progresiva (RANP) (de Jong, 2006). Los factores ambientales y de manejo pueden agravar la enfermedad (de Jong, 2006; OIE, 2007).

La capacidad de *P. multocida* de causar RAP está asociada a la producción de la PMT (Apartado 1. 9. 1. 2.). Así, está demostrado que las cepas que no producen la toxina no causan RAP (Pedersen y Barfod, 1981; Rutter y Rojas, 1982; Bowersock *et al.*, 1992), y sólo aquellas cepas capaces de producirla van a poder inducir la degeneración progresiva del tejido del cornete nasal (Eamens *et al.*, 1988; Djordjevic *et al.*, 1998), característica de la RAP. Además, como se citó anteriormente, el tipo capsular asociado a esta enfermedad es el tipo D (de Jong, 1980; Eamens *et al.*, 1988; Lariviere *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 2003a).

Los animales portadores que no desarrollan la enfermedad son un riesgo muy importante para el mantenimiento y la diseminación de la enfermedad, siendo frecuente la detección de animales portadores en granjas sin historial de enfermedad o con formas leves de la misma (Chanter y Rutter, 1989; Perea, 2005). Además, se ha aislado *P. multocida* toxigénica de ratas, ratones, conejos, terneros, perros, gatos y pavos (Kielstein, 1986; Nielsen *et al.*, 1986), representando estas especies animales, por lo tanto, también una posible fuente de transmisión. El contacto suele ser directo y el patógeno se transmite vía oronasal (Runnels, 1982; de Jong, 2006). En explotaciones libres se asocia la aparición de esta enfermedad a la compra de cerdos portadores (Perea, 2005; de Jong, 2006).

Los estudios de tipado genético destacan, por lo general, una elevada homogeneidad en las cepas causantes de RAP (Harel *et al.*, 1990; Djordjevic *et al.*, 1998; Fussing *et al.*, 1999). Esta limitada diversidad genética es más acusada en ciertos países como Australia, que ha estado libre de esta enfermedad hasta 1984, mientras que en EEUU y otros países de Europa esta enfermedad se ha diseminado durante más tiempo y existe, por lo tanto, mayor variabilidad (Gardner *et al.*, 1994).

- **Patogénesis**

Para que *P. multocida* colonice la mucosa nasal normalmente debe producirse un daño previo (Elling y Pedersen, 1985). Este daño lo pueden causar, por ejemplo, irritantes químicos (ácido acético) y otros patógenos como *B. bronchiseptica* (Perea, 2005). Estos factores inducen modificaciones en el epitelio nasal y en la producción de mucus, formando un ambiente idóneo para la colonización por *P. multocida* (Runnels, 1982; Gagne y Martineau-Doize, 1993; Perea, 2005; de Jong, 2006). Es entonces cuando se producen los efectos dañiños de la PMT, aunque se desconoce exactamente su mecanismo de acción (Perea, 2005). Se ha sugerido también que el efecto sobre la inmunomodulación que produce la PMT es muy importante para la virulencia (Jordan *et al.*, 2003). La gravedad de los procesos depende, además, de otros factores como la presencia de otros microorganismos y determinados factores ambientales (Runnels, 1982; Chanter y Rutter, 1989; Gagne y Martineau-Doize, 1993; Hamilton *et al.*, 1999; de Jong, 2006). Por ejemplo, la producción intensiva, el hacinamiento, una alta tasa de reposición, la mezcla de lotes, las condiciones ambientales (temperatura y humedad), el estrés, otros patógenos implicados, etc., pueden contribuir a la severidad del proceso (de Jong, 2006; OIE, 2007).

- **Síntomas**

El cerdo afectado por RAP presenta entre otros signos clínicos: estornudos, tos, deformación del hocico, atrofia de cornetes, desviación del tabique, exudado seroso (normalmente unilateral), que llega a ser mucopurulento y hemorrágico, obstrucciones de conductos lagrimales, fiebre, etc. (Chanter y Rutter, 1989; de Jong, 2006). En cursos crónicos se producen estriaciones de la jeta. Además se reduce la ganancia diaria de peso y se aumenta el índice de conversión, produciéndose retraso en el crecimiento de los animales (Chanter y Rutter, 1989).

- **Lesiones**

Las lesiones se caracterizan por el desarrollo de una rinitis con atrofia grave y no regenerativa (Chanter y Rutter, 1989; de Jong, 2006). La jeta se acorta y deforma, atrofiándose los cornetes nasales (de Jong, 2006) (Figuras 3 y 4). Si es muy grave la ingesta de alimento puede verse dificultada. Los principales cambios histológicos son la infiltración de neutrófilos polimorfonucleraes en los bronquios, bronquiolos y alvéolos, así como la pérdida del epitelio y la deposición de fibrina (Elling y Pedersen, 1985; Chanter y Rutter, 1989).

Figura. 3. Cerdo con RAP en el que puede apreciarse la desviación de la jeta. Foto cedida por Mateo del Pozo.

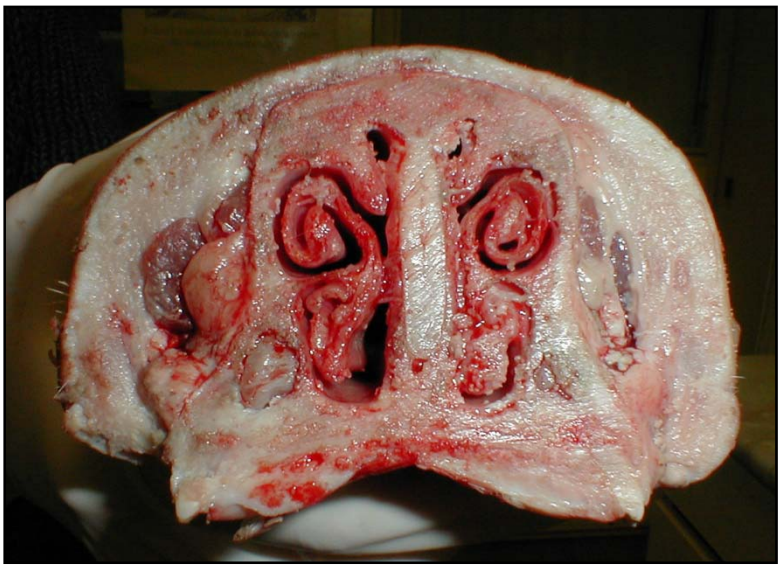

Figura. 4. Atrofia nasal de cornetes nasales típica de procesos de RAP en un corte transversal de la jeta. Foto cedida por Elena Vizcaíno.

- **Diagnóstico**

El diagnóstico clínico es sencillo pues los signos suelen ser evidentes. Además, se debe tener en cuenta el historial de la granja, considerando la entrada de nuevos animales y el movimiento de los mismos. Se ha de realizar un diagnóstico diferencial con la rinitis necrótica que produce *Fusobacterium necrophorum* junto con otros microorganismos. En dicha patología también se produce distorsión facial, pero al corte se revela normalmente una masa de tejido necrótico de mal olor (Perea, 2005).

La atrofia de cornetes se observa seccionando las jetas mediante un corte transversal en matadero o mediante el uso de radiografía y tomografía (Done, 1976), pudiéndose medir de manera subjetiva (Runnels, 1982) u objetiva (Gatlin *et al.*, 1996).

La diferenciación de cepas toxigénicas de las no toxigénicas es fundamental para el diagnóstico y el control de la RAP (OIE, 2007). El diagnóstico definitivo se realiza mediante la detección del agente etiológico, y/o de la PMT (OIE, 2007). Para detectar la PMT se han utilizado muchos tipos de ensayos siendo, actualmente, las técnicas ELISA y PCR las más extendidas, al tratarse de métodos rápidos, sensibles, específicos y no implicar el uso de animales de laboratorio, entre otras razones (Foged *et al.*, 1988; Weber *et al.*,

1993; Nagai *et al.*, 1994; Lichtensteiger *et al.*, 1996; Kamp *et al.*, 1996; Donnio *et al.*, 1999; Choi y Chae, 2001).

- **Tratamiento**

Clásicamente se han utilizado antimicrobianos como la oxitetraciclina y las sulfonamidas para tratar esta enfermedad (Rutter, 1985; de Jong, 1999), aunque se puede utilizar una amplia variedad de los mismos, tales como penicilinas, gentamicina, cefalosporinas, eritromicina y kananmicina (Fales *et al.*, 1990).

- **Profilaxis**

Para prevenir la aparición y contagio de la enfermedad, al igual que ocurre en los procesos respiratorios, es fundamental el control de las medidas de manejo, pudiéndose aplicar las mismas que se citaron anteriormente (Apartado 1. 9. 2. 5. 1.)

Actualmente se vacuna de forma rutinaria en las granjas de cría intensiva de cerdos frente a los agentes que producen RAP. Así encontramos en el mercado diferentes vacunas en las que se suelen asociar anacultivos de *B. bronchiseptica* y toxoide de *P. multocida* acompañadas, o no, de anacultivos de este último microorganismo (de Jong, 2006). Es muy importante vacunar a las madres para que transmitan inmunidad pasivamente a lechones (calostro), que es la inmunidad más importante en lechones destetados (Perea, 2005; OIE, 2007). Cuando las madres no han sido vacunadas los lechones se vacunan a las 5-7 semanas de edad. Recientemente se ha desarrollado una vacuna modificada genéticamente con la que se han obtenido muy buenos resultados (To *et al.*, 2005).

Mediante todas las medidas citadas anteriormente, la detección y la eliminación de portadores, y manteniendo las vacunaciones se puede llegar a erradicar la RAP (Maes *et al.*, 2000; Stark, 2000).

1.9.2.5.3. Procesos septicémicos.

La septicemia producida por *P. multocida* es un proceso muy poco frecuente en cerdos (Verma, 1988; Mackie *et al.*, 1992; Townsend *et al.*, 1998b; Pijoan, 2006). Se han descrito algunos brotes de septicemia aguda producidos por aislados de tipo capsular B en la India (Murty y Kaushik, 1965; Pillai *et al.*,

1986; Verma y Saxena, 1987), en Sri Lanka (Gamage *et al.*, 1995) y en Vietnam (Townsend *et al.*, 1998a). Se ha sugerido que las cepas que producen septicemia en cerdos proceden del ganado vacuno (Townsend *et al.*, 1998a). En Australia, sin embargo, se han visto implicados el tipo capsular A (Cameron *et al.*, 1996) y el tipo capsular D no toxigénico (Mackie *et al.*, 1992).

En el caso del brote producido por el tipo capsular A la septicemia se asoció a una neumonía inicial causada por *P. multocida* subsp. *gallicida* (Cameron *et al.*, 1996; Mackie, 1996), de la que se derivó una bacteriemia generalizada (Dungworth, 1993). Esto es posible en condiciones que comprometen el sistema inmune del hospedador, como pueden ser estrés a una infección primaria o concurrente con otras bacterias o virus (Dungworth, 1993).

2. OBJETIVOS

Las patologías respiratorias son, actualmente, uno de los principales problemas sanitarios y económicos en los sistemas de cría intensiva de ganado porcino. En el CRP están implicados multitud de factores como son el manejo, la genética, diferentes patógenos (bacterias y virus) etc. Dentro de los agentes bacterianos, y a pesar de ser considerado un patógeno secundario, *P. multocida* se aisla con una elevada prevalencia siendo, en ocasiones, el agente mayoritario. Además, este microorganismo da lugar a los procesos de RAP (cepas toxigénicas) y, en ocasiones, a procesos septicémicos.

Considerando la relevancia que *P. multocida* tiene en el desarrollo de distintas enfermedades en el ganado porcino, y teniendo en cuenta que no son muchos los trabajos dedicados a su estudio, consideramos importante conocer las características de dicho microorganismo en la cabaña ganadera de nuestro país.

El objetivo global de la presente memoria de tesis doctoral fue el de caracterizar los aislados de *P. multocida* obtenidos a partir de diferentes muestras (principalmente de pulmón) de cerdos de diversas regiones de España.

Los objetivos concretos fueron los siguientes:

- Aislamiento e identificación de cepas de *P. multocida* a partir de lesiones neumónicas y de otras localizaciones orgánicas en el ganado porcino.
- Caracterización fenotípica de los aislados, incluyendo la determinación de la subespecie, el biovar y el tipo capsular.

- Determinación de la presencia/ausencia de determinados factores asociados a virulencia, incluyendo la PMT, genes asociados con la adquisición del hierro, proteínas de exterior de membrana, sialidasas, neuraminidasas y adhesinas.
- Caracterización genética de los aislados mediante PFGE y evaluación de la diversidad genética de los mismos.

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aislados de *P. multocida.*

En total se estudiaron **205 aislados** pertenecientes a la especie *P. multocida*, que fueron obtenidos a partir de muestras de diferentes órganos y tejidos de ganado porcino, recogidas en el curso de procedimientos de rutina diagnóstica en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras se clasificaron como neumónicas cuando procedían de pulmones que presentaban lesiones, septicémicas cuando procedían de órganos diferentes al pulmón (corazón, cerebro, ganglio, etc.) o cuando se hubieron obtenido de cualquiera de estos órganos y de pulmón y por último las procedentes de casos de RAP. El estudio se realizó entre los años 2001 y 2006 en 8 empresas productivas intensivas (47 explotaciones) de ganado porcino distribuidas en diferentes áreas geográficas de España.

En este estudio se incluyeron, además, diferentes **cepas de referencia**, todas pertenecientes a la especie *P. multocida* subspecie *multocida*, reflejadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas de referencia de *P. multocida* subsp. *multocida*.

Colección	Nomenclatura	Tipo capsular	PMT
NCTC (***National Collection of Type Cultures***)	10322 NCTC[T]	A	-
	10323 NCTC	B	-
	10324 NCTC	C (antiguo)	-
	10325 NCTC	D	-
	10326 NCTC	E	-
National Animal Disease Center	P4679	F	-
CECT **(Colección Española de Cultivos Tipo)**	4325 CECT	D	+

[T] Cepa tipo

3.2. Conservación de los aislados.

Para la conservación de los aislados se partía de cultivos puros de 48 horas de incubación en agar sangre. Todos los aislados fueron conservados en medio de congelación, por duplicado, a –20º C y –80º C.

El medio de congelación estaba compuesto por:

- 10 g de caldo triptona (Oxoid)
- 20 g de leche descremada en polvo
- 80 ml de glicerina (Panreac)
- 320 ml de agua destilada

Una vez disueltos los componentes por agitación, el medio se esterilizaba a 110º C durante 10 minutos y se distribuía en tubos estériles en volúmenes de 1,5 ml.

Cada aislado se identificaba mediante un número correlativo. A esta referencia le correspondía una clave compuesta por una combinación de letras y números. Esta clave se ha codificado siguiendo los criterios descritos a continuación.

Primera cifra: empresa (1-8). **Subíndice**: número de animal (orden cronológico). **Letra**: representando cada una de ellas una muestra diferente, tal y como se indica a continuación: P, pulmón; Z, corazón; T, tonsila; B, bazo; C, cerebro; F, líquido cefalorraquídeo; G, ganglio; A, líquido articular; X, líquido torácico y D, origen desconocido. **Dos últimas cifras**: año de aislamiento.

Ej: 3_2Z04, corresponde a un aislado obtenido del corazón del animal número 2 de la empresa productiva 3, obtenido en el año 2004.

3.3. Identificación de especie.

3.3.1. Identificación morfológica y bioquímica.

Para proceder a la identificación morfológica y bioquímica los aislados fueron descongelados y resembrados por agotamiento en Columbia agar sangre (Biomerieux). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37º C. Una vez obtenidos cultivos puros se procedía a su identificación. Ésta fue realizada en base a las características macroscópicas y microscópicas de las colonias (tinción de Gram), además de mediante las pruebas bioquímicas incluidas en la galería multisustrato API 20E (Biomerieux) y otras realizadas de manera convencional [catalasa, oxidasa, motilidad y crecimiento en agar McConckey (Biomerieux)].

3.3.2. Identificación molecular.

Se utilizó la técnica de PCR para confirmar que los aislados pertenecían a la especie *P. multocida.* En primer lugar se realizó la extracción de ADN hirviendo dos colonias en 100 µl de agua Mili-Q en un baño maría a 100º C durante 10 minutos. El extracto se conservó congelado a -20º C y se utilizó para todas las reacciones de PCR que se detallarán en los capítulos siguientes. Todos los cebadores fueron sintetizados por Roche Diagnosis.

Los cebadores utilizados en el caso de la PCR específica de especie, así como las condiciones de la misma fueron los descritos por Townsend *et al.* (1998). Se amplificó el fragmento KMT1, único en *P. multocida,* utilizando los iniciadores indicados en la Tabla 5, obteniéndose un producto de amplificación de 460 pb.

Tabla 5. Cebadores de PCR específica de especie.

Nombre cebador	Secuencia de cebadores (5´- 3´)
KMT1T7	ATCCGCTATTTACCCAGTGG
KMT1SP6	GCTGTAAACGAACTCGCCAC

Como control positivo se utilizó la cepa de referencia NCTC 10322.

La mezcla de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl. Las cantidades utilizadas se detallan en la Tabla 6, mientras que las condiciones de la reacción se describen en la Tabla 7.

Tabla 6. Volúmenes empleados en la PCR específica de especie.

Reactivos	Volumen
Agua bidestilada estéril (Sigma)	14,9 µl
Tampón 10X con $MgCl_2$ (25 mM)(Biotools)	2,5 µl
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (250 µl/10 mM) (Biotools)	0,5 µl
Cebadores (20 µM)	1 µl de cada uno
Taq DNA polimerasa (0.5 U) (Biotools)	0,1 µl
ADN extraído	5 µl
Total	**25 µl**

Tabla 7. Condiciones de PCR de especie *P. multocida*.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95° C	5 minutos
Desnaturalización	30ciclos	95° C	30 segundos
Hibridación		55° C	30 segundos
Elongación		72° C	30 segundos
Elongación final		72° C	10 minutos

Las amplificaciones se realizaron en todos los casos en un termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf). La visualización de los productos de PCR se efectuó en geles de agarosa al 2% en TAE 1x con bromuro de etidio (1 mg/ml) en transiluminador de luz ultravioleta. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los de 100 pb y 1 Kb (Biotools).

Cada amplificación realizada, además, incluyó un control negativo, que contenía todos los reactivos excepto el ADN problema, sustituyendo estos 5 µl con agua destilada estéril.

3.4. Identificación de subespecie.

La clasificación de los aislados en las diferentes subespecies (*P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *gallicida* y *P. multocida* subsp. *septica*) se realizó en base a las pruebas de acidificación del sorbitol y dulcitol (Mutters *et al.*, 1985a). La prueba del sorbitol está incluida en la galería multisustrato API 20E, pero debido a su importancia en la clasificación de las diferentes subespecies, se confirmó realizándola también de manera convencional, de la misma manera que el dulcitol. La preparación se realizó añadiendo en un litro de agua destilada 15 gramos de indicador Rojo Fenol (Difco) y 5 gramos del azúcar [sorbitol (Sigma) y dulcitol (Merck)]. Se dispensó en tubos de ensayo (5 ml), que se autoclavaron a 110º C durante 10 minutos. Cada tubo era inoculado con 2-3 gotas de una solución bacteriana densa y se incubó a 37º C. Los resultados fueron leídos a las 24 y 48 horas.

Según el patrón de acidificación de estos dos azúcares, los aislados se clasificaron en una de las tres subespecies, tal y como se describe en la Tabla 2 (Apartado 1.2.).

3.5. Determinación de biovar.

La determinación de los biovares de *P. multocida* se efectuó en base a los resultados obtenidos en las pruebas de acidificación del sorbitol y dulcitol, (Apartado 3.4.), además de las pruebas de utilización de la urea, acidificación de la maltosa, arabinosa, lactosa, trehalosa, xilosa, galactosa y la prueba de ODC (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997).

En la tira multisustrato API 20E (Biomerieux) se pudieron determinar la actividad ODC y la acidificación del sorbitol y de la arabinosa, así como la hidrólisis de la urea. La prueba de la ODC (Sigma), además, fue preparada de manera tradicional para proceder a su confirmación, ya que según bibliografía (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 2001b), y la experiencia propia, es una prueba clave para la clasificación de los aislados en los diferentes biovares. Los demás azúcares también fueron preparados en tubo de ensayo de manera convencional, de la misma manera que se detalló para el sorbitol y el dulcitol en el apartado 3. Estos azúcares fueron maltosa (Panreac), D (+) xylosa (Panreac), D (+) glucosa (Panreac), D (+) trehalosa (Sigma), lactosa (Panreac), y L (+) arabinosa (Calbiochem). La prueba ODC fue preparada

suspendiendo 9 gramos de caldo de ODC en un litro de agua destilada. Se dispensó en tubos de ensayo y se esterilizaron autoclavándolos a 121º C durante 15 minutos. Esta prueba se incubó en anaerobiosis y los resultados fueron leídos a las 24h, 48 h y a los 7 días.

Una vez realizadas todas las pruebas (patrón de utilización de azúcares, y producción de ureasa y ODC) se clasificó cada aislado en un biovar determinado, según se detalla en la Tabla 3 (Apartado 1.7.1.1.).

3.6. Determinación del tipo capsular.

La determinación de los tipos capsulares (A, B, D, E y F) se realizó en base a la técnica de PCR descrita por Townsend *et al.* (2001). La metodología fue similar a la descrita por estos autores pero con la variación de que en nuestro estudio fueron realizadas las técnicas de PCR de manera independiente, en lugar de una PCR múltiple, como indican en su trabajo. En todos los casos se incluyeron las cepas de referencia de los tipos capsulares para corroborar su especificidad. En la Tabla 8 se detallan genes, cebadores y tamaño de fragmentos de ADN amplificados (amplicones).

Tabla 8. Cebadores utilizados en las PCR de tipos capsulares de *P. multocida*.

Tipo capsular	Gen diana	Nombre cebador	Secuencia de cebadores (5´- 3´)	Tamaño amplicón (pb)
A	*hyaD-hyaC*	CAPA-FWD CAPA-REV	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1044
D	*bcbD*	CAPD-FWD CAPD-REV	TTACAAAAGAAAGACTAGAGACCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657
B	*dcbF*	CAPB-FWD CAPB-REV	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	760
E	*ecbJ*	CAPE-FWD CAPE-REV	TCCGCAGAAAATTATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511
F	*fcbD*	CAPF-FWD CAPF-REV	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851

Las cantidades de la mezcla de PCR fueron las mismas que las que se utilizaron en la PCR de especie (Tabla 6), exceptuando pequeñas modificaciones, realizadas para optimizar la reacción. Así, en las PCR de los tipos capsulares A,

B y F, en lugar de 5 µl de ADN sólo se añadieron 3 µl, y en el tipo capsular E, 2 µl. La cantidad de agua se incrementó en un volumen de 2 µl y 3 µl respectivamente.

Las condiciones de PCR fueron, también, las mismas que se utilizaron en la PCR específica de especie (Tabla 7), exceptuando variaciones en la temperatura de hibridación, realizadas para optimizar la reacción, tal y como se indica en la Tabla 9. En cada una de las PCR se utilizó un control positivo distinto (Tabla 9). Además, el tiempo de elongación en los ciclos de PCR (72º C) fue de 60 segundos en el caso del tipo capsular A, a diferencia del resto de tipos capsulares, en los que fue de 30 segundos.

Tabla 9. Temperaturas de hibridación y controles positivos utilizados en las PCR de tipos capsulares de *P. multocida*.

Tipo capsular	Tª hibridación	Control positivo
A	61º C	NCTC 10322
D	59º C	NCTC 10325
B	58º C	NCTC 10323
E	55º C	NCTC 10326
F	59º C	P 4679

3.7. Detección de factores de virulencia.

3.7.1. PMT (Toxina dermonecrótica).

3.7.1.1. Detección mediante PCR.

La presencia/ausencia del gen *toxA,* que codifica para la PMT fue determinada mediante la aplicación de una PCR descrita previamente por Davies *et al.* (2003), que estaba basada en la PCR realizada previamente por Lichtensteiger *et al.* (1996), pero con modificaciones en los cebadores y en la temperatura de hibridación. La PCR amplificó un fragmento de 1854 pb. La secuencia de los iniciadores empleados se indica en la Tabla 10, mientras que las condiciones de la PCR se detallan en la Tabla 11.

Tabla 10. Cebadores de la PCR del gen *toxA*.

Nombre cebador	Secuencia de cebadores (5´- 3´)
TOX-FWD	CGTGAACTGCGTACTCAA
TOX-REV	AAGAGGAGGCATGAAGAG

Tabla 11. Condiciones de PCR de gen *toxA*.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95º C	5 minutos
Desnaturalización	40ciclos	94º C	30 segundos
Hibridación	40ciclos	57º C	30 segundos
Elongación	40ciclos	72º C	1 minuto
Elongación final		72º C	10 minutos

El control positivo utilizado en esta PCR fue la cepa de referencia CECT 4325 (tipo capsular D, PMT +).

Los volúmenes de la mezcla fueron los mismos que los utilizados en la PCR de especie (Tabla 6).

3.7.1.2. Detección mediante ELISA.

La presencia de la PMT de *P. multocida* fue confirmada en todos los aislados estudiados mediante una técnica de ELISA "sándwich" específica para la PMT. Para ello se utilizó el kit DAKO PMT ELISA de DakoCytomation siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, las cepas analizadas fueron sembradas en placas de Agar Sangre, procediendo a su incubación durante toda la noche a 37ºC. Tras este periodo se añadieron 2 ml de agua destilada estéril a cada una de las placas, recogiendo las colonias mediante arrastre con un asa de Drigalsky. El contenido se pasó a un tubo eppendorf con una pipeta estéril, transfiriéndose 200 µl de cada una de las muestras a los pocillos de preparación de los extractos (*White Strips*), por duplicado, donde fueron incubados durante toda la noche a 37ºC con el fragmento Fab´ de anticuerpos de conejo frente a PMT conjugado con peroxidasa. Por otro lado, se transfirieron 50 µl del conjugado anti-PMT a otra

placa (*Clear Immunostrips*) cuyos pocillos están pre-tapizados con un anticuerpo monoclonal anti-PMT. En los controles positivos y negativos, además, se añadieron 50 µl antígeno patrón y agua destilada, respectivamente, mientras que en los pocillos para el análisis de las muestras se añadió la misma cantidad de los extractos que fueron incubados en los pocillos de preparación, en todos los casos por duplicado. Se procedió a incubar la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, tras lavar las placas, se añadieron 100 µl del substrato realizando una incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de solución de parado a cada uno de los pocillos. Finalmente se procedió a la lectura de las placas a 490 nm.

Mediante esta técnica se analizaron todos los aislados, la cepa de referencia NCTC 10325 (tipo capsular D, PMT negativa) y la cepa CETC 4325 (tipo capsular D, PMT positiva), esta última utilizada como control positivo.

3.7.1.3. Secuenciación.

En este estudio se realizó una secuenciación por partes del gen *toxA*, debido al gran tamaño del mismo [4.321 pb) (Petersen, 1990)]. Se amplificaron 4 fragmentos (T1-T4), diseñando para ello iniciadores internos, y, posteriormente, se procedió a unir estas secuencias parciales para obtener, finalmente, la secuencia completa de dicho gen (Figura 5).

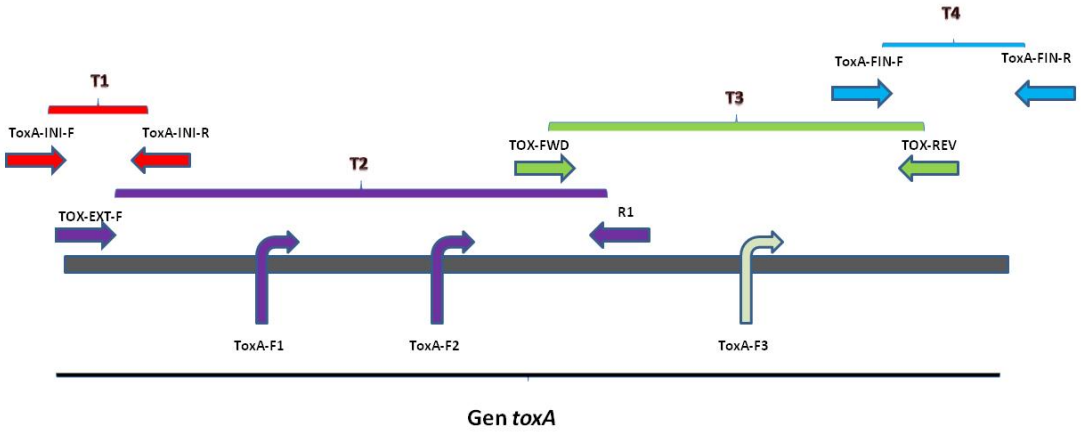

Figura 5. Esquema de la amplificación y secuenciación del gen *tox*A de *P. multocida*.

Se secuenciaron dos aislados de tipo capsular A. El aislado 8_1N06, procedente de un cerdo con RAP y el aislado 1_{26}P01, procedente de un cerdo que presentaba neumonía. Para ello se diseñaron los iniciadores necesarios con la ayuda de programas informáticos (OLIGO v6.0 y MEGA 4.1), en base a la secuencia de la toxina de un aislado de *P. multocida* de tipo capsular D incluida en la base de datos pública (GeneBank) con el número de acceso X51512. Dicha secuencia, así como los iniciadores utilizados, son mostrados a continuación (Figura 6).

```
>X51512
1       aacaagggaaaatagctagattagacgatatcgataatatcataaataatatttaaaaat
        ---------> ToxA-INI-F ---------->
61      tacgccccttgacctagaggggctttttattacatcaaaaaaataaacccaaacactgc

121     gaatgtttggggttttatttataaccaaaatacattaatatgtttattaagtaagcatta

181     tcttactttaggaataaactaacatagaggttatggatatgaaaacaaaacatttttta
                         ----------> TOX-EXT-F ---------->
241     actcagattttactgtaaaaggaaaaagtgccgatgaaatttttagaagattgtgtactg

301     atcatcctgacaagcaattaaacaatgtaaaatggaaagaagtttttattaatcgttttg

361     gtcagatgatgctagatactcctaatccgagaaagattgtagaaaaaattattaatgaag

421     ggcttgaaaaacaaggcctgaaaaatatagatcctgaaactacatatttcaacatttttt

481     catcttctgacagctccgatgggaacgtttttcattataactctttatcagaatcctatc
          <---- ToXA-INI-R <----
541     gagttactgatgcctgcctaatgaatatttttgtggagcgttattttgatgattgggact

601     tgctaaatagcttagccagtaatggaatatattcagtaggaaaagaaggagcttattatc

661     ctgatcatgattatggtccagaatataaccctgtttggggaccaaacgaacaaatttacc

721     attctagagtgattgcagatatcctttatgctcgctccgtatgggatgaatttaaaaaat

781     acttcatggagtattggcaaaaatatgctcagctttataccgaaatgttatctgatacat

841     ttcttgcaatggctattcagcaatatacacgacaaacgcttactgatgaaggcttctta
                                     ----------> *TOXA-F1 ---------->
901     tggtttgtaacacatattatggcaataaggaagaagttcaaataactctactagatatct

961     atggataccttccactgatataatttgtatagagcaaaaagggcttcctactcctaaag

1021    tgatactttacattcctggaggaacacaaccatttgttgaatttcttaatacagatgatc

1081    tgaaacaatggattgcatggcatttaaaagataacaaacatatggtccgattccgcaaac

1141    atttctcgctaaaacaacgtcaggaaggagaaacgtttacaggtatagataaagcacttc

1201    aatatattgcagaagagtcccctgaatggcctgccaataaatacatcctttataatccga

1261    cacatttagaaacagaaaatttatttaacatcatgatgaagcgaacagaacagcggatgc

1321    ttgaagatagtgatgtacagattagatcaaattcagaagctacccgtgactatgctcttt

1381    cattactcgaaacctttatttcacagttatctgcaatagatatgttagtaccagcagtag

1441    gtatcccaattaattttgccctatcagctacagcattaggacttagctcggatattgtag
                                     ----------> *TOXA-F2 ---------->
1501   ttaatggagattcatatgaaaagagaaaatatggaattgggtccttagtgcaatctgcat
```

```
1561  tattcacaggaattaatcttattccagttatttcggaaaccgcagaaattttatcttctt
1621  tctctagaacagaagaagatattccagctttttcactgaagaacaagctttagctcaac
1681  gctttgaaatagtagaagaagaattacattctatctcacctgatgatcctcctcgagaaa
1741  ttactgacgaaaatttacataaaattcgtctggtacgtcttaacaatgaaaatcaacctt
1801  tagttgtgttacgaagattaggaggaaataaatttatcagaatcgagcctataacattcc
1861  aggaaataaaaggttctttagtaagtgaagttataaatccagtgactaataaaacgtact
1921  acgtaagcaatgctaaactattagggggctctccttatagtcctttccgtattggattag
1981  aaggtgtttggacaccagaggtattaaaagcaagagcttccgttattggaaagcctattg
2041  gagaatcatataaaagaatattagccaaactacaaagaatacataacagtaatatcttag
2101  atgagcgacaaggtttaatgcatgaactcatggagcttattgatctttatgaagaatcgc
2161  aaccttcttcagagcgtttgaatgcttttcgtgaactgcgtactcaattagaaaaagcgc
                                   ---> TOX-FWD --->
2221  tttatcttcctgaaatggaagcattaaaaaaacaaatactacagattcctaacaaaggtt
                                                              <---
2281  ctggtgccgctcgatttttacttcgtacagccatgaatgaaatggctggaaaaaccagtg
      <--- ToxA-R1 <---
2341  aaagcacggctgatttaatacgctttgccttgcaagatacagtaatttcagcgccttttc
2401  gcggatatgctggtgcgattccagaggcaatagactttcctgtaaaatatgtaatagaag
2461  acatatctgtatttgataaaatacagacaaattactgggaacttcctgcttatgaaagct
2521  ggaacgaaggaagtaatagccgattactgcctggtttgttacgtgaatcgcaaagcaagg
2581  ggatgttaagtaagtgtcgtatcatagaaaatagcctttatattggacatagctatgaag
2641  aaatgttttacagcatttctccatattcaaaccaggttggagggccttatgaattatatc
2701  ctttcactttttcagtatgcttcaagaagtacaaggtgatttaggatttgagcaggcct
2761  ttgccacacgtaacttttcaatactcttgtttctgatcgactatccttaatggaaaata
                                 ---> *ToxA-F3 --->
2821  cgatgttacttacagaaagttttgattatacaccttgggatgctatttatggagatatta
2881  attatgatgaacaatttgctgcaatgtctattaatgaacgcatagaaaaatgtatgaata
2941  cctatagaggtgtggcattccaaaactcttcaaaaagtattgactttttcctaaataatc
3001  taaccacattcattgataatggactaaccgaaattgctatatctgatttaccgtatgata
3061  ttgtgcaacaagaaatctctcaattcttacaaggaagtaatgaatggaaaacacttgatg
3121  ccatgttatttaacttagataaaggagatattaatggtgctttcagaaagcttctgcaat
3181  cagcaaaagataataataaaatttagagctatagggcattcagataattctgttccgc
3241  catttaataacccttataagtctttatattataaaggaaatataatagctgaagcaattg
3301  aaaaactagatcgagaaggtcaaaaatttgttgtatttgctgatagttctctgctcaaca
3361  gcacgcctgggacaggtcgtcctatgccaggactagttcaatatttaaaaataccagcaa
3421  ctgtagtagatagcgatggtgcatggcaatttcttccagatgtagcttcaagcagagttc
3481  ctattgaagttacagagttagaaaattggcaagtcttaactcctccacaaggtaagattc
3541  ttggattaaagcaatttaagttaacggcaggttttccaacagaacaaagtcgcttacctc
```

```
3601  ttttagagaattcggtttctgaagatttaagggaagaattaatgcaaaagattgatgcaa

3661  taaaaaatgatgtgaaaatgaatagtttagtgtgtatggaagctggctcttgtgattcag

3721  taagccctaaggtagctgcccgtcttaaagatatggggttagaagctgggatgggtgctt

3781  ctattacctggtggagacgtgaaggcgggatggaattttcacatcagatgcatactactg
                 ---> ToxA-FIN-F --->
3841  cttcctttaaatttgctggtaaagagtttgccgtggatgcttcacatttacaatttgtac

3901  acgaccaattagatacaactatcctgatactacctgtagatgattgggctttagaaatag

3961  ctcaaagaaatcgggctattaatccttttgtggaatatgttagtaaaacaggaaacatgt

4021  tagcactcttcatgcctcctcttttcacaaagcctcgcttaacaagagcactataactaa
            <--- TOX-REV <---
4081  ttaaaaactgtattaaagccttatattataaggctttaattttctttcaagaattattaa

4141  gtagaagaatcaaaatcaatgagatagataaaatcaaatgttattaccaatacaactttc

4201  ttaagtatactttttgaatttttgcgttaataaatttataatacccttaactcaataaa

4261  agaagttattgagaagtttaaatcttgtgagcaagatgaagatataatttcagcaatcga
          <------- ToxA-FIN-R <-------
4321  tcttattagcgcttcatatagaagggctgtggatgcagtggaacaaagattcggttctag
```

Figura 6. Secuencia del gen *toxA* de la cepa X51512 e iniciadores utilizados para la secuenciación de este gen.

