

IDENTIFICACION DE CEPAS DE *Gallibacterium anatis* AISLADAS EN EL PERU

Y. Koga¹, A.I. Zavaleta², K.L. Jiménez², K. Villacorta¹

¹Bioservice SRL, Lima 35, PERU, ²Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Marcos, Lima - PERU

Jr. Puno 1002 - Lima 1, Perú.
 E mail : ykogay@hotmail.com
 amparoi@terra.com.pe
 karimlizeth@gmail.com
 Telephone: 0051-1- 3284737- Anexo 34

RESUMEN

Se investigó la aplicación de un método molecular para la diferenciación de cepas de *Gallibacterium anatis* y *Pasteurella multocida* involucradas en brotes de síndromes respiratorios y septicémicos en granjas aviares. Se obtuvieron 20 aislados de hisopados traqueales, muestras de hígados y de pulmones para estudios genotípicos. Fenotípicamente, los aislados mostraron diferentes características; sin embargo, las técnicas basadas en DNA usando análisis de restricción de DNA 16S ribosomal (ARDRA) mostraron 2 patrones diferentes de DNA correspondiendo a 4 y 16 cepas de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* respectivamente. Los resultados se compararon con patrones de DNA de las cepas de colección. La presente investigación reveló la presencia de *Gallibacterium anatis* y *Pasteurella multocida* en las muestras clínicas de las aves comerciales.

INTRODUCCION

Gallibacterium fue recientemente establecido como un nuevo género dentro de la familia Pasteurellaceae. Las bacterias pertenecientes a este género había sido previamente reportada como *Pasteurella anatis*, organismos aviares semejantes a *Pasteurella haemolytica* o *Actinobacillus salpingiditis*. El potencial patogénico reportado para *Gallibacterium* es altamente variable. Estos organismos han sido aislados de aves clínicamente sanas, en las cuales se los ha considerado como parte de la flora del tracto respiratorio y de la parte baja del tracto genital. Sin embargo, otros han aislado *Gallibacterium* en cultivos puros de aves enfermas afectadas con salpingitis, ooforitis, peritonitis, septicemia, pericarditis, hepatitis y lesiones del tracto respiratorio alto, indicando que, al menos algunas cepas de *Gallibacterium* poseen un potencial patogénico.

METODOS

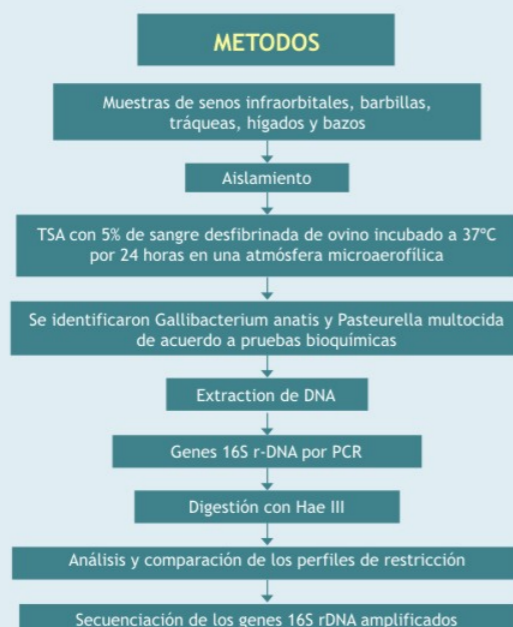


Fig. 1. Aves con signos clínicos compatibles con Síndrome Respiratorio y Septicémico.



Fig. 2. Fuerte β-hemolisis y crecimiento de la colonia bacteriana.

Tabla 1. Identificación y origen de las cepas

CEPAS	ORIGEN	TIPO DE COLONIA
Bios 101	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 102	Tráquea	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 103	Hígado	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 104	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 105	Hígado	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 106	Tráquea	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 107	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 108	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 109	Bazo	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 110	Barbillas	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 111	Bazo	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 112	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 113	Tráquea	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 114	Hisopado nasal	Parduzca, seca, no hemolítica
Bios 115	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 116	Bazo	Parduzca, seca, no hemolítica
Bios 117	Tráquea	Parduzca, seca, no hemolítica
Bios 118	Hisopado nasal	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 119	Hígado	Lisa y brillante, parduzca, β hemolítica
Bios 120	Hisopado nasal	Parduzca, seca, no hemolítica