La secuencia de los cebadores utilizados, así como su posición en el gen *toxA* y el tamaño del fragmento amplificado, se reflejan en la Tabla 12. Los cebadores internos se señalan mediante un asterisco.

Tabla 12. Cebadores utilizados en las PCR de secuenciación del gen *toxA*.

Segmento amplificado	Cebadores principales	Cebadores internos	Secuencia de cebadores (5´- 3´)	Tamaño amplicón	Posición (pb)
T1	toxA-INI-F		AACAAGGGAAAATAGCTAGATTAGACGAT	460 pb	1-29
	toxA-INI-R		CCCATCGGAGCTGTCAGAAGA		503-483
T2	TOX-EXT-F		ACTAACATAGAGGTTATGGATATGAAAACAAAAC	2295 pb	198-231
		*ToxA-F1	CGACAAACGCTTACTGATGAAGGC		870-893
		*ToxA-F2	GCATTAGGACTTAGCTGGATATTGTAG		1473-1500
	ToxA-R1		AATCGAGCGGCACCAGAACC		2296-2276
T3	TOX-FWD		CGTGAACTGCGTACTCAA	1854 pb	2190-2207
		*ToxA-F3	TCTTGTTTCTGATCGACTATCCTTAATGG		2786-2814
	TOX-REV		AAGAGGAGGCATGAAGAG		4043-4265
T4	ToxA-FIN-F		GTGGAGACGTGAAGGCGGG	500 pb	3791-3809
	ToxA-FIN-R		TTGCTCACAAGATTTAAACTTCTCAATAAC		4294-4265

* Cebadores internos

La PCR del segmento T3 fue la misma que la de la detección del gen *toxA* (Apartado 3.7.1.1.), utilizándose los mismos volúmenes y condiciones de PCR. En el caso de los segmentos T1, T2 y T4 se utilizaron los volúmenes de PCR descritos en la Tabla 13.

Tabla 13. Volúmenes utilizados en las PCR de los segmentos T1, T2 y T4.

Reactivos	Volumen
Agua bidestilada estéril (Sigma)	19,1 µl
Tampón 10X con $MgCl_2$ (25 mM)(Biotools)	2,5 µl
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (250 µl/10 mM) (Biotools)	1 µl
Cebadores (20 µM)	0,6 µl de cada uno
Taq DNA polimerasa (1 U) (Biotools)	0,2µl
ADN extraído	1 µl
Total	**25 µl**

Las condiciones de estas PCR fueron, de nuevo, las mismas que las utilizadas en la PCR de detección del gen *toxA* (Tabla 11).

Purificación

El producto de cada PCR (ADN amplificado) fue purificado utilizando el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN GmbH), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo consta de una serie de pasos que incluyen diversas centrifugaciones con diferentes tampones, pasando la muestra por una columna con un filtro. En la columna, en presencia de sales y a un determinado pH, el ADN se adsorbe a la superficie de la membrana de la columna de purificación silica-gel, pasando los contaminantes a través de la columna. Las impurezas se eliminan mediante sucesivos lavados con otro tampón y finalmente se eluye el ADN purificado con un tampón específico en un eppendorf (1,5 ml), manteniéndose congelado a -20º C de temperatura. Este ADN purificado se utilizará para su posterior secuenciación.

Secuenciación

Para secuenciar el ADN purificado se utilizó un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3730 DNA (Applied Biosystems) (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España).

Análisis y evaluación de los resultados.

Las secuencias fueron alineadas mediante el software ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw). Tras efectuar el análisis de las secuencias, éstas fueron comparadas con las incluidas en las bases de datos GeneBank. Para ello se utilizó el programa FASTA (Pearson, 1994) y el software BLAST (www.pubmed/BLAST/nucleotide).

3.7.2. Otros factores de virulencia.

Además de la cápsula y la PMT, se detectaron los siguientes genes que codifican para factores asociados a virulencia:

- Factores asociados a la adquisición de hierro: *tbpA*, complejo *exbBD-tonB, hgbA* y *hgbB.*
- Proteínas de exterior de membrana y porinas: *ompH*, *oma87 y psl* (P6).
- Neuraminidasas: *nanH* y *nanB.*
- Superóxidodismutasas*: sodA* y *sodC.*
- Hemaglutinina filamentosa: *pfhA*.
- Fimbria tipo 4 (pili): *ptfA*

Para determinar la presencia/ausencia de estos genes se utilizó la técnica de PCR. En la Tabla 14 se muestran los genes amplificados en cada una de las PCR, así como la secuencia de los cebadores que amplifican el segmento detectado, el tamaño del mismo (pb) y el artículo de referencia.

Tabla 14. Cebadores de PCR de factores de virulencia.

Gen	Cebador	Secuencia de cebadores (5´- 3´)	Tamaño amplicón	Referencia
nanH	NanH-FWD	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	360 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	NanH-REV	GCTGTAAACGAACTCGCCAC		
nanB	nanB-FWD	GTCCTATAAAGTGACGCCGA	584 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	nanB-REV	ACAGCAAAGGAAGACTGTCC		
sodA	SodA-FWD	TACCAGAATTAGGCTACGC	361 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	SodA-REV	GAAACGGGTTGCTGCCGCT		
sodC	SodC-FWD	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA	235 pb	(Lainson *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2006)
	SodC-REV	TGGTGCTGGGTGATCATCATG		
psl	psl-FWD	TCTGGATCCATGAAAAAACTAACTAAAGTA	439 pb	(Kasten *et al.*, 1997; Ewers *et al.*, 2006)
	psl-REV	AAGGATCCTTAGTATGCTAACACAGGACGACG		
ompH	OmpH-FWD	CGCGTATGAAGGTTTAGGT	438 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	OmpH-REV	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC		
oma87	Oma87-FWD	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC	948 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	Oma87-REV	TGACTTGCGCAGTTGCATAAC		
ptfA	ptfA-FWD	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	488 pb	(Doughty *et al.*, 2000)
	ptfA-REV	TCATGAATTCTTATGCGCAAAA		
exbBD	tonB-FWD	GGTGGTGATATTGATGCGGC	1144 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
tonB	tonB-REV	GCATCATGCGTGCACGGTT		
hgbA	hgbA-FWD	TGGCGGATAGTCATCAAG	419 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	hgbA-REV	CCAAAGAACCACTACCCA		
hgbB	hgbB-FWD	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	788 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	hgbB-REV	CATTGAGTACGGCTTGACAT		
pfhA	Pfha-FWD	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	275 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	Pfha-REV	TGGTACATTGGTGAATGCTG		
tbPA	tbPA-FWD	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC	728 pb	(Ewers *et al.*, 2006)
	tbPA-FWD	TAACGTGTACGGAAAAGCCC		

En algunos casos se optimizó la reacción para amplificar varios fragmentos en una sola PCR, desarrollando varias PCR múltiples. Realizamos un total de 8 técnicas de PCR, 4 de ellas simples y 4 múltiples, denominándolas mediante números romanos (I-VIII). Los genes amplificados en cada una de ellas, así como las condiciones de PCR, se especifican en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de PCR para los factores de virulencia

			Condiciones de PCR* **Tª (º C)/tiempo (segundos)**		
Denominación PCR	**Genes**	**Nº ciclos**	**Desnaturalización**	**Hibridación**	**Elongación**
I	*ompH*	30	94/30	57/30	72/60
II	*psl*	25	94/30	50/40	72/60
III	*ptfA*	30	94/30	55/30	72/60
56IV	*tbPA*	25	94/30	60/30	72/30
V	*nanH+pfhA*	25	94/30	56/30	72/30
VI	*hgbA+hgbB*	25	94/30	56/30	72/45
VII	*sodA+sodC*	25	94/30	55/30	72/40
VIII	*exbBD-tonB+ oma87+nanB*	25	94/30	60/45	68/40

* En todos los casos se realizó una desnaturalización inicial a 95º C durante 5 minutos y una elongación final a 72º C durante 10 minutos.

Las cantidades de los componentes de la mezcla de cada PCR (para un volumen final de 25 µl), así como las cepas de *P. multocida* utilizadas como controles positivos, se indican en la Tabla 16.

Tabla 16. Controles positivos y cantidades de la mezcla de PCR para los factores de virulencia.

PCR	**Controles positivos**	**Cantidades de la mezcla de PCR (en µl).**					
		Agua	**Tampón**	**dNTPs**	**Cebadores**	**Taq. polimerasa**	**ADN**
I	NCTC 10322	17,8	2,5	0,5	1	0,2	2
II	NCTC 10322	17,8	2,5	0,5	1	0,2	2
III	NCTC 10322	17,8	2,5	0,5	1	0,2	2
IV	NCTC 10323	17,8	2,5	0,5	1	0,2	2
V	NCTC 10324	15,8	2,5	0,5	1	0,2	2
VI	NCTC 10324	17,0	2,5	0,5	0,7	0,2	2
VII	NCTC 10322	15,8	2,5	0,5	1	0,2	2
VIII	NCTC 10322	13,8	2,5	0,5	1	0,2	2

3.8. Caracterización molecular: PFGE.

Se empleó la técnica de Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), ya que, en el caso de la especie *P. multocida* se ha establecido como la técnica "gold standard" para su caracterización molecular (Goering, 1993). Esta técnica tiene como objetivo la obtención de patrones legibles de bandas (denominados PFPs, *pulsed-field profiles*) característicos de cada aislado obtenidos mediante la utilización de una determinada enzima de restricción.

Principio de la técnica

El PFGE es un sistema de tipado genético que se basa en el análisis del ADN cromosómico. Básicamente consiste en la fragmentación del genoma bacteriano mediante enzimas de restricción. Posteriormente se realiza una electroforesis multidireccional con pulsos eléctricos de diferente duración, que permite (ya que el tiempo que requieren los fragmentos para reorientarse es proporcional a su tamaño) la separación de fragmentos de hasta 10 Mb.

Esta técnica consta de los siguientes pasos:

1. Extracción y purificación del ADN en condiciones que permitan resultados reproducibles.

2. Digestión del ADN mediante endonucleasas que reconocen unas pocas secuencias diana.

3. Electroforesis del producto de digestión en condiciones de cambio de la dirección del campo eléctrico.

Protocolo:

Se siguió el protocolo descrito por Téllez (2003) para la caracterización de aislados de *Salmonella,* pero incluyendo algunas modificaciones, tal y cómo se describe a continuación. A partir de cultivos puros de 24 horas de incubación en agar sangre, se tomaban 2-3 colonias con un asa de platino, que eran inoculadas en un tubo universal que contenía 2 ml de infusión cerebro corazón (BHI) (Difco) y se incubaban a 37º C durante toda la noche. Posteriormente se realizaban 3 lavados con 2 ml de tampón de lavado (TE1X) (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, Agual Milli-Q, pH 8), mediante centrifugaciones a 4000 rpm durante 10 minutos a 4º C. Para la preparación de los bloques se resuspendía el sedimento

anteriormente citado en tampón TE 1X hasta obtener una transmitancia del 20% en el colorímetro. De esa suspensión se tomaban 200 µl a los que se añadían 10 µl de proteinasa K (Roche Applied Science) (20 mg/ml). La agarosa MP (Roche) se preparaba a una concentración del 1% en tampón TE 1X, manteniéndola en baño maría (60º C) hasta su uso. En el momento de la preparación de los bloques se añadían 25 µl de SDS (10% sodium dodecyl sulphate) (Panreac) (preparado en baño maría a 55-56º C). Pasados los 30 minutos del choque térmico, se añadían 200 µl de la agarosa al microtubo (relación 1:1) y se mezclaba con la suspensión bacteriana. Tras la homogenización, se dispensaban 200 µl de esta mezcla en los moldes específicos para PFGE (dos bloques por aislado), que se mantenían a 4º C durante, al menos, 20 minutos para facilitar la solidificación. Para producir la lisis bacteriana se preparaba el tampón de lisis (Tris ClH 1M, EDTA 0,5M, N-L-Sark 10%, Agua Mili-Q) y se añadía proteinasa K (25 µl) en concentración de 1 mg/ml. Posteriormente se dispensaban 2 ml del tampón en un tubo universal y se procedía a desmoldar los bloques en la solución. Los tubos universales se incubaban durante 2 horas a 56º C y en agitación. Pasado este tiempo se procedía a eliminar el tampón de lisis y se realizaban 2 lavados con agua estéril Mili-Q y 4 lavados de 10 minutos de duración, cada uno (a 4º C) con tampón TE 1X. Tras este proceso se procedía a la restricción enzimática de los bloques de ADN de *P. multocida* utilizando para ello la enzima *BspI* (Fermentas MBI) a 37º C durante 16 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó como marcador de peso molecular una cepa de *Salmonella* del serotipo Braenderup H9812, digerida mediante la enzima de restricción *XbaI* (MBI Fermentas). Se eligió esta enzima por ser la que ofrece unos mejores resultados y discriminación en PFGE. Además, se añadió un marcador de peso molecular (Mid Range PFG Marker, BiloLabs) para determinar el tamaño de las bandas obtenidas. Para la adecuada separación de los fragmentos de ADN se preparó un gel de agarosa MP al 1% en tampón TBE 0,5X y se colocaron los bloques de ADN inmersos en él. Antes de comenzar la electroforesis se vertían 2,200 ml de tampón TBE 0,5X en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad) para que recirculara y disminuyera la temperatura hasta 14º C. El gel se desmoldaba del soporte y se introducía en la cubeta de electroforesis, seleccionándose los parámetros para la realización de la electroforesis en un aparato de sistema CHEF-DRII system (Bio-Rad). Se aplicaron pulsos de 1-30 segundos durante 22 horas a 6V y con un ángulo de inclinación de 120º. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se

teñía por inmersión en una solución de bromuro de etidio (1 μg/ml). El tiempo de inmersión era variable y dependía del estado de la solución. El exceso de bromuro de etidio del gel era eliminado posteriormente mediante inmersión de éste en un baño de agua destilada. El gel se visualizaba y fotografiaba en un transiluminador Fluor-S (BioRad). La comparación de los perfiles de PFGE (PFPs) se realizó visualmente. Para la interpretación de los datos y realización del dendrograma se utilizó el programa informático Bionumerics.

El grado de diversidad genética (DG) fue hallado dividiendo el número de pulsotipos obtenidos entre el número total de aislados analizados.

3.9. Análisis estadístico.

Las significación estadística de las diferencias observadas en los distintos parámetros estimados se evaluó aplicando el test de chi-cuadrado y el método exacto de Fisher utilizando los programas de análisis estadísticos SPSS12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y PEPI 4.0 (Computer Program for Epidemiologist, J.H. Abramson and P.M. Gahlinger).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de especie.

4.1.1. Identificación morfológica y bioquímica.

Todos los aislados presentaron un aspecto macroscópico similar en medio agar-sangre Columbia (Biomerieux), formando colonias grandes, de color blanquecino, muy mucosas y de olor característico. En la tinción de Gram se observaron bacilos cortos que presentaron una bipolaridad típica. Ninguno de ellos creció en agar McConckey (Biomerieux), no produjeron hemólisis y resultaron positivos a la prueba de la oxidasa (reacción débil) y de la catalasa. Todas estas características eran indicativas de que los aislados podrían pertenecer al género *Pasteurella,* aunque se necesitaron más pruebas para llegar a determinar la especie. Por lo tanto, para realizar la identificación de los aislados se utilizó la galería de pruebas bioquímicas API 20E, ya que es un sistema rápido y sencillo de realizar y, que se indica como útil para identificar los aislados pertenecientes a *P. multocida* y que ha sido utilizada en estudios similares (Buttenschon y Rosendal, 1990; Bisgaard *et al.*, 1991b; Leotta *et al.*, 2006b).

De los 205 aislados sospechosos de pertenecer a la especie *P. multocida,* (por sus características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas básicas), 161 (78,5%) fueron identificadas por la galería multisustrato API 20E como *P. multocida* con buena identificación (nivel excelente, muy bueno, bueno

y bueno en la especie). El resto de aislados (n=44, 21,5%) se identificaron como pertenecientes a otras especies bacterianas o a *P. multocida* pero con niveles de identificación no fiables (desde inaceptable a buena identificación en el género). 18 aislados (8,7%) fueron asignados a otras especies, siendo 13 de ellos identificados como *Pasteurella pneumotropica/Mannheimia haemolytica* y 5 como pertenecientes al grupo de las bacterias no fermentadoras (*Non-fermenter* spp.). Al no ser ninguno de nuestros aislados hemolíticos descartamos la posibilidad de que fueran pertenecientes a la especie *M. haemolytica*. El resto, un 12,7% de los aislados (n=26), fueron identificados como *P. multocida* pero no con buena identificación (Tabla 17).

Tabla 17. Relación de las especies identificadas mediante API 20E, grado de identificación de esta galería comercial y porcentajes de las mismas.

Especie	Nivel de identificación API 20E	Nº total	Porcentaje por nivel de identificación	Nº total por especie	Porcentaje por especie
P. multocida	Excelente	110	53,6%	187	91,2%
	Muy buena	7	3,4%		
	Buena	11	5,3%		
	Buena en la especie	33	16,0%		
	Buena en el Género	2	0,9%		
	Débil discriminación	15	7,3%		
	Dudoso	8	3,9%		
	Inaceptable	1	0,4%		
P. pneumotropica	Buena	7	3,4%	13	6,3%
	Buena en Género	3	1,4%		
	Aceptable en Género	1	0,4%		
	Débil discriminación	2	0,9%		
Bacterias no fermentadoras	Débil discriminación	5	2,4%	5	2,4%
Total		205		205	

Este resultado suponía que no todos los aislados sospechosos de pertenecer a la especie *P. multocida*, eran bien identificados mediante el sistema API 20E por lo que, posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas de manera convencional y una técnica molecular (PCR) (Apartado 4.1.2.) para confirmar la identificación de todos los aislados.

Por otra parte, se observó una gran variedad de perfiles bioquímicos en nuestros aislados (26 diferentes), como se detalla en la Tabla 18. Este resultado

era predecible dada la naturaleza heterogénea de *P. multocida* y están descritas multitud de variedades bioquímicas dentro de la especie (Heddleston, 1976; Bisgaard y Falsen, 1986; Biberstein *et al.*, 1991; Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997).

Tabla 18. Relación de todos los perfiles bioquímicos y nivel de identificación obtenidos mediante API 20E**.**

Identificación	Perfil bioquímico	Nº total de aislados	Nivel de identificación
P. multocida	0044565	1	Inaceptable
	0044124	2	Débil discriminación
	0144124	13	
	0042024	1	Dudoso
	0041524	1	
	0141520	1	
	0145520	4	
	0340524	1	
	0140104	1	Buena en Género
	0040120	1	
	0040124	6	Muy buena en Género
	0140124	33	Buena en Especie
	0040024	7	Buena
	0140004	4	
	0104524	1	Muy buena
	0040524	15	Excelente
	0044524	8	
	0140520	4	
	0140524	38	
	0144524	45	
P. pneumotropica	0000024	2	Débil discriminación
	0100024	1	Aceptable en Género
	0100124	3	Buena en Género
	0000124	6	Buena
	0000125	1	
Bacterias no fermentadoras	0000004	5	Débil discriminación
Toltal		205	

Sin embargo, al analizar los datos en detalle se puede observar que existen ciertos perfiles prevalentes, y que 4 de ellos agrupan el 64% de los aislados, tal y como ha sido detallado en la Tabla 18. Así el perfil que se obtuvo con mayor frecuencia (21,9%) fue el representado por el código numérico 0144524, que identifica a los aislados como *P. multocida* con excelente nivel de

identificación. Este perfil incluye un resultado positivo para las pruebas ODC, indol, oxidasa y la oxidación de la glucosa, el manitol, el sorbitol y la sacarosa. El segundo perfil más común (18,5%) fue el perfil 0140524**,** que representa a aislados de *P. multocida* identificados también con un nivel excelente. La única diferencia es que estos aislados no oxidan la glucosa. En tercer lugar (16,0%) aparece el perfil 0140124 (buena identificación en la especie), aislados que no oxidan la glucosa ni el sorbitol y, por último, el perfil 0040524 (excelente identificación), que incluye a un 7.3% de los aislados.

Los aislados identificados como pertenecientes a la especie ***P. multocida*** (91,2% de los aislados) presentaron características comunes:

- Pruebas bioquímicas **positivas** (95-100%) en todos los aislamientos: producción de indol (IND), la prueba de la utilización de la D-sacarosa (SAC) y la prueba de la valoración de la enzima citocromo-oxidasa (OX).

- Pruebas bioquímicas **negativas** (95-100%) en todos los aislamientos: valoración de la actividad de la enzima ß-galactosidasa (ONPG), valoración de la actividad de la enzima lisina decarboxilasa (LDC), actividad enzimática de la arginina-dihidrolasa (ADH), utilización del citrato (CIT), producción de sulfhídrico (H_2S), actividad enzimática de la ureasa (URE), actividad enzimática de la enzima triptofano desaminasa (TDA), pruebas de utilización del inositol (INO), L-ramnosa (RHA), L-arabinosa (ARA), amigdalina (AMY), D-melobiosa (MEL), hidrólisis de la gelatina (GEL) y prueba de producción de acetoína (VP).

- Pruebas bioquímicas **variables**:
  - La actividad enzimática de la Ornitina decarboxilasa (ODC) fue positiva en un 77,5% de los casos.
  - Un 63,6% de los aislados utilizó el D-sorbitol.
  - En el caso de la utilización de la D-glucosa se obtuvo un 39,5% de resultados positivos.
  - El 92,5% de los aislados utilizó el D-manitol.

Cinco aislados fueron clasificados por la galería comercial API 20E como pertenecientes al grupo de las bacterias no fermentadoras, todos con un nivel de identificación de discriminación débil. Se trata de aislados que únicamente fueron positivos a la prueba de la citocromo-oxidasa.

En 13 ocasiones se identificó a los aislados como pertenecientes a la especie *P. pneumotropica* (en un 3,4% con buen nivel de identificación). La diferencia fundamental con los aislados identificados como *P. multocida* era que todos ellos eran negativos a la prueba de producción de indol, prueba fundamental en la diferenciación de ambas especies, según el Manual Bergey´s de Bacteriología Sistemática (Olsen *et al.*, 2005). Además, 4 de los aislados fueron negativos a la prueba de la ODC, uno fue positivo a la prueba de utilización del D-manitol y, finalmente, otro uno fue positivo también a la prueba de la amigdalina.

Estos resultados preliminares de identificación bioquímica fueron tomados con cautela ya que, como se detallaba en la bibliografía consultada, la identificación mediante estas pruebas resulta en ocasiones problemática en el caso de la especie *P. multocida*. Ello es debido a la gran variabilidad existente en los perfiles bioquímicos, hecho que puede llevar a confusión en la delimitación e identificación de las especies y subespecies dentro del género *Pasteurella* (Heddleston, 1976; Bisgaard, 1993; Petersen *et al.*, 1998).

En este estudio se encontraron variaciones en pruebas clave de identificación, como son la ODC y el indol, hecho ya destacado en investigaciones previas (Christensen *et al.*, 2004a). En el caso del **indol** se observaron 27 aislados (13,1%) negativos a esta prueba, lo que indicaba, a priori, que no pertenecían a la especie *P. multocida*, ya que clásicamente se considera que esta especie es, salvo excepciones, positiva a la prueba del indol (Heddleston, 1976; Buttenschon y Rosendal, 1990; Hunt *et al.*, 2001a; Olsen *et al.*, 2005). En el caso de la prueba de la **ODC** más de la mitad de los aislados fueron negativos (n=149, 72,6%), resultado superior a lo descrito previamente, ya que las variantes negativas suelen ser mucho menos frecuentes (Snipes *et al.*, 1988b; Bisgaard *et al.*, 1991b; Zhao *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997; Bowles *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2004), siendo lo usual los aislados ODC positivos (Carter, 1984; Buttenschon y Rosendal, 1990; Hunt *et al.*, 2001a).

Debido a estos resultados inusuales se procedió a realizar la prueba de la ODC y la del indol de manera convencional (pruebas bioquímicas en tubo de ensayo) en todos estos aislados. Además se incluyeron el sorbitol y el dulcitol, ya que servirían más adelante para la clasificación de los aislados en una de las tres subespecies descritas de *P. multocida* (Mutters *et al.*, 1985a).

Después de analizar los resultados observamos una gran diferencia entre las pruebas convencionales y el sistema comercial API 20E, como se detalla en las Tablas siguientes (Tablas 19a, b y c). En el caso del dulcitol no pudimos realizar la comparación entre los resultados de ambos métodos ya que esta prueba no estaba incluida en la galería API 20E.

Tabla 19. Resultados obtenidos en las pruebas convencionales en tubo de ensayo y en las pruebas de la galería comercial API 20E de:

a) Ornitina decarboxilasa **(ODC)**

		API 20E		
		ODC +	**ODC -**	
Prueba convencional en tubo	**ODC +**	149	56	205
	ODC -	0	0	0
		149	56	205

b) sorbitol **(SOR)**

		API 20E		
		SOR +	**SOR -**	
Prueba convencional en tubo	**SOR +**	118	87	205
	SOR -	0	0	0
		118	87	205

c) indol **(IND)**

		API 20E		
		IND +	**IND -**	
Prueba convencional en tubo	**IND +**	158	27	205
	IND -	0	0	0
		158	27	205

Tal y como reflejan las Tablas anteriores, existe una falta de correlación en los resultados obtenidos en la prueba incluida en la galería comercial API 20E y en la prueba convencional. En el caso de la ODC, un 27,3% de los aislados resultaron negativos por el sistema comercial API y positivos en la

prueba convencional. En el caso del sorbitol este porcentaje fue del 42,4% y en el del indol del 13,2%. Estos resultados indican una alta discrepancia entre ambas pruebas, hecho que ya destacaron otros trabajos previos (Collins *et al.*, 1981; Bisgaard *et al.*, 1991b; Hunt *et al.*, 2001b; Boot *et al.*, 2004; Vera-Lizarazo *et al.*, 2008), lo que puede suponer un problema para el diagnóstico clínico, ya que puede dar lugar a una identificación errónea de los aislados pertenecientes a la especie *P. multocida*.

En el medio convencional todos los aislados resultaron positivos a las pruebas ODC, sorbitol e indol. Este resultado es más coherente, ya que las variantes negativas de estas pruebas son mucho menos frecuentes en aislados de *P. multocida* (Blackall *et al.*, 1997; Townsend *et al.*, 1998a; Jamaludin *et al.*, 2005). Sustituyendo los resultados de estas pruebas por las que se habían obtenido en la galería API 20E, ose obtuvieron nuevos perfiles bioquímicos que se correspondían con nuevas identificaciones. Estos datos se reflejan en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados obtenidos mediante la galería comercial API 20E y la combinación con las pruebas convencionales en tubo de ensayo (nuevos perfiles, identificaciones y niveles de los mismos).

Identificación (API 20E)	Nivel identificación (API 20E)	Perfil bioquímico (API 20E)	Nuevo perfil bioquímico	Nuevo nivel de identificación	Nueva identificación
P. multocida	Inaceptable	0044565	0144565	Inaceptable	***P. multocida***
	Débil discriminación	0044124	0144524	Excelente	
		0144124	0144524		
	Dudoso	0042024	0142424	Dudoso	
		0041524	0141524		
		0141520	0141520		
		0145520	0145520		
		0340524	0340524		
	Buena en Género	0140104	0140504	Muy buena	
		0040120	0140520	Excelente	
	Muy buena en Género	0040124	0140524		
	Buena en Especie	0140124	0140524		

Identificación (API 20E)	Nivel identificación (API 20E)	Perfil bioquímico (API 20E)	Nuevo perfil bioquímico	Nuevo nivel de identificación	Nueva identificación
P. multocida	Buena	0040024	0140424	Buena en Especie	***P. multocida***
		0140004	0140404	Buena en Género	
	Muy buena	0104524	0144524	Excelente	
	Excelente	0040524	0140524		
		0044524	0144524		
		0140520	0140520		
		0140524	0140524		
		0144524	0144524		
P. pneumotropica	Débil discriminación	0000024	0140424	Buena en Especie	
	Aceptable en Género	0100024	0140424		
	Buena en Género	0100124	0440524	Dudoso	
	Buena	0000124	0140524	Excelente	
		0000125	0140525	Dudoso	
Bacterias no fermentadoras	Débil discriminación	0000004	0140404	Buena en Género	

NOTA: los números en rojo indican los cambios en el código numérico que refleja el perfil bioquímico de los aislados según los resultados de las pruebas convencionales de ODC, sorbitol e indol.

Si se tenían en cuenta los nuevos resultados de identificación bioquímica (pruebas del sorbitol, ODC e indol de forma convencional), las identificaciones variaban. De este modo, todos los aislados se clasificaron como *P. multocida*. Del total de aislados un 89,1% fueron clasificados con una buena identificación (nivel excelente, muy bueno y bueno en la especie), lo que, comparando con los datos anteriores de la galería API 20E (78,3%), suponía un aumento considerable de aislados de *P. multocida* identificados correctamente. Disminuyeron a su vez el número de aislados que presentaban niveles de identificación no fiables, y no se encontró ningún aislado que fuera clasificado como otra especie bacteriana (Tabla 21).

Estos datos confirmaron que para realizar una identificación rutinaria de *P. multocida* las galerías API 20E pueden suponer una buena opción, y en el caso de que existan dudas sobre el resultado se puede recurrir a la realización

de ciertas pruebas bioquímicas de forma convencional (especialmente ODC, sorbitol, indol) para, de este modo, confirmarlo.

Tabla 21. Niveles de identificación de *P. multocida* obtenidos mediante las pruebas convencionales en tubo de ensayo.

Especie	Nuevo nivel de identificación	Nº total	Porcentaje por nivel de identificación
P. multocida	Excelente	172	83,9%
	Muy buena	1	0,4%
	Buena en la Especie	10	4,8%
	Buena en el Género	9	4,3%
	Dudoso	12	5,8%
	Inaceptable	1	0,4%
Total		205	

4.1.2. Identificación molecular.

La identificación bioquímica de todos los aislados como pertenecientes a la especie *P. multocida* fue confirmada mediante una PCR específica de especie (Townsend *et al.*, 1998a) que detectaba el fragmento KMT1, obteniéndose una banda de 460 pb (Figura 7).

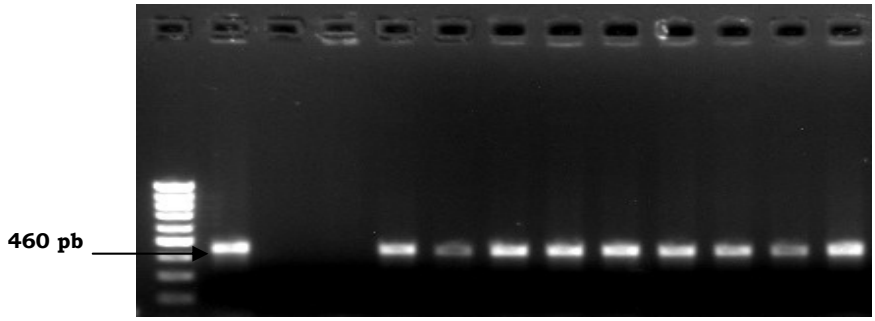

Figura 7. Gel de PCR de **especie *P. multocida***. Línea 1, marcador de peso molecular (100 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); línea 3, control negativo; línea 4, *E. coli*; Líneas 5-13, aislados de *P. multocida*.

Los 205 aislados fueron positivos a la prueba de la PCR; por lo tanto esta técnica puede ser considerada como óptima para identificar los aislados de *P. multocida*, ya que clasificó el 100% de los aislados como pertenecientes a esta especie de forma clara. Sin embargo, algunas de las pruebas incluidas en el API 20E, junto con pruebas bioquímicas convencionales, son útiles para diferenciar las diferentes subespecies y/o biovares.

Esta técnica de PCR fue evaluada en varios estudios, siendo considerada como la mejor opción para la identificación de aislados de *P. multocida*, demostrando una gran sensibilidad y especificidad (Hunt *et al.*, 2000). Clásicamente esta PCR parecía presentaban ciertos problemas, ya que los aislados de la especie *Pasteurella canis* biovar 2 también otorgaban resultados positivos (Christensen *et al.*, 2004a). Este microorganismo, además, ha sido aislado de muestras de cerdos (Schimmel y Sachse, 1993) y está estrechamente relacionado con *P. multocida* (Townsend *et al.*, 1998a; Townsend *et al.*, 2001; Mbuthia *et al.*, 2001; Miflin y Blackall, 2001). Sin embargo, Christensen *et al.* (2004), mediante estudios de secuenciación del gen del ARNr 16S y de hibridación de ADN-ADN, reclasificaron el biovar 2 de la especie *P. canis como* perteneciente a *P. multocida*, por lo que se resolvieron las dudas sobre la especificidad de esta PCR y, por lo tanto, se considera esta técnica como una prueba útil y altamente específica para identificar *P. multocida*.

4.2. Identificación de subespecie.

Los 205 aislados de nuestro estudio fueron identificados a nivel de subespecie como ***P. multocida* subsp. *multocida***, ya que resultaron positivos a la prueba del sorbitol y negativos a la del dulcitol (ambas pruebas realizadas en tubo de ensayo).

Existen pocos trabajos que clasifiquen los aislados de *P. multocida* en una de las tres subespecies: *gallicida*, *multocida* y *septica*. La mayoría de los estudios se han realizado en aves, además de en ganado bovino (Madsen *et al.*, 1985; Hirsh *et al.*, 1990; Snipes *et al.*, 1990; Buttenschon y Rosendal, 1990; Bisgaard *et al.*, 1991a; Bisgaard *et al.*, 1991b; Korbel *et al.*, 1992; Mohan *et al.*, 1994; Fegan *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2003). En cerdos sólo se han realizado estudios en Zimbabwe (Mohan *et al.*, 1994) y en Australia (Cameron *et al.*, 1996; Blackall *et al.*, 1997).

La clasificación de los aislados de *P. multocida* en las tres subespecies descritas por Mutters *et al.* (1985) se realizó en base a la producción de ácido a partir del sorbitol y dulcitol. A pesar de que existen estudios que ponen en duda la utilidad de estas pruebas para la diferenciación de las tres subespecies y que se han sugerido otras pruebas para ello (alfa-glucosidasa y secuenciación de genes *housekeeping*, por ejemplo) (Petersen *et al.*, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000;

Petersen *et al.*, 2001; Muhairwa *et al.*, 2001a; Hunt *et al.*, 2001a), ninguna de ellas es totalmente fiable y, el cualquier caso, la utilización del dulcitol y del sorbitol son las pruebas que se describen en el último Manual de Bergey´s de Bacteriología Sistemática (2005) (Olsen *et al.*, 2005) y las que se han realizado en la mayoría de estudios epidemiológicos sobre *P. multocida* y, por lo tanto, son las que se han utilizado en este trabajo.

Teniendo en cuenta únicamente los resultados obtenidos en la galería comercial API 20E, todos los aislados fueron negativos al dulcitol y un gran porcentaje de aislados (42,4%), además, lo fueron a la prueba del sorbitol. En el caso de no utilizar ninguno de los azúcares, estos aislados serían clasificados como *P. multocida* subespecie *septica.* Se trata de un hallazgo inesperado considerando que las muestras procedían de ganado porcino, siendo esta subespecie aislada en muy raras ocasiones en esta especie animal (Varga *et al.*, 2007), aunque su aislamiento es habitual en muestras procedentes de aves salvajes, perros, y, sobre todo, gatos (Baldrias *et al.*, 1988; Dziva *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001; Muhairwa *et al.*, 2001b; Christensen *et al.*, 2005). Por otra parte, la utilización de las pruebas bioquímicas realizadas de manera clásica determinó que todos los aislados utilizaban el sorbitol. Esto determinó que todos ellos se clasificaron como pertenecientes a *P. multocida* subespecie *multocida* (sorbitol positivo, dulcitol negativo), resultado más lógico puesto que esta subespecie ha sido señalada por distintos autores como la más frecuentemente aislada (independientemente de la forma clínica) a partir de ganado porcino (Blackall *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Dziva *et al.*, 2001; Jamaludin *et al.*, 2005).

4.3. Caracterización.

4.3.1. Biovares.

En nuestro trabajo, los 205 aislados de *P. multocida* fueron caracterizados en 3 biovares (1, 2, y 3) de los 14 descritos en los trabajos de Blackall *et al.* (1997) y Fegan *et al.* (1995) (Tabla 3, Apartado 1.7.1.1.). La mayor frecuencia de aislamiento fue de aislados encuadrados en el biovar 3 (119 aislados, 58,0%), seguida por el biovar 2 (81 aislados, 39,5%). Únicamente 5

aislados (2,4%) se caracterizaron como biovar 1. Estos resultados se reflejan en la Figura 8.

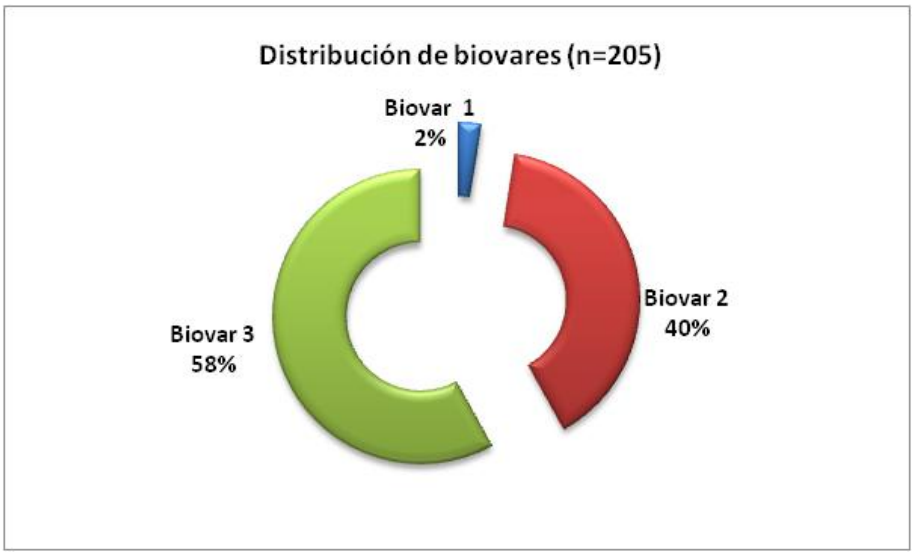

Figura 8. Distribución de biovares de *P. multocida* aislados.

Son muy pocos los trabajos publicados en los que se haya realizado una caracterización fenotípica exhaustiva de los aislados de *P. multocida* clasificándolos en los diferentes biovares descritos. Los primeros estudios de biotipado en *P. multocida* se realizaron con aislados procedentes de aves en Australia (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1995). En sus trabajos se detallaron 10 biovares diferentes en los 110 aislados de *P. multocida* obtenidos. Más adelante el mismo grupo de trabajo caracterizó 150 aislados procedentes de cerdos y además de hallar algunos de los biovares encontrados en aves, describieron otros nuevos (hasta el biovar 14) (Blackall *et al.*, 1997). Estos trabajos se limitaron a realizar la caracterización fenotípica de los aislados, sin tener en cuenta, por ejemplo, el estado salud/enfermedad del animal del que se obtenían las muestras, el tipo capsular al que pertenecían los aislados o la presencia o no de determinados factores de virulencia, no pudiendo asociar, por lo tanto, determinados biovares a alguna/s de estas características. Más adelante se realizaron algunas investigaciones más sobre biotipado de *P. multocida*, en combinación con técnicas moleculares en Vietnam (Townsend *et al.*, 1998a), Australia (Bowles *et al.*, 2000), Nueva Zelanda (Jamaludin *et al.*, 2005) y Argentina (Leotta *et al.*, 2006b). En Europa únicamente tenemos constancia de un estudio reciente realizado en Hungría en el que se determinaron los biovares de aislados de *P. multocida* obtenidos de ganado porcino (además de determinar el tipo capsular y la presencia de la PMT) (Varga

et al., 2007). En cuanto a nuestro país se refiere se ha defendido recientemente una tesis en la que se determinaron los biovares de *P. multocida* en aislados obtenidos de pulmones neumónicos de cerdos de diferentes regiones de España (Vera-Lizarazo, 2008).

En nuestro trabajo se observó un número limitado de biovares en los aislados de *P. multocida* presentes en el ganado porcino analizado. Este hecho confirma los resultados previos obtenidos en España, donde se hallaron los biovares 2 y 3 principalmente (Vera-Lizarazo, 2008), pero contrasta con los datos obtenidos en otros países en los que se han realizado estudios similares en cerdos como, por ejemplo, Australia y Nueva Zelanda (Blackall *et al.*, 1997; Townsend *et al.*, 2000; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Jamaludin *et al.*, 2005) y Hungría (Jamaludin *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2007), donde encontraron una mayor diversidad de biovares (hasta 8 diferentes). En estos trabajos se halló un gran número de aislamientos que fueron clasificados en los mismos biovares que en nuestro estudio, siendo el biovar 3 el mayoritario en todas las ocasiones, seguido del biovar 2. En Australia y Nueva Zelanda aislaron, además, frecuentemente los biovares 12 y 8 (subespecie *gallicida*), biovares que no encontramos entre nuestros aislados, mientras que el biovar 1 y otros fueron aislados en menor proporción (Blackall *et al.*, 1998; Bowles *et al.*, 2000; Jamaludin *et al.*, 2005). En Hungría, tras el biovar 3 y el 2, se aislaron los biovares 12, 13, 7 y, en menor proporción, el 6, el 8 y el 4 (Varga *et al.*, 2007). En España, además de los bivares 2 y 3, se detectó de forma anecdótica (0,6%) el biovar 13 (Vera-Lizarazo, 2008).

Existe una mayor variedad de biovares en aislados de *P. multocida* de aves, especie en la que se han encontrado hasta 10 biovares diferentes (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1998).

El predomino de aislados del **biovar 3** en nuestro estudio entra dentro de lo esperado, ya que es el más común en los aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* tanto en cerdos (Blackall *et al.*, 1997; Townsend *et al.*, 1998a; Bowles *et al.*, 2000; Jamaludin *et al.*, 2005; Leotta *et al.*, 2006b), como en aves (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997; Leotta *et al.*, 2006b). El porcentaje de aislados de biovar 3 que se obtuvieron en nuestro estudio (58%), sin embargo, fue inferior al señalado en el estudio similar realizado en cerdos de España (81%) (Vera-Lizarazo, 2008), así como de otros países: 67-80% en Australia (Blackall *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000), 68% en Hungría (Varga

et al., 2007), 71,5% en Nueva Zelanda (Jamaludin *et al.*, 2005) y 90% en Argentina (Leotta *et al.*, 2006b).

El **biovar 2** también ha sido aislado en ganado porcino, tal y como se señaló anteriormente, en Australia (Blackall *et al.*, 1997; Bowles *et al.*, 2000), Nueva Zelanda (Jamaludin *et al.*, 2005) y Hungría (Varga *et al.*, 2007), así como en aves en Australia (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1998), representando siempre un porcentaje mucho menor (desde un 10% a un 23%) al que se encontró en nuestra investigación (39,5%), destacando, además, que este resultado es casi el doble al descrito en el trabajo de Vera-Lizarazo (2008) en nuestro país.

Por lo tanto, los biovares 2 y 3 son los mayoritarios dentro del ganado porcino español, aunque la proporción de cada uno de ellos varía según el estudio realizado.

El **biovar 1** representa en nuestro trabajo un porcentaje muy escaso de la totalidad de aislados, al igual que ocurre en otros países (Australia y Argentina) donde se han realizado estudios en cerdos (Blackall *et al.*, 1997; Bowles *et al.*, 2000; Leotta *et al.*, 2006b). En Europa parece ser que es la primera vez que se ha aislado este biovar en cerdos, ya que en los estudios realizados en Hungría y en España no se encontró ningún aislado de *P. mulltocida* perteneciente al biovar 1 (Varga *et al.*, 2007; Vera-Lizarazo, 2008). En estudios realizados en aves este biovar tiene una mayor representación (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1998).

En cuanto al estudio de la distribución de los biovares en las diferentes empresas productivas, se tuvo en cuenta sólo aquellas en las que el número de aislados era igual o mayor a 10 (empresas nº 1, 2, 3 y 8). En una misma empresa pudieron detectarse aislados de biovares diferentes. Los biovares 2 y 3 aparecían en todas las compañías, mientras que el biovar 1 únicamente se aisló en las empresas nº 1 y nº 3. Los resultados se muestran en la Tabla 22 y la Figura 9.

Tabla 22. Número de aislados de cada biovar en las distintas empresas productivas.

Empresa	Nº aislados biovar 1	Nº aislados biovar 2	Nº aislados biovar 3	Nº aislados total
1	2 (1,5%)	52 (39,4%)	78 (59,1%)	132
2	0 (0,0%)	3 (13,0%)	20 (86,9%)	23
3	3 (12,0%)	18 (72,0%)	4 (16,0%)	25
8	0 (0,00%)	2 (20,00%)	8 (80,00%)	10

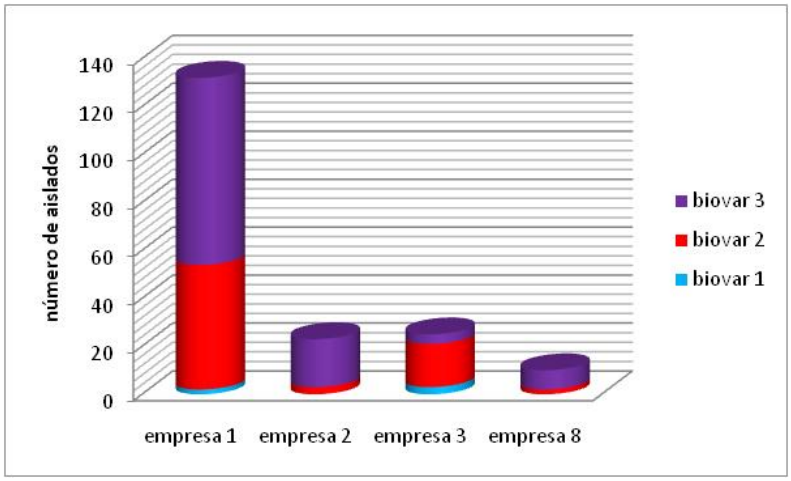

Figura 9. Distribución de los diferentes biovares en las empresas de producción.

El biovar 3 fue el más frecuentemente aislado en todas las empresas, excepto en la nº 3. Los porcentajes de aislamiento de este biovar variaban en cada una de ellas (Figura 9), representando un 59,1% en la empresa nº 1, un 86,9% en la empresa nº 2 y un 80% en la empresa nº 8, siendo únicamente de un 16% en la empresa nº 3.

En cuanto al biovar 2, éste representaba un porcentaje menor que el del biovar 3 en todas las empresas productivas, excepto en la nº 3, siendo de un 39,4% en la nº 1, un 13,0% en la nº 2 y un 20% en la nº 8. Destaca el porcentaje tan elevado (72%) de aislados de biovar 2 en una de las empresas productivas (la nº 3), que constaba de dos granjas de madres situadas en el Noroeste de España y de los cebaderos que recibían cerdos de estas explotaciones, ubicados en Castilla León. Al no disponer de otras muestras de las mismas regiones, no es posible determinar si la mayor prevalencia de este biovar tenía alguna asociación con la zona geográfica, o era debido a otras

causas como pudieran ser el sistema de manejo, el origen de los animales, incidencia de otras enfermedades, profilaxis y tratamientos antimicrobianos, etc.

Respecto a la forma clínica, el 55,8% de los aislados procedentes de pasterelosis neumónica y el 59,7% de los aislados procedentes de pasterelosis sistémica se clasificaron en el biovar 3, mientras que el 43,4% y el 34,7%, respectivamente, lo fueron en el biovar 2. Analizando estos datos se puede observar que no hay diferencias significativas (IC= 95%) entre ambos procesos y los biovares 2 y 3.

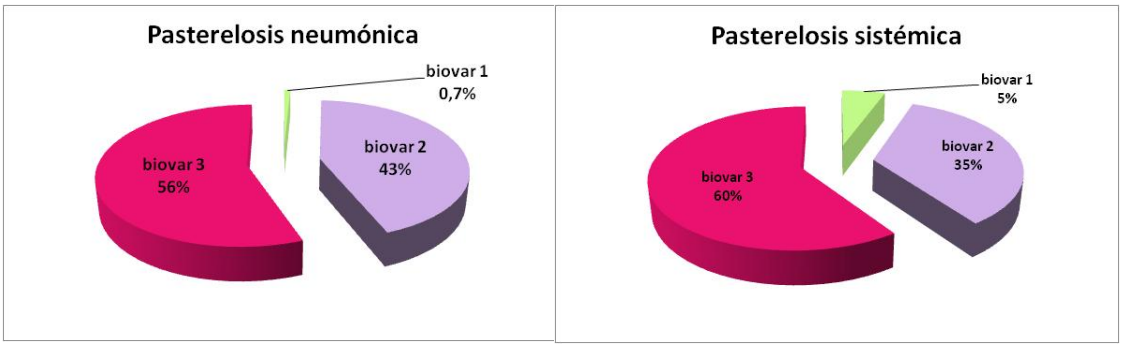

Figura 10. Distribución de los diferentes biovares en los procesos de pasterelosis sistémica y pasterelosis neumónica.

De casos de RAP únicamente fueron obtenidos 4 aislados, todos ellos clasificados en el biovar 3. No se pudieron obtener conclusiones sobre la asociación del biovar 3 con estos procesos debido al escaso número de aislados, y a no haber hallado otros estudios de biotipado en muestras obtenidas de RAP.

Respecto al biovar 1, en los procesos septicémicos se encontraron 4 de los cinco aislados de este biovar, lo que puede significar una asociación entre la presentación de septicemia o una mayor virulencia de aislados de *P. multocida* de este biovar, aunque debido, de nuevo, al escaso número de aislados no se pudo extraer una conclusión definitiva (Figura 10).

No se pudo determinar, por lo tanto, una especial asociación en cuanto al desarrollo de procesos clínicos producidos por *P. multocida* biovar 2 y biovar 3, siendo demasiado escaso el número de aislados del biovar 1 como para obtener conclusiones. Por lo tanto, es necesario ampliar las investigaciones de caracterización epidemiológica para confirmar si existe o no asociación entre determinados biovares de *P. multocida* y el desarrollo de determinadas enfermedades.

Además de nuestro trabajo, el único estudio que reseñaba el proceso clínico del que se obtuvieron los aislados de *P. multocida* y se determinaba el biovar fue el realizado en Argentina por Leotta *et al.* (2006b), en el que obtuvieron muestras de 10 cerdos que presentaban procesos neumónicos y todos los aislados fueron caracterizados en el biovar 3, excepto uno que fue caracterizado como biovar 1. De nuevo son pocos aislados, pero se confirma la presencia de los biovares 3 y 1 en procesos neumónicos, al igual que en nuestro trabajo, con la diferencia de que en su caso ningún aislado fue del biovar 2. En los trabajos en los que las muestras se habían obtenido a partir de animales aparentemente sanos (Townsend *et al.*, 2000; Jamaludin *et al.*, 2005) no se observaron diferencias significativas respecto a los biovares hallados en nuestras investigaciones.

4.3.2. Tipo capsular.

Los 205 aislados de *P. multocida* fueron caracterizados, fundamentalmente, en los tipos capsulares A y D (162 y 38 aislados respectivamente), siendo únicamente 5 los aislados pertenecientes al tipo capsular F (Figura 11). Estos resultados coinciden con estudios anteriores, siendo usual encontrar los tipos capsulares A y D en cerdos tanto sanos (Lariviere *et al.*, 1992; Jamaludin *et al.*, 2005), como enfermos (Iwamatsu y Sawada, 1988; Djordjevic *et al.*, 1998; Dziva *et al.*, 2000; Dziva *et al.*, 2001).

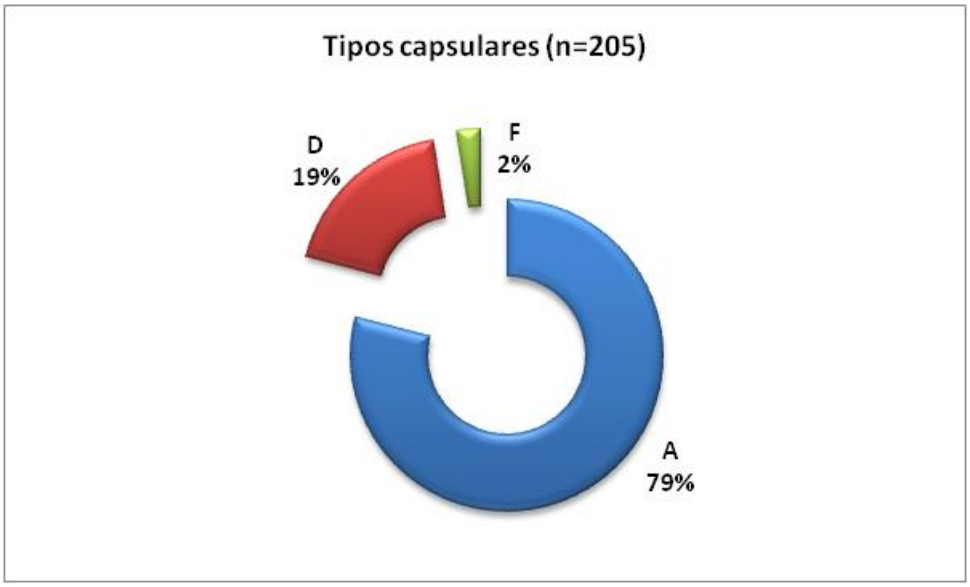

Figura 11. Distribución de los aislados en los tipos capsulares de *P. multocida*.

Para realizar la determinación de los tipos capsulares de *P. multocida* (A, B, D, E y F), antiguamente se realizaban pruebas de inhibición de la hemaglutinación (Carter, 1955), desarrollándose, más tarde, las pruebas de la hialuronidasa para detectar el tipo capsular A (Carter y Rundell, 1975), y de la acriflavina para detectar el tipo capsular D (Carter y Subronto, 1973). Éstos eran métodos laboriosos y que no eran capaces de tipar todos los aislados (Rimler y Rhoades, 1989b). Gracias al avance de las técnicas moleculares, se pudo desarrollar una técnica de PCR múltiple que determinaba los diferentes tipos capsulares, resultando un método más rápido, fiable, sensible y altamente específico (Townsend *et al.*, 2001). Además, se ha demostrando su utilidad para la caracterización de aislamientos tanto de aves, como de ovinos y porcinos (Davies *et al.*, 2004). Esta fue la técnica elegida para clasificar nuestros aislados en los diferentes tipos capsulares. Sin embargo, no se realizó esta técnica de manera múltiple como fue descrita en el trabajo original (Townsend *et al.*, 2001), sino que se desarrollaron las técnicas de PCR de manera individual para cada tipo capsular, teniendo en cuenta los tipos capsulares más frecuentes que se esperaban encontrar. De este modo, se realizó en primer lugar la PCR para determinar el tipo capsular A (Figura 12), ya que la mayoría de aislados procedían de muestras de cerdos de procesos respiratorios, y éste era, previsiblemente, el tipo capsular que era más probable encontrar (Pijoan *et al.*, 1983; Pijoan *et al.*, 1984; Iwamatsu y Sawada, 1988; Zhao *et al.*, 1992; Djordjevic *et al.*, 1998). A los aislados que no eran de este tipo capsular se les realizó una PCR para determinar el tipo capsular D (Figura 13), el segundo tipo capsular hallado con mayor frecuencia en muestras de ganado porcino (Zhao *et al.*, 1992; Jamaludin *et al.*, 2005), después el tipo capsular F (Figura 14), posteriormente el tipo capsular B (Figura 15), y, finalmente, el tipo capsular E (Figura 16) (Moreno *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2003a). Los resultados obtenidos confirmaron esta previsión.

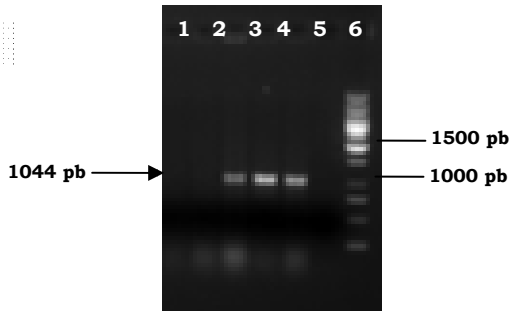

Figura 12. Tipo capsular A. Gel de PCR Línea 1, control negativo; línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); Líneas 3 y 4, cepas de *P. multocida* aisladas; línea 5, *E. coli*; línea 6, marcador de peso (3000 pb).

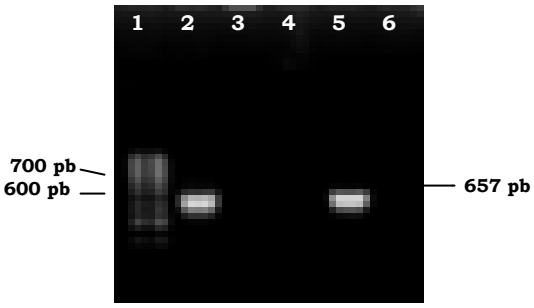

Figura 13. Tipo capsular D. Gel de PCR Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia CETC 4325); línea 3, control negativo; línea 4, *E. coli*; Líneas 5 y 6, cepas aisladas de *P. multocida*.

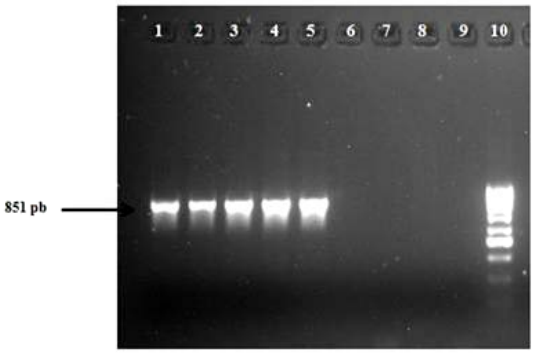

Figura 14. **Tipo capsular F**. Gel de PCR. Líneas 1-5, aislados de *P. multocida;* línea 6, cepa de referencia NCTC 10322 (tipo capsular A); línea 7, cepa de referencia NCTC 10323 (tipo capsular B); línea 8, *E. coli*; línea 9, control negativo; línea 10, marcador de peso (1000 pb).

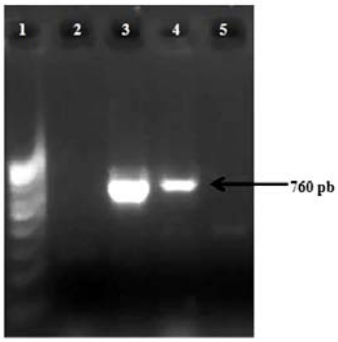

Figura 15. Tipo capsular B. Gel de PCR. Línea 1, marcador de peso (1000pb); línea 2, cepa de referencia NCTC 10322 (tipo capsular A); línea 3, control positivo (cepa de referencia NCTC 10323); línea 4, cepa de referencia NCTC 10324 (tipo capsular B); línea 5, control negativo.

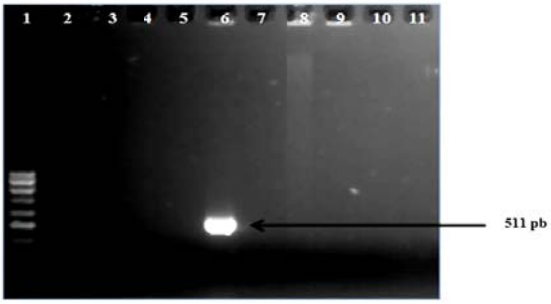

Figura 16. **Tipo capsular E**. Gel de PCR. Línea 1, marcador de peso (1000pb); línea 2, cepa de referencia NCTC 10322 (tipo capsular A); línea 3, cepa de referencia NCTC 10323 (tipo capsular B); línea 4, cepa de referencia NCTC 10324 (tipo capsular B); línea 5, cepa de referencia NCTC 10325 (tipo capsular D); línea 6, control positivo: cepa de referencia NCTC 10326 (tipo capsular E); líneas 7-9 aislados de *P. multocida*; línea 10, *E. coli*; línea 11, control negativo.

Una vez determinado el tipo capsular de todos los aislados se pudo observar que el **tipo capsular A** era el más frecuente, representando un 79% del total de los aislados. Este no fue un resultado sorprendente, ya que este tipo capsular es el más frecuente en todo tipo de hospedadores, incluyendo a los cerdos (Pijoan *et al.*, 1983; Pijoan *et al.*, 1984; Bisgaard *et al.*, 1991b; Rhoades *et al.*, 1992; Christiansen *et al.*, 1992a; Dziva *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2003a; Christensen *et al.*, 2005). Estos datos están de acuerdo con otro estudio muy similar, realizado también en España (concretamente en Cataluña), en el que clasificaron la mayoría de los aislados (97,7 %) de *P. multocida* como pertenecientes a dicho tipo capsular (Rubies *et al.*, 2002).

Se detectaron aislados de tipo capsular A en todas las **empresas productivas**. En las 4 empresas con un número de aislados mayor de 10, el tipo capsular A fue el predominante en 2 de ellas, concretamente el 91% en la nº 1 y el 84% en la nº 3, pertenecieron a este tipo. En las otras dos empresas los porcentajes fueron menores (13% en la empresa nº 2 y 40% en la empresa nº 8), siendo, por el contrario, la mayoría de aislados de tipo capsular D (Tabla 23 y Figura 17).

Tabla 23. Distribución de aislados de *P. multocida* de los diferentes tipos capsulares en las empresas de producción.

Empresa	Nº aislados tipo capsular A	Nº aislados tipo capsular D	Nº aislados tipo capsular F	Nº aislados total
1	121 (91,7%)	9 (6,8%)	2 (1,5%)	132
2	3 (13,0%)	20 (86,9%)	0 (0,0%)	23
3	21(84,0%)	1 (4,0%)	3 (12,0%)	25
8	4 (40,0%)	6 (60,0%)	0 (0,0%)	10

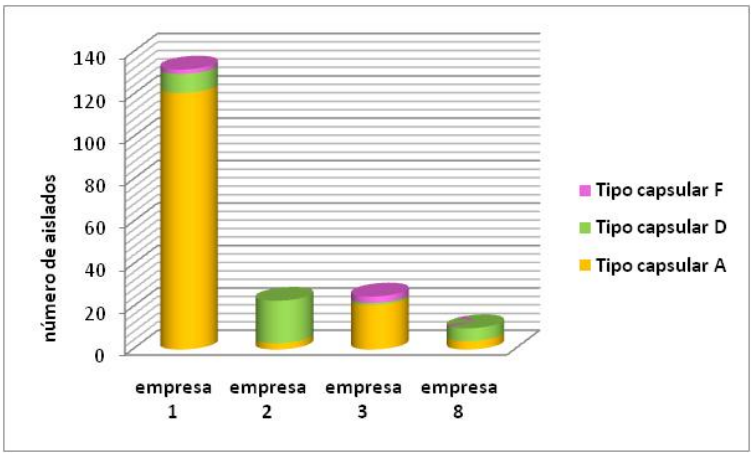

Figura 17. Distribución de los tipos capsulares en las empresas de producción.

Por su parte, los aislados de **tipo capsular D** (38 aislados, 18,5%) fueron aislados de animales de 6 empresas productivas, no siendo encontrado en las empresas nº 5 y nº 6. En la empresa nº 8, el tipo capsular D representó el 60%. Esta empresa había tenido casos de RAP, lo que podría ser una explicación de la mayor prevalencia del tipo capsular D, (Pijoan *et al.*, 1984; Foged *et al.*, 1988; Lariviere *et al.*, 1992). Sin embargo, la mayor frecuencia de aislados de tipo capsular D fue obtenida en la empresa nº 2, representando la gran mayoría de

los aislados (86,9%) (Figura 17 y Tabla 23). Curiosamente ninguna muestra de esta empresa procedía de casos de RAP, habiéndose aislado un 56,2% de aislados de procesos neumónicos y un 43,4% de procesos septicémicos. La empresa nº 2 es de ciclo cerrado (una única granja), por lo que podría ser que el movimiento limitado de animales haya propiciado el mantenimiento de cepas prevalentes, agrupados genéticamente (85% de las cepas encuadradas el subcluster A3), como se describe en otros estudios y como se detallará más adelante (Apartado 4. 3. 6.).

En cuanto a los **biovares** en los que se clasificaban los aislados de tipo capsular A, la mitad pertenecieron el biovar 3 y la otra mitad al biovar 2. Los aislados de tipo capsular D fueron, sin embargo, todos del biovar 3. La única referencia que encontramos en la bibliografía que presentaba datos de tipo capsular asociados al biovar, fue un estudio realizado en Vietnam en cerdos que presentaban pasterelosis sistémica (Townsend *et al.*, 1998b). Estos autores encontraron que los aislados de tipo capsular D y los de tipo capsular B estaban siempre asociados al biovar 3 y, sin embargo, los aislados del tipo capsular A pertenecían a los biovares 3, 8 y 11. Por lo tanto nuestros resultados corroboran que la diversidad de biovares se presenta únicamente en el tipo capsular A.

Respecto a los **procesos clínicos** se encuentra distribución similar de tipos capsulares A y D, tanto en procesos sistémicos (75% tipo capsular A y 19,4% tipo capsular D), como en neumónicos (82,8% tipo capsular A y 16,4% tipo capsular D), destacando, pese al escaso número de aislados, la mayor proporción de aislados de tipo capsular F en procesos sistémicos (5,5%), que en neumónicos (0,7%), como puede observarse en la Figura 18.

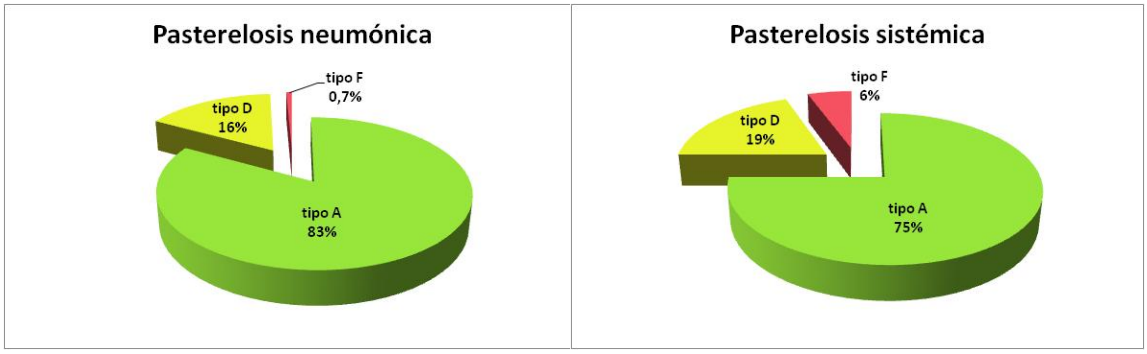

Figura 18. Distribución de los diferentes tipos capsulares en los procesos de pasterelosis neumónica y de pasterelosis sistémica.

Se pueden observar, por lo tanto, que los aislados tanto de tipo capsular A como de tipo capsular D se distribuyen de manera similar, sin que existan diferencias estadísticamente significativas entre ambos (IC=95%), entre los principales procesos clínicos. El tipo capsular A ha sido asociado clásicamente a procesos neumónicos en ganado porcino, siendo el tipo capsular D mucho menos frecuente (Pijoan *et al.*, 1984; Fussing *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2003a). De hecho, existen estudios, demostrados mediante técnicas de adherencia *in vitro*, que indican una mayor afinidad del tipo capsular A por células pulmonares porcinas que el tipo capsular D (Vena *et al.*, 1991). Además, aunque el papel de *P. multocida* como patógeno en el desarrollo de neumonía no ha quedado demostrado de forma concluyente, existen trabajos que indican que aislados de tipo capsular D pueden invadir el pulmón pero no sobrevivir en él fácilmente, al contrario que aislados de tipo capsular A, que gracias a su cápsula de ácido hialurónico evaden la fagocitosis (Maheswaran y Thies, 1979; Pijoan y Trigo, 1990; Zhao *et al.*, 1992).

En cuanto a los procesos septicémicos, el mayor porcentaje de aislados fueron clasificados en el tipo A, hecho a destacar, ya que únicamente tenemos constancia de un brote producido por este tipo capsular en Australia (Cameron *et al.*, 1996). Los casos de procesos septicémicos producidos por *P. multocida* en cerdos son esporádicos y, generalmente, están implicadas cepas de tipo capsular B y E (De Alwis, 1992; Gamage *et al.*, 1995; Townsend *et al.*, 1998b; Dziva *et al.*, 2001) y en algún caso de tipo capsular D (Mackie *et al.*, 1992; Mackie, 1996). Hemos de señalar, sin embargo, que los casos reseñados en la literatura parecen referirse a procesos clínicos agudos que implican a un número importante de animales, mientras que la mayoría de nuestros aislados no procedían de brotes agudos de enfermedad. Por lo tanto, habría que ampliar los estudios para determinar el papel que juegan las cepas de *P. multocida* en los procesos clínicos septicémicos en ganado porcino.

En los procesos de **RAP**, 3 de los 4 aislados fueron del tipo capsular D y uno sólo del tipo capsular A. A pesar de la limitada representación de aislados obtenidos de esta enfermedad, el predominio del tipo capsular D sobre el tipo capsular A fue un hallazgo esperado, ya que, como se indicó previamente, la asociación del tipo capsular D con la RAP es un hecho ampliamente demostrado (de Jong y Akkermans, 1986; Eamens *et al.*, 1988; Foged, 1988; Lariviere *et al.*, 1992; Sakano *et al.*, 1992a).

Respecto al **tipo capsular F**, fueron muy pocos los aislados encontrados de este tipo (n=5) (Figura 5), todos ellos caracterizados como biovar 1. Fueron aislados en 2 granjas en dos años diferentes. De los cinco aislados, 3 procedían de animales de una misma granja (2 aislados del mismo animal -de pulmón y corazón-), muestreados el mismo día. Los otros dos aislados pertenecían a otra empresa, y fueron tomados también en el mismo momento de un animal con pasterelosis sistémica y de otro animal que presentaba un proceso neumónico.

El haber encontrado tan pocos aislados del tipo capsular F puede considerarse como un hallazgo normal, ya que este tipo capsular no es muy común. Fue descrito por primera vez en 1987 en pavos en California (Rimler y Rhoades, 1987), y suele estar asociado a aislados de *P. multocida* de aves (Rhoades y Rimler, 1987; Rimler y Rhoades, 1987; Wilson *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 2003b). En el caso del ganado porcino el tipo capsular F no es habitual, representando en todos los casos un bajo número de aislados (Moreno *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2003a; Varga *et al.*, 2007). Además, no se ha encontrado ninguna referencia sobre el aislamiento de este tipo capsular en la cabaña porcina española, por lo que ésta parece ser la primera descripción del tipo capsular F en *P. multocida* en este país. La primera referencia de este tipo capsular en ganado porcino es en un estudio realizado en Brasil (Moreno *et al.*, 2003), en el que se caracterizaron 3 aislados (2 de cerebro y uno de tejido subcutáneo) como tipo capsular F. En el mismo año, en otro trabajo realizado en Inglaterra y Gales (Davies *et al.*, 2003a), se obtuvieron dos aislados de dicho tipo capsular de muestras de cerdos que presentaban neumonía y, posteriormente, en el año 2007 en Hungría se obtuvo otro aislamiento de este tipo (Varga *et al.*, 2007). Todas las muestras procedían de casos clínicos (también neumonía y septicemia), y el tipo capsular F tenía una escasa representación en relación a los tipos capsulares A y D, al igual que ocurre en nuestro estudio. En nuestro caso, la gran mayoría de aislados (80%) procedían de casos de pasterelosis sistémica, y tan sólo un 20% de procesos neumónicos (Figura 18), por lo que se puede pensar en una mayor asociación de este tipo capsular a los procesos septicémicos, aunque haya que recordar, de nuevo, el escaso número de aislados de este tipo capsular, que no permite obtener conclusiones claras.

En cuanto al origen del tipo capsular F en mamíferos, algunos autores han sugerido una transferencia horizontal o un cambio de especificidad de

hospedador. Como ejemplo baste mencionar un caso de *P. multocida* de tipo capsular F obtenido en terneros, en el que se exponía la hipótesis de un origen aviar de los aislados de este tipo, ya que estos animales habían sido estabulados donde previamente lo habían sido aves (Jones *et al.*, 1988), presentando síntomas clínicos similares a los asociados al tipo F en aves (sinusitis, conjuntivitis) (Jones *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 2003b; Davies *et al.*, 2004). Además, recientemente se han descrito casos en ovejas (Watson y Davies, 2002; Davies *et al.*, 2003c), ganado bovino y gatos (Ewers *et al.*, 2006), aunque en estos trabajos no se discutía el posible origen y/o transmisión del tipo capsular F. En nuestro caso concreto desconocemos el historial de la granja no pudiendo, por lo tanto, realizar ningún tipo de hipótesis.

Por otra parte, todos los aislados caracterizados en nuestro estudio como tipo capsular F fueron del biovar 1. En los pocos estudios que describen este tipo capsular, no se determinó el biovar, por lo que sus resultados no pueden ser comparados con los nuestros. Harían falta más estudios para comprobar si todos los aislados de tipo capsular F son siempre del biovar 1 o, por el contrario, pueden ser de varios biovares, tal y como ocurre con el tipo capsular A.

En nuestro estudio ningún aislado perteneció al **tipo capsular B** ni al **tipo capsular E**, resultado lógico ya que estos tipos capsulares se asocian normalmente a procesos de septicemia hemorrágica en ganado bovino y búfalo (Bain *et al.*, 1982; Carter y De Alwis, 1989; De Alwis, 1992; Wilson *et al.*, 1992). El tipo capsular B, además, ha sido aislado en raras ocasiones en aves (Rhoades y Rimler, 1987) y en algún caso en cerdos (Murty y Kaushik, 1965; Wilson *et al.*, 1992; Gamage *et al.*, 1995; Townsend *et al.*, 1998b; Dziva *et al.*, 2001), pero nunca en Europa.