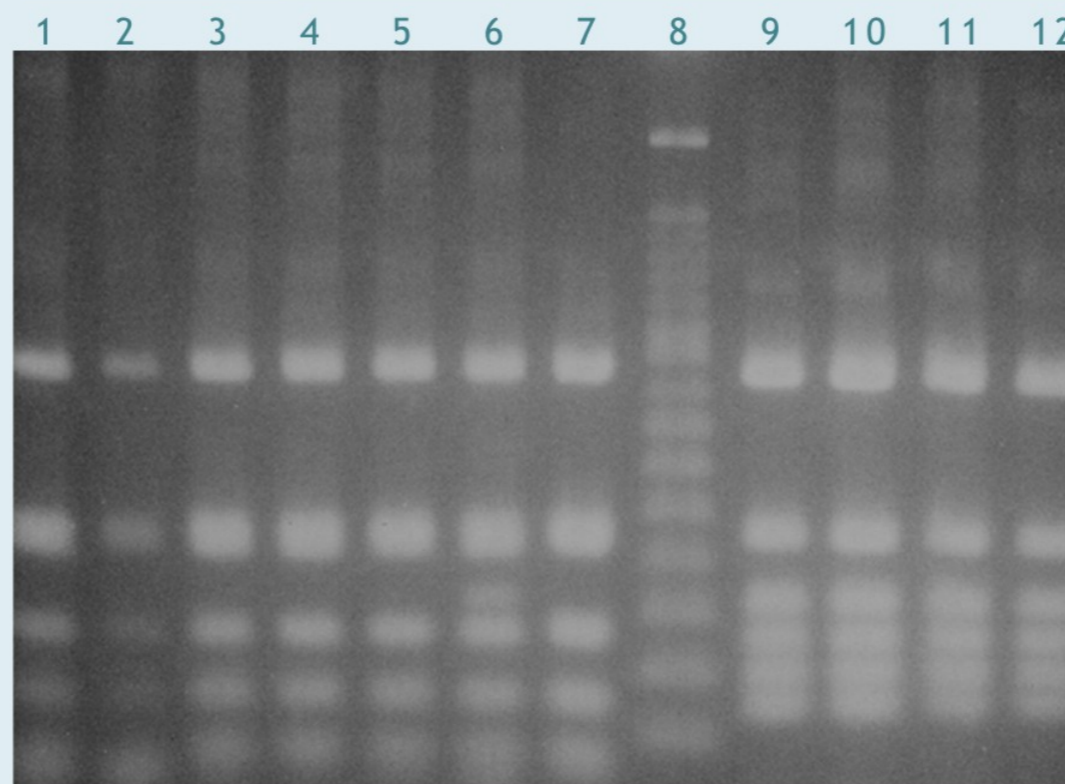


Fig.5. ARDRA de los 16 patrones genéticos rDNA 16S, obtenidos con HaeIII. Línea 1, BIOS101; 2, Bios103; 3, BIOS106; 4, BIOS107; 5, BIOS110; 6, BIOS111; 7, cepa 542 de *Gallibacterium anatis*; 8, Marcador de Peso Molecular 50 kb; 9, cepa 1166 de *Pasteurella multocida*; 10, BIOS114; 11, BIOS116; 12, BIOS117.

RESULTADOS

De todas las cepas aisladas, se identificaron 4 cepas de *Pasteurella multocida* y 16 de *Gallibacterium anatis* de acuerdo a sus características morfológicas. Todas los aislados presuntivos de *Gallibacterium anatis* recuperados de las placas de cultivo fueron sometidos a más caracterizaciones fenotípicas mostrando ser gram negativos, no móviles, de forma redondeada o pleomórfica que aparecían solos o en pareja, las colonias eran mayormente β hemolíticas, grisáceas, no transparentes pero eventualmente traslúcidas en la periferia, con una consistencia butírica, suaves y brillantes, circulares con un margen entero y de 1.0 a 2.0 mm de diámetro luego de 24 horas a 37° C, microaerofílicas, catalasa y oxidasa negativos. La técnica empleada del análisis de restricción del DNA ribosomal 16S mostró 2 patrones de DNA diferentes correspondiendo a 4 y 16 cepas de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* respectivamente.

DISCUSIÓN

Gallibacterium spp. creció rápidamente en las placas de agar sangre de ovino y fueron fácilmente identificables por su zona β hemolítica característica dentro de las 24 horas de incubación, de ahí su alto valor predictivo positivo. Aún más, muchas de las muestras positivas mostraron una muy alta proporción de colonias hemolíticas de *Gallibacterium* entre el número total de colonias, indicando que si *Gallibacterium* estaba presente, entonces el método del cultivo bacteriano tenía probabilidades de detectarlo. Se debe investigar si *Gallibacterium anatis* está poco implicado en enfermedades o si es porque no es bien detectado. Las lesiones macroscópicas del síndrome respiratorio y septicémico, una manifestación típica de infección por *Gallibacterium anatis* no puede ser fácilmente distinguida de un amplio rango de patógenos gram negativos, especialmente *P. multocida*, que es el patógeno más prevalente en este tipo de enfermedad. Los patrones de bandas del ARDRA de los aislados fueron claramente diferentes para *Gallibacterium anatis* y *Pasteurella multocida*.

CONCLUSIONES

La digestión con la endonucleasa de restricción Hae III del rDNA 16S amplificado puede ser usada para diferenciar entre *Gallibacterium anatis* y *Pasteurella multocida*. La simplicidad y la aplicabilidad general del ARDRA hace posible que esta técnica sea implementada en muchos laboratorios con equipo básico de biología molecular.