4.3.3. Presencia de toxina dermonecrótica.

La presencia de la PMT fue evidenciada en 16 de los 205 aislados de *P. multocida* analizados en este estudio (Tabla 24), lo que supone el 7,8% del total de aislados.

Tabla 24. Aislados de *P. multocida* que presentan la PMT.

Aislado	Explotación	Tipo capsular	Biovar	Proceso clínico
1_{24}P01	XI	A	3	Pasterelosis neumónica
1_{22}P01				
1_{26}P01				
1_{57}P02	XIX			
1_{59}P02				
1_{52}P02	XXVI			
1_{51}P02				
1_{3}P01	XV			
1_{64}P02	IV			
1_{41}Z02	XX			Pasterelosis sistémica
8_{2}P06	XLV	D		Pasterelosis neumónica
8_{7}D06				RAP
8_{8}D06				
8_{1}N06		A		
8_{9}N06		D		
5_{3}P04	XLI	A		Pasterelosis neumónica

Nota. La codificación de los aislados se corresponde con:
Primera cifra: empresa (1-8). **Subíndice**: número de animal (orden cronológico). **Letra**: representando cada una de ellas una muestra diferente como se indica a continuación: P, pulmón; Z, corazón; T, tonsila; B, bazo; C, cerebro; F, líquido cefalorraquídeo; G, ganglio; A, líquido articular y X, líquido torácico. **Dos últimas cifras**: año de aislamiento.

La detección de éstos aislados toxigénicos se realizó mediante una técnica molecular (PCR, Apartado 3.7.1.1.) y una técnica inmunológica (ELISA, Apartado 3.7.1.2.).

Mediante la técnica de PCR se detectó el fragmento del gen *toxA,* del tamaño esperado de 1856 pb (Davies *et al.*, 2003a), tanto en los 16 aislados previamente citados, como en la cepa de referencia NCTC 4325 (control positivo), como puede observarse en el ejemplo presentado en la Figura 19.

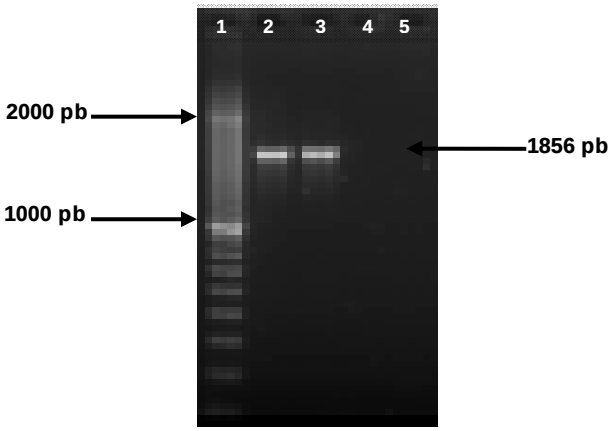

Figura 19. Gel de PCR de **PMT** de *P. multocida*. Línea 1, marcador de peso (3000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 4325); líneas 3 y 4, aislados de *P. multocida*; línea 5, control negativo.

La técnica de ELISA otorgó resultados positivos en los mismos casos que la PCR.

Los aislados de *P. multocida* que presentan la PMT no se pueden diferenciar mediante pruebas bioquímicas o mediante características morfológicas de los aislados no toxigénicos. Si se puede, sin embargo, detectar la presencia de la PMT mediante varios métodos como son: ensayos biológicos que incluyen el cultivo celular (Pennings y Storm, 1984; Rutter y Luther, 1984; Chanter *et al.*, 1986; Eamens *et al.*, 1988; Amigot *et al.*, 1998), pruebas en piel de cobaya (de Jong y Akkermans, 1986) y ensayos de letalidad en ratón (Pijoan *et al.*, 1984); ensayos inmunológicos como ELISA (Foged *et al.*, 1988), ensayos de hibridación por *colony-blot* (Magyar y Rimler, 1991) y *Western-blot* (Nagai *et al.*, 1994) y técnicas moleculares de PCR (Kamps *et al.*, 1990; Nagai *et al.*, 1994; Lichtensteiger *et al.*, 1996; Donnio *et al.*, 1999; Hunt *et al.*, 2000), PCR anidada (Choi y Chae, 2001) y sondas de ADN (Kamps *et al.*, 1990).

Entre todo este tipo de ensayos se eligieron las técnicas de PCR y ELISA, ya que son métodos no excesivamente laboriosos, que no implican la utilización de animales de laboratorio y que han demostrado ser eficaces en estudios previos (Foged *et al.*, 1988; Nagai *et al.*, 1994; Lichtensteiger *et al.*, 1996; Amigot *et al.*, 1998). El gen cromosómico *toxA,* que codifica la PMT presenta un grado de conservación elevado, por lo que este gen es una buena diana para identificar los aislados toxigénicos mediante PCR, siendo ésta una técnica

eficaz, además de ser rápida y económica (Buys *et al.*, 1990; Lax *et al.*, 1990; Petersen, 1990). Por otra parte, varios estudios han demostrado la utilidad de la técnica de ELISA para detectar la PMT de *P. multocida* (Foged *et al.*, 1988; Amigot *et al.*, 1998; Finco-Kent *et al.*, 2001).

En nuestro trabajo existió una concordancia del 100% entre los resultados obtenidos tras la detección de la PMT mediante la técnica de ELISA y aquellos obtenidos mediante la técnica de PCR, siendo todos los resultados coincidentes, tanto positivos como negativos. Por lo tanto, cualquiera de los dos métodos de detección aplicados en nuestro estudio supone una buena opción para evidenciar la presencia de la PMT en esta especie bacteriana. La técnica de PCR es más rápida y menos laboriosa que la técnica ELISA (el protocolo constaba de una incubación *overnigth*). Por otra parte, mediante la técnica ELISA se puede determinar si además de poseer el gen *toxA*, los aislados de *P. multocida* lo expresan, mientras que la técnica de PCR sólo detecta el gen, sea funcional o no (Register y Dejong, 2006). Nuestros resultados mostraron que todos los aislados que poseían el gen de la PMT lo expresaban, resultados que coinciden con lo descrito por la mayoría de autores en estudios similares (Lichtensteiger *et al.*, 1996; Amigot *et al.*, 1998).

La baja prevalencia (7,8%) de aislados toxigénicos en las explotaciones de ganado porcino muestreadas, limitándose a unas pocas granjas, coincide con estudios previos, siendo habitual hallar una baja prevalencia de cepas toxigénicas en aislados de *P. multocida* obtenidos de cerdos, en el caso de que no procedan de procesos de RAP (Gardner *et al.*, 1989; Fussing *et al.*, 1999; Vera-Lizarazo, 2008).

Clásicamente se ha asociado la presencia de la PMT con los procesos de RAP y con el tipo capsular D (de Jong, 1980; Rutter y Rojas, 1982; Eamens *et al.*, 1988; Gardner *et al.*, 1994; Ewers *et al.*, 2006). En nuestro caso no pudimos obtener más que 4 aislados procedentes de casos de RAP (probablemente debido a largas campañas de vacunación, además de eutanasias selectivas realizadas en nuestro país), presentando todos ellos la PMT, y perteneciendo 3 al tipo capsular D y 1 al tipo capsular A (Tabla 24).

Por otra parte, en los procesos neumónicos es frecuente hallar aislados de tipo capsular A no toxigénicos (Pijoan *et al.*, 1984; Pijoan y Fuentes, 1987; Iwamatsu y Sawada, 1988; Zhao *et al.*, 1992; Djordjevic *et al.*, 1998). En nuestro estudio corroboramos estos datos, ya que de todos los aislados

procedentes de pasterelosis neumónica (128 aislados), únicamente 11 (8,5%) presentaron la PMT y todos excepto uno fueron caracterizados como del tipo capsular A (Tabla 10). Igualmente en el estudio realizado en Cataluña por Rubies *et al.* (2002), la mayoría de los aislamientos de cerdos (todos procedentes de casos de neumonía) fueron caracterizados como tipo capsular A (97,7%) y ninguno presentó la PMT. En el trabajo de Vera-Lizarazo (2008) realizado con muestras de pulmón de cerdos procedentes de Castilla y León, Cataluña y Cantabria, la mayoría de aislados fueron también clasificados en el tipo capsular A (99,1%), siendo únicamente un 19,9% positivos a la detección de la PMT mediante PCR, todos ellos de tipo capsular A. Estos resultados coinciden con la mayoría de los autores, quienes describieron que la PMT suele estar en baja proporción en casos de procesos neumónicos en ganado porcino (Djordjevic *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2001).

En los escasos trabajos descritos sobre pasterelosis sistémica en ganado porcino se ha estudiado en muy pocas ocasiones la presencia de la PMT, reflejando que dicha toxina no suele estar asociada a este tipo de procesos (Mackie *et al.*, 1992; Mackie, 1996). En nuestro caso, de los 72 aislados obtenidos de procesos septicémicos, únicamente uno de ellos presentó la PMT, lo que indicaba una prevalencia muy baja (1,4%), dato que confirmaba lo descrito por los autores citados anteriormente.

Respecto a nuestros aislados de *P. multocida* de tipo **capsular F**, ninguno de ellos presentó dicha toxina, resultado que coincide con la bibliografía previa (Moreno *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2003a)

4.3.4. Secuenciación de la PMT.

Las PMTs de los dos aislados de tipo capsular A seleccionados en nuestro estudio (1_{26}P01 y 8_{1}N06) eran idénticas, ya que presentaban una similaridad del 100% en la secuencia del gen *toxA*. Además, ambas PMTs mostraban una similaridad de más del 99,8% con las secuencias publicadas de PMTs de cepas de tipo capsular D. La mayor semejenza se halló con las secuencias con número de acceso AF240778, AJ566110, X52478, las cuales presentaban cada una una base diferente al resto de cepas. La cepa X51512 difería en 4 nucleótidos, la cepa AY864768 difería en 6 nucleótidos y la cepa AY965266 en 7. En la Tabla 25 se detalla la base que cambia en cada aislado respecto a la base que se

presenta en las demás cepas (base mayoritaria) y la posición en la que se encuentra este cambio.

La única manera de demostrar que la PMT de ambos tipos capsulares era idéntica era realizando la secuenciación total del gen que la codifica (*toxA*) (Frandsen *et al.*, 1991). En el caso del tipo capsular A no se encontró constancia de que éste trabajo se hubiera llevado a cabo previamente, ya que únicamente se había secuenciado una región del gen *toxA* de1,5-kb (Nagai *et al.*, 1994), por lo que en nuestro trabajo se decidió realizar la secuenciación completa de este gen en dos aislados de tipo capsular A, comparándolos con las secuencias completas de aislados de tipo capsular D.

Tabla 25. Variación de nucleótidos y su posición en la secuencia del gen *toxA*.

	Base mayoritaria	Cambio de base	Posición
AF240778	A	G	1856
AJ566110	A	C	606
X52478	T	A	2776
X51512	G	C	1128
	C	G	1129
	G	C	2541
	C	G	2542
AY864768	A	C	264
	T	C	1683
	G	A	1772
	A	G	2086
	A	G	3303
	G	T	3376
AY965266	T	A	1112
	T	C	1450
	T	C	1805
	T	C	2339
	T	C	3368
	A	G	3554
	T	C	3983

Como se puede observar en la Tabla 25, las variaciones en la secuencia de nucléotidos eran mínimas respecto a un total de 4381 pb (Lax *et al.*, 1990). Se demostró, por lo tanto, que el gen *toxA* presentaba un alto grado de conservación, independientemente del tipo capsular de *P. multocida* (A o D). Este resultado coincidía y confirmaba trabajos previos, que indicaban que la PMT de cepas de ambos tipos capsulares debía ser similar o idéntica (de Jong y

Akkermans, 1986; Rimler, 1987; Foged *et al.*, 1988; Frymus *et al.*, 1989; Frandsen *et al.*, 1991; Nagai *et al.*, 1994; Donnio *et al.*, 1999) .

Las modificaciones que suponían estos cambios de nucleótidos, implicaban en algunos casos variaciones en la secuencia de aminoácidos. Tal y como se detalla en la Tabla 26, se aprecia la variación en esta secuencia de la PMT en 1 aminoácido en los aislados AJ566110 y X52478, en 2 aminoácidos en los aislados X51512 y AY965266 y en 5 aminoácidos en el aislado AY864768.

Tabla 26. Variación de aminoácidos y su posición en la secuencia del gen *toxA*.

	Aminoácido mayoritario	**Cambio de aminoácido**	**posición**
AJ566110	Asparagina	Histidina	130
X52478	Fenilalanina	Tirosina	853
X51512	Alanina	Arginina	304
	Alanina	Arginina	775
AY965266	Ácido aspártico	Ácido glutámico	298
	Isoleucina	Treonina	411
AY864768	Lisina	Glutamina	16
	Fenilalanina	Leucina	489
	Asparagina	Serina	623
	Lisina	Ácido glutámico	1029
	Glicina	Valina	1053

Además, las escasas variaciones en los aminoácidos de la PMT (en total la toxina consta de 1285 aminoácidos) no implicaban a zonas importantes de actividad de dicha toxina, descritas previamente por otros autores (Petersen, 1990; Pullinger *et al.*, 2001; Busch *et al.*, 2001). Por lo tanto, parece poco probable que estas variaciones afecten a su funcionalidad, hecho que corrobora estudios previos en los que se habían comparado la PMT de cepas de tipos capsulares A y D, poniendo en evidencia que en ambos casos las actividades biológicas eran similares (letal para ratones, necrosis en dermis de cobaya, cambios histológicos en cornetes nasales, etc.) (de Jong y Akkermans, 1986; Foged *et al.*, 1987; Foged *et al.*, 1988; Frandsen *et al.*, 1991), que presentaban idéntico patrón de hibridación del gen *toxA* al ADN cromosómico, que tenían la misma masa molecular (143 kDa) y que tenían las mismas propiedades inmunológicas (Rimler, 1987; Frymus *et al.*, 1989; Frandsen *et al.*, 1991).

La evidencia de que únicamente existe una PMT, igual en todos los aislados independientemente del tipo capsular, es un dato valioso fundamentalmente para el diagnóstico y profilaxis de la RAP. De este modo es

posible diseñar métodos fiables de detección de la PMT, así como diseñar vacunas frente a los aislados toxigénicos que fueran eficaces para prevenir los procesos causados por *P. multocida* independientemente de su tipo capsular.

4.3.5. Presencia de otros factores de virulencia.

En nuestra investigación efectuamos la detección de algunos factores posiblemente asociados a la virulencia de *P. multocida*, y que fueron descritos en un estudio bastante completo, realizado por Ewers *et al.* (2006) en Alemania, pero modificando la metodología de trabajo (Apartado 3.7.2.). En lugar de realizar técnicas de PCR simples para cada uno de los genes, en algunos casos se desarrollaron PCR múltiples que detectaban varios genes a la vez. Se utilizaron en todos los casos los mismos cebadores que se describían en el artículo, pero se modificaron las cantidades de la mezcla de PCR y las condiciones de la misma para optimizar las reacciones. Se realizaron 4 PCR simples ya descritas y se diseñaron, además, 4 PCR múltiples, que amplificaban 2 genes en los tres primeros casos y tres genes en el último caso (Tabla 27 y Figuras 20-24).

Tabla 27. Técnicas de PCR realizadas para detectar la presencia de genes asociados a virulencia.

Denominación PCR	Genes	Figura
I	*ompH*	14
II	*psl*	15
III	*ptfA*	16
IV	*tbPA*	17
V	*nanH+phfA*	18
VI	*hgbA+hgbB*	19
VII	*sodA+sodC*	20
VIII	*exbBD-tonB+oma87+nanB*	21

Las Figuras siguientes muestran ejemplos del resultado de la aplicación de estas técnicas de PCR en algunos aislados de *P. multocida*, incluyendo también, cepas de referencia, controles negativos y, en ocasiones, otras especies bacterianas, tales como *Haemophilus parasuis* y *E. coli*.

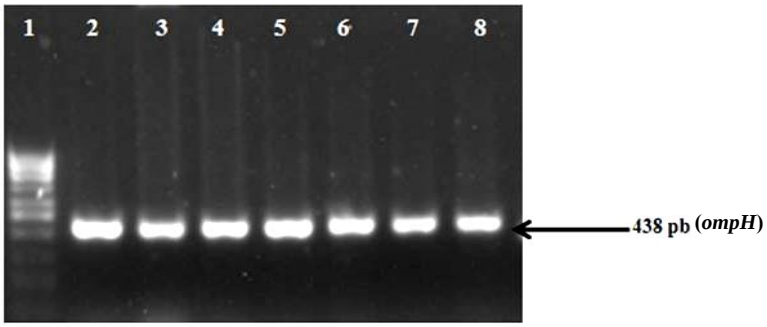

Figura 20. Gel de PCR **I**. Gen ***ompH*.** Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); línea 3, cepa de referencia NCTC 10323; línea 4, cepa de referencia NCTC 10324; línea 5, cepa de referencia NCTC 10326, líneas 6-8, aisladas de *P. multocida*.

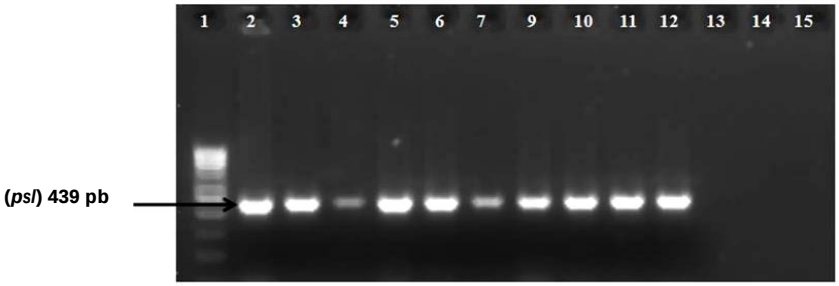

Figura 21. Gel de PCR **II**. Gen ***psl*.** Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); línea 3, cepa de referencia NCTC 10323; línea 4, cepa de referencia NCTC 10324; línea 5, cepa de referencia NCTC 10326, líneas 6-12, aisladas de *P. multocida*; línea 13 *H. parasuis*; línea 14, *E. coli*; línea 15, control negativo.

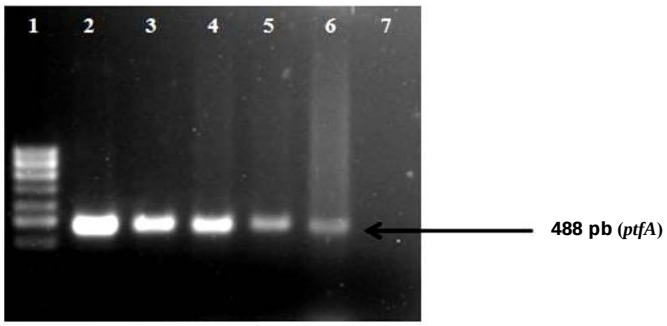

Figura 22. Gel de PCR **III**. Gen ***ptfA***. Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); línea 3, cepa de referencia NCTC 10323; línea 4, cepa de referencia NCTC 10326; líneas 5 y 6, aisladas de *P. multocida*; línea 7, control negativo.

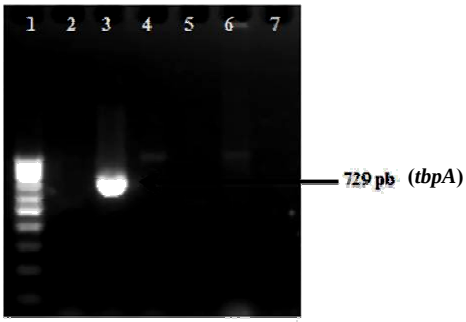

Figura 23. Gel de **PCR IV**. Gen ***tbpA***. Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, cepa de referencia NCTC 10322; línea 3, control positivo (cepa de referencia NCTC 10323); línea 4, cepa de referencia NCTC 10326; líneas 5 y 6, aisladas de *P. multocida*; línea 7, control negativo.

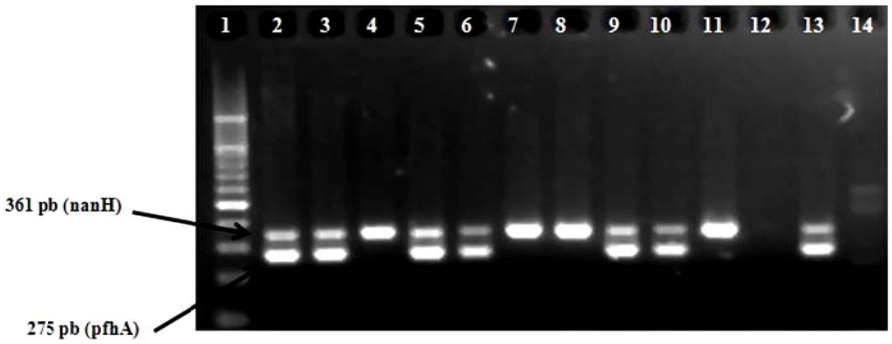

Figura 24. Gel de **PCR V.** Genes ***nanH*** y ***pfhA***. Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10324); línea 3, cepa de referencia NCTC 10322; línea 4, cepa de referencia NCTC 10325; líneas 5-11 y 13, aisladas de *P. multocida*; línea 12, *E. coli*; línea 14, control negativo.

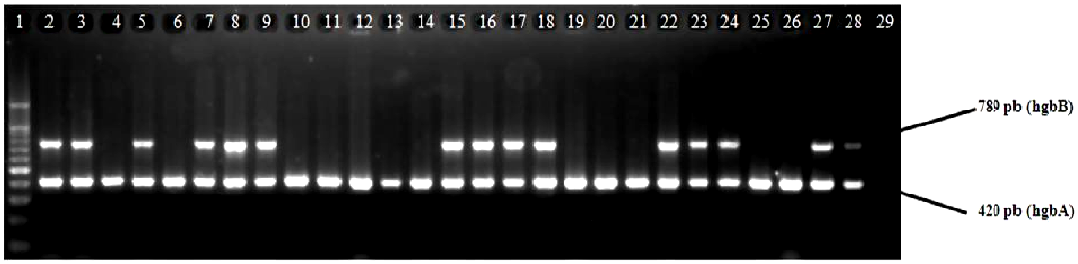

Figura 25. Gel de **PCR VI**. Genes ***hgbB*** y ***hgbA***. Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10324); línea 3, cepa de referencia NCTC 10323; línea 4, cepa de referencia NCTC 10326; líneas 5-28, aisladas de *P. multocida*; línea 29, control negativo.

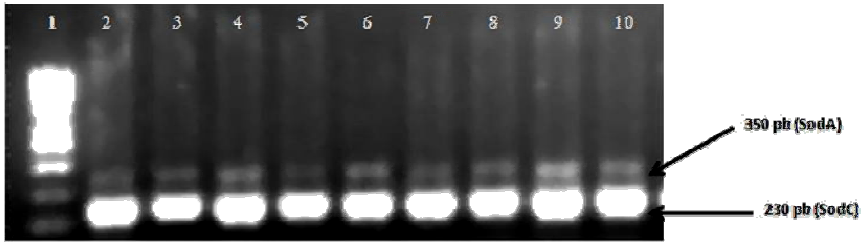

Figura 26. Gel de **PCR VII**. Genes ***sodA*** y ***sodC***. Línea 1, marcador de peso (1000pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10323); línea 3, cepa de referencia NCTC 10322; línea 4, cepa de referencia NCTC 10324; línea 5, cepa de referencia NCTC 10324; líneas 6-10, cepas de *P. multocida* aisladas.

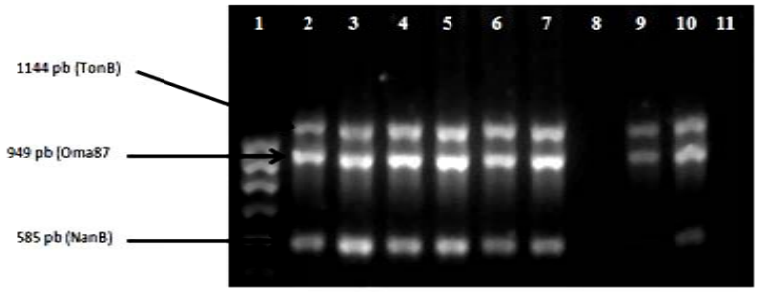

Figura 27. Gel de **PCR V**. Genes ***exBD-tonB***, ***oma87*** y ***nanB***. Línea 1, marcador de peso (1000 pb); línea 2, control positivo (cepa de referencia NCTC 10322); línea 3, cepa de referencia NCTC 10323; línea 4, cepa de referencia NCTC 10324; línea 5, cepa de referencia NCTC 10326, líneas 6, 7, 9 y 10, aisladas de *P. multocida*; línea 8, *E. coli*; línea 11, control negativo.

Cómo se muestra en las Figuras anteriores, tanto las PCR simples ya descritas, como las múltiples puestas a punto en este trabajo, resultaron ser técnicas eficaces para la detección de los genes de *P. multocida* asociados a virulencia, logrando, además, mediante estas últimas agilizar y economizar el trabajo. No se encontraron amplificaciones inespecíficas (en ningún caso se observó producto amplificado en los aislados de *H. parasuis*, o *E. coli*, por ejemplo) y en las PCR múltiples se diferenciaron con claridad las bandas que resultaban de amplificar los diferentes genes de virulencia, sin que hubiera lugar a confusión en la detección de los diferentes productos de amplificación.

Una vez determinada la utilidad de estas PCRs, se analizaron los resultados obtenidos para cada uno de los genes asociados a virulencia en nuestros aislados de *P. multocida* (Tabla 28).

Tabla 28. Presencia de genes asociados a virulencia en aislados de *P. multocida*.

Biovar	Tipo capsular	Nº aislados	Genes asociados a factores de virulencia. Porcentaje de aislados positivos (%)												
			psl	*ompH*	*oma87*	*ptfA*	*pfhA*	*nanB*	*nanH*	*tbpA*	*tonB*	*hgbA*	*hgbB*	*sodA*	*sodC*
1	F	5	100	100	100	100	40	100	100	0	100	100	100	100	100
2	A	81	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100
3	A	81	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	100	100
	D	38	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	100	100
Total		205	**100**	**100**	**100**	**100**	**40,5**	**100**	**100**	**0**	**100**	**100**	**60,5**	**100**	**100**

Como se puede apreciar en la Tabla 28, los genes encontrados en el 100% de los 205 aislados de *P. multocida* analizados deen este estudio fueron: *psl*, *ompH*, *oma87*, *ptfA*, *nanB*, *nanH, tonB*, *hgbA, sodA* y *sodC*. Ninguno de los aislados presentó el gen *tbpA* y únicamente se encontró variabilidad en el caso de los genes *pfhA* y *hgbB*, ya que estaban presentes en un 40,5% y 60,5% de los aislados estudiados, respectivamente

- El gen ***psl*** codifica para la proteína exterior de membrana de actividad porina llamada Psl, que es muy similar a la proteína P6 de *H. influenzae*, bien estudiada y caracterizada (Kasten *et al.*, 1995). Esta proteína posiblemente esté implicada en la adhesión inespecífica, entre otras funciones (Ewers *et al.*, 2004). El 100% de los aislados analizados resultaron ser *psl* positivos, al igual que ocurrió en el estudio de Ewers *et al.* (2006), independientemente de la especie animal estudiada y en el de Vera-Lizarazo (2008) en ganado porcino. Además, estudios previos ya indicaban que este gen estaba ampliamente distribuido en todos los serotipos de *P. multocida* (Kasten *et al.*, 1995).

- Los genes ***ompH* y *oma87*** codifican para proteínas de membrana externa implicadas en las relaciones con el hospedador, estando involucradas, por ejemplo, en el transporte de determinadas moléculas (porinas), exponiendo epítopos en la superficie (responsables de la inmunidad cruzada), confiriendo antividad antifagocitaria, etc. (Truscott y Hirsh, 1988; Confer, 1993; Dabo *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003b). Estos genes estaban presentes en el 100% de los aislados. Este dato coincide con los estudios de Vera-Lizarazo (2008) y de Ewers *et al.* (2006), en el que únicamente encontraron excepciones en aislados obtenidos de muestras de aves, ya que un 5% de los mismos carecía del gen. Curiosamente eran los aislados no capsulados los que carecían de este gen. Al estar esta proteína íntimamente asociada a la membrana y exterior de la célula podrían haberla perdido al perder la cápsula. Ninguno de nuestros aislados de *P. multocida* carecía de cápsula, por lo que no es extraño que no se haya encontrado ningún aislado *oma87* negativo. A parte de este caso, el resto de los estudios indicaban que éstas proteínas normalmente están conservadas en las especies bacterianas, expresándose en todos los serotipos de *P. multocida* (Ruffolo y Adler, 1996; Vasfi *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1999).

- En el caso de los genes ***nanH*** y ***nanB***, ambos estaban presentes en todos los aislados estudiados. El gen *nanB* también fue detectado en todos los aislados del estudio de Ewers *et al.* (2006) y de Vera-Lizarazo (2008). El gen

nanH, sin embargo, presentaba variaciones respecto a la especie animal de la que se habían obtenido los aislados de *P. multocida* (Ewers *et al.*, 2006). En el caso de los cerdos era un porcentaje muy elevado, de un 98,1%, muy similar al obtenido por Vera-Lizarazo (2008) (97,7%) y en nuestro estudio. En el resto de especies animales oscilaba la prevalencia desde un 53,3% en ovejas a un 100% en búfalo, aunque en la mayoría de los casos estaba presente entre un 83,3% y un 100% de los aislados (Ewers *et al.*, 2006). Estudios previos ya indicaban una elevada presencia y alto grado de conservación del gen *nanH* en aislados de *P. multocida* en aves (Mizan *et al.*, 2000) y conejos (Sanchez *et al.*, 2004).

Las sialidasas codificadas por ambos genes están relacionadas con la adhesión celular, ya que desenmascaran receptores de hospedador y reducen la eficacia de sus defensas, afectando especialmente a las membranas mucosas (Corfield, 1992). Existen pequeñas diferencias entre las especificidades de cada una de la proteínas (NanH y NanB) que pueden aumentar la capacidad invasiva de *P. multocida* (Mizan *et al.*, 2000), por lo que la combinación de ambos factores de virulencia parece ser importante para colonizar el tracto respiratorio del hospedador, de una forma más eficaz que con uno sólo de ellos. Parece, por lo tanto, que la gran mayoría de los aislados de *P. multocida* que infectan a los cerdos poseen ambas sialidasas, lo que facilita la colonización del tracto respiratorio de los mismos.

- Los genes ***sodA*** y ***sodC*** codifican para dos proteínas superoxidodismutasas de exterior de membrana que parecen estar implicadas en la virulencia de *P. multocida,* y cuya función principal es permitir la adherencia a la célula del hospedador (Boyle y Finlay, 2003). No parece haber discusión en que se encuentran siempre presentes en los aislados de este microorganismo, dato corroborado por su presencia en el 100% de aislados de *P. multocida* analizados en nuestro trabajo, así como en el realizado por Ewers *et al.* (2006) y por Vera-Lizarazo (2008).

- El gen ***ptfA*** codifica la proteína PtfA de *P. multocida* (fimbria tipo 4), que es un importante elemento de adhesión a las células del hospedador en bacterias Gram negativas (Glorioso *et al.*, 1982). En nuestro estudio se detectó este gen en todos los aislados, al igual que hicieron Ewers *et al.*, (2006) y Vera-Lizarazo (2008) en aislados obtenidos de ganado porcino. Asimismo confirmaban los resultados obtenidos por Ruffolo *et al.* (1997), quienes destacaron una amplia distribución del gen *ptfA* en aislados de *P. multocida*

independientemente del tipo capsular. También en este caso existían ligeras variaciones en algunas especies animales, descritas por Ewers *et al.* (2006), ya que la presencia de este gen en los aislados obtenidos de ganado bovino fue de un 99%, mientras que en ganado ovino fue del 86,7%.

- El locus de los genes ***ebxB, exbD y tonB*** codifica para proteínas que forman parte del complejo TonB que, básicamente, está implicado en el metabolismo del hierro. Proporciona energía para la absorción y el transporte de este mineral, esencial para la supervivencia y crecimiento de de *P. multocida* (Gray-Owen y Schryvers, 1996; Bosch *et al.*, 2002a). De nuevo observamos una coincidencia total en nuestros resultados de detección de este locus del complejo tonB (100% positivos) con los resultados obtenidos por Ewers *et al.* (2006) y Vera-Lizarazo (2008) en cerdos. La única excepción que encontraron dichos autores fue en aves ya que el 5% de los aislados no poseían este gen.

- El gen ***tbpA*** codifica una proteína transmembrana de unión a la transferrina que media el transporte de hierro a través de la membrana externa (Gray-Owen *et al.*, 1995; Gray-Owen y Schryvers, 1996; Ogunnariwo y Schryvers, 2001). Normalmente en las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* existen dos proteínas (TbpA y TbpB) implicadas en esta función (Gray-Owen y Schryvers, 1996). Sin embargo, en *P. multocida* sólo se ha evidenciado la existencia de la proteína TbpA en algunos aislados de muestras clínicas de rumiantes (Veken *et al.*, 1994; Ogunnariwo y Schryvers, 2001; Ewers *et al.*, 2006). Por ello no fue sorprendente que ninguno de nuestros aislados presentara este gen, al igual que en los aislados de origen porcino estudiados por Ewers *et al.* (2006) y Vera-Lizarazo (2008).

- El gen ***hgbA*** codifica la proteína de unión a la hemoglobina para adquirir hierro a partir de sustratos del hospedador (Bosch *et al.*, 2002b). Está presente en la totalidad de nuestros aislados, tal y como ocurre en los estudiados por Vera-Lizarazo (2008), siendo, además, muy similar al indicado por Ewers *et al.* (2006) en ganado porcino (prevalencia del 98,1%). En las demás especies animales este gen también está conservado, presentando sólo ligeras variaciones, ya que oscila desde un 87,5% en perros hasta un 100% en búfalos, ovejas, conejos y humanos (Ewers *et al.*, 2006). Otros estudios ya habían indicado previamente que este gen estaba ampliamente distribuido en *P. multocida* de diferentes serotipos y aislados de distintas especies animales, y se sugería que era esencial para la viabilidad de esta bacteria (Bosch *et al.*, 2002b).

Todos los genes mencionados anteriormente (excepto el gen *tbpA*) están presentes en todos los aislados, independientemente del tipo capsular y del proceso clínico del cuál estaban obtenidos, corroborando de este modo el estudio de Ewers *et al.* (2006). A diferencia de ello encontramos variaciones en los genes *pfhA* y *hgbB*, datos que se analizan a continuación.

- El gen ***pfhA*** codifica para la proteína PfhA, que es una hemaglutinina filamentosa (Ward *et al.*, 1998a; Sato y Sato, 1999). Encontramos en este caso una amplia variación en la presencia de este gen entre nuestros aislados ya que únicamente 83 de ellos lo presentaban, es decir, un 40,5% del total. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Vera-Lizarazo (2008), quien halló una prevalencia del 46,8% del gen *pfhA* en aislados obtenidos de pulmones de cerdos que presentaban lesiones neumónicas. Ewers *et al.* (2006), también observaron que no todos los aislados de *P. multocida* resultaban *pfhA* positivos, detallando, además, grandes variaciones entre las diferentes especies animales. Este gen estaba presente en el 37,5% del total de sus aislados, siendo detectado, por ejemplo, en el 100% de las muestras de búfalos, llegando a representar únicamente un 6,5% del total de aislados en pequeños rumiantes y estando ausente en aislados de origen humano. En cerdos este gen estuvo presente en el 21,2% de sus aislados (la mitad de los nuestros).

Es de destacar que en nuestro trabajo la gran mayoría de aislados *pfha* positivos fueron clasificados como tipo capsular A y fueron asignados al biovar 2, excepto 2 aislados que fueron clasificados como tipo capsular F y pertenecían al biovar 1. No se encontró ningún aislado de tipo capsular D ni perteneciente al biovar 3 que presentara este gen, ni tampoco ningún aislado toxigénico *phfA* positivo (Tabla 29).

Tabla 29. Prevalencia del gen *pfhA* en los diferentes biovares de *P. multocida* aislados.

	***pfhA* +**	***pfhA* -**	**total**
Biovar 1	2 (40%)	3 (60%)	5
Biovar 2	81(100%)	0 (0%)	81
Biovar 3	0 (0%)	119 (100%)	119
			205

Esta parece ser la primera descripción de la asociación de un determinado factor de virulencia con un biovar concreto en *P. multocida*, ya que no se han realizado investigaciones previas que combinen ambos datos.

En cuanto a la significación que la presencia de este gen pudiera tener, se ha demostrado que está implicado en fenómenos de inmunomodulación y cuya función principal es la adhesión a células del tracto respiratorio (Kimura *et al.*, 1990; Mooi *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1998a; Sato y Sato, 1999), pero no se ha encontrado en nuestro estudio ningún tipo de asociación con las diferentes patologías en ganado porcino (neumonía, septicemia o RAP).

- El gen ***hgbB*** está implicado en el transporte y la captación del hierro, aunque parece ser menos eficiente que *hgbA*, por lo menos en *H. influenzae* (Cope *et al.*, 2001). A pesar de que estaba descrito que el gen *hgbB* estaba ampliamente distribuido en aves y bóvidos (Cox *et al.*, 2003), en nuestro estudio observamos que la presencia de este gen no era constante en los aislados de *P. multocida*, resultados que coincidían con el de Ewers *et al.* (2006). La prevalencia de este gen en su estudio era bastante alta (77,9% de media general), encontrándose en un máximo de 100% de las cepas aisladas de humanos y conejos y un mínimo de un 57,7% en pequeños rumiantes (Ewers *et al.*, 2006; Vera-Lizarazo, 2008). En el caso del ganado porcino, estos autores hallaron un 86,5% de aislados *hgbB* positivos, frente al 60,5% de aislamientos positivos detectados en nuestro estudio, resultado muy similar de nuevo al estudio de Vera-Lizarazo (2008), quien halló un 60% de prevalencia de este gen.

De nuevo encontramos una asociación significativa del gen *hgbB* con el biovar, en este caso con el biovar 3, ya que todos los aislados de este biovar eran *hgbB* positivos y, sin embargo, ningún aislado de biovar 2 presentaba este gen. En el caso del biovar 1, éste gen estaba presente en los 5 aislados obtenidos (Tabla 30), indicando que se deberían ampliar los estudios para determinar si este gen presenta también una asociación significativa con este biovar.

Tabla 30. Presencia del gen *hgbB* en los diferentes biovares de *P. multocida*.

	***hgbB* +**	***hgbB* -**	**total**
Biovar 1	5 (100%)	0 (0%)	5
Biovar 2	0 (0%)	81(100%)	81
Biovar 3	119 (100%)	0 (0%)	119
			205

Como ya se ha indicado anteriormente, el gen *hgbB* está implicado en la adquisición de hierro dentro de la célula hospedadora, al igual que el gen *hgbA*, presente éste en todos los aislados de *P. multocida*. Por lo tanto, parece que en

las cepas de *P. multocida* poseer además del gen *hgbA,* el gen *hgbB* podría aumentar la capacidad de adquirir hierro y, por lo tanto, aumentar la viabilidad y supervivencia de los aislados que posean este gen. Esta podría ser una de las razones de la mayor prevalencia de aislados de biovar 3 frente a aislados de biovar 2, ya que éstos últimos carecen de este gen. Sin embargo, esto no sería una explicación en el caso del biovar 1, ya que es un biovar muy poco prevalente a pesar de presentar en todos los casos el gen *hgbB,* aunque podrían estar implicados otros factores.

En nuestro caso hemos de destacar la fuerte asociación negativa estadísticamente significativa (p=0.000) entre los genes *hgbB* y *pfhA* (Tabla 31), dato que concuerda con la investigación de Ewers *et al.* (2006) quienes destacaban, también, una asociación negativa significativa entre ambos genes en ganado porcino y bovino (p=0.000).

Tabla 31. Prevalencia de la combinación de los genes *hgbB y pfhA* en los diferentes biovares de *P. multocida* aislados.

	***pfhA* +/ *hgbB* +**	***pfhA* -/ *hgbB* -**	***pfhA* +/ *hgbB* -**	***pfhA* -/ *hgbB* +**	**Total**
Biovar 1	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (60%)	5
Biovar 2	0 (0%)	0 (0%)	81(100%)	0 (0%)	81
Biovar 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	119 (100%)	119
					205

Por otra parte, no detectamos en el mismo aislado el gen *toxA* y el gen *pfhA* en ninguna ocasión, resultado similar al publicado por Ewers *et al.* (2006), quienes destacaron una asociación negativa significativa entre ambos genes (p=0.040). Sin embargo hemos de tener en cuenta que nuestros aislados que presentaban el gen *toxA* eran todos del biovar 3 y, quizá, la ausencia del gen *pfhA* sea debido a este hecho y no a la presencia/ausencia del gen *toxA*.

4.3.6. Caracterización molecular: PFGE.

Los estudios de caracterización molecular llevados a cabo en *P. multocida* han sido realizados principalmente en aves (Kim y Nagaraja, 1990; Wilson *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 2001; Olson y Wilson, 2001; Davies *et al.*, 2003b). En el caso del ganado porcino la mayoría de los trabajos se han llevado a cabo en casos de RAP (Harel *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 1994; Fussing *et al.*, 1999; Donnio *et al.*, 1999), existiendo algunos artículos sobre procesos neumónicos

(Zhao *et al.*, 1993; Blackall *et al.*, 2000; Rubies *et al.*, 2002; Vera-Lizarazo, 2008) y septicémicos (Townsend *et al.*, 1998b; Blackall *et al.*, 2000).

Tal y como se detalló anteriormente (Apartado 1.7.2.), la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE) está descrita como el sistema de tipado "*gold standar*" para la caracterización molecular de *P. multocida* (Goering, 1993; Barbier *et al.*, 1996). Esta técnica presenta una elevada tipabilidad y poder discriminatorio aplicada a la caracterización de este patógeno, así como una buena reproducibilidad (Pedersen *et al.*, 2003), siendo estos parámetros superiores a los obtenidos con otras técnicas de tipificación molecular, tales como REA, ribotipado, RAPD y REP-PCR (Gunawardana *et al.*, 2000). Esta técnica además ha sido utilizada para la caracterización de aislamientos de *P. multocida* en distintas especies animales (Aalbaek *et al.*, 1999; Gunawardana *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2003), e incluso en aislados humanos (Blackwood *et al.*, 1996). Sin embargo, los estudios realizados en los que se ha analizado la relación entre aislados de este patógeno en ganado porcino mediante dicha técnica molecular son escasos (Donnio *et al.*, 1999; Leotta *et al.*, 2006b; Vera-Lizarazo, 2008). Asimismo, la experiencia previa de nuestro grupo de trabajo con otros patógenos bacterianos como por ejemplo *Lactococcus garvieae* (Vela *et al.*, 2000), *Streptococcus suis* (Vela *et al.*, 2003) o *Pseudomonas anguilliseptica* (Blanco *et al.*, 2002), había sido muy satisfactoria utilizando la técnica de PFGE, demostrando ésta ser una técnica útil en estudios de caracterización molecular.

Debido a todo lo señalado anteriormente, resultaba interesante realizar un estudio de caracterización genética de aislados de *P. multocida* de ganado porcino en España utilizando la técnica de PFGE. Además, según los datos que obran en nuestro poder, en nuestro país únicamente existen (hasta lo que nuestro conocimiento se refiere) dos tesis doctorales en las que se utilizó las técnicas REA y PFGE para la caracterización molecular de aislados de *P. multocida* en cerdos (Rubies *et al.*, 2002; Vera-Lizarazo, 2008).

Todas las cepas analizadas en este estudio (205 aislados de campo y 6 cepas de referencia) fueron caracterizadas mediante la técnica PFGE, utilizando la endonucleasa de restricción *ApaI* (*BspI*). Esta enzima de restricción utilizada fue seleccionada ya que, según estudios previos, es la más adecuada para la caracterización de *P. multocida* al producir bandas claras y bien separadas y ser los patrones fácilmente interpretables (Donnio *et al.*, 1999; Gunawardana *et al.*, 2000; Lainson *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2003).

Todos los aislados fueron tipables, resultando 69 PFPs diferentes (1-69), que presentaron entre 8 y 13 bandas bien definidas de 22 a 492 kb (Figura 28).

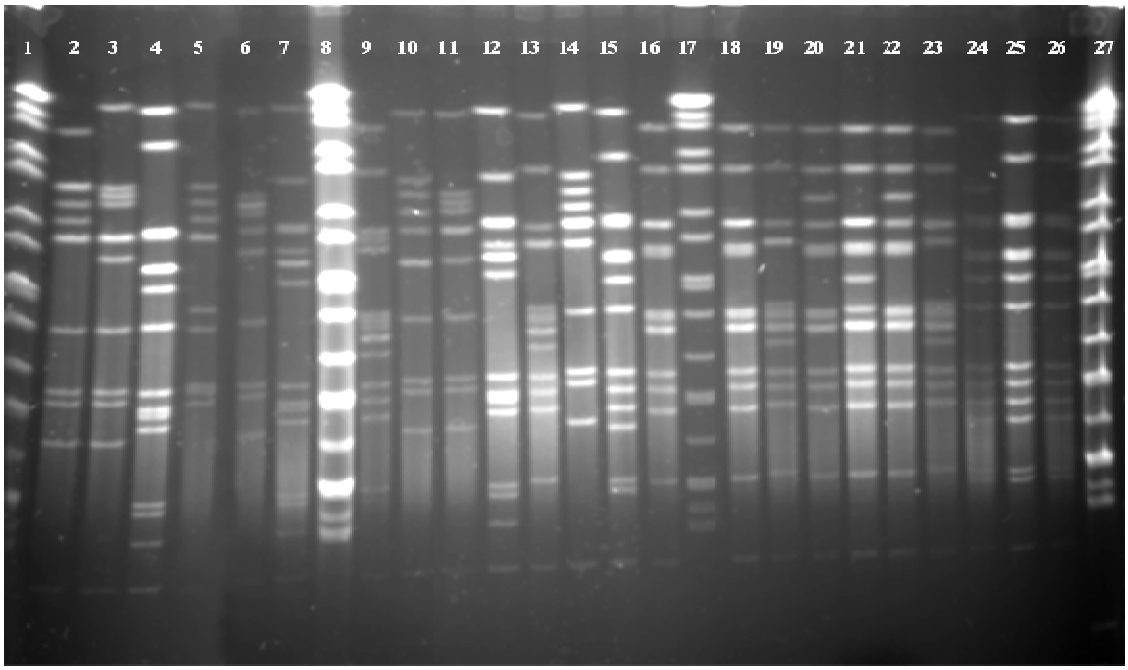

Figura 28. Perfiles genéticos obtenidos por PFGE representativos de los aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* tras la digestión del ADN bacteriano con el enzima de restricción *Apa*I. Líneas 1, 8, 17 y 27, *Salmonella* serotipo Braenderup H9812; línea 2, aislado 1_{40}C02; línea 3, aislado 1_{41}Z02; línea 4, aislado 1_{1}P01; línea 5, aislado 1_{55}P02; línea 6, aislado 1_{63}PL02; línea 7, aislado 1_{57}P02; línea 9, aislado 1_{65}P02; línea 10, aislado 1_{60}Z02; línea 11, aislado 1_{53}P02; línea 12, aislado 5_{3}P04; línea 13, aislado 1_{81}Z03; línea 14, aislado 1_{2}P01; línea 15, aislado 1_{87}P03; línea 16, aislado 1_{74}P02; línea 18, aislado 3_{6}P04; línea 19, aislado 1_{44}Z02; línea 20, aislado 1_{107}Z03; línea 21, aislado 1_{101}Z03; línea 22, aislado 1_{15}P01; línea 23, aislado 1_{44}Z02; línea 24, aislado 1_{116}P04; línea 25, aislado 1_{115}PL03; línea 26, aislado 1_{115}Z03.

En nuestro estudio la técnica de PFGE demostró poseer un elevado poder discriminatorio, ya que permitió diferenciar entre aislamientos que mostraban idénticas características fenotípicas, como eran el tipo capsular, biovar y presencia o no de toxina. Hecho lógico ya que la técnica de PFGE tiene un elevado poder discriminatorio (Arbeit, 1995).

La relación de los perfiles genéticos obtenidos, asociada con el biovar, el tipo capsular, la presencia/ausencia de los genes *toxA*, *pfhA* y *hgbB,* así como el número de aislados analizados se presenta en la Tabla 32.

Tabla 32. Clasificación de los aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* estudiados, según su perfil genético (patrón PFGE), biovar, tipo capsular, presencia/ausencia de los genes *toxA*, *pfhA* y *hgbB*.

Referencia aislados	Patrón PFGE	Biovar	Tipo capsular	*toxA*	*pfhA*	*hgbB*	Nº aislados
1_{6}P01, 1_{25}P01	1	3	A	-	-	+	2
1_{98}P03	2	3	A	-	-	+	1
1_{105}P03, 1_{105}Z03, 1_{106}P03	3	3	A	-	-	+	3
1_{105}A03	4	3	A	-	-	+	1
1_{18}P01, 1_{29}Z01, 1_{39}C02, 1_{83}P03, 1_{87}P03, 1_{88}P03, 1_{100}P03, 1_{101}Z03, 1_{102}P03, 1_{109}P03, 1_{110}P03, 1_{111}A03, 4_{6}T04	5	3	A	-	-	+	13
1_{100}P03	6	3	A	-	-	+	1
1_{103}P03, 1_{104}Z03	7	1	F	-	+	+	2
1_{3}P01, 1_{22}P01, 1_{24}P01, 1_{26}P01, 1_{51}P02, 1_{52}P02	8	3	A	+	-	+	6
CECT 4325	9	3	D	+	-	+	1
2_{1}P02, 2_{3}P02, 2_{12}P03, 2_{16}P04, 2_{16}Z04, 2_{18}P04	10	3	D	-	-	+	6
NCTC 10325	11	3	D	-	-	+	1
1_{41}Z02, 1_{57}P02, 1_{59}P02, 5_{3}P04, 8_{1}N06	12	3	A	+	-	+	5
8_{7}D06	13	3	D	+	-	+	1
8_{2}P06, 8_{8}D06, 8_{9}N06	14	3	D	+	-	+	3
1_{114}Z03, 1_{116}P04	15	3	D	-	-	+	1
1_{115}P03, 1_{115}P03, 1_{115}Z03, 2_{13}P03	16	3	D	-	-	+	4
1_{34}P02, 1_{34}Z02, 1_{82}P03, 1_{85}P03, 2_{4}P02, 2_{5}P02, 2_{5}Z02, 2_{6}P02, 2_{6}Z02, 2_{7}P02, 2_{9}C02, 2_{9}P02, 2_{11}P03, 2_{15}P04, 2_{19}P04, 3_{23}P04, 4_{4}P04, 7_{2}G04, 8_{4}P06, 8_{10}P06	17	3	D	-	-	+	20
2_{14}P03	18	3	D	-	-	+	1
2_{10}P03	19	3	D	-	-	+	1
1_{64}P02	20	3	A	+	-	+	1
1_{74}P02, 1_{89}P03, 1_{93}P03, 1_{94}P03, 3_{4}P04, 3_{6}P04, 8_{3}P06	21	3	A	-	-	+	7
7_{1}P04	22	3	A	-	-	+	1
1_{99}Z03	23	3	A	-	-	+	1
1_{14}P01, 1_{97}P03, 1_{107}Z03	24	3	A	-	-	+	3
5_{2}P04	25	3	A	-	-	+	1
6_{1}Z02	26	3	A	-	-	+	1
5_{4}P04	27	3	A	-	-	+	1

Referencia aislados	Patrón PFGE	Biovar	Tipo capsular	*toxA*	*pfhA*	*hgbB*	Nº aislados
4_{1}P04	28	3	A	-	-	+	1
1_{30}P01,1_{90}P03, 1_{91}P03, 1_{96}P03	29	3	A	-	-	+	4
1_{21}P01, 1_{40}Z02, 1_{44}Z02, 1_{67}P02, 1_{70}P02, 1_{70}Z02, 1_{71}P02, 1_{72}Z02, 1_{77}Z03, 1_{78}P03, 1_{92}P03, 1_{96}Z03, 1_{112}P03, 1_{113}C03	30	3	A	-	-	+	14
1_{118}Z04	31	3	A	-	-	+	1
1_{49}P02	32	3	A	-	-	+	1
1_{68}B02	33	3	A	-	-	+	1
1_{27}P01, 1_{35}C02, 1_{40}C02, 1_{38}Z02, 1_{38}P02, 1_{37}Z02, 1_{69}C02, 1_{69}P02	34	3	A	-	-	+	8
1_{117}G04	35	3	A	-	-	+	1
1_{50}P02	36	3	A	-	-	+	1
3_{12}P04	37	3	A	-	-	+	1
NCTC 10323	38	3	B	-	-	+	1
NCTC 10326	39	3	F	-	-	+	1
NCTC 10324	40	13	B	-	+	+	1
1_{31}P02, 1_{32}P02, 1_{95}P03	41	2	A	-	+	-	3
1_{1}P01, 1_{8}Z01, 1_{9}Z01, 1_{10}P01, 1_{11}Z01, 1_{12}P01, 1_{13}Z01, 1_{16}P01, 1_{17}P01, 1_{19}P01, 1_{20}P01, 1_{28}P01, 1_{33}C02, 1_{36}P02, 1_{42}P02, 1_{42}Z02, 1_{43}Z02, 1_{45}P02, 1_{46}P02, 1_{47}P02, 1_{48}P02, 1_{63}P02, 1_{65}P02, 1_{73}P02, 1_{76}Z03, 1_{79}P03, 1_{81}Z03, 3_{17}P04	42	2	A	-	+	-	28
6_{2}Z03	43	2	A	-	+	-	1
3_{3}P04, 3_{20}G04, 3_{20}P04, 3_{21}P04, 3_{22}P04, 5_{1}P04	44	2	A	-	+	-	6
1_{15}P01	45	2	A	-	+	-	1
1_{56}P02, 1_{79}Z03 3_{14}P04, 3_{15}P04, 3_{16}P04, 8_{6}P06	46	2	A	-	+	-	6
3_{1}P04, 3_{5}P04, 3_{7}P04, 3_{8}P04, 3_{9}P04, 3_{10}P04, 3_{13}P04	47	2	A	-	+	-	7
3_{2}P04, 3_{11}T04	48	2	A	-	+	-	2
4_{3}P04, 8_{5}P06	49	2	A	-	+	-	2
1_{23}P01, 1_{61}P02	50	2	A	-	+	-	2
NCTC 10322	51	2	A	-	+	-	1
1_{53}P02, 1_{62}P02	52	2	A	-	+	-	2
1_{66}P02	53	2	A	-	+	-	1
1_{54}P02, 1_{84}G03, 1_{84}P03	54	2	A	-	+	-	3
6_{2}P03	55	2	A	-	+	-	1
2_{2}Z02, 2_{17}P04	56	2	A	-	+	-	2
1_{80}Z03	57	2	A	-	+	-	1
2_{8}Z02	58	2	A	-	+	-	1
1_{2}P01	59	2	A	-	+	-	1
3_{18}P04, 3_{18}Z04, 3_{19}Z04	60	1	F	+	-	+	3
1_{58}P02	61	2	A	-	+	-	1
1_{75}B03, 1_{75}Z03	62	2	A	-	+	-	2
4_{5}P04	63	2	A	-	+	-	1
1_{55}P02	64	2	A	-	+	-	1

Referencia aislados	Patrón PFGE	Biovar	Tipo capsular	*toxA*	*pfhA*	*hgbB*	Nº aislados
1_4P01	65	2	A	-	+	-	1
1_{60}Z02, 1_{86}G03	66	2	A	-	+	-	2
1_5P01	67	2	A	-	+	-	1
1_7P01	68	2	A	-	+	-	1
4_2P04	69	2	A	-	+	-	1

CODIFICACIÓN:

Primera cifra: empresa (1-8). **Subíndice**: número de animal (orden cronológico). **Letra**: representando cada una de ellas una muestra diferente como se indica a continuación: P, pulmón; Z, corazón; T, tonsila; B, bazo; C, cerebro; F, líquido cefalorraquídeo; G, ganglio; A, líquido articular; X, líquido torácico y D, origen desconocido. **Dos últimas cifras**: año de aislamiento.

Tal y como se muestra en la Tabla 32, cada una de las cepas de referencia fue caracterizada en un perfil único (PFPs 9, 11, 38, 38, 40 y 51). En cuanto a los 205 aislados de campo analizados, éstos fueron clasificados en 63 PFPs, lo que suponía una DG de un 0,33. De todos los aislados analizados, 37 (18,0%) representaban perfiles únicos. Observamos por lo tanto, que los aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* analizados presentaban una heterogeneidad moderada.

La DG que presenta *P. multocida* es variable según el proceso clínico que produce en las diferentes especies hospedadoras. Por ejemplo, se evidencia una marcada homogeneidad genética, típica, en la mayoría de las ocasiones, de patógenos primarios (Selander y Musser, 1990), en casos de RAP en cerdos (Harel *et al.*, 1990; Nielsen y Rosdahl, 1990; Gardner *et al.*, 1994; Djordjevic *et al.*, 1998; Fussing *et al.*, 1999) y en los casos de septicemia hemorrágica en ganado bovino (Johnson *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1992; Townsend *et al.*, 1997a; Townsend *et al.*, 1998b). Por otra parte, en los procesos de cólera aviar se ha descrito, generalmente, una mayor heterogenicidad (Snipes *et al.*, 1989; Christiansen *et al.*, 1992b; Wilson *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1995; Djordjevic *et al.*, 1998; Blackall *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2003b; Shivachandra *et al.*, 2007). Sin embargo, en los procesos neumónicos en ganado porcino existe cierta controversia. Así, determinados estudios previos describen una limitada diversidad genética (Harel *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 1992; Fussing *et al.*, 1999; Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Rubies *et al.*, 2002) y se ha llegado a sugerir que diferentes subpoblaciones de *P. multocida* especialmente virulentas eran las causantes de estos procesos respiratorios (Davies *et al.*, 2003b). Sin

embargo, otros autores habían destacado que los aislados de *P. multocida* presentaban una heterogenicidad considerable utilizando diferentes técnicas de tipado como REA, ribotipado, análisis de restricción de fragmentos y análisis de plásmidos (Buttenschon y Rosendal, 1990; Djordjevic *et al.*, 1998). Estas discrepancias podrían ser explicadas en base a diferencias en las técnicas de tipificación molecular (que poseen distinto poder discriminatorio) o bien a la procedencia de los aislados que puede sesgar el estudio como por ejemplo, si se muestrean poblaciones reducidas o sistemas de producción cerrados, en casos de brotes agudos de enfermedad etc. (Bowles *et al.*, 2000).

En nuestro estudio, en el caso de neumonía porcina, el grado de DG es moderado, coincidiendo este resultado con el reciente trabajo de Vera-Lizarazo (2008) en el que se obtuvo una DG similar a la nuestra (0,30), utilizando también PFGE. Sin embargo, en Cataluña, Rubies *et al.* (2002) describieron un grado de DG mucho menor (0,07) en aislados de *P. multocida* obtenidos de muestras de ganado porcino que presentaban neumonía. Esta gran diferencia podría explicarse debido al menor poder discriminatorio de la técnica REA frente a la de PFGE (Pedersen *et al.*, 2003) y/o a que estos autores muestrearon animales de una única pirámide productiva de ciclo cerrado. En este tipo de sistemas de producción no es extraño hallar unos pocos patrones genéticos que predominan sobre el resto y se mantienen a lo largo del tiempo, describiéndose un grado de DG limitada (Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000). En nuestro estudio, además de utilizar una técnica de tipado genético de mayor poder discriminatorio, los aislados se habían obtenido de diversas regiones geográficas y de diferentes empresas (con diversos sistemas de producción y manejo), hechos que pueden explicar la mayor variabilidad genética.

La relación genética entre los aislamientos de *P. multocida* subsp. *multocida* basada en los perfiles de restricción generados mediante UPGMA tras la digestión del ADN con el enzima *Apa*I es presentada en el dendograma simple mostrado en la Figura 29.

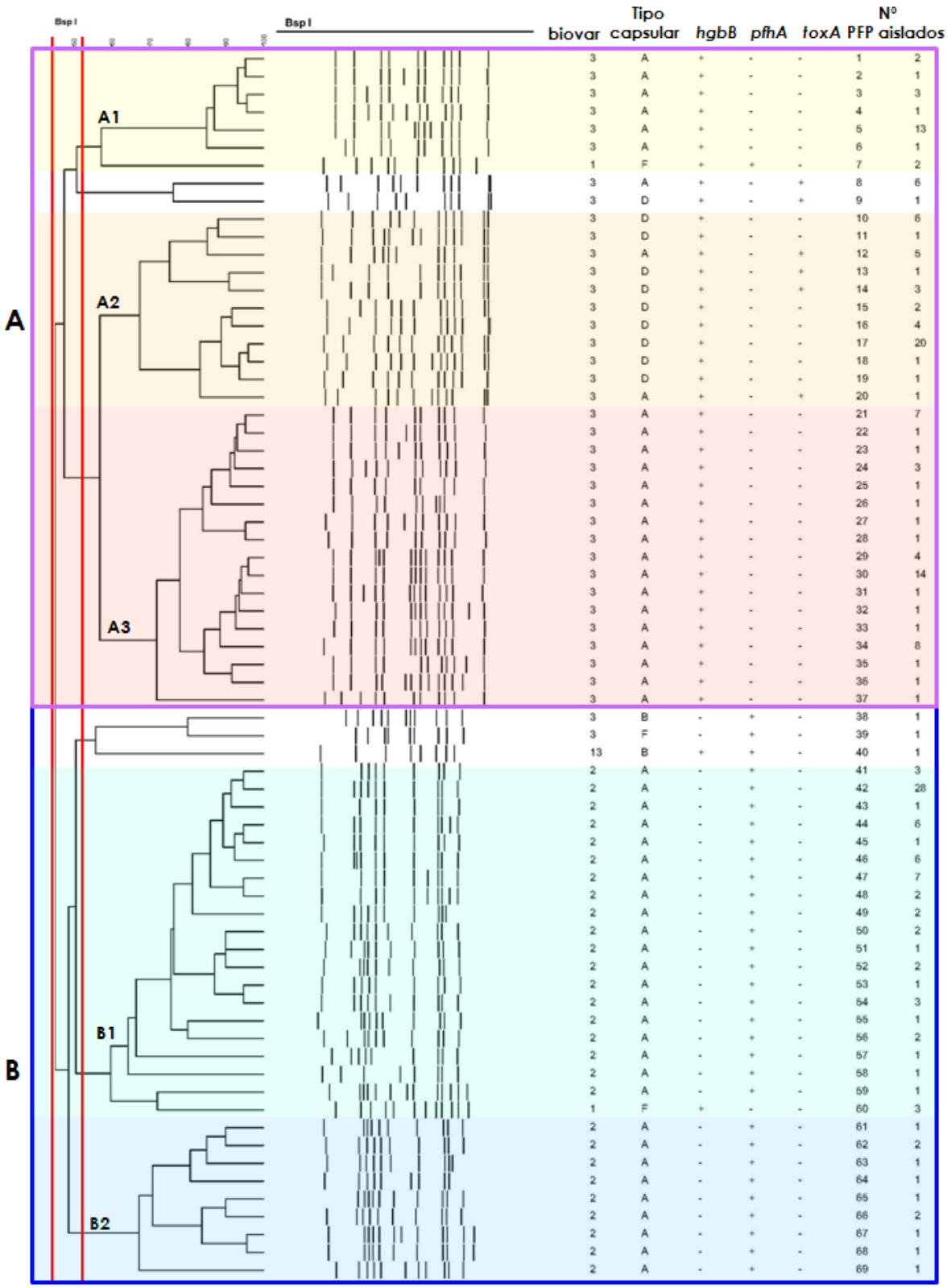

Figura 29. Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre los 211 aislados de *P. multocida* subsp. *multocida* realizado en base al análisis de grupos UPGMA de los 69 PFPs obtenidos después de la digestión del ADN bacteriano con la enzima de restricción *Apa*I.

En el dendograma generado se observaron claramente 2 grupos genéticos principales, A y B, con una similaridad entre ellos de un 45% (Figura 29). El grupo A, que incluía 121 aislados de campo y 2 cepas de referencia (58,2% del total de aislados), podía ser subdividido en 3 subgrupos principales (con una similaridad del 59%), denominados A1 (21 cepas), A2 (44 cepas) y A3 (48 cepas), mientras que el grupo B estaba formado por 84 aislados de campo y 4 cepas de referencia (41,7% del total de aislados) y se subdividía (con igual similaridad) en los subgrupos prinipales B1 (74 cepas) y B2 (11 cepas).

Los 123 aislados incluidos en el grupo genético A fueron clasificados en 35 PFPs diferentes (DG=0,28). Estos aislados se habían obtenido a lo largo de todos los años de estudio y procedían de todas las empresas productivas muestreadas. Prácticamente todos los aislados del biovar 3 (98,3%) (excepto 2 situados en el grupo genético B), se ubicaron en este grupo, 81 de ellos de tipo capsular A y los 38 restantes de tipo capsular D, además de 2 aislados de biovar 1 (de tipo capsular F) y 2 cepas de referencia (NCTC 10325 y CETC 4325). En este grupo se incluyeron todos los aislados de nuestro estudio que presentaban la PMT (tanto de tipo capsular A como de tipo capsular D).

Por otro lado, en el grupo genético B se situaron 88 aislados (41,7%), 4 de ellos cepas de referencia (NCTC 10322, NCTC 10323, NCTC 10324 y NCTC 10326), que se clasificaron en 32 perfiles genéticos diferentes (DG=0,36). Todas las empresas productivas, excepto la nº 7, estuvieron representadas en este grupo y los aislados fueron obtenidos también a lo largo de todos los años de muestreo. La totalidad de los aislados de biovar 2 estuvieron ubicados en este grupo genético, la mayoría de ellos de tipo capsular A (excepto 3 aislados de tipo capsular F, biovar 1, y 2 cepas de referencia de tipo capsular B, de los biovares 3 y 13).

Por lo expuesto anteriormente, se puede destacar que existía una asociación estadísticamente significativa entre el biovar 3 y el grupo genético A, y entre el biovar 2 y el grupo genético B (Fig. 29). Ninguno de los biovares compartió, en ningún caso, el mismo PFP. Parecía claro, por lo tanto, que ambos biovares formaban subpoblaciones clonales diferentes dentro de *P. multocida* subsp. *multocida*, y que se diferenciaban, además, en al menos dos factores de virulencia (*hgbB* y *pfhA*). Esta especial agrupación de los diferentes biovares de *P. multocida* ya había sido resaltada en estudios previos, aunque utilizaran diferentes técnicas de tipificación a las utilizadas en este trabajo, y

fueran realizadas en diferentes especies animales. Por ejemplo, Blackall *et al.* (1998) en un estudio epidemiológico realizado en Australia en aves domésticas utilizando la técnica de MLEE, observaron que aislados de diferentes biovares se podían asociar a grupos específicos. Al igual que en nuestro caso, los biovares 2 y 3 aparecían claramente separados y, sin embargo, el biovar 1 estaba distribuido en ambos grupos genéticos (Blackall *et al.*, 1998). En el mismo año se realizó otro trabajo de caracterización de *P. multocida* en ganado porcino, utilizando esta vez la técnica de REP-PCR, en el que también se destacó una asociación entre tipo REP y biovar (Townsend *et al.*, 2000). Más tarde, Bowles *et al.* (2000), también en Australia, estudiando aislados de *P. multocida* obtenidos de cerdos mediante la técnica de ribotipado agruparon los diferentes biovares y sugirieron que los aislados de biovar 2 podían formar un grupo genético diferenciado dentro de la especie *P. multocida* subsp. *multocida*. Finalmente, en España Vera-Lizarazo (2008), mediante PGFE, también observó una relación entre biovar y grupo genético.

El grado de DG detectado en nuestro estudio fue moderado, tanto en el biovar 3 como en el 2. De este modo, los aislados de biovar 3 (n=124), fueron caracterizados en 34 PFPs diferentes (DG=0,28). El PFP más frecuente fue el nº 17, representado por 20 aislados (16,2%), seguido por el PFP nº 5, con 13 aislados (10,5%) y el PFP nº 30 con 14 aislados (11,3%). Todos los aislados de biovar 2 (n=82) se distribuyeron en 27 PFPs diferentes (DG=0,32). El más prevalente fue el PFP nº 42, con 28 aislados (34,5%). Analizando estos datos se puede determinar que no existen diferencias estadísticamente significativas (IC=99%) entre la DG de los biovares 2 y 3. Este resultado no coindice con estudios previos en los que se había destacado que el biovar 3 presentaba una elevada DG, mayor que la de los demás biovares, más limitados genéticamente (Townsend *et al.*, 1998a; Blackall *et al.*, 2000; Leotta *et al.*, 2006b).

Dentro de cada uno de los grupos genéticos principales se puede destacar la asociación de las cepas en diferentes subgrupos (A1-A3 y B1-B2) principalmente en función de su origen (Fig. 29, Tabla 32), resultados que concuerdan con los obtenidos por otros autores (Townsend *et al.*, 1997a; Gunawardana *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2007; Vera-Lizarazo, 2008). Así, dentro del subgrupo genético A2 se situaron el 86,9% de los aislados obtenidos en la empresa de producción nº 2 y el 70% de los de la empresa nº 8, mientras que en el subgrupo B1 se ubicaron el 84% de los aislados de la empresa nº 3 (Fig. 29,

Tabla 32). En el resto de subgrupos se encontraron principalmente las cepas de la empresa nº 1, distribuyéndose el 15,1% de cepas de ésta en el subgrupo genético A1, 29,5% en el A3, 32,5% en el B1 y 6,8% en el B2. Estas diferencias podrían ser explicadas en base a que esta compañía constaba de multitud de granjas receptoras que tenían diferentes sistemas de manejo, estaban situadas en diferentes localizaciones y se muestrearon durante diferentes años, en contraste, por ejemplo, a la empresa nº 2, de ciclo cerrado y representada por una única granja.

Por otra parte se puede observar que en el subgrupo A2 se concentraron la mayoría de los aislados (76,3%) de tipo capsular D, estando más de la mitad de ellos (52,6%) representados por un único perfil genético (PFP nº 17). Sin embargo, la mayoría de aislados de tipo capsular A (162 aislados) estaban ampliamente distribuidos por todo el dendograma, incluyéndose en todos los subgrupos genéticos. Este resultado coincide con lo destacado por otros autores quienes indicaron que existía una mayor heterogeneidad de los aislamientos de tipo capsular A, frente al resto de los tipos capsulares (Dziva *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2003b; Leotta *et al.*, 2006b). No se trata de un hecho extraño ya que el tipo capsular A se aisla de un rango más amplio de hospedadores y causa diferentes manifestaciones clínicas, mientras que los demás tipos capsulares tienden a ser más específicos respecto a la especie hospedadora y proceso clínico (Dziva *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2003b; Ewers *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2006; Leotta *et al.*, 2006b). Por ejemplo, Davies *et al.* (2003) realizaron un estudio en Inglaterra y Gales en *P. multocida* aisladas de aves, hallando una asociación clara entre los diferentes tipos capsulares y los tipos OMP. Aislados de tipo capsular B, D y F, así como los no tipables, estaban asociados a tipos OMP específicos y representaban grupos clonales bien definidos, mientras que aislados de tipo capsular A estuvieron clasificados en una gran variedad de tipos OMP (Davies *et al.*, 2003b). En el caso concreto del ganado porcino, en Brasil se llevó a cabo un estudio de caracterización molecular muy similar al nuestro, pero utilizando la técnica de SE-AFLP en cerdos que presentaban neumonía, RAP y septicemia reseñando, igualmente, una elevada heterogeneidad en los aislados de tipo capsular A frente a la mayoría de los aislados de tipo capsular D de cavidad nasal y productores de toxina que se agrupaban en el mismo grupo genético (Moreno *et al.*, 2003). Por otro lado, aislados de distintos tipos capsulares no fueron caracterizados en ningún caso en el mismo perfil genético en nuestro estudio, coincidiendo con lo citado por

Harel *et al.* (1990), aunque en ocasiones se ha señalado la clasificación de los tipos capsulares A y D en el mismo perfil genético (Donnio *et al.*, 1999; Vera-Lizarazo *et al.*, 2008).

A pesar de la variedad de PFPs hallada, existían algunos patrones que destacaban sobre los demás debido a su mayor prevalencia. Así, por ejemplo, hay cuatro perfiles (PFP nº 5, 17, 30 y 42) que agrupan el 35% de todos los aislados (Tabla 32). El PFP más frecuentemente aislado fue el nº 42 que estaba representado por 28 aislados (13,6% del total de aislados de campo) ubicados en el subgrupo genético B1. Todos ellos fueron clasificados en el tipo capsular A y en el biovar 2 y ninguno de ellos era toxigénico. Salvo una excepción, el total de estos aislados se había obtenido en la empresa de producción nº 1 (en 8 explotaciones diferentes) a lo largo de los 4 años de muestreo. El segundo PFP más frecuente fue el nº 17, incluido en el subgrupo genético A2, y en el que fueron clasificados un total de 20 aislados (9,7%). En este caso, todos eran del tipo capsular D, biovar 3, y ninguno presentaba la PMT. Aunque más de la mitad de estos aislados (55%) pertenecían a una única empresa de producción (la nº 2), también se detectaron aislados con este perfil en otras 4 empresas en todos los años excepto en el 2001. Es decir, era un perfil que se distribuía ampliamente en distintas empresas (que tenían diferentes sistemas de producción) situadas en diversas localizaciones geográficas. El tercer PFP más frecuente fue el nº 30 que incluía 14 aislados (6,8%), y el cuarto PFP fue el nº 5, que incluía 13 aislados (6,3%). Ambos perfiles estaban situados en el grupo genético A, e incluían aislados de tipo capsular A, biovar 3, no toxigénicos. La mayoría de aislados de ambos perfiles pertenecían a la empresa nº 1, dato lógico, ya que era la empresa que tenía, con gran diferencia, la mayor representación en nuestro estudio.

Destaca, por lo tanto, la presencia de ciertos PFPs prevalentes que se habían obtenido de diferentes empresas de producción a lo largo de los diferentes años del estudio, y que fueron clasificados en diferentes biovares y tipos capsulares (Tabla 32, Fig. 29), lo que indica que su mayor prevalencia no está asociada a ninguna de estas características. La existencia de cepas prevalentes ya había sido descrita previamente, ya que existían determinados ribotipos y patrones de restricción que predominaban y se asociaban a procesos de neumonía (Zhao *et al.*, 1992; Bowles *et al.*, 2000; Rubies *et al.*, 2002; Vera-Lizarazo *et al.*, 2008) y a RAP en ganado porcino (Gardner *et al.*, 1994; Fussing

et al., 1999). Algunos autores reseñan la permanencia de estas cepas en el tiempo (Christensen *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 2003), resultado que concuerda con nuestro estudio, como por ejemplo en el caso del PFP nº 42, aislado desde el año 2001 al 2004 en la empresa de producción nº 1. En otros patógenos respiratorios porcinos también han sido destacados perfiles genéticos más prevalentes, como el caso de *S. suis* (Vela *et al.*, 2003), así como en otras bacterias como *Lactococcus garvieae* (Vela *et al.*, 2000) o *Listeria monocytogenes* (Vela *et al.*, 2001). Se ha sugerido que estas cepas predominantes podrían ser variantes más virulentas, que serían las responsables de la mayoría de los casos clínicos (Selander y Musser, 1990; Mogollon *et al.*, 1991; Torremorell y Pijoan, 1998; Vela *et al.*, 2003). Estos resultados no se confirman en nuestro caso, ya que no se hallaron diferencias en los factores de virulencia estudiados en los PFPs prevalentes sobre el resto. Por lo tanto habría que buscar otras causas como podrían ser la presencia de factores de virulencia desconocidos o la influencia de la naturaleza de la propia producción porcina (Blackall *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2000; Rubies *et al.*, 2002), como ya se indicó anteriormente. Por ejemplo, en nuestro estudio, el PFP nº 17 fue un patrón prevalente en la empresa nº 2 (empresa de ciclo cerrado) que se mantenía a lo largo del tiempo, lo que podría implicar que este perfil genético fuera más virulento (factores desconocidos) y/o sobreviviera más fácilmente en el ambiente/hospedador, aspecto favorecido por este tipo de sistema de producción, en el que es más fácil que exista uno o unos pocos perfiles genéticos predominantes (Zhao *et al.*, 1992; Rubies *et al.*, 2002).

Respecto a los principales procesos clínicos, entre los aislados de procesos neumónicos (n=127) se detectaron 50 PFPs diferentes (DG=0,39) que estaban situados en los dos grupos genéticos principales (56,6% en grupo A y 43,3% en el grupo B) (Tabla 32 y Fig. 29). En el caso de aislados de procesos septicémicos se observó un grado de DG muy similar (0,41) ya que fueron hallados 30 PFPs diferentes en los 72 aislados obtenidos en animales que presentaban este proceso clínico (61,1% en grupo A y 38,8% en grupo B) (Tabla 32 y Fig. 29). No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas (IC=99%) entre la DG de los aislados independientemente del proceso clínico. Incluso se encontraron ejemplos de perfiles genéticos compartidos entre aislados procedentes de casos de neumonía y RAP (PFP nº 14), y entre ambos y los de procesos de septicemia (PFP nº 12). En la mayoría de los casos, los perfiles que incluían más de un aislamiento (19 perfiles) se encontraban

igualmente representados tanto por aislados obtenidos de procesos neumónicos como septicémicos, clasificados en los tipos capsulares A y D de *P. multocida* y los biovares 2 y 3, sin diferencias entre los principales factores de virulencia estudiados. Por lo tanto, parece que ciertas cepas, independientemente de su tipo capsular, biovar y presencia/ausencia de factores de virulencia, son capaces de producir neumonía y septicemia en el cerdo. Como se citó en párrafos anteriores, en referencia a los casos de neumonía, la mayoría de autores señalan que *P. multocida* actúa como patógeno secundario formando parte del CRP, hecho que explican, por un lado debido a la elevada DG y, por otro, a que se aisla en muchas ocasiones combinada con otros agentes víricos o bacterianos (Buttenschon y Rosendal, 1990; White *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1994; Djordjevic *et al.*, 1998). En nuestro caso en el 39% de las ocasiones *P. multocida* se aisló junto con otras bacterias (principalmente *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* y *H. parasuis*). Sin embargo, la DG fue moderada y un 60% de las cepas fueron aisladas en cultivo puro, representados por 38 PFPs diferentes, de los que un 26,3% se compartieron con aislados septicémicos. Algunos autores han indicado que pueden existir cepas de *P. multocida* que actuarían como patógenos primarios (Davies *et al.*, 2003b), incluso otros han indicado que a partir de procesos neumónicos puedan desencadenarse procesos septicémicos (Buttenschon y Rosendal, 1990; Dungworth, 1993). Por ejemplo, Dungworth *et al.* (1993) describieron que la pasterelosis neumónica es una enfermedad primaria del pulmón que puede asociarse a bacteriemia o septicemia, como ocurre en el caso de otras neumonías producidas por diferentes bacterias. También Buttenschøn *et al.* (1990) caracterizaron genéticamente aislados de *P. multocida* de tipo capsular A implicados en un proceso septicémico, demostrando que los aislados obtenidos de riñones de cerdos enfermos presentaban los mismos PFPs que los aislados de los mismos animales obtenidos de pulmón, concluyendo que eran diseminados a través de la sangre desde el origen principal en el pulmón. Nuestro estudio parece confirmar que ciertas cepas, independientemente del tipo capsular y biovar, bajo determinadas circunstancias, son capaces de diseminarse desde el pulmón a otros órganos y/o tejidos del hospedador.

5. CONCLUSIONES

Primera

Pasteurella multocida subsp. *multocida* fue la única subespecie aislada a partir de las muestras clínicas analizadas en el presente estudio, confirmando el predominio de esta subespecie como responsable de procesos clínicos en el ganado porcino.

Segunda

El sistema de identificación comercial API 20E puede resultar útil para la identificación rutinaria de la especie *P. multocida*. Sin embargo, su eficacia mejora considerablemente cuando se complementa con la realización de ciertas pruebas de manera tradicional, concretamente la decarboxilación de la ornitina, producción de indol y producción de ácido a partir del sorbitol.

Tercera

La gran mayoría de aislados, tanto de procesos neumónicos como septicémicos, pertenecieron al tipo capsular A (79%), carecían de la toxina dermonecrótica (92%) y se vincularon a un número limitado de biovares (1, 2 y 3). A pesar de que el biovar 3 fue el más prevalente, representando el 58% del total de aislados analizados, destacó la elevada prevalencia del biovar 2 (40% de los aislados) en relación a estudios previos en España y resto de países.

Cuarta

El hecho de que aproximadamente la cuarte parte (23%) de los perfiles de restricción obtenidos por PFGE incluyeran tanto aislados pulmonares como de otras localizaciones orgánicas, sugiere que al menos algunas de las cepas de *P. multocida* asociadas a procesos neumónicos tendrían la capacidad de diseminarse e infectar a otros tejidos u órganos.

Quinta

La totalidad de los aislados de *P. multocida* presentaron los genes asociados a virulencia *ompH*, *oma87*, *psl*, *nanH*, *nanB*, *tonB*, *hgbA*, *sodA* y *sodC.* Sin embargo, la presencia de los genes *pfhA* (que codifica para una hemaglutinina filamentosa) y *hgbB* (implicado en la captación del hierro) estuvo asociada a los biovares 2 y 3, respectivamente.

Sexta

Los aislados clínicos de *P. multocida*, tanto de casos de neumonía como de septicemia presentaron una diversidad genética moderada, detectándose ciertos perfiles prevalentes distribuidos ampliamente por las diferentes localizaciones geográficas y pirámides productivas, teniendo la capacidad de persistir a lo largo del tiempo.

Séptima

Los aislados de los biovares 2 y 3 se asociaron mediante PFGE en dos grupos claramente definidos. Este resultado, junto con las diferencias halladas en los genes *pfhA* y *hgbB* sugieren que ambos biovares representan poblaciones de *P. multocida* diferenciadas a nivel genético.

6. RESUMEN

Pasteurella multocida es una bacteria comensal del tracto respiratorio que puede dar lugar a diferentes patologías en distintas especies animales en todo el mundo. En el ganado porcino es el agente responsable de los procesos de rinitis atrófica progresiva (RAP) y de procesos neumónicos, formando parte del complejo respiratorio porcino, que es causa de importantes problemas sanitarios y económicos en las explotaciones de cría intensiva. Además, en ocasiones, puede dar lugar a procesos septicémicos.

Se trata de una especie muy heterogénea en la que se distinguen tres subespecies (*multocida*, *gallicida* y *séptica*), 13 biovares (1-10 y 12-14), 5 tipos capsulares (A, B, D, E y F) y 16 serotipos (1-16). Se han descrito diferentes genes posiblemente asociados a virulencia, algunos de los cuales tienen una prevalencia variable en las cepas de *P. multocida*.

El principal objetivo de nuestro estudio fue el de caracterizar fenotípica y genéticamente aislados de *P. multocida* obtenidos a partir de diferentes muestras, principalmente neumónicas, de ganado porcino de varias empresas productivas distribuidas por diferentes regiones de España.

Se identificaron 205 aislados mediante el empleo de métodos bioquímicos (API 20E) y moleculares (PCR), confirmándose que pertenecían a la especie *P. multocida.*. Se determinó que existían diversos patrones bioquímicos, siendo algunos prevalentes, agrupando, de este modo, en 4 de ellos el 64% de los aislados.

Mediante diferentes pruebas bioquímicas se determinó que todos los aislados pertenecían a la subespecie *multocida*, siendo clasificados en un escaso número de biovares (1, 2 y 3). De ellos el biovar 3 fue el que se halló con una mayor prevalencia, resultado esperado, seguido del biovar 2 que, sin embargo, representaba una proporción considerablemente mayor (40%) a la hallada en estudios previos.

La determinación del tipo capsular mediante PCR permitió clasificar la mayoría de aislados en el tipo A (79%), siendo el resto de los tipos capsulares D (18,5%) y F (0,02%). Por otra parte, se detectó la presencia de la toxina dermonecrótica (PMT) en únicamente 16 aislados (7,8%). Estos resultados entran dentro de lo esperado, ya que la mayoría de las muestras procedían de procesos neumónicos en los que, generalmente, están implicadas cepas de tipo capsular A que carecen de la PMT. Además, la secuenciación del gen que codifica para la PMT de dos aislados de tipo capsular A, permitió comprobar que ésta era prácticamente idéntica a la del gen de cepas de tipo capsular D.

Respecto a la presencia de determinados genes asociados a la virulencia se demostró, utilizando para ello PCR simples y múltiples, que la mayoría de ellos estaban presentes en todos los aislados. Así, los genes *psl*, *ompH*, *oma87*, *ptfA*, *nanB*, *nanH*, *tonB*, *hgbA*, *sodA* y *sodC* estuvieron presentes en el 100% de los aislados, mientras que el gen *tbpA* no se encontró en ninguno de ellos. Sin embargo, la prevalencia de los genes *pfhA* y *hgbB* fue variable (40% y 60%, respectivamente) y curiosamente estuvieron asociadas al biovar. De este modo todos los aislados del biovar 2 poseían el gen *pfhA* y los de biovar 3 tenían el gen *hgbB.*

Por último, se utilizó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE), calificada como el métodod *gold estándar* para la caracterización molecular de cepas de *P. multocida*. Mediante dicho procedimiento se pudieron clasificar los 205 aislados en 69 patrones diferentes, lo que suponía una diversidad genética moderada (0,31). A pesar de la variabilidad de perfiles de PFGE se pudo destacar la presencia de ciertos patrones prevalentes que se distribuían por las diferentes empresas productivas y regiones geográficas, permaneciendo a lo largo del tiempo. Además, se evidenciaron dos grupos genéticos (con una similiaridad del 45%), diferenciándose claramente la población de cepas del biovar 2 de la población de cepas del biovar 3.

7. SUMMARY

Pasteurella multocida is a commensal microorganism of the upper respiratory tract which is able to produce different diseases in several animal species worldwide. In swine is the agent responsible of the progressive atrophic rhinitis (PAR) and pneumonic processes, being implicated in the porcine respiratory complex, which causes significant health and economic problems in the intensive production systems. Moreover, it can lead to septicaemic processes under certain circumstances.

P. multocida is a very heterogeneous species with three subspecies (*multocida*, *gallicida* and *septica*), 13 biovars (1-10 and 12-14), 5 capsular types (A, B, D, E and F) and 16 serotypes (1-16). Different genes probably associated with virulence have been described, some of which have a variable prevalence among strains of *P. multocida..*

The main aim of present study was to characterize phenotypically and genetically isolates from *P. multocida* obtained from different samples, mainly from pneumonic processes, from pigs of several companies widely distributed in different regions of Spain.

A total of 205 isolates were identified by biochemical (API 20E) and molecular (PCR) methods, confirming that they belonged to the species *P. multocida*. It was determined that different biochemical patterns existed, some of them more prevalent, thus bringing together 4 of them 64% of the isolates.

When the commercial identification system was complemented performing different biochemical tests all isolates were classified into the *multocida* subspecies, and were assigned into a limited number of biovars (1, 2 and 3). Of these, biovar 3, as expected, was found to have the higher prevalence

followed by biovar 2 (40%). The prevalence of this biovar was higher compared with previous studies.

The capsular type determined by PCR allowed the classification of most isolated as type A (79%), while the other isolates were of capsular type D (18.5%) and F (0.02%). On the other hand, *Pasteurella multocida* toxin (PMT) was only detected in 16 isolates (7.8%). These results were not surprising, because most of the samples came from pneumonic processes, which generally involve capsular type A strains lacking the PMT. Furthermore, the determined sequence of the PMT encoding gene of two capsular type A isolates were almost identical to that of capsular type D strains.

Regarding the presence of certain genes associated with virulence, it was demonstrated, by simple and multiplex PCR, that most of them were present in all isolates. Thus *psl, ompH, oma87, ptfA, NanB, nanH, TonB, hgbA*, *sodA* and *sodC* genes were present in the 100% of the isolates, while the *tbpA* gene was not found in any of them. However, the prevalence of genes *pfhA* and *hgbB* was variable (40% and 60% respectively) and were associated with the biovar. Thus, the presence of the genes *pfhA* and *hgbB* were associated with isolates of biovar 2 and biovar 3, repectively.

Finally, *P. multocida* isolates were characterized by the pulsed-field electrophoresis (PFGE). This technique is considered as the gold standard method for molecular characterization of *P. multocida* strains. By this method it was possible to classify the 205 strains in 69 different PFGE patterns, indicating a moderate genetic diversity (0.31). Despite the variability of PFGE profiles, it was also noted the presence of certain prevalent patterns that were distributed in the different production companies and geographical regions, remaining during time. In addition, at a genetic similarity of 45%, the isolates of biovar 2 and 3 clustered in two different well defined genetic groups.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Aalbaek, B., Eriksen, L., Rimler, R. B., Leifsson, P. S., Basse, A., Christiansen, T., y Eriksen, E. (1999). Typing of *Pasteurella multocida* from haemorrhagic septicaemia in Danish fallow deer (Dama dama). APMIS 107, 913-920.

Abdullahi, M. Z., Gilmour, N. J., y Poxton, I. R. (1989). Identification of non-haemolytic pasteurellae cultured from the lungs of cattle. Vet.Rec. 125, 154.

Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Rajakumar, K., Serrano, M., van, Zanden A., Zhang, Y., y Ruffolo, C. (1999). Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. J.Biotechnol. 73, 83-90.

Al-Hasani, K., Boyce, J., McCarl, V. P., Bottomley, S., Wilkie, I., y Adler, B. (2007). Identification of novel immunogens in *Pasteurella multocida*. Microb.Cell Fact. 6, 3.

Amass, S. F., Clark, L. K., van Alstine, W. G., Bowersock, T. L., Murphy, D. A., Knox, K. E., y Albregts, S. R. (1994). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. J.Am.Vet.Med.Assoc. 204, 102-107.

Amigot, J. A., Torremorell, M., y Pijoan, C. (1998). Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. J.Vet.Diagn.Invest 10, 169-173.

Amonsin, A., Wellehan, J. F., Li, L. L., Laber, J., y Kapur, V. (2002). DNA fingerprinting of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. J.Clin.Microbiol. 40, 3025-3031.

Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., y Bisgaard, M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol. 49 Pt 1, 67-86.

Arbeit, R. D. (1995). Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In Manual of Clinical Microbiology 190-208.

Arons, M. S., Fernando, L., y Polayes, I. M. (1982). *Pasteurella multocida*--the major cause of hand infections following domestic animal bites. J.Hand Surg.[Am.] 7, 47-52.

Avril, J. L., Donnio, P. Y., y Pouedras, P. (1990). Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. J.Clin.Microbiol. 28, 1438-1440.

Backstrand, J. M. y Botzler, R. G. (1986). Survival of *Pasteurella multocida* in soil and water in an area where avian cholera is enzootic. J.Wildl.Dis. 22, 257-259.

Backstrom, L. y Hoefling, D. C. (1982). Respiratory diseases of swine. Vet.Clin.North Am.Large.Anim Pract. 4, 259-276.

Baekbo, P. y Nielsen, J. P. (1988). Airbone *Pasteurella multocida* in pig fattening units. Proceedings.International Pig Veterinary Society 8, 51.

Bain, R. V. (1963). Hemorrhagic Septicemia, Monograph. FAO, Agricultural series *No. 62*.

Bain, R. V., De Alwis, M. C., Carter, G. R, y Gupta, B. K. (1982). Haemorrhagic Septicaemia. FAO Animal Production and Health Paper *No. 33*.

Baldrias, L., Frost, A. J., y O'Boyle, D. (1988). The isolation of *Pasteurella*-like organisms from the tonsillar region of dogs and cats. J.Small Anim.Pract 29, 63-68.

Barbier, N., Saulnier, P, Chachaty, E., Dumontier, S., y Andremont, A. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. J.Clin.Microbiol 34, 1096-1099.

Biberstein, E. L. (1990). *Pasteurella*. In Review of Veterinary Microbiology. E.L.Biberstein y Y.C.Zee (eds.). Blackwell Scientific Publications, Boston, Oxford. 175-180.

Biberstein, E. L., Jang, S. S., Kass, P. H., y Hirsh, D. C. (1991). Distribution of indole-producing urease-negative pasteurellas in animals. J.Vet.Diagn.Invest 3, 319-323.

Birkbeck, T. H., Laidler, L. A., Grant, A. N., y Cox, D. I. (2002). *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L.). Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 52, 699-704.

Bisgaard, M. (1993). Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. Zentralbl.Bakteriol. 279, 7-26.

Bisgaard, M., Abdullahi, M. Z., y Gilmour, N. J. (1991a). Further studies on the identification of pasteurellaceae from cattle lungs. Vet.Rec. 128, 428-429.

Bisgaard, M. y Falsen, E. (1986). Reinvestigation and reclassification of a collection of 56 human isolates of *Pasteurellaceae*. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.[B] 94, 215-222.

Bisgaard, M., Houghton, S. B., Mutters, R., y Stenzel, A. (1991b). Reclassification of German, British and Dutch isolates of so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. Vet.Microbiol. 26, 115-124.

Biswas, A., Shivachandra, S. B., Saxena, M. K., Kumar, A. A., Singh, V. P., y Srivastava, S. K. (2004). Molecular variability among strains of *Pasteurella multocida* isolated from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in India. Vet.Res.Commun. 28, 287-298.

Blackall, P. J., Bojesen, A. M., Christensen, H., y Bisgaard, M. (2007). Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 57, 666-674.

Blackall, P. J., Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, L. L., y Bisgaard, M. (2005). Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 55, 353-362.

Blackall, P. J., Fegan, N., Chew, G. T., y Hampson, D. J. (1998). Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. Microbiology 144 (Pt 2), 279-289.

Blackall, P. J., Fegan, N., Pahoff, J. L., Storie, G. J., McIntosh, G. B., Cameron, R. D., O'Boyle, D., Frost, A. J., Bara, M. R., Marr, G., y Holder, J. (2000). The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis. Vet.Microbiol. 72, 111-120.

Blackall, P. J. y Miflin, J. K. (2000). Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. Avian Pathol. 29, 271-287.

Blackall, P. J., Pahoff, J. L., y Bowles, R. (1997). Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. Vet.Microbiol. 57, 355-360.

Blackall, P. J., Pahoff, J. L., Marks, D., Fegan, N., y Morrow, C. J. (1995). Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. Aust.Vet.J. 72, 135-138.

Blackwood, R. A., Rode, C. K., Read, J. S., Law, I. H., y Bloch, C. A. (1996). Genomic fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis to identify the source of *Pasteurella multocida* sepsis. Pediatr.Infect.Dis.J. 15, 831-833.

Blanco, M. M., Gibello, A., Vela, A. I., Moreno, M. A., Dominguez, L., y Fernandez-Garayzabal, J. F. (2002). PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. Dis.Aquat.Organ 50, 19-27.

Bochev, I. (2008). Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. II. Diagnostics, treatment and prevention. Bulg.J.Vet.Med. 11, 219-234.

Bochev, I. (2007). Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. Bulg.J.Vet.Med. 10, 131-146.

Boerlin, P., Siegrist, H. H., Burnens, A. P., Kuhnert, P., Mendez, P., Pretat, G., Lienhard, R., y Nicolet, J. (2000). Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. J.Clin.Microbiol. 38, 1235-1237.

Bolinger (1878). Pasteurellosis. Cited by Hudson, J.r: In Infectious Diseases of Animals: Diseases due to Bacteria. 2, 121.

Boot, R. E., Van del Brink, M., Handgraaf, P., y Timmermans, R. (2004). The use of the API 20NE bacteria classification procedure to identify *Pasteurellaceae* strains in rodents and rabbits. Scand.J.Lab.Anim.Sci 31, 177-183.

Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Perez De Rozas, A. M., Badiola, I., y Barbe, J. (2002a). *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. FEMS Microbiol.Lett. 210, 201-208.

Bosch, M., Garrido, M. E., Llagostera, M., Perez De Rozas, A. M., Badiola, I., y Barbe, J. (2002b). Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. Infect.Immun. 70, 5955-5964.

Bosch, M., Garrido, M. E., Perez De Rozas, A. M., Badiola, I., Barbe, J., y Llagostera, M. (2004). *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. Vet.Microbiol. 99, 103-112.

Botzler, R. G. (2002). Avian cholera on north coast California: distinctive epizootiological features. Ann.N.Y.Acad.Sci. 969, 224-228.

Botzler, R. G. (1991). Epizootiology of avian cholera in wildfowl. J.Wildl.Dis. 27, 367-395.

Bousquet, E., Pommier, P., Wessel-Robert, S., Morvan, H., oit-Valiergue, H., y Laval, A. (1998). Efficacy of doxycycline in feed for the control of pneumonia caused by *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in fattening pigs. Vet.Rec. 143, 269-272.

Bowersock, T. L., Hooper, T., y Pottenger, R. (1992). Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine. J.Vet.Diagn.Invest 4, 419-422.

Bowles, R. E., Pahoff, J. L., Smith, B. N., y Blackall, P. J. (2000). Ribotype diversity of porcine *Pasteurella multocida* from Australia. Aust.Vet.J. 78, 630-635.

Boyce, J., Lo, R. Y., y Wilkie, I. (2004). *Pasteurella* and *Mannheimia*. In Pathogenesis of Bacterial Infections of Animals.C.Gyles, J.Prescott, G.Songer, C.Thoen (eds.).Blackwell Publishing, Iowa.USA. 285-294.

Boyce, J. D. y Adler, B. (2000). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infect.Immun. 68, 3463-3468.

Boyce, J. D., Chung, J. Y., y Adler, B. (2000). *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. J.Biotechnol. 83, 153-160.

Boyle, E. C. y Finlay, B. B. (2003). Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. Curr.Opin.Cell Biol. 15, 633-639.

Braun, V. (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. FEMS Microbiol.Rev. 16, 295-307.

Bredy, J. P. y Botzler, R. G. (1989). The effects of six environmental variables on *Pasteurella multocida* populations in water. J.Wildl.Dis. 25, 232-239.

Brickell, S. K., Thomas, L. M., Long, K. A., Panaccio, M., y Widders, P. R. (1998). Development of a PCR test based on a gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the causal agent of haemorrhagic septicaemia in Asia. Vet.Microbiol. 59, 295-307.

Brockmeier, S. L., Palmer, M. V., Bolin, S. R., y Rimler, R. B. (2001). Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. Am.J.Vet.Res. 62, 521-525.

Brogden, K. A. y Packer, R. A. (1979). Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. Am.J.Vet.Res. 40, 1332-1335.

Brogden, K. A., Rhoades, K. R., y Heddleston, K. L. (1978). A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. Avian Dis. 22, 185-190.

Burns, K. E., Ruiz, J., y Glisson, J. R. (2003). Evaluation of the effect of heating an oil-emulsion *Pasteurella multocida* bacterin on tissue reaction and immunity. Avian Dis. 47, 54-58.

Burril, T. J. (1883). New species of *Micrococcirs* (bacteria). Am.Nat 17, 319-320.

Busch, C., Orth, J., Djouder, N., y Aktories, K. (2001). Biological activity of a C-terminal fragment of *Pasteurella multocida* toxin. Infect.Immun. 69, 3628-3634.

Buttenschon, J. y Rosendal, S. (1990). Phenotypical and genotypical characteristics of paired isolates of *Pasteurella multocida* from the lungs and kidneys of slaughtered pigs. Vet.Microbiol. 25, 67-75.

Buys, W. E., Smith, H. E., Kamps, A. M., Kamp, E. M., y Smits, M. A. (1990). Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida* ssp. *multocida*. Nucleic Acids Res. 18, 2815-2816.

Cameron, R. D., O'Boyle, D., Frost, A. J., Gordon, A. N., y Fegan, N. (1996). An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp *gallicida* in large pig herd. Aust.Vet.J. 73, 27-29.

Carpenter, T. E., Snipes, K. P., Kasten, R. W., Hird, D. W., y Hirsh, D. C. (1991). Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in turkeys. Am.J.Vet.Res. 52, 1345-1349.

Carter, G. R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. Am.J.Vet.Res. 16, 481-484.

Carter, G. R. (1967). Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. Adv.Vet.Sci. 11, 321-379.

Carter, G. R. (1973). *Pasteurella* infections as sequelae to respiratory viral infections. J Am Vet Med Assoc 163, 863-864.

Carter, G. R. (1982). Whatever happened to hemorrhagic septicemia? J.Am.Vet.Med.Assoc. 180, 1176-1177.

Carter, G. R. (1984). Genus 1. *Pasteurella*. In Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. N.R.Krieg and J.G.Holt (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 1, 552-558.

Carter, G. R. y De Alwis, M. C. (1989). Haemorrhagic Septicaemia. In *Pasteurella* and Pasteurellosis. C.Adlam and J.M.Rutter (eds.). Academic Press, London. 131-160.

Carter, G. R. y Chengappa, M. M. (1980). Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. J.Clin.Microbiol. 11, 94-96.

Carter, G. R. y Chengappa, M. M. (1981). Identification of types B and E *Pasteurella multocida* by counterimmunoelectrophoresis. Vet.Rec. 108, 145-146.

Carter, G. R. y Rundell, S. W. (1975). Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet.Rec. 96, 343.

Carter, G. R. y Subronto, P. (1973). Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. Am.J.Vet.Res. 34, 293-294.

Carvalho, L. F., Segales, J., y Pijoan, C. (1997). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs. Vet.Microbiol. 55, 241-246.

Chang, W. H. y Carter, G. R. (1976). Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. J.Am.Vet.Med.Assoc. 169, 710-712.

Chanter, N., Goodwin, R. F., y Rutter, J. M. (1989). Comparison of methods for the sampling and isolation of toxigenic *Pasteurella multocida* from the nasal cavity of pigs. Res.Vet.Sci. 47, 355-358.

Chanter, N. y Rutter, J. M. (1989). Pasteurellosis in pigs and the determinants of virulence of toxigenic *Pasteurella multocida*. In Pasteurella and Pasteurellosis.C.Adlam and J.M.Rutter (eds.).Academic Press, London. 161-195.

Chanter, N., Rutter, J. M., y Mackenzie, A. (1986). Partial purification of an osteolytic toxin from *Pasteurella multocida*. J.Gen.Microbiol. 132, 1089-1097.

Chaslus-Dancla, E., Lesage-Decauses, M. C., Leroy-Setrin, S., Martel, J. L., Coudert, P., y Lafont, J. P. (1996). Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. Vet.Microbiol. 52, 91-102.

Chaslus-Dancla, E., Lesage-Descauses, M. C., Leroy-Setrin, S., Martel, J. L., y Lafont, J. P. (1995). Tetracycline resistance determinants, Tet B and Tet M, detected in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* from bovine herds. J.Antimicrob.Chemother. 36, 815-819.

Chen, H. I., Hulten, K., y Clarridge, J. E., III (2002). Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. J.Clin.Microbiol. 40, 3438-3441.

Chevalier, G., Duclohier, H., Thomas, D., Shechter, E., y Wroblewski, H. (1993). Purification and characterization of protein H, the major porin of *Pasteurella multocida*. J.Bacteriol. 175, 266-276.

Cheville, N. F. y Rimler, R. B. (1989). A protein toxin from *Pasteurella multocida* type D causes acute and chronic hepatic toxicity in rats. Vet.Pathol. 26, 148-157.

Choi, C. y Chae, C. (2001). Enhanced detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs using a nested polymerase chain reaction. Vet.J. 162, 255-258.

Choi, C., Kim, B., Cho, W. S., Kim, J., Kwon, D., Cheon, D. S., y Chae, C. (2001). Capsular serotype, *toxA* gene, and antimicrobial susceptibility profiles of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with pneumonia in Korea. Vet.Rec. 149, 210-212.

Choi, K. H., Maheswaran, S. K., y Felice, L. J. (1989). Characterization of outer membrane protein-enriched extracts from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. Am.J.Vet.Res. 50, 676-683.

Christensen, H., Angen, O., Mutters, R., Olsen, J. E., y Bisgaard, M. (2000). DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 50 Pt 3, 1095-1102.

Christensen, H., Angen, O., Olsen, J. E., y Bisgaard, M. (2004a). Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. Microbiology 150, 1757-1767.

Christensen, H., Bisgaard, M., Angen, O., Frederiksen, W., y Olsen, J. E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. J.Clin.Microbiol. 43, 259-270.

Christensen, H., Foster, G., Christensen, J. P., Pennycott, T., Olsen, J. E., y Bisgaard, M. (2003). Phylogenetic analysis by 16S rDNA gene sequence comparison of avian taxa of Bisgaard and characterization and description of two new taxa of Pasteurellaceae. J.Appl.Microbiol. 95, 354-363.

Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J. E., y Bisgaard, M. (2004b). Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 54, 1601-1609.

Christensen, J. P. y Bisgaard, M. (1997). Avian pasteurellosis: Taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. Avian Pathol. 26, 461-483.

Christensen, J. P. y Bisgaard, M. (2000). Fowl cholera. Rev.Sci.Tech. 19, 626-637.

Christensen, J. P., Dietz, H. H., y Bisgaard, M. (1998). Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from back-yard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna in Denmark. Avian Pathol. 27, 373-381.

Christiansen, K. H., Carpenter, T. E., Snipes, K. P., y Hird, D. W. (1992a). Transmission of *Pasteurella multocida* on California turkey premises in 1988-89. Avian Dis. 36, 262-271.

Christiansen, K. H., Carpenter, T. E., Snipes, K. P., Hird, D. W., y Ghazikhanian, G. Y. (1992b). Restriction endonuclease analysis of *Pasteurella multocida* isolates from three California turkey premises. Avian Dis. 36, 272-281.

Chuba, P. J., Bock, R., Graf, G., Adam, T., y Gobel, U. (1988). Comparison of 16S rRNA sequences from the family Pasteurellaceae: phylogenetic relatedness by cluster analysis. J.Gen.Microbiol. 134, 1923-1930.

Chung, J. Y., Wilkie, I., Boyce, J. D., y Adler, B. (2005). Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. Vaccine 23, 2751-2755.

Chung, J. Y., Wilkie, I., Boyce, J. D., Townsend, K. M., Frost, A. J., Ghoddusi, M., y Adler, B. (2001). Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. Infect.Immun. 69, 2487-2492.

Ciprian, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R., y de la, Garza M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can.J.Vet.Res. 52, 434-438.

Cole, S. P., Guiney, D. G., y Corbeil, L. B. (1993). Molecular analysis of a gene encoding a serum-resistance-associated 76 kDa surface antigen of *Haemophilus somnus*. J.Gen.Microbiol. 139, 2135-2143.

Collier, J. R. (1968). Significance of bacteria in bovine respiratory disease. J Am Vet Med Assoc. 153, 1645-1651.

Collins, M. T., Weaver, N., y Ellis, R. P. (1981). Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20E, Minitek, and Oxi/Ferm systems. J.Clin.Microbiol. 13, 433-437.

Confer, A. W. (1993). Immunogens of *Pasteurella*. Vet.Microbiol. 37, 353-368.

Cope, L. D., Love, R. P., Guinn, S. E., Gilep, A., Usanov, S., Estabrook, R. W., Hrkal, Z., y Hansen, E. J. (2001). Involvement of HxuC outer membrane protein in utilization of hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. Infect.Immun. 69, 2353-2363.

Corfield, T. (1992). Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition. Glycobiology 2, 509-521.

Corney, B. G., Diallo, I. S., Wright, L. L., Hewitson, G. R., De Jong, A. J., Burrell, P. C., Duffy, P. F., Stephens, C. P., Rodwell, B. J., Boyle, D. B., y Blackall, P. J. (2007). *Pasteurella multocida* detection by 5' Taq nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. J.Microbiol.Methods 69, 376-380.

Cote, S., Harel, J., Higgins, R., y Jacques, M. (1991). Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R plasmids in *Pasteurella multocida* from swine. Am.J.Vet.Res. 52, 1653-1657.

Cox, A. J., Hunt, M. L., Boyce, J. D., y Adler, B. (2003). Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. Microb.Pathog. 34, 287-296.

Curtis, P. E. y Ollerhead, G. E. (1981). Investigation to determine whether healthy chickens and turkeys are oral carriers of *Pasteurella multocida*. Vet.Rec. 108, 206-207.

Dabo, S. M., Confer, A. W., y Murphy, G. L. (1997). Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. Vet.Microbiol. 54, 167-183.

Dabo, S. M., Debey, B. M., Montelongo, M., y Confer, A. W. (1999). Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with an rRNA probe. J.Med.Microbiol. 48, 279-286.

Davies, R. L., MacCorquodale, R., Baillie, S., y Caffrey, B. (2003a). Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. J.Med.Microbiol. 52, 59-67.

Davies, R. L., MacCorquodale, R., y Caffrey, B. (2003b). Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. Vet.Microbiol. 91, 169-182.

Davies, R. L., MacCorquodale, R., y Reilly, S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. Vet.Microbiol. 99, 145-158.

Davies, R. L., Watson, P. J., y Caffrey, B. (2003c). Comparative analyses of *Pasteurella multocida* strains associated with the ovine respiratory and vaginal tracts. Vet.Rec. 152, 7-10.

De Alwis, M. C. (1982). Immune status of buffalo calves exposed to natural infection with haemorrhagic septicaemia. Trop.Anim Health Prod. 14, 29-30.

De Alwis, M. C. (1992). Haemorrhagic septicaemia--a general review. Br.Vet.J. 148, 99-112.

De Alwis, M. C. y Thambithurai, V. (1965). Haemorrhagic septicaemia in a wild elephant in Ceylon. Ceylon Vet.J 13, 17-19.

De Alwis, M. C. y Vipulasiri, A. A. (1980). A case of haemorrhagic septicaemia in a wild elephant in Srilanka. Ceylon Vet.J 13, 17-19.

De Alwis, M. C., Wijewardana, T. G., Gomis, A. I., y Vipulasiri, A. A. (1990). Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection) in buffaloes. Trop.Anim Health Prod. 22, 185-194.

De Jong, M. F. (1980). [Some aspects of the study of atrophic rhinitis in pigs (author's transl)]. Tijdschr.Diergeneeskd. 105, 711-714.

De Jong, M. F. (2006). Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In Diseases of Swine 9 th edition. B.Straw, J.J.Zimmerman, S.Dállaire, y D.J.Taylor (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.577-602.

De Jong, M. F. y Akkermans, J. P. (1986). Investigation into the pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs. I. Atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* and the meaning of a thermolabile toxin of *P. multocida*. Vet.Q. 8, 204-214.

De Ley J., Mannheim, W., Mutters, R., Piechulla, K., Tytgat, R., Segers, P., Bisgaard, M., Frederiksen, W., Hinz, K. H., y Vanhoucke, M. (1990). Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. Int.J.Syst.Bacteriol. 40, 126-137.

DeAngelis, P. L. y Padgett-McCue, A. J. (2000). Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. J.Biol.Chem. 275, 24124-24129.

DeLong, D. y Manning, D. S. (1994). Bacterial diseases. The Biology of the Laboratory Rabbit.2nd ed. 129-170.

Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Olsen, I., y Fraser, G. J. (1993). Phylogeny of the *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. Zentralbl.Bakteriol. 279, 35-44.

Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Olsen, I., y Fraser, G. J. (1992). Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. J.Bacteriol. 174, 2002-2013.

Diallo, I. S., Bensink, J. C., Frost, A. J., y Spradbrow, P. B. (1995). Molecular studies on avian strains of *Pasteurella multocida* in Australia. Vet.Microbiol. 46, 335-342.

Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Ha, H., Walker, M. J., y Chin, J. C. (1998). Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (*toxA*-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. J.Med.Microbiol. 47, 679-688.

Dominick, M. A. y Rimler, R. B. (1986). Turbinate atrophy in gnotobiotic pigs intranasally inoculated with protein toxin isolated from type D *Pasteurella multocida*. Am.J.Vet.Res. 47, 1532-1536.

Done, J. T. (1976). Porcine atrophic rhinitis: snout radiography as an aid to diagnosis and detection of the disease. Vet.Rec. 98, 23-28.

Donham, K. J. (1991). Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. Am.J.Vet.Res. 52, 1723-1730.

Donnio, P. Y., Avril, J. L., Andre, P. M., y Vaucel, J. (1991). Dermonecrotic toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from man. J.Med.Microbiol. 34, 333-337.

Donnio, P. Y., lardet-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.

Doughty, S. W., Ruffolo, C. G., y Adler, B. (2000). The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 72, 79-90.

Drzeniek, R., Scharmann, W., y Balke, E. (1972). Neuraminidase and N-acetylneuraminate pyruvate-lyase of *Pasteurella multocida*. J.Gen.Microbiol. 72, 357-368.

Dudet, L. I., Chailler, P., Dubreuil, J. D., y Martineau-Doize, B. (1996). *Pasteurella multocida* toxin stimulates mitogenesis and cytoskeleton reorganization in Swiss 3T3 fibroblasts. J.Cell Physiol 168, 173-182.

Dungworth, D. L. (1993). The respiratory system. In Pathology of Domestic Animals.K.V.F.Jubb, P.C.Kennedy and N.Palmer (eds.).Academic Press, San Diego. vol 2, Chapter 6, 656-664.

Dziva, F., Christensen, H., Olsen, J. E., y Mohan, K. (2001). Random amplification of polymorphic DNA and phenotypic typing of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 82, 361-372.

Dziva, F., Christensen, H., van Leengoed, L. A., Mohan, K., y Olsen, J. E. (2004). Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. Vet.Microbiol. 102, 117-122.

Dziva, F., Mohan, K., y Pawandiwa, A. (2000). Capsular serogroups of *Pasteurella multocida* isolated from animals in Zimbabwe. Onderstepoort J.Vet.Res. 67, 225-228.

Dziva, F., Muhairwa, A. P., Bisgaard, M., y Christensen, H. (2008). Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 128, 1-22.

Eamens, G. J., Kirkland, P. D., Turner, M. J., Gardner, I. A., White, M. P., y Hornitzky, C. L. (1988). Identification of toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs by in vitro characterisation. Aust.Vet.J. 65, 120-123.

Elias, B. y Hamori, D. (1976). Data on the aetiology of swine atrophic rhinitis. V. The role of genetic factors. Acta Vet.Acad.Sci.Hung. 26, 13-19.

Elling, F. y Pedersen, K. B. (1985). The pathogenesis of persistent turbinate atrophy induced by toxigenic *Pasteurella multocida* in pigs. Vet.Pathol. 22, 469-474.

Esslinger, J., Seleim, R. S., Herrmann, G., y Boble, H. (1994). Adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells and to macrophages of different animal species. Revue Med.Vet. 145, 49-53.

Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiessling, S., Filter, M., y Wieler, L. H. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet.Microbiol.

Ewers, C., Lubke-Becker, A., y Wieler, L. H. (2004). [*Pasteurella*: insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterial type]. Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr. 117, 367-386.

Fales, W. H., Turk, J. R., Miller, M. A., Bean-Knudsen, C., Nelson, S. L., Morehouse, L. G., y Gosser, H. S. (1990). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* type D from Missouri swine. J.Vet.Diagn.Invest 2, 80-81.

Fegan, N., Blackall, P. J., y Pahoff, J. L. (1995). Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. Vet.Microbiol. 47, 281-286.

Felix, M., Tallon, P., Salavert, M., Navarro, V., Breton, J. R., Perez-Belles, C., y Gobernado, M. (2003). [Bacteremia due to *Pasteurella* spp.: a rare process in our hospital over the last 8 years]. Enferm.Infecc.Microbiol Clin. 21, 334-339.

Felix, R., Fleisch, H., y Frandsen, P. L. (1992). Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption in vitro. Infect.Immun. 60, 4984-4988.

Finco-Kent, D. L., Galvin, J. E., Suiter, B. T., y Huether, M. J. (2001). *Pasteurella multocida* toxin type D serological assay as an alternative to the toxin neutralisation lethality test in mice. Biologicals 29, 7-10.

Flori, J., Mousing, J., Gardner, I. A., Willeberg, P, y Have, P. (1995). Risk factors associated with seroposivity to porcine respiratory coronavirus in Danish swine herds. Prev.Vet.Med. 25, 51-62.

Flossmann, K. D., Grajetzki, C., y Rosner, H. (1985). [Demonstration of iron transport activity in *Pasteurella multocida* cultures]. J.Basic Microbiol. 25, 559-567.

Foged, N. T. (1988). Quantitation and purification of the *Pasteurella multocida* toxin by using monoclonal antibodies. Infect.Immun. 56, 1901-1906.

Foged, N. T., Nielsen, J. P., y Pedersen, K. B. (1988). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. J.Clin.Microbiol. 26, 1419-1420.

Foged, N. T., Pedersen, K. B., y Elling, F. (1987). Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS Microbiol.Lett 43, 45-51.

Frandsen, P. L., Foged, N. T., Petersen, S. K., y Bording, A. (1991). Characterization of toxin from different strains of *Pasteurella multocida* serotype A and D. Zentralbl.Veterinarmed.B 38, 345-352.

Franque. (1830). Was ist die Schnüffelkranhkeit der Schweine? Dtsch.Z.Gesammte Tierheilkd 1, 75.

Friend, M. (1999). Avian cholera. In Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds.M.Friend and J.C.Franson (eds.).Information and Technology Report 1999-01, Biological resource Division, U.S.Geological Survey, Madison, Wisconsin. 75-92.

Frymus, T., Muller, E., y Petzoldt, K. (1989). Antigenic relationship between the dermonecrotic toxins produced by *Pasteurella multocida* type D and type A. Zentralbl.Veterinarmed.B 36, 199-202.

Fuentes, M. (2009). Entendiendo el complejo respiratorio porcino. Laboratorios Biogram, C.A. http://www.terra.es/personal2/adymix/articulos/e31p12.htm.

Fuentes, M. y Pijoan, C. (1986). Phagocytosis and intracellular killing of *Pasteurella multocida* by porcine alveolar macrophages after infection with pseudorabies virus. Vet.Immunol.Immunopathol. 13, 165-172.

Fuentes, M. C. y Pijoan, C. (1987). Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. Am.J.Vet.Res. 48, 1446-1448.

Fuller, T. E., Kennedy, M. J., y Lowery, D. E. (2000). Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microb.Pathog. 29, 25-38.

Fussing, V., Nielsen, J. P., Bisgaard, M., y Meyling, A. (1999). Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin-producing *Pasteurella multocida* ssp. multocida in Denmark. Vet.Microbiol. 65, 61-74.

Gagne, S. y Martineau-Doize, B. (1993). Nasal epithelial changes induced in piglets by acetic acid and by *Bordetella bronchiseptica*. J Comp Pathol 109, 71-81.

Galdiero, M., Palomba, E., De, L., Vitiello, M., y Pagnini, P. (1998). Effects of the major *Pasteurella multocida* porin on bovine neutrophils. Am.J.Vet.Res. 59, 1270-1274.

Gamage, I. N. A., Wijewardana, T. G., Bastianzs, H. L. G., y Vipulasiri, A. A. (1995). An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. Sri Lanka Veterinary Journal 42, 15-19.

Ganiere, J. P., Escande, F., Andre, G., y Larrat, M. (1993). Characterization of *Pasteurella* from gingival scrapings of dogs and cats. Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis. 16, 77-85.

Gardner, I. A., Eamens, G. J., Turner, M. J., y Hornitzky, C. L. (1989). Toxigenic type D *Pasteurella multocida* in New South Wales pig herds--prevalence and factors associated with infection. Aust.Vet.J. 66, 318-321.

Gardner, I. A., Kasten, R., Eamens, G. J., Snipes, K. P., y Anderson, R. J. (1994). Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. J.Vet.Diagn.Invest 6, 442-447.

Gatlin, C. L., Jordan, W. H., Shryock, T. R., y Smith, W. C. (1996). The quantitation of turbinate atrophy in pigs to measure the severity of induced atrophic rhinitis. Can.J.Vet.Res. 60, 121-126.

Gautam, R., Kumar, A. A., Singh, V. P., Singh, V. P., Dutta, T. K., y Shivachandra, S. B. (2004). Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. Res.Vet.Sci. 76, 179-185.

Gautier, A. L., Dubois, D., Escande, F., Avril, J. L., Trieu-Cuot, P., y Gaillot, O. (2005). Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. J.Clin.Microbiol. 43, 2307-2314.

Giles, C. J., Smith, I. M., Baskerville, A. J., y Brothwell, E. (1980). Clinical bacteriological and epidemiological observations on infectious atrophic rhinitis of pigs in southern England. Vet.Rec. 106, 25-28.

Gilmour, N. J. (1978). Pasteurellosis in sheep. Vet.Rec. 102, 100-102.

Glisson, J. R., Hofacre, C. L., y Christensen, J. P. (2003). Fowl cholera. In Diseases of Poultry. Y.M.Saif, H.J.Barnes, J.R.Glisson, A.M.Fadly, L.R.McDougald y D.E.Swayne (eds.). Iowa State Yniversity Press, Ames, Iowa, Usa. 658-677.

Glorioso, J. C., Jones, G. W., Rush, H. G., Pentler, L. J., Darif, C. A., y Coward, J. E. (1982). Adhesion of type A *Pasteurella mulocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. Infect.Immun. 35, 1103-1109.

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.

Gois, M., Sisak, F., Kuksa, F., y Sovadina, M. (1975). Incidence and evaluation of the microbial flora in the lungs of pigs with enzootic pneumonia. Zentralbl.Veterinarmed.B 22, 205-219.

Gottschalk, M. y D. J. Taylor. (2006). *Actinobacillus pleoropneumoniae.* In Diseases of Swine, 9 th edition. B.Straw, J.J.Zimmerman, S.Dállaire, y D.J.Taylor (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 563-576.

Grangeon, V., Lelievre, H., Celard, M., Campagni, P. H., Vandenesch, F., y Cordier, J. F. (2000). [*Pasteurella multocida* lung abscess. Study of a case with demonstration of a cat as vector]. Rev.Mal Respir. 17, 693-696.

Gray, H. (1913). In A System of Veterinary Medicine 1, 420-423.

Gray-Owen, S. D., Loosmore, S., y Schryvers, A. B. (1995). Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. Infect.Immun. 63, 1201-1210.

Gray-Owen, S. D. y Schryvers, A. B. (1996). Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. Trends Microbiol. 4, 185-191.

Green, B. A., Vazquez, M. E., Zlotnick, G. W., Quigley-Reape, G., Swarts, J. D., Green, I., Cowell, J. L., Bluestone, C. D., y Doyle, W. J. (1993). Evaluation of mixtures of purified *Haemophilus influenzae* outer membrane proteins in protection against challenge with nontypeable *H. influenzae* in the chinchilla otitis media model. Infect.Immun. 61, 1950-1957.

Grimont, F. y Grimont, P. A. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann.Inst.Pasteur Microbiol. 137B, 165-175.

Gunawardana, G. A., Townsend, K. M., y Frost, A. J. (2000). Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. Vet.Microbiol. 72, 97-109.

Gutierrez Martin, C. B. y Rodriguez Ferri, E. F. (1993). In vitro susceptibility of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* strains isolated from swine to 42 antimicrobial agents. Zentralbl.Bakteriol. 279, 387-393.

Gwaltney, S. M., Galvin, R. J., Register, K. B., Rimler, R. B., y Ackermann, M. R. (1997). Effects of *Pasteurella multocida* toxin on porcine bone marrow cell differentiation into osteoclasts and osteoblasts. Vet.Pathol. 34, 421-430.

Halbur, P. (1996). Changing trends in the porcine respiratory disease complex. In Proc.National Pork Producers Council Pork Sumit.

Hall, W. J., Heddleston, K. L., Legenhausen, D. H., y Hughes, R. W. (1955). Studies on pasteurellosis. I. A new species of *Pasteurella* encountered in chronic fowl cholera. Am.J.Vet.Res. 16, 598-604.

Hamilton, T. D., Roe, J. M., Hayes, C. M., Jones, P., Pearson, G. R., y Webster, A. J. (1999). Contributory and exacerbating roles of gaseous ammonia and organic dust in the etiology of atrophic rhinitis. Clin.Diagn.Lab Immunol. 6, 199-203.

Hancock, R. E., Siehnel, R., y Martin, N. (1990). Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. Mol.Microbiol. 4, 1069-1075.

Hansen, L. M. y Hirsh, D. C. (1989). Serum resistance is correlated with encapsulation of avian strains of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 21, 177-184.

Harel, J., Cote, S., y Jacques, M. (1990). Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. Can.J.Vet.Res. 54, 422-426.

Harmon, B. G., Glisson, J. R., Latimer, K. S., Steffens, W. L., y Nunnally, J. C. (1991). Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. Am.J.Vet.Res. 52, 1507-1511.

Harper, M., Boyce, J. D., y Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol.Lett. 265, 1-10.

Heckels, J. E. (1989). Structure and function of pili of pathogenic *Neisseria* species. Clin.Microbiol.Rev. 2 Suppl, S66-S73.

Heddleston, K. L. (1976). Physiologic characteristics of 1,268 cultures of *Pasteurella multocida*. Am.J.Vet.Res. 37, 745-747.

Heddleston, K. L., Gallagher, J. E., y Rebers, P. A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteruella multocida* from avian species. Avian Dis. 16, 925-936.

Heddleston, K. L. y Rebers, P. A. (1968). Fowl cholera: active immunity induced in chickens and turkeys by oral administration of killed *Pasteurella multocida*. Avian Dis. 12, 129-134.

Heddleston, K. L. y Rebers, P. A. (1972). Fowl cholera: cross-immunity induced in turkeys with formalin-killed in-vivo-propagated *Pasteurella*. Avian Dis. 16, 578-586.

Heddleston, K. L. y Rebers, P. A. (1974). Fowl cholera bacterins: host-specific cross-immunity induced in turkeys with *Pasteurella multocida* propagated in embryonating turkey eggs. Avian Dis. 18, 231-239.

Heddleston, K. L., Rebers, P. A., y Wessman, G. (1975). Fowl cholera: immunologic and werologic response in turdeys to live *Pasteruella multocida* vaccine administered in the drinking water. Poult.Sci. 54, 217-221.

Hirsh, D. C., Jessup, D. A., Snipes, K. P., Carpenter, T. E., Hird, D. W., y McCapes, R. H. (1990). Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from waterfowl and associated avian species in California. J.Wildl.Dis. 26, 204-209.

Hirsh, D. C., Martin, L. D., y Rhoades, K. R. (1985). Resistance plasmids of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. Am.J.Vet.Res. 46, 1490-1493.

Hoie, S., Falk, K., y Lium, B. M. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. Acta Vet.Scand. 32, 395-402.

Holst, E., Rollof, J., Larsson, L., y Nielsen, J. P. (1992). Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. J.Clin.Microbiol. 30, 2984-2987.

Hu, S. P., Felice, L. J., Sivanandan, V., y Maheswaran, S. K. (1986). Siderophore production by *Pasteurella multocida*. Infect.Immun. 54, 804-810.

Hubbert, W. T. y Rosen, M. N. (1970). *Pasteurella multocida* Infections: I. *Pasteurella multocida* Infection Due to Animal Bite. Am.J.Public Health Nations.Health 60, 1103-1108.

Huber, B. S., Allred, D. V., Carmen, J. C., Frame, D. D., Whiting, D. G., Cryan, J. R., Olson, T. R., Jackson, P. J., Hill, K., Laker, M. T., y Robison, R. A. (2002). Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism analyses of *Pasteurella multocida* isolates from fatal fowl cholera infections. J.Clin.Microbiol. 40, 2163-2168.

Hueppe, F. (1886). Ueber die Wildseucine und ihre Bedeutung für die Nationalökonomie und die Hygiene. Berliner Klinische Wochenschrift 44, 753-758.

Hunt, Gerardo S., Citron, D. M., Claros, M. C., Fernandez, H. T., y Goldstein, E. J. (2001a). *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and alpha-glucosidase activity. J.Clin.Microbiol. 39, 2558-2564.

Hunt, M. L., Adler, B., y Townsend, K. M. (2000). The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 72, 3-25.

Hunt, M. L., Boucher, D. J., Boyce, J. D., y Adler, B. (2001b). In vivo-expressed genes of *Pasteurella multocida*. Infect.Immun. 69, 3004-3012.

Iaria, C. y Cascio, A. (2007). Please, do not forget *Pasteurella multocida*. Clin.Infect.Dis. 45, 940.

iDali, C., Foged, N. T., Frandsen, P. L., Nielsen, M. H., y Elling, F. (1991). Ultrastructural localization of the *Pasteurella multocida* toxin in a toxin-producing strain. J.Gen.Microbiol. 137, 1067-1071.

Ikeda, J. S. y Hirsh, D. C. (1988). Antigenically related iron-regulated outer membrane proteins produced by different somatic serotypes of *Pasteurella multocida*. Infect.Immun. 56, 2499-2502.

Iovane, G., Pagnini, P., Galdiero, M., Cipollaro de, l'Ero G., Vitiello, M., D'Isanto, M., y Marcatili, A. (1998). Role of *Pasteurella multocida* porin on cytokine expression and release by murine splenocytes. Vet.Immunol.Immunopathol. 66, 391-404.

Ireland, L., Adler, B., y Milner, A. R. (1991). Proteins and antigens of *Pasteurella multocida* serotype 1 from fowl cholera. Vet.Microbiol. 27, 175-185.

Ireland, L. A., Milner, A. R., y Smart, I. J. (1989). Serotyping of isolates of *Pasteurella multocida* from chickens. Aust.Vet.J. 66, 119-120.

Isaacson, R. E. y Trigo, E. (1995). Pili of *Pasteurella multocida* of porcine origin. FEMS Microbiol.Lett. 132, 247-251.

Iwamatsu, S. y Sawada, T. (1988). Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolates and pneumonic lesions of porcine lung. Nippon Juigaku.Zasshi 50, 1200-1206.

Jacques, M., Belanger, M., Diarra, M. S., Dargis, M., y Malouin, F. (1994). Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and in vivo. Microbiology 140 (Pt 2), 263-270.

Jacques, M., Kobisch, M., Belanger, M., y Dugal, F. (1993). Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. Infect.Immun. 61, 4785-4792.

Jaglic, Z., Jeklova, E., Leva, L., Kummer, V., Kucerova, Z., Faldyna, M., Maskova, J., Nedbalcova, K., y Alexa, P. (2008). Experimental study of pathogenicity of *Pasteurella multocida* serogroup F in rabbits. Vet.Microbiol. 126, 168-177.

Jamaludin, R., Blackall, P. J., Hansen, M. F., Humphrey, S., y Styles, M. (2005). Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. N.Z.Vet.J. 53, 203-207.

Jap, B. K. y Walian, P. J. (1996). Structure and functional mechanism of porins. Physiol Rev. 76, 1073-1088.

Jap, B. K. y Walian, P. J. (1990). Biophysics of the structure and function of porins. Q.Rev.Biophys. 23, 367-403.

Jarosik, G. P., Sanders, J. D., Cope, L. D., Muller-Eberhard, U., y Hansen, E. J. (1994). A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. Infect.Immun. 62, 2470-2477.

Jawetz, E. (1950). A pneumotropic pasteurella of laboratory animals; bacteriological and serological characteristics of the organism. J.Infect.Dis. 86, 172-183.

Jeanteur, D., Lakey, J. H., y Pattus, F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. Mol.Microbiol. 5, 2153-2164.

Jin, H., Ren, Z., Pozsgay, J. M., Elkins, C., Whitby, P. W., Morton, D. J., y Stull, T. L. (1996). Cloning of a DNA fragment encoding a heme-repressible hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus influenzae*. Infect.Immun. 64, 3134-3141.

Jin, H., Ren, Z., Whitby, P. W., Morton, D. J., y Stull, T. L. (1999). Characterization of *hgpA*, a gene encoding a haemoglobin/haemoglobin-haptoglobin-binding protein of *Haemophilus influenzae*. Microbiology 145 (Pt 4), 905-914.

Johnson, R. B., Dawkins, H. J., y Spencer, T. L. (1991). Electrophoretic profiles of *Pasteurella multocida* isolates from animals with hemorrhagic septicemia. Am.J.Vet.Res. 52, 1644-1648.

Johnson, R. H. y Rumans, L. W. (1977). Unusual infections caused by *Pasteurella multocida*. JAMA 237, 146-147.

Jones, D. M. (1962). A pasteurella-like organism from the human respiratory tract. J.Pathol.Bacteriol. 83, 143-151.

Jones, T. O., Minns, M., y Rimler, R. B. (1988). Isolation of *P. multocida* F-3,4 from a calf in the UK. Vet.Rec. 123, 354.

Jordan, D, Hoffmann, L, y Thacker, E (2006). *Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex. Am. Ass. Swine Vet. Congress. Kansas City.Miss.USA. 149-152.

Jordan, R. W., Hamilton, T. D., Hayes, C. M., Patel, D., Jones, P. H., Roe, J. M., y Williams, N. A. (2003). Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated by toxigenic *Pasteurella multocida*. FEMS Immunol.Med.Microbiol. 39, 51-59.

Kamp, E. M., Bokken, G. C., Vermeulen, T. M., de Jong, M. F., Buys, H. E., Reek, F. H., y Smits, M. A. (1996). A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. J.Vet.Diagn.Invest 8, 304-309.

Kamp, E. M., Van der Heijden, P. J., y Tetenburg, B. J. (1987). Purification of a heat labile dermonecrotic toxin from culture fluid of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 13, 235-248.

Kamps, A. M., Buys, W. E., Kamp, E. M., y Smits, M. A. (1990). Specificity of DNA probes for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strains. J.Clin.Microbiol. 28, 1858-1861.

Kardos, G. y Kiss, I. (2005). Molecular epidemiology investigation of outbreaks of fowl cholera in geographically related poultry flocks. J.Clin.Microbiol. 43, 2959-2961.

Kasten, R. W., Carpenter, T. E., Snipes, K. P., y Hirsh, D. C. (1997). Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. Avian Dis. 41, 676-682.

Kasten, R. W., Hansen, L. M., Hinojoza, J., Bieber, D., Ruehl, W. W., y Hirsh, D. C. (1995). *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. Infect.Immun. 63, 989-993.

Kasza, L., Hodges, R. T., Betts, A. O., y Trexler, P. C. (1969). Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine adenovirus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet.Rec. 84, 262-267.

Kielstein, P. (1986). On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella-multocida*-strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle. Zentralbl.Veterinarmed.B 33, 418-424.

Kilian, M. y Frederiksen, W. (1981). Identification tables for the *Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus* group. In Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus.W.Frederiksen and E.L.Biberstein (eds.).Academic Press, London. 281-290.

Kim, C. J. y Nagaraja, K. V. (1990). DNA fingerprinting for differentiation of field isolates from reference vaccine strains of *Pasteurella multocida* in turkeys. Am.J.Vet.Res. 51, 207-210.

Kimman, T. G., Lowik, C. W., van de Wee-Pals LJ, Thesingh, C. W., Defize, P., Kamp, E. M., y Bijvoet, O. L. (1987). Stimulation of bone resorption by inflamed nasal mucosa, dermonecrotic toxin-containing conditioned medium from *Pasteurella multocida*, and purified dermonecrotic toxin from *P. multocida*. Infect.Immun. 55, 2110-2116.

Kimura, A., Mountzouros, K. T., Relman, D. A., Falkow, S., y Cowell, J. L. (1990). *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective

antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. Infect.Immun. 58, 7-16.

Kitt, Th (1893). Bakterienkunde und Pathologische Mikroskopie 304.

Klebba, P. E. y Newton, S. M. (1998). Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. Curr.Opin.Microbiol. 1, 238-247.

Koneman, E. W., Stephen, D. A., Williams, M. J., y Schrenberger, P. G. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana.Buenos Aires, Argentina. 388-461.

Korbel, R., Gerlach, H., Bisgaard, M., y Hafez, H. M. (1992). Further investigations on *Pasteurella multocida* infections in feral birds injured by cats. Zentralbl.Veterinarmed.B 39, 10-18.

Krause, T., Bertschinger, H. U., Corboz, L., y Mutters, R. (1987). V-factor dependent strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*. Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A] 266, 255-260.

Kristjansson, M., Samore, M. H., Gerding, D. N., DeGirolami, P. C., Bettin, K. M., Karchmer, A. W., y Arbeit, R. D. (1994). Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. J.Clin.Microbiol. 32, 1963-1969.

Kroll, J. S., Langford, P. R., Wilks, K. E., y Keil, A. D. (1995). Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! Microbiology 141 (Pt 9), 2271-2279.

Kuhnert, P., Boerlin, P., Emler, S., Krawinkler, M., y Frey, J. (2000). Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. Int.J.Med.Microbiol. 290, 599-604.

Kuhnert, P. y Korczak, B. M. (2006). Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family *Pasteurellaceae* by multilocus sequence analysis (MLSA). Microbiology 152, 2537-2548.

Kumar, A., Devlin, H. R., y Vellend, H. (1990). *Pasteurella multocida* meningitis in an adult: case report and review. Rev.Infect.Dis. 12, 440-448.

Lainson, F. A., Aitchison, K. D., Donachie, W., y Thomson, J. R. (2002). Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. J.Clin.Microbiol. 40, 588-593.

Lariviere, S., Leblanc, L., Mittal, K. R., y Martineau, G. P. (1992). Characterization of *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis. J.Clin.Microbiol. 30, 1398-1401.

Lax, A. J. y Chanter, N. (1990). Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. J.Gen.Microbiol. 136, 81-87.

Lax, A. J., Chanter, N., Pullinger, G. D., Higgins, T., Staddon, J. M., y Rozengurt, E. (1990). Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. FEBS Lett. 277, 59-64.

Lax, A. J. y Grigoriadis, A. E. (2001). *Pasteurella multocida* toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. Int.J.Med.Microbiol. 291, 261-268.

Lee, J. C., Betley, M. J., Hopkins, C. A., Perez, N. E., y Pier, G. B. (1987a). Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. J.Infect.Dis. 156, 741-750.

Lee, J. C., Michon, F., Perez, N. E., Hopkins, C. A., y Pier, G. B. (1987b). Chemical characterization and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from mucoid *Staphylococcus aureus*. Infect.Immun. 55, 2191-2197.

Lee, M. D., Burch, F. T., Maurer, J. J., Henk, A., y Thayer, S. (2000). DNA fingerprinting of plasmid-containing serotype A: 3,4 *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera in chickens and turkeys. Avian Dis. 44, 201-204.

Lehmann, K. B y Neumann, R. (1899). Lehmann's Medizin, Handatlanten Band X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 2, 196.

Leotta, G. A., Chinen, I., Vigo, G. B., Gugliada, J., y Rivas, M. (2006a). [Evaluation of two techniques of molecular subtyping to study *Pasteurella multocida*]. Rev.Argent Microbiol. 38, 190-196.

Leotta, G. A., Vigo, G. B., Chinen, I., Prieto, M., Callejo, R., y Rivas, M. (2006b). [Identification, biotypification and characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated in Argentina]. Rev.Argent Microbiol. 38, 125-129.

Lichtensteiger, C. A., Steenbergen, S. M., Lee, R. M., Polson, D. D., y Vimr, E. R. (1996). Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J.Clin.Microbiol. 34, 3035-3039.

Ligniéres, J. M (1990). Contribution à létude et à la classification des septicèmies hémorrhagique. Les Pasteurelloses. Ann.Inst.Pasteure 15, 734-736.

Lin, J., Huang, S., y Zhang, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes.Infect. 4, 325-331.

Loosmore, S. M., Yang, Y. P., Coleman, D. C., Shortreed, J. M., England, D. M., y Klein, M. H. (1997). Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect.Immun. 65, 3701-3707.

Loubinoux, J., Lozniewski, A., Lion, C., Garin, D., Weber, M., y Le Faou, A. E. (1999). Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. J.Clin.Microbiol. 37, 2488-2492.

Lubke, A., Hartmann, L., Schroder, W., y Hellmann, E. (1994). Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. Zentralbl.Bakteriol. 281, 45-54.

Lugtenberg, B., van, Boxtel R., y de, Jong M. (1984). Atrophic rhinitis in swine: correlation of *Pasteurella multocida* pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns. Infect.Immun. 46, 48-54.

Lugtenberg, B., van, Boxtel R., Evenberg, D., de, Jong M., Storm, P., y Frik, J. (1986). Biochemical and immunological characterization of cell surface proteins of

Pasteurella multocida strains causing atrophic rhinitis in swine. Infect.Immun. 52, 175-182.

Luo, Y., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Hancock, R. E., Bains, M., Cheng, I. H., y Wang, C. (1997). Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. J.Bacteriol. 179, 7856-7864.

Luo, Y., Zeng, Q., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Cheng, I. H., y Wang, C. (1999). Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. Vaccine 17, 821-831.

Mackie, J. T. (1996). Haemorrhagic septicaemia in pigs. Aust.Vet.J. 74, 399-400.

Mackie, J. T., Barton, M., y Kettlewell, J. (1992). *Pasteurella multocida* septicaemia in pigs. Aust.Vet.J. 69, 227-228.

Madsen, E. B., Bisgaard, M., Mutters, R., y Pedersen, K. B. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from lungs of calves with pneumonia. Can.J.Comp Med. 49, 63-67.

Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., y de, Kruif A. (2000). Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. Vet.Res. 31, 313-327.

Magyar, T. y Rimler, R. B. (1991). Detection and enumeration of toxin-producing *Pasteurella multocida* with a colony-blot assay. J.Clin.Microbiol. 29, 1328-1332.

Maheswaran, S. K. y Thies, E. S. (1979). Influence of encapsulation on phagocytosis of *Pasteurella multocida* by bovine neutrophils. Infect.Immun. 26, 76-81.

Mannheim, W (1983). Taxonomy of the family *Pasteurellaceae* Pohl 1981 as revealed by DNA/DNA hybridization. In Gram negative bacteria of medical and public health importance: Taxonomy - Identification - Applications.H.Leclerc (ed.).INSERM, Paris. 114, 211-226.

Mannheim, W. y Carter, G. R (1984). In Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology.N.R.Krieg and J.G.Holt (eds.).Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 1, 550-558.

Mannheim, W., Pohl, S., y Hollander, R. (1980). [On the taxonomy of *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*: DNA base composition, respiratory quinones, and biochemical reactions of representative collection cultures (author's transl)]. Zentralbl.Bakteriol.A 246, 512-540.

Manning, P. J. (1982). Serology of *Pasteurella multocida* in laboratory rabbits: a review. Lab Anim Sci. 32, 666-671.

Marco, E. (2009). *Haemophilus parasuis* y su papel en el complejo respiratorio porcino. Suis 55, 14-26.

Martínez, F. J. y Prieto, C. (2007). Complejo respiratorio porcino: aspectos más importantes. Producción animal 22, nº 237, 4-17.

Matsumoto, M. y Strain, J. G. (1993). Pathogenicity of *Pasteurella multocida*: its variable nature demonstrated by in vivo passages. Avian Dis. 37, 781-785.

Matsumoto, M., Strain, J. G., y Engel, H. N. (1991). The fate of *Pasteurella multocida* after intratracheal inoculation into turkeys. Poult.Sci. 70, 2259-2266.

May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S., y Kapur, V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98, 3460-3465.

Mbuthia, P. G., Christensen, H., Boye, M., Petersen, K. M., Bisgaard, M., Nyaga, P. N., y Olsen, J. E. (2001). Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. J.Clin.Microbiol. 39, 2627-2633.

McAllister, H. A. y Carter, G. R. (1974). An aerogenic Pasteurella-like organism recovered from swine. Am.J.Vet.Res. 35, 917-922.

Miflin, J. K. y Blackall, P. J. (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Lett.Appl.Microbiol. 33, 216-221.

Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M., y Lee, M. D. (2000). Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. J.Bacteriol. 182, 6874-6883.

Mogollon, J. D., Pijoan, C., Murtaugh, M. P., Collins, J. E., y Cleary, P. P. (1991). Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. J.Clin.Microbiol. 29, 782-787.

Mohan, K., Kelly, P. J., Hill, F. W., Muvavarirwa, P., y Pawandiwa, A. (1997). Phenotype and serotype of *Pasteurella multocida* isolates from diseases of dogs and cats in Zimbabwe. Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis. 20, 29-34.

Mohan, K., Sadza, M., Madsen, M., Hill, F. W., y Pawandiwa, A. (1994). Phenotypic characterization of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 38, 351-357.

Mohan, K., Sinha, M. N., Singh, R. P., y Gupta, C. M. (1968). A study of immunity against *Pasteurella multocida* in buffalo calves and their carrier status. Vet.Rec. 83, 155-156.

Mooi, F. R., Jansen, W. H., Brunings, H., Gielen, H., van der Heide, H. G., Walvoort, H. C., y Guinee, P. A. (1992). Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. Microb.Pathog. 12, 127-135.

Moreno, A. M., Baccaro, M. R., Ferreira, A. J., y Pestana De Castro, A. F. (2003). Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. J.Clin.Microbiol. 41, 1743-1746.

Morrison, R. B., Pijoan, C., Hilley, H. D., y Rapp, V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. Can.J.Comp Med. 49, 129-137.

Morton, D. J., Whitby, P. W., Jin, H., Ren, Z., y Stull, T. L. (1999). Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. Infect.Immun. 67, 2729-2739.

Moxon, E. R., Deich, R. A., y Connelly, C. (1984). Cloning of chromosomal DNA from *Haemophilus influenzae*. Its use for studying the expression of type b capsule and virulence. J.Clin.Invest 73, 298-306.

Muhairwa, A. P., Christensen, J. P., y Bisgaard, M. (2000). Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. Avian Pathol. 29, 133-142.

Muhairwa, A. P., Christensen, J. P., y Bisgaard, M. (2001a). Relationships among *Pasteurellaceae* isolated from free ranging chickens and their animal contacts as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing. Vet.Microbiol. 78, 119-137.

Muhairwa, A. P., Mtambo, M. M., Christensen, J. P., y Bisgaard, M. (2001b). Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. Vet.Microbiol. 78, 139-153.

Mullan, P. B. y Lax, A. J. (1996). *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. Infect.Immun. 64, 959-965.

Muller, H. E. y Krasemann, C. (1974). [The virulence of *Pasteurella multocida* strains and their neuraminidase production (author's transl)]. Zentralbl.Bakteriol.[Orig.A] 229, 391-400.

Muniandy, N., Edgar, J., Woolcock, J. B., y Mukkur, T. K. S. (1992). Virulence, purification, structure, and protective potential of the putative capsular polysaccharide of *Pasteurella multocida* type 6:B. Pasteurellosis in Production Animals 43, 47-54.

Munson, R. S., Jr. y Granoff, D. M. (1985). Purification and partial characterization of outer membrane proteins P5 and P6 from *Haemophilus influenzae* type b. Infect.Immun. 49, 544-549.

Murty, D. K. y Kaushik, R. K. (1965). Studies on a outbreak of acute swine pasteurellosis due to *Pasteurella multocida* Type B (Carter, 1955). Vet.Rec. 77, 411-416.

Mutters, R., Bisgaard, M., y Pohl, S. (1986). Taxonomic relationship of selected biogroups of *Pasteurella haemolytica* as revealed by DNA:DNA hybridizations. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.[B] 94, 195-202.

Mutters, R., Ihm, P, Pohl, W, Frederiksen, W., y Mannheim, W (1985a). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis, Pasteurella canis, Pasteurlella stomatis, Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. Int.J.Syst.Bacteriol. 35, 309-322.

Mutters, R., Piechulla, K., Hinz, K. H., y Mannheim, W (1985b). *Pasteurella avium* (Hinz and Kunjara 1977) comb. nov. and *Pasteurella volantium* sp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol 35, 5-9.

Nagai, S., Someno, S., y Yagihashi, T. (1994). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. J.Clin.Microbiol. 32, 1004-1010.

Nakai, T., Sawata, A., y Kume, K. (1985). Intracellular locations of dermonecrotic toxins in *Pasteurella multocida* and in *Bordetella bronchiseptica*. Am.J.Vet.Res. 46, 870-874.

Nakai, T., Sawata, A., Tsuji, M., y Kume, K. (1984). Characterization of dermonecrotic toxin produced by serotype D strains of *Pasteurella multocida*. Am.J.Vet.Res. 45, 2410-2413.

Namioka, S y Bruner, D. W. (1963). Serological studies on *Pasteurella multocida*. IV. Type distribution of the organisms on the basis of their capsule and O groups. Cornell Vet. 53, 41-53.

Namioka, S y Murata, M (1961a). Serological studies on *Pasteurella multocida*. I. A simplified method for capsule typing of the organism. Cornell Vet. 51, 498-521.

Namioka, S y Murata, M (1961b). Serological studies on *Pasteurella multocida*. III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals. Cornell Vet. 51, 522-528.

Neumann, R., Mehlhorn, G., Buchholz, I., Johannsen, U., y Schimmel, D. (1987a). [Experimental studies on the effect of chronic aerogenous toxic gas burden of suckling pigs with different ammonia concentrations. II. The reaction of cellular and humoral infection defense mechanisms of NH3-exposed suckling pigs under the conditions of an experimental *Pasteurella multocida* infection with and without thermomotor stress]. Zentralbl.Veterinarmed.B 34, 241-253.

Neumann, R., Mehlhorn, G., Leonhardt, W., Kastner, P., Willig, R., Schimmel, D., y Johannsen, U. (1987b). [Experimental studies on the effect of chronic aerogenous toxic gas stress in suckling pigs using different concentrations of ammonia. I. Clinical picture of NH3-exposed suckling pigs under the conditions of experimental *Pasteurella multocida* infection with and without thermomotor stress]. Zentralbl.Veterinarmed.B 34, 183-196.

Newsome, I. E. y Croos, F. (1932). Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. JAVMA 80, 711-719.

Nielsen, J. P., Bisgaard, M., y Pedersen, K. B. (1986). Production of toxin in strains previously classified as *Pasteurella multocida*. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.[B] 94, 203-204.

Nielsen, J. P. y Rosdahl, V. T. (1990). Development and epidemiological applications of a bacteriophage typing system for typing *Pasteurella multocida*. J.Clin.Microbiol. 28, 103-107.

O'Neill, E., Moloney, A., y Hickey, M. (2005). *Pasteurella multocida* meningitis: case report and review of the literature. J.Infect. 50, 344-345.

O'Riordan, K. y Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin.Microbiol.Rev. 17, 218-234.

Ogunnariwo, J. A., Alcantara, J., y Schryvers, A. B. (1991). Evidence for non-siderophore-mediated acquisition of transferrin-bound iron by *Pasteurella multocida*. Microb.Pathog. 11, 47-56.

Ogunnariwo, J. A. y Schryvers, A. B. (2001). Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. J.Bacteriol. 183, 890-896.

OIE (2004). Cólera aviar (Pasteurelosis aviar). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Parte 2. Título 2.7. Capítulo 2. 7. 11.

OIE (2005). Septicemia hemorrágica. Código Sanitario para los Animales Terrestres Parte 2. Título 2.3. Capítulo 2.3.12.

OIE (2007). Rinitis atrófica del cerdo. Código Sanitario para los Animales Terrestres Parte 2. Título 2.6. Capítulo 2.6.1.

Olsen, I., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., y Busse, H. J. (2005). Family I. Pasteurellaceae Pohl 1981b, 382 VP. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology.D.J.Brenner, N.R.Krieg, J.T.Staley and G.M.Garrity (eds.).Michigan State University.East Lausing, USA. 2, 851-856.

Olson, L. D. y Bond, R. E. (1968). Survival of *Pasteurella multocida* in soil, water, carcasses, and in the mouths of various birds and mammals. Proc.Annu.Meet.U.S.Anim Health Assoc. 72, 244-246.

Olson, L. D. y Wilson, M. A. (2001). DNA fingerprint patterns of *Pasteurella multocida* from the same turkey farm on the same and different years. Avian Dis. 45, 807-812.

Palzer, A., Ritzmann, M., Wolf, G., y Heinritzi, K. (2008). Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. Vet.Rec. 162, 267-271.

Pandit, K. K. y Smith, J. E. (1993). Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. Res.Vet.Sci. 54, 20-24.

Pasteur, L. (1880). Sur les maladies virulents et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera del poules. Comp.Rend.Acad.Sci 90, 239, 952, 1030.

Pavri, K. M. y Apte, W. H. (1967). Isolation of *Pasteurella multocida* from a fatal disease of horses and donkeys in India. Vet.Rec. 80, 437-439.

Pearson, W. R. (1994). Using the FASTA program to search protein and DNA sequence databases. Methods Mol.Biol. 24, 307-331.

Pedersen, K., Dietz, H. H., Jorgensen, J. C., Christensen, T. K., Bregnballe, T., y Andersen, T. H. (2003). *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. J.Wildl.Dis. 39, 808-816.

Pedersen, K. B. y Barfod, K. (1981). The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord.Vet.Med. 33, 513-522.

Penn, C. W. y Nagy, L. K. (1974). Capsular and somatic antigens of *Pasteurella multocida*, types B and E. Res.Vet.Sci. 16, 251-259.

Pennings, A. M. y Storm, P. K. (1984). A test in vero cell monolayers for toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs suspected of having atrophic rhinitis. Vet.Microbiol. 9, 503-508.

Perea, J. A. (2005). Rinitis atrófica progresiva. Rinitis atrófica no progresiva. Pasteurelosis neumónica. Enfermedades infecciosas. Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba. 1-12. www.uco.es/dptos/sanidad-animal/Enf_Infecciosas.rtf

Petersen, K. D., Christensen, H., Bisgaard, M., y Olsen, J. E. (2001). Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. Microbiology 147, 2739-2748.

Petersen, K. D., Christensen, J. P., y Bisgaard, M. (1998). Phenotypic and genotypic diversity of organisms previously classified as maltose positive *Pasteurella multocida*. Zentralbl.Bakteriol. 288, 1-12.

Petersen, S. K. (1990). The complete nucleotide sequence of the *Pasteurella multocida* toxin gene and evidence for a transcriptional repressor, *TxaR*. Mol.Microbiol. 4, 821-830.

Petersen, S. K. y Foged, N. T. (1989). Cloning and expression of the *Pasteurella multocida* toxin gene, *toxA*, in *Escherichia coli*. Infect.Immun. 57, 3907-3913.

Petersen, S. K., Foged, N. T., Bording, A., Nielsen, J. P., Riemann, H. K., y Frandsen, P. L. (1991). Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. Infect.Immun. 59, 1387-1393.

Pijoan, C. (2006). Pneumonic Pasteurellosis. In Diseases of Swine, 9 th edition. B.Straw, J.J.Zimmerman, S.Dállaire, y D.J.Taylor (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 719-726.

Pijoan, C., Campos, M., y Ochoa, G. (1980). Effect of a hog cholera vaccine strain on the bactericidal activity of porcine alveolar macrophages. Rev.Latinoam.Microbiol. 22, 69-71.

Pijoan, C. y Fuentes, M. (1987). Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine. J.Am.Vet.Med.Assoc. 191, 823-826.

Pijoan, C. y Fuentes, M. (1986). Desarrollo de un modelo de neumonía en cerdos utilizando un virus de *Pseudorrabia* y *P. multocida*. Tumbles: Med , Swine in Biomedical Research 491-498.

Pijoan, C., Lastra, A., Ramirez, C., y Leman, A. D. (1984). Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. J.Am.Vet.Med.Assoc. 185, 522-523.

Pijoan, C., Morrison, R. B., y Hilley, H. D. (1983). Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. J.Clin.Microbiol. 17, 1074-1076.

Pijoan, C. y Ochoa, G. (1978). Interaction between a hog cholera vaccine strain and *Pasteurella multocida* in the production of porcine pneumonia. J.Comp Pathol. 88, 167-170.

Pijoan, C. y Trigo, F. (1990). Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. Can.J.Vet.Res. 54 Suppl, S16-S21.

Pillai, A. G. R., Katiyar, A. K., Awadhidya, R. P., y Vegad, J. L. (1986). An outbreak of pasteurellosis in swine. Indian Veterinary Journal 63, 527-529.

Pohl, S (1981). DNA relatedness among members of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. M.Kilian, W.Frederiksen and E.L.Biberstein (eds.). Academic Press, London, United Kingdom. 245-253.

Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F. D., y Locht, C. (2000). *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. Infect.Immun. 68, 1919-1927.

Price, J. I. y Brand, C. J. (1984). Persistence of *Pasteurella multocida* in Nebraska wetlands under epizootic conditions. J.Wildl.Dis. 20, 90-94.

Pruimboom, I. M., Rimler, R. B., Ackermann, M. R., y Brogden, K. A. (1996). Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. Avian Dis. 40, 887-893.

Pullinger, G. D., Bevir, T., y Lax, A. J. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. Mol.Microbiol. 51, 255-269.

Pullinger, G. D., Sowdhamini, R., y Lax, A. J. (2001). Localization of functional domains of the mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. Infect.Immun. 69, 7839-7850.

Quinn, P. J, Carter, M. E, Markey, B., y Carter, G. R (1999). *Pasteurella* species. In Clinical Veterinary Microbiology.P.J.Quinn, M.E.Carter, B.Markey and G.R.Carter (eds.).Mosby, Edimburg, Scotland. 254-258.

Raemdonck, D. L., Tanner, A. C., Tolling, S. T., y Michener, S. L. (1994). Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Salmonella choleraesuis* isolates from pigs. Vet.Rec. 134, 5-7.

Raffi, F., Barrier, J., Baron, D., Drugeon, H. B., Nicolas, F., y Courtieu, A. L. (1987). *Pasteurella multocida* bacteremia: report of thirteen cases over twelve years and review of the literature. Scand.J.Infect.Dis. 19, 385-393.

Ramis, G., Pallarés, F. J., Quereda, J. J., Herrero, J. M., y Muñoz Luna, A. (2009). La evolución del Complejo Respiratorio Porcino. Mundo Ganadero 215, 50-54.

Ratledge, C. y Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu.Rev.Microbiol. 54, 881-941.

Rebers, P. A., Jensen, A. E., y Laird, G. A. (1988). Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. Avian Dis. 32, 313-318.

Register, K. B. y Dejong, K. D. (2006). Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. Vet.Microbiol.

Ren, Z., Jin, H., Morton, D. J., y Stull, T. L. (1998). *hgpB*, a gene encoding a second *Haemophilus influenzae* hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding protein. Infect.Immun. 66, 4733-4741.

Rhoades, K. R. y Rimler, R. B. (1990b). Somatic serotypes of *Pasteurella multocida* strains isolated from avian hosts (1976-1988). Avian Dis. 34, 193-195.

Rhoades, K. R. y Rimler, R. B. (1990c). Virulence and toxigenicity of capsular serogroup D *Pasteurella multocida* strains isolated from avian hosts. Avian Dis. 34, 384-388.

Rhoades, K. R. y Rimler, R. B. (1987). Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. Avian Dis. 31, 895-898.

Rhoades, K. R. y Rimler, R. B. (1992). Serological characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from wild ruminants as capsular serogroup B. Vet.Rec. 130, 331-332.

Rhoades, K. R. y Rimler, R. B. (1990a). *Pasteurella multocida* colonization and invasion in experimentally exposed turkey poults. Avian Dis. 34, 381-383.

Rhoades, K. R. y Rimler, R. B. (1993). *Pasteurella multocida* virulence factors: selection of fowl cholera-inducing and non-inducing strains. Avian Dis. 37, 1071-1073.

Rhoades, K. R., Rimler, R. B., y Bagley, R. A. (1992). Fowl cholera epornitic: antigenic characterization and virulence of selected *Pasteurella multocida* isolates. Avian Dis. 36, 84-87.

Ribeiro, G. A., Carter, G. R., Frederiksen, W., y Riet-Correa, F. (1989). *Pasteurella haemolytica*-like bacterium from a progressive granuloma of cattle in Brazil. J.Clin.Microbiol. 27, 1401-1402.

Rideau, P., Coudert, P., Mercier, P., y Hervouet, P. (1992). A comparative study of the virulence of *Pasteurella multocida* from rabbits (*O. cuniculus).* Fifth World Rabbit Congress.Corvallis, USA: C, 1389-1400.

Rimler, R. B. (2000). Restriction endonuclease analysis using *Hhal* and *Hpall* to discriminate among group B *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia. J.Med.Microbiol. 49, 81-87.

Rimler, R. B. (1978). Coagglutination test for identification of *Pasteurella multocida* associated with hemorrhagic septicemia. J.Clin.Microbiol. 8, 214-218.

Rimler, R. B. (1987). Cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*: passive immunization of turkeys against fowl cholera caused by different serotypes. Avian Dis. 31, 884-887.

Rimler, R. B. (1994). Partial purification of cross-protection factor(s) from *Pasteurella multocida*. Avian Dis. 38, 778-789.

Rimler, R. B. (1996). Passive immune cross-protection in mice produced by rabbit antisera against different serotypes of *Pasteurella multocida*. J.Comp Pathol. 114, 347-360.

Rimler, R. B. y Brogden, K. A. (1986). *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. Am.J.Vet.Res. 47, 730-737.

Rimler, R. B. y Glisson, J. R. (1997). Fowl cholera. In Diseases of Poultry.W.Calnek, H.J.Barnes, C.W.Beard, L.R.McDougald and Y.M.Saif (eds.) .Ames, Iowa State University Press. 143-159.

Rimler, R. B., Register, K. B., Magyar, T., y Ackermann, M. R. (1995). Influence of chondroitinase on indirect hemagglutination titers and phagocytosis of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F. Vet.Microbiol. 47, 287-294.

Rimler, R. B. y Rhoades, K. R. (1989b). Solubilization of membrane-associated cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*. Avian Dis. 33, 258-263.

Rimler, R. B. y Rhoades, K. R. (1987). Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J.Clin.Microbiol. 25, 615-618.

Rimler, R. B. y Rhoades, K. R. (1989a). *Pasteurella multocida*. In Pasteurella and Pasteurellosis.C.Adlan and J.M.Rutter (eds.).Academic Press Inc, California, USA 35-75.

Rimler, R. B. y Wilson, M. A. (1994). Re-examination of *Pasteurella multocida* serotypes that caused haemorrhagic septicaemia in North America. Vet.Rec. 134, 256.

Rodríguez-Ferri, E. F., Gutiérrez- Martínez, C.B., Navas J., De la Puente, V., Del Río, M. I., García del Blanco, N, Monter, J. L., Gutiérrez, B. y Blanco, M. (2002). Neumonía por *Pasteurella multocida*. Información Veterinaria. Mayo/Junio. 35-39

Roberts, R. S. (1947). An immunological study of *Pasteurella septica*. J.Comp.Pathol 57, 261-278.

Roche, R. J. y Moxon, E. R. (1995). Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. Trends Microbiol. 3, 304-309.

Rollof, J., Johansson, P. J., y Holst, E. (1992). Severe *Pasteurella multocida* infections in pregnant women. Scand.J.Infect.Dis. 24, 453-456.

Rosen, M. N. (1975). Pasteurellosis (*P. multocida*). In Diseases Transmitted from animals to Man.W.T.Hubbert, W.F.McCulloch, P.R.Schnurrenberger (eds.).Springfield, Illinois. 6th edition, 129-138.

Rosenau, A., Labigne, A., Escande, F., Courcoux, P., y Philippon, A. (1991). Plasmid-mediated ROB-1 beta-lactamase in *Pasteurella multocida* from a human specimen. Antimicrob.Agents Chemother. 35, 2419-2422.

Rosenbusch, C. T. y Merchant, I. A. (1939). A Study of the Hemorrhagic Septicemia *Pasteurellae*. J.Bacteriol. 37, 69-89.

Rosner, H., Grimmecke, H. D., Knirel, Y. A., y Shashkov, A. S. (1992). Hyaluronic acid and a (1----4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. Carbohydr.Res. 223, 329-333.

Ross, R. F. (2006). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. Anim Health Res.Rev. 7, 13-29.

Ross, R. F. (1999). Mycoplasma Diseases. In Diseases of Swine.B.Straw, S.Dállaire, W.Mengeling andD.Taylor (eds.).Ames, Iowa University Press. 495-510.

Roy, S., Das, A. B., y Biswas, T. (1994). Antigenicity and antigenic relatedness of the outer membrane proteins of *Shigella* species. Microbios 79, 55-64.

Rozengurt, E., Higgins, T., Chanter, N., Lax, A. J., y Staddon, J. M. (1990). *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 87, 123-127.

Rubies, X. Epidemiología de Pasteurella multocida en una estructura piramidal porcina. (1996). Tesis doctoral.

Rubies, X., Casal, J., y Pijoan, C. (2002). Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid. Vet.Microbiol. 84, 69-78.

Ruffolo, C. G. y Adler, B. (1996). Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. Infect.Immun. 64, 3161-3167.

Ruffolo, C. G., Tennent, J. M., Michalski, W. P., y Adler, B. (1997). Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. Infect.Immun. 65, 339-343.

Runnels, L. J. (1982). Infectious atrophic rhinitis of swine. Vet.Clin.North Am.Large.Anim Pract. 4, 301-319.

Rutter, J. M. (1981). Quantitative observations on *Bordetella bronchiseptica* infection in atrophic rhinitis of pigs. Vet.Rec. 108, 451-454.

Rutter, J. M. (1985). Atrophic rhinitis in swine. Adv.Vet.Sci.Comp Med. 29, 239-279.

Rutter, J. M. y Luther, P. D. (1984). Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. Vet.Rec. 114, 393-396.

Rutter, J. M. y Mackenzie, A. (1984). Pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs: a new perspective. Vet.Rec. 114, 89-90.

Rutter, J. M. y Rojas, X. (1982). Atrophic rinitis in gnotobiotics piglets ; differences in the pathogenicity of *P. multocida* in combined infections with *B. bronchiséptica*. Vet.Record 110, 531-535.

Sakano, T., Okada, M., Taneda, A., Ono, M., y Sato, S. (1992a). Experimental atrophic rhinitis in 2 and 4 month old pigs infected sequentially with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 31, 197-206.

Sakano, T., Taneda, A., Okada, M., Ono, M., Hayashi, Y., y Sato, S. (1992b). Toxigenic type A *Pasteurella multocida* as a causative agent of nasal turbinate atrophy in swine. J.Vet.Med.Sci. 54, 403-407.

Salmon, S. A., Watts, J. L., Case, C. A., Hoffman, L. J., Wegener, H. C., y Yancey, R. J., Jr. (1995). Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. J.Clin.Microbiol. 33, 2435-2444.

Samuel, M. D., Botzler, R. G., y Wobeser, G. (2006). Avian cholera. In Infectious Diseases of Wild Birds.N.J.Thomas, B.J.Hunter and C.T.Atkinson (eds.).Ames, Iowa, Blackwell Publishing. 239-269.

Samuel, M. D., Goldberg, D. R., Shadduck, D. J., Price, J. I., y Cooch, E. G. (1997). *Pasteurella multocida* serotype 1 isolated from a lesser snow goose: evidence of a carrier state. J.Wildl.Dis. 33, 332-335.

Samuel, M. D., Shadduck, D. J., Goldberg, D. R., y Johnson, W. P. (2003). Comparison of methods to detect *Pasteurella multocida* in carrier waterfowl. J.Wildl.Dis. 39, 125-135.

Sanchez, S., Mizan, S., Quist, C., Schroder, P., Juneau, M., Dawe, D., Ritchie, B., y Lee, M. D. (2004). Serological response to *Pasteurella multocida* NanH sialidase in persistently colonized rabbits. Clin.Diagn.Lab Immunol. 11, 825-834.

Sato, Y. y Sato, H. (1999). Development of acellular pertussis vaccines. Biologicals 27, 61-69.

Saxena, M. K., Kumar, A. A., Chaudhari, P., Shivachandra, S. B., Singh, V. P., y Sharma, B. (2005). Ribotyping of Indian isolates of *Pasteurella multocida* based on 16S and 23S rRNA genes. Vet.Res.Commun. 29, 527-535.

Scharmann, W., Drzeniek, R., y Blobel, H. (1970). Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. Infect.Immun. 1, 319-320.

Schimmel, D. y Erler, W. (1991). [The significance of the dermonecrotic toxin of *P. multocida* serovar D in the pathogenesis of pneumonia in swine]. Zentralbl.Veterinarmed.B 38, 382-384.

Schimmel, D. y Sachse, K. (1993). Classification of *Pasteurella* field strains isolated from farms in Germany using traditional methods and DNA-DNA hybridization. Zentralbl.Bakteriol. 279, 125-130.

Schlater, L. K., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Moss, C. W., Lambert, M. A., y Packer, R. A. (1989). *Pasteurella caballi*, a new species from equine clinical specimens. J.Clin.Microbiol. 27, 2169-2174.

Selander, R. K. y Musser, J. M. (1990). Population genetics of bacterial pathogenesis. In Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis.B.H.Iglewski and V.L.Clark (eds.).Academic Press, San Diego, California. 11-36.

Shigidi, M. T. y Mustafa, A. A. (1979). Biochemical and serological studies on *Pasteurella multocida* isolated from cattle in the Sudan. Cornell Vet. 69, 77-84.

Shin, E. K., Seo, Y. S., Han, J. H., y Hahn, T. W. (2007). Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. J.Vet.Sci. 8, 65-73.

Shivachandra, S. B., Kumar, A. A., y Chaudhuri, P. (2007). Molecular characterization of Avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup-A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR. Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.

Shivachandra, S. B., Kumar, A. A., Gautam, R., Joseph, S., Saxena, M. K., Chaudhuri, P., y Srivastava, S. K. (2006). Characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* by restriction endonuclease and amplified fragment length polymorphism. Res.Vet.Sci. 81, 8-18.

Shivachandra, S. B., Kumar, A. A., Gautam, R., Singh, V. P., Saxena, M. K., y Srivastava, S. K. (2005). Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. Vet.J.

Skerman, V. B. D, McGowan, V., y Sneath, P. H. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. Int.J.Syst.Bacteriol 30, 225-420.

Smith, G. R. y Philips, J. E. (1990). *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In Topley and Wilson´s.Principles of Bacteriology, Virology and Immunology. M.T.Parker y B.I.Duerden (eds.). B.C.Decker Inc.Usa. 2, 383-399.

Sneath, P. H. (1992). Correction of orthography of epithets in *Pasteurella* and some problems with recommendations on latinization. Int.J.Syst.Bacteriol. 42, 658-659.

Sneath, P. H. y Stevens, M. (1990). *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol. 40, 148-153.

Snipes, K. P. y Biberstein, E. L. (1982). *Pasteurella testudinis* sp. nov.: a parasite of desert tortoises (*Gopherus agassizi*). Int.J.Syst.Bacteriol 32, 201-210.

Snipes, K. P., Carpenter, T. E., Corn, J. L., Kasten, R. W., Hirsh, D. C., Hird, D. W., y McCapes, R. H. (1988a). *Pasteurella multocida* in wild mammals and birds in California: prevalence and virulence for turkeys. Avian Dis. 32, 9-15.

Snipes, K. P., Ghazikhanian, G. Y., y Hirsh, D. C. (1987). Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. Avian Dis. 31, 254-259.

Snipes, K. P., Hansen, L. M., y Hirsh, D. C. (1988b). Plasma- and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. Am.J.Vet.Res. 49, 1336-1338.

Snipes, K. P. y Hirsh, D. C. (1986). Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. Avian Dis. 30, 500-504.

Snipes, K. P., Hirsh, D. C., Kasten, R. W., Carpenter, T. E., Hird, D. W., y McCapes, R. H. (1990). Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-88. Avian Dis. 34, 315-320.

Snipes, K. P., Hirsh, D. C., Kasten, R. W., Hansen, L. M., Hird, D. W., Carpenter, T. E., y McCapes, R. H. (1989). Use of an rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. J.Clin.Microbiol. 27, 1847-1853.

Sorensen, V., Jorsal, S. E. y Mousing, J. (2006). Diseases of the Respiratory System. In Diseases of Swine 9 th edition. B.Straw, J.J.Zimmerman, S.Dállaire, y D.J.Taylor (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 149-178.

Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Curr.Opin.Microbiol. 2, 312-316.

Stark, K. D. (2000). Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine--a literature review. Vet.J. 159, 37-56.

Stephens, C. P., Gibson, J. A., y Richardson, L. (1995). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolates from cases of pneumonia in slaughter swine from south-east Queensland. Aust.Vet.J. 72, 156.

Sterner-Kock, A., Lanske, B., Uberschar, S., y Atkinson, M. J. (1995). Effects of the *Pasteurella multocida* toxin on osteoblastic cells in vitro. Vet.Pathol. 32, 274-279.

Straw, B. E. (1986). Slaughter check methodology. Animal Association of Swine Practitioner 35-40.

Strom, M. S. y Lory, S. (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Annu.Rev.Microbiol. 47, 565-596.

Svoboda, K. H., Pohl, S., y Mannheim, W. (1981). [Investigations on the phylogeny of *Pasteurella multocida*: DNA base sequence relatedness among strains representing Carter's serogroups A through E, and elimination of biovar 6 (so-called dog-type strains) (author's transl)]. Zentralbl.Bakteriol.A 248, 494-501.

Switzer, W. P. (1956). Studies on infectious atrophic rhinitis. V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. Am.J.Vet.Res. 17, 478-484.

Switzer, W. P. y Farrington, D. O. (1975). Infectious atrophic rhinitis. In Diseases of Swine. H.W.Dunne y A.D.Leman (eds.). Iowa University Press, Ames, Usa. 687-711.

Tatum, F. M. y Briggs, R. E. (2005). Construction of in-frame *aroA* deletion mutants of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Haemophilus* somnus by using a new temperature-sensitive plasmid. Appl.Environ.Microbiol. 71, 7196-7202.

Tellez.S. (2003). Estudio de la frecuencia de detección y caracterización de aislados de *Salmonella* spp. obtenidos de resptiles y anfibios. Tesis.

Tennent, J. M. y Mattick, J. S. (1994). Type 4 fimbriae. Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines 127-146.

Thacker, B. (1997). Anaporc 170, 44-72.

Thacker, E. y Thanawongnuwech, R. (2002). Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Thai J.Vet.Med. 32, 125-134.

Thacker, E. L., Thacker, B. J., y Janke, B. H. (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. J.Clin.Microbiol. 39, 2525-2530.

Thomson, C. M., Chanter, N., y Wathes, C. M. (1992). Survival of toxigenic *Pasteurella multocida* in aerosols and aqueous liquids. Appl.Environ.Microbiol. 58, 932-936.

Thurston, J. R., Rimler, R. B., Ackermann, M. R., y Cheville, N. F. (1992). Use of rats to compare atrophic rhinitis vaccines for protection against effects of heat-labile protein toxin produced by *Pasteurella multocida* serogroup D. Vet.Immunol.Immunopathol. 33, 155-162.

To, H., Someno, S., y Nagai, S. (2005). Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. Am.J.Vet.Res. 66, 113-118.

Topley, W. W. C y Wilson, G. S. (1929). The Principles of Bacterology and Immunity.Edward Arnold & Co.London. 488.

Torremorell, M. y Pijoan, C. (1998). Prolonged persistence of an epidemic *Streptococcus suis* strain in a closed pig population. Vet.Rec. 143, 394-395.

Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., y Adler, B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J.Clin.Microbiol. 39, 924-929.

Townsend, K. M. y Dawkins, H. J. (1993). Field alternation gel electrophoresis--status quo. J.Chromatogr. 618, 223-249.

Townsend, K. M., Dawkins, H. J., y Papadimitriou, J. M. (1997b). REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. Res.Vet.Sci. 63, 151-155.

Townsend, K. M., Dawkins, H. J., y Papadimitriou, J. M. (1997a). Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alternation gel electrophoresis (FAGE). Vet.Microbiol. 57, 383-395.

Townsend, K. M., Frost, A. J., Lee, C. W., Papadimitriou, J. M., y Dawkins, H. J. (1998a). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J.Clin.Microbiol. 36, 1096-1100.

Townsend, K. M., Hanh, T. X., O'Boyle, D., Wilkie, I., Phan, T. T., Wijewardana, T. G., Trung, N. T., y Frost, A. J. (2000). PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. Vet.Microbiol. 72, 69-78.

Townsend, K. M., O'Boyle, D., Phan, T. T., Hanh, T. X., Wijewardana, T. G., Wilkie, I., Trung, N. T., y Frost, A. J. (1998b). Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. Vet.Microbiol. 63, 205-215.

Trevisan, V (1887). Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha constratta I'infezione rabbica. Rend.R.1st.Lomb.Sci.Let 20, 88-94.

Trüper, H. G. y De´Clari, L. (1998). Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". Int.J.Syst.Bacteriol 48, 615.

Truscott, W. M. y Hirsh, D. C. (1988). Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. Infect.Immun. 56, 1538-1544.

Tsuji, M. y Matsumoto, M. (1989). Pathogenesis of fowl cholera: influence of encapsulation on the fate of *Pasteurella multocida* after intravenous inoculation into turkeys. Avian Dis. 33, 238-247.

Varga, Z., Sellyei, B., y Magyar, T. (2007). Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary. Acta Vet.Hung. 55, 425-434.

Vasfi, Marandi M., Dubreuil, J. D., y Mittal, K. R. (1996). The 32 kDa major outer-membrane protein of *Pasteurella multocida* capsular serotype D. Microbiology 142 (Pt 1), 199-206.

Vasfi, Marandi M., Harel, J., y Mittal, K. R. (1997). Identification by monoclonal antibodies of serotype D strains of *Pasteurella multocida* representing various geographic origins and host species. J.Med.Microbiol. 46, 603-610.

Vasfi, Marandi M. y Mittal, K. R. (1997). Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against Pasteurella multocida. Infect.Immun. 65, 4502-4508.

Veken, J. W., Oudega, B., Luirink, J., y de Graaf, F. K. (1994). Binding of bovine transferrin by *Pasteurella multocida* serotype B:2,5, a strain which causes haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle. FEMS Microbiol.Lett. 115, 253-257.

Veken, J. W., Shah, N. H., Klaasen, P., Oudega, B., y de Graaf, F. K. (1996). Binding of host iron-binding proteins and expression of iron-regulated membrane proteins by different serotypes of *Pasteurella multocida* causing haemorrhagic septicaemia. Microb.Pathog. 21, 59-64.

Vela, A. I., Fernandez-Garayzabal, J. F., Vazquez, J. A., Latre, M. V., Blanco, M. M., Moreno, M. A., de La, Fuente L., Marco, J., Franco, C., Cepeda, A., Rodriguez Moure, A. A., Suarez, G., y Dominguez, L. (2001). Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates. Appl.Environ.Microbiol. 67, 5840-5843.

Vela, A. I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M. A., Borge, C., Perea, J. A., Dominguez, L., y Fernandez-Garayzabal, J. F. (2003). Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. J.Clin.Microbiol. 41, 2498-2502.

Vela, A. I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Liebana, P., Albendea, C., Alcala, B., Mendez, A., Dominguez, L., y Fernandez-Garayzabal, J. F. (2000). Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae*

isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. J.Clin.Microbiol. 38, 3791-3795.

Vena, M. M., Blanchard, B., Thomas, D., y Kobisch, M. (1991). Adherence of *Pasteurella multocida* isolated from pigs and relationship with capsular type and dermonecrotic toxin production. Ann.Rech.Vet. 22, 211-218.

Vera-Lizarazo, Y. A. (2008). Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de lesiones neumónicas porcinas. Tesis.

Vera-Lizarazo, Y. A., Ferri, E. F., de la Fuente, A. J., y Martin, C. B. (2006). Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pigs in Spain in 1987-1988 and 2003-2004. Am.J.Vet.Res. 67, 663-668.

Vera-Lizarazo, Y. A., Rodriguez Ferri, E. F., y Gutierrez Martin, C. B. (2008). Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. Res.Vet Sci 85, 453-456.

Verma, N. D. (1988). *Pasteurella multocida* B:2 in haemorrhagic septicaemia outbreak in pigs in India. Vet.Rec. 123, 63.

Verma, N. D. y Saxena, S. C. (1987). An outbreak of swine pasteurellosis on an organised farm of North-Eastern hills region. Indian J.Anim.Sci 57, 528-532.

Virag, G. Y., Barna, T., Fabian, K., y Frasang, K. (2008). Pheno- and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains recovered from healthy and diseased rabbits. Pathology and Hygiene 113-117.

Virji, M., Alexandrescu, C., Ferguson, D. J., Saunders, J. R., y Moxon, E. R. (1992). Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. Mol.Microbiol. 6, 1271-1279.

Virji, M., Saunders, J. R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D., y Ferguson, D. J. (1993). Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. Mol.Microbiol. 10, 1013-1028.

Voets, M. T. (1982). Genetic factors influencing atrophic rhinitis in the pig. Proc.Int.Pig Vet.Soc.Congr.México City. 244.

Von Altrock A. (1998). [Occurrence of bacterial infectious agents in pathologically/anatomically altered lungs of pigs and compilation of resistance spectra]. Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr. 111, 164-172.

Wandersman, C. y Stojiljkovic, I. (2000). Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. Curr.Opin.Microbiol. 3, 215-220.

Ward, C. L., Wood, J. L., Houghton, S. B., Mumford, J. A., y Chanter, N. (1998a). *Actinobacillus* and *Pasteurella* species isolated from horses with lower airway disease. Vet.Rec. 143, 277-279.

Ward, P. N., Miles, A. J., Sumner, I. G., Thomas, L. H., y Lax, A. J. (1998b). Activity of the mitogenic *Pasteurella multocida* toxin requires an essential C-terminal residue. Infect.Immun. 66, 5636-5642.

Watson, P. J. y Davies, R. L. (2002). Outbreak of *Pasteurella multocida* septicaemia in neonatal lambs. Vet.Rec. 151, 420-422.

Weber, A., Wachowitz, R., Singer, H., y Heil-Franke, G. (1993). [The detection of *Pasteurella multocida* toxin using a commercially available ELISA]. Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr. 106, 328-330.

Weber, D. J., Wolfson, J. S., Swartz, M. N., y Hooper, D. C. (1984). *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 63, 133-154.

Westling, K., Farra, A., Cars, B., Ekblom, A. G., Sandstedt, K., Settergren, B., Wretlind, B., y Jorup, C. (2006). Cat bite wound infections: a prospective clinical and microbiological study at three emergency wards in Stockholm, Sweden. J.Infect. 53, 403-407.

White, D. G., Wilson, R. A., Gabriel, A. S., Saco, M., y Whittam, T. S. (1990). Genetic relationships among strains of avian *Escherichia coli* associated with swollen-head syndrome. Infect.Immun. 58, 3613-3620.

White, D. J., Jolley, W. L., Purdy, C. W., y Straus, D. C. (1995). Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 strain associated with bovine pneumonia. Infect.Immun. 63, 1703-1709.

Wickremasuriya, U. G. y Kenderagama, K. W (1982). A case report of haemorrhagic septicaemia in a wild elephant. Sri Lanka Vet. J., 30, 24.

Wijewanta, E. A. y Karunaratne, K. G. (1968). Studies on the occurrence of *Pasteurella multocida* in the nasopharynx of healthy cattle. Cornell Vet. 58, 462-465.

Wilson, M. A., Duncan, R. M., Nordholm, G. E., y Berlowski, B. M. (1995). *Pasteurella multocida* isolated from wild birds of North America: a serotype and DNA fingerprint study of isolates from 1978 to 1993. Avian Dis. 39, 587-593.

Wilson, M. A., Morgan, M. J., y Barger, G. E. (1993). Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates. J.Clin.Microbiol. 31, 255-259.

Wilson, M. A., Rimler, R. B., y Hoffman, L. J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. J.Clin.Microbiol. 30, 1518-1524.

Wobeser, G. (1992). Avian cholera and waterfowl biology. J.Wildl.Dis. 28, 674-682.

Woo, Y. K. y Kim, J. H. (2006). Fowl cholera outbreak in domestic poultry and epidemiological properties of *Pasteurella multocida* isolate. J.Microbiol. 44, 344-353.

Yamamoto, J., Sakano, T., y Shimizu, M. (1990). Drug resistance and R plasmids in *Pasteurella multocida* isolates from swine. Microbiol.Immunol. 34, 715-721.

Zhang, H., Niesel, D. W., Peterson, J. W., y Klimpel, G. R. (1998). Lipoprotein release by bacteria: potential factor in bacterial pathogenesis. Infect.Immun. 66, 5196-5201.

Zhao, G., Pijoan, C., Choi, K., Maheswaran, S. K., y Trigo, E. (1995). Expression of iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. Can.J.Vet.Res. 59, 46-50.

Zhao, G., Pijoan, C., y Murtaugh, M. P. (1993). Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. Can.J.Vet.Res. 57, 136-138.

Zhao, G., Pijoan, C., Murtaugh, M. P., y Molitor, T. W. (1992). Use of restriction endonuclease analysis and ribotyping to study epidemiology of *Pasteurella multocida* in closed swine herds. Infect.Immun. 60, 1401-1405.

Zielinski, G. C. y Ross, R. F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am.J.Vet.Res. 54, 1262-1269